



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES POLIFENÓLICOS DESDE MACROALGAS *MACROCYSTIS PYRIFERA* Y *ULVA RIGIDA*.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

VERÓNICA ANGÉLICA CONSUEGRA VALENZUELA

PROFESOR GUÍA

MARIA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

JUAN ASENJO DE LEUZE

SANTIAGO DE CHILE

2014

Resumen

Las algas se utilizan desde tiempos inmemoriales para consumo humano y extracción de subproductos. Entre los más conocidos estas los ficocoloidales como el alginato, agar y carragenano, de gran valor en la industria alimenticia. Actualmente, existe interés por la utilización de biomasa algal en la producción de biocombustibles, lo cual abre una potencial explotación de otros subproductos de algas, creando procesos sustentables y amigables medioambientalmente. Dadas las condiciones naturales extremas en que se desarrollan estos organismos, uno de los compuestos de mayor interés que producen son los antioxidantes, moléculas bioactivas de distinta naturaleza, ya sea carbohidratos, lípidos, terpenoides y compuestos polifenólicos.

En el marco del proyecto de cooperación CONICYT-Chile AKA-Finlandia (AKA ERNC-009) para la producción de biocombustibles de tercera generación, se plantea la obtención de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante como subproducto, afectando mínimamente la degradación de los azúcares disponibles en las algas, para su utilización en biocombustible

El presente trabajo consistente en la determinación de las mejores condiciones de extracción de compuestos antioxidantes polifenólicos desde macroalgas verdes (*Ulva rigida*) y pardas (*Macrocystis pyrifera*), evaluando diferentes variables: solvente, tiempo de extracción, temperatura de extracción y relación sólido – líquido. Para ello se empleó un diseño experimental estadístico basado en el método Taguchi. Para este diseño se realizó un extenso análisis de la literatura existente en torno al tema y selección de los métodos de evaluación de actividad antioxidante, condiciones y metodología de extracción. Se cuantificó los compuestos fenólicos totales por método de Folin-Ciocalteu, capacidad antioxidante por reducción del radical DPPH y las azúcares reductores por método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Los resultados obtenidos se analizaron por métodos estadísticos, utilizando Análisis de Componentes Principales para determinar los factores que aportan mayor variabilidad a la actividad antioxidantes durante el proceso extractivo.

Como principales resultados fue que se seleccionó el alga *M. pyrifera* como fuente de antioxidantes polifenólicos. Se logró determinar una metodología que permite extraer una cantidad de polifenoles totales de $374,4 \pm 27,4$ [mg GAE/100gPS], actividad de 84,9 % de captura del radical DPPH y ausencia de azúcares reductores en el extracto bioactivo. Las mejores condiciones de extracción determinadas corresponden a utilizar como solvente etanol al 75%, una relación sólido-líquido de 1:10 p/v, temperatura de extracción de 37°C por 180 minutos, siendo el tiempo de extracción el factor con mayor efecto en el tratamiento de extracción determinado por el Análisis de Componentes Principales. El método desarrollado sirve como primera aproximación al potencial del alga parda como fuente de antioxidantes industriales y siendo un punto de partida en un proceso de optimización.

Estos resultados representan un rendimiento másico de los polifenoles extraídos de un 0,4%. Considerando los niveles de producción actual de *M.pyrifera* en la X región del país se lograría una producción de alrededor de 2 ton/año de antioxidantes polifenólicos desde el alga, representando un 0,015% del mercado global de polifenoles al año 2011. Este valor podría ser promisorio si se piensa en las posibilidades de aumentar el cultivo de estas algas en la región.

A mi familia

Agradecimientos

A todos quienes hicieron posible el desarrollo de la presente memoria,

Muy especialmente a mi familia quienes me han apoyado durante toda los años de estudio con todo su amor y comprensión. Esta memoria se las dedico a ustedes: papá, mamá y especialmente a mi pequeñita quien es la motivación para trabajar cada día. Besitos Lauri.

A Joaquín, por tu compañía, amor y comprensión, que junto a nuestra chiquita hemos formado una linda familia.

A los profesores miembros de la comisión, especialmente a la profesora guía María Elena Lienqueo por la orientación y disposición durante todo el desarrollo de la memoria y la profesora Oriana Salazar por su orientación durante la corrección y los años de estudio de la carrera

A los miembros del CIByB quienes fueron de gran apoyo durante la ejecución del trabajo de laboratorio y especialmente a Allison Leyton y Nancy Carrasco quienes me orientaron en todo lo concerniente al trabajo técnico.

A los profesores Mario Edding de la Universidad Católica del Norte y Alejandro Buschmann de la Universidad de Los Lagos quienes donaron las algas para el desarrollo de este proyecto.

Al proyecto CONICYT-AKA (AKA ERNC-009) y a la Dirección de Investigación de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, por el aporte financiero al desarrollo de la presente memoria.

Tabla de Contenido

1.	Introducción	1
1.1.	Motivación	1
1.1.1.	Uso comercial de algas.....	1
1.1.2.	Aditivos naturales en la industria.....	2
1.2.	Antecedentes generales.....	3
1.2.1.	Macroalgas	3
1.2.2.	Concepto de biorefinería en algas	5
1.2.3.	Compuestos bioactivos	6
1.2.3.1.	Compuestos con actividad antioxidante	6
1.2.3.1.1	Compuestos polifenólicos en algas pardas y verdes.....	7
1.2.4.	Métodos de extracción, caracterización y purificación de antioxidantes.....	10
1.2.4.1.	Determinación de la actividad antioxidante	11
1.3.	Antecedentes del trabajo.....	12
1.4.	Objetivos	13
2.	Materiales y métodos	14
2.1.	Materiales	14
2.2.	Métodos	15
2.2.1.	Metodología de extracción	15
2.2.2.	Cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante	17
2.2.3.	Medición de azúcares reductores	19
2.2.4.	Extracción de antioxidantes por método control	19
2.2.5.	Análisis Estadístico	19
3.	Resultados y Discusión	20
3.1.	Actividad antioxidante en <i>Macrocystis pyrifera</i>	20
3.2.	Actividad antioxidante en <i>Ulva rigida</i>	23
3.3.	Análisis de componentes principales (ACP)	26
3.3.1.	Análisis Componentes Principales en <i>Macrocystis pyrifera</i>	26
3.3.2.	Análisis Componentes Principales en <i>Ulva rigida</i>	29
3.4.	Efecto del solvente.....	30
3.4.1.	Efecto del solvente sobre la extracción en <i>Macrocystis pyrifera</i>	30
3.4.2.	Efecto del solvente sobre la extracción en <i>Ulva rigida</i>	31

3.5.	Efecto de la temperatura	32
3.5.1.	Efecto de la temperatura en <i>Macrocystis pyrifera</i>	32
3.5.2.	Efecto de la temperatura en <i>Ulva rigida</i>	32
3.6.	Efecto de la relación sólido-líquido	33
3.6.1.	Efecto de la relación sólido-líquido en <i>Macrocystis pyrifera</i>	33
3.6.2.	Efecto de la relación sólido-líquido en <i>Ulva rigida</i>	33
3.7.	Efecto del tiempo de extracción	33
3.7.1.	Efecto del tiempo de extracción en <i>Macrocystis pyrifera</i>	33
3.7.2.	Efecto del tiempo de extracción en <i>Ulva rigida</i>	34
3.8.	Otros efectos.....	34
3.8.1.	Tamaño de partícula.....	34
3.8.2.	Condiciones de secado	35
3.8.3.	Variaciones estacionales y ambientales de las algas.	35
3.8.4.	Moléculas interferentes en los test	36
3.8.5.	Diseño experimental	36
3.9.	Mejores condiciones	37
3.10.	Aspectos económicos de la extracción de antioxidantes en <i>Macrocystis pyrifera</i>	39
4.	Recomendaciones	42
4.1.	Condiciones de extracción	42
	Tamaño de partículas.....	42
	Precipitación de moléculas interferentes	42
	Prevenir la oxidación durante la extracción.....	42
	Agregar etapa de filtración.....	42
4.2.	Uso de test adicionales	43
	Uso de cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)	43
4.3.	Utilización de mejoras en la recuperación.....	43
5.	Conclusiones.....	45
6.	Bibliografía	47
7.	Anexos.....	52
	Anexo N°1.....	52
	Exportaciones de algas chilenas.....	52
	Anexo N°2.....	53

<i>Macrocystis pyrifera</i>	53
<i>Ulva rigida</i>	54
Anexo N°3.....	56
Anexo 4.....	57
Preparación reactivo DNS	57
Anexo 5.....	58
Cálculo participación en el mercado mundial de polifenoles	58

Índice de Figuras

Figura 1. Pirámide de producción de subproductos de algas.....	1
Figura 2. Ejemplo de biorefinería basada en biomasa de algas	5
Figura 3. Estructuras de florotaninos derivados de algas marinas	9
Figura 4. Diagrama del proceso de extracción sólido-líquido de antioxidantes	16
Figura 5. Exportaciones algas chilenas 2009,2010	52
Figura 6. <i>Macrocystis pyrifera</i> en su ambiente natural.....	53
Figura 7. <i>Ulva rigida</i> sobre roca.....	55
Figura 8. Análisis proximal para <i>Ulva rigida</i> . Cosecha marzo 2013.....	55
Figura 9. Análisis proximal para <i>Macrocystis pyrifera</i> . Cosecha junio 2013.....	56
Figura 10. Número de publicaciones científicas relacionadas con antioxidantes naturales.....	56

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Gráfico de distribución de muestras PC1 vs PC2 en <i>M. pyrifera</i>	27
Gráfico 2. Gráfico de distribución de muestras PC1 vs PC3 en <i>M. pyrifera</i>	28
Gráfico 3. Correlación de variables para <i>M. pyrifera</i>	28
Gráfico 4. Gráfico de distribución de muestras PC1 vs PC2 en <i>U. rigida</i>	29
Gráfico 5. Correlación de variables para <i>U. rigida</i>	30

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación botánica simplificada de las macroalgas: reino, división, filo y ejemplos de géneros de algas.....	4
Tabla 2. Reactivos, estándares y solventes.....	14-15
Tabla 3. Diseño experimental de Taguchi, con las variables en estudio.	17
Tabla 4. Resultados <i>Macrocystis pyrifera</i>	21-22
Tabla 5. Resultados <i>Ulva rigida</i>	24-25
Tabla 6. Resultados mejores condiciones.....	38
Tabla 7. Enzimas utilizadas para extraer antioxidantes en algas.....	42-43
Tabla 8. Mejores condiciones de extracción <i>M.pyrifera</i> y <i>U.rigida</i>	44

Lista de Nomenclaturas

*OH	Radical hidroxil
ACP	Análisis de Componentes Principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPPH*	Radical α , α -Diphenilpicrilhidrazil
GAE	Ácido gálico equivalente
g PS	Gramos peso seco
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
MAAs	Aminoácidos tipo micospolina
ORAC	Oxygen radical antioxidant capacity
ROO*	Radical peroxilo
RO*	Radical alcoxilo
p/v	Relación peso/volumen
μ L	Microlitros
nm	Nanómetros
TE	Trolox equivalente
Trolox	(\pm)-6-hidroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid

1. Introducción

1.1. Motivación

1.1.1. Uso comercial de algas

En general las algas se cultivan o cosechan desde hace mucho tiempo para diferentes usos: alimento humano o animal, fertilizantes, cosméticos, etc. Su principal aplicación industrial se restringe a la extracción de ficocoidales (agar, carragenina y alginatos) utilizados como aditivos en alimentos [1]. Recientemente existe interés en las algas tanto para su utilización como biomasa en la generación de biocombustibles de tercera generación como para fuente potencial de compuestos bioactivos con aplicaciones farmacológicas, nutraceuticas, ingredientes funcionales en alimentos, etc. La Figura 1 muestra la pirámide de producción de los derivados de algas. Las operaciones comerciales actuales se enfocan desde la parte media a la punta de la pirámide, y donde la producción de energía a partir de algas puede ser competitiva con los combustibles fósiles en combinación con otros productos de mayor valor agregado o a gran escala. Para reforzar esta idea, algunos valores estimados de subproductos de algas son: \$1.600.000 pesos/ton para alginato, \$1.560.000 pesos/ton fucoidán (como detergente), \$800.000 pesos/ton manitol [2], siendo los productos con grado químico y como aditivos alimenticios los más cotizados para la coproducción con biocombustibles.

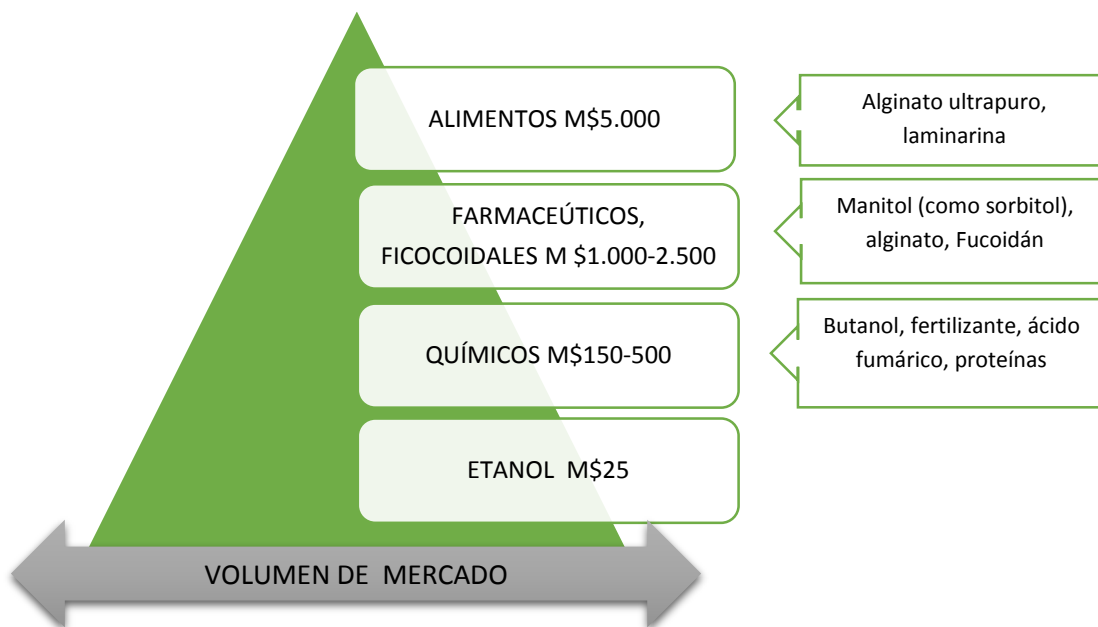


Figura 1. Pirámide de producción de subproductos de algas. Valor en pesos/tonelada de alga seca. M=mil. (Basado en [3]).

Chile posee grandes capacidades para la producción de productos de alto valor comercial a partir de biomasa de algas, las cuales crecen naturalmente a lo largo de toda la costa del país. La Tabla 1 en anexo N° 1 presenta el valor de las exportaciones chilenas durante 2009 y 2010, principalmente algas pardas y rojas secas y subproductos como agar y carragenina (un 60% del mercado mundial).

Las exportaciones totales del país en el sector corresponden al 10% del mercado mundial y en el año 2011 reportaron un flujo de 200 millones de dólares [4-5]. Dentro de estos productos existe un potencial desarrollo en el área de antioxidantes para uso farmacológico, como también en aditivos alimenticios, cuyo origen natural podría reemplazar los actuales aditivos sintéticos utilizados en la industria.

1.1.2. Aditivos naturales en la industria

Como ya se indicó las algas marinas son ricas en compuestos bioactivos, los cuales tienen un uso potencial como ingredientes funcionales en la alimentación humana y animal. Los compuestos bioactivos más extensamente estudiados corresponden a polisacáridos, florotaninos y diterpenos. Se ha reportado en ellos propiedades antivirales, antitumorales, anti diabetes, antioxidantes, antiinflamatorias entre otras [6]. Si a ello sumamos el interés actual por generar biocombustibles de tercera generación a partir de biomasa algal, el concepto de biorefinería de algas reúne el aprovechamiento energético y otros subproductos en un proceso sustentable, amigable medioambientalmente y hasta económicamente rentable. En este marco se pretende diseñar un proceso de extracción de compuestos bioactivos con actividad antioxidante minimizando la degradación de los polisacáridos presentes, los cuales pueden ser aprovechados para producir bioetanol mediante fermentación.

La composición bioquímica de las algas es diversa, teniendo gran contenido de polisacáridos, proteínas, lípidos, minerales, pigmentos. Esta composición varía entre una especie y otra incluso entre especímenes de la misma especie y época del año en que se coseche, por lo que son materia prima altamente adecuada para aprovechar en biorefinerías, obteniendo como producto alimentos, químicos y biocombustibles [7].

Por otro lado, los antimicrobiales sintéticos (como el benzoato de sodio, nitrito de sodio y ácido sórbico) y antioxidantes sintéticos (BHA (Butilhidroxianisol), BHT (Butilhidroxitolueno), TBHQ (Butilhidroquinona terciaria)) son ampliamente utilizados en la industria alimenticia desde 1940 para preservar alimentos. Sin embargo, estos antioxidantes sintéticos se han identificado y limitado su uso por ser tóxicos y exhibir efectos carcinogénicos [8]. Más aun, las demandas actuales de los consumidores por alimentos mínimamente procesados con preservantes naturales son crecientes. La identificación y extracción de antioxidantes naturales alternativos está ganando relevancia. En este contexto los extractos de algas han incrementado el número de investigaciones centradas en las propiedades promotoras de la salud, destacando investigaciones en que extractos que contienen antioxidantes polifenólicos naturales han sido utilizados para aumentar la estabilidad oxidativa y mantener o mejorar la calidad intrínseca y el valor nutricional de los alimentos [8]. Es por esto que el presente estudio se orienta a la recuperación de estos productos.

1.2. Antecedentes generales

1.2.1. Macroalgas

Las algas son un tipo de organismo fotótrofo de medio acuático. Corresponden a un grupo polifilético, es decir un grupo de organismos que han seguido líneas evolutivas distintas, por lo cual abarca una serie de organismos con características disímiles entre sí [9]. A diferencia de las plantas, las algas no poseen mayor grado de diferenciación en tejidos como raíces, tallos u hojas; sus ciclos reproductivos son diferentes, pueden ser unicelulares o pluricelulares y su tamaño puede variar desde unos pocos micrómetros en las algas unicelulares, hasta más de 50 metros en macroalgas [10]. Hay miles de tipos de algas, y de éstos, hay entre 300 y 400 tipos que se utilizan comercialmente para la alimentación y otros propósitos. Todas las variedades requieren luz solar, por ello, en el mar, la mayoría se encuentra en la zona fótica o capa superficial, hasta 50 o 70 metros de profundidad, variando de acuerdo a la región. Es importante señalar que las algas que se utilizan comercialmente se cultivan y cosechan desde especímenes silvestres.

Existen 3 tipos de macroalgas, que se clasifican según el tipo de pigmentos que las conforman en: pardas, rojas o verdes. Cada tipo se describe brevemente a continuación:

Algas Pardas [11]: son casi exclusivamente marinas, ya que sólo se conocen unas pocas especies de agua dulce. Son muy abundantes en costas rocosas donde crecen en la zona litoral y sublitoral, especialmente en aguas frías agitadas y bien aireadas. Estas algas son importantes productores primarios, donde llegan a formar verdaderos bosques submarinos, los cuales constituyen un ambiente favorable para numerosos animales marinos. La combinación de pigmentos fotosintéticos les permite realizar la fotosíntesis a muy diferentes niveles en el océano, incluso a profundidades donde solo llegan las longitudes de onda más cortas (azul-verdosa) de la luz solar. Su pared celular contiene, además de celulosa, ácido algínico y sales sulfatadas. Estos compuestos dan resistencia y flexibilidad al alga, ya que forman geles en la matriz intercelular, ayudándoles a resistir las tensiones provocadas por las olas y las corrientes marinas. Además, intervienen en el intercambio iónico y ayudan a evitar la desecación del alga, especialmente cuando viven en la zona litoral, donde queda periódicamente expuesta al aire y a la luz solar. Estos compuestos son de gran interés económico y aplicación industrial, pudiendo llegar a poseer alginato en un 20-40% del peso seco del alga [12].

Algas rojas [13]: Las algas rojas son principalmente marinas con muy poca representación en el agua dulce y de dimensiones macroscópicas existiendo pocos casos de especies unicelulares. Los pigmentos de estas algas pueden ser distintos según las condiciones en las que viven pudiendo variar de color si estas condiciones cambian. Al igual que las algas pardas, pueden vivir en las profundidades marinas ya que posee los pigmentos rojos y de color azul violáceo, capaces de absorber la energía luminosa de las radiaciones verdes y azules y conseguir la fijación del carbono mediante la fotosíntesis. Estas algas aparte de ocupar el carbono para su uso en el proceso de la fotosíntesis, al igual que la mayoría de los vegetales, tienen un mecanismo adicional de la absorción de carbono de calcificación. El calcio es depositado en las paredes de las células de algas coralinas en forma de carbonato de calcio al igual que los corales. Contribuyen considerablemente a la mayor parte de carbonato de calcio que forma la estructura de los arrecifes de coral, su papel más importante en la mayoría de las zonas del arrecife, es actuar como cemento, lo que obliga a los materiales que forman los arrecifes generar una estructura sólida y robusta. La pared de estas algas

está compuesta por pequeñas cantidades de celulosa y cantidades mayoritarias de polímeros de galactosa sulfatados y mucílagos. Los poligalactanos sulfatados de la pared son extraídos por sus propiedades coloidales como agentes gelificantes, entre ellos se encuentran el agar, agarosa y carragenanos [14].

Algas verdes [15]: Son algas muy diversas en cuanto a su morfología y organización general y tienen gran plasticidad en su desarrollo y metabolismo, lo que las ha llevado a colonizar numerosos hábitats. Los pigmentos fotosintéticos que posee son las clorofilas a y b, β -caroteno y otros carotenoides. Almacenan almidón dentro del cloroplasto. Su pared celular está compuesta principalmente por celulosa, y en algunos casos presenta además otros polímeros o está calcificada. Estas algas viven en ambientes marinos costeros formando parte del nanoplancton o sujetas al fondo marino. También es posible encontrarlas abundantemente en aguas dulces, lagos y ríos. Las macroalgas verdes están compuestas de muchos polisacáridos, entre ellos destaca el ulvan. Ulvan está principalmente formado de secuencias de repeticiones de disacáridos compuestos de ramnosa sulfatada y ácido glucurónico, ácido idurónico o xilosa.

En la Tabla 1 se presenta una clasificación botánica simplificada de los tres filos de macroalgas. Para el presente estudio se utilizó un alga parda, *Macrocystis pyrifera*, y un alga verde, *Ulva rigida*, cuyos géneros se muestran en negrita en Tabla 1. Estas algas se describen en Anexo N°2 en cuanto a su distribución, ecología y principales compuestos de importancia económica o usos.

Tabla 1. Clasificación botánica simplificada de las macroalgas: reino, división, filo y ejemplos de géneros de algas. En negrita se destacan los géneros de las algas utilizadas en el presente estudio (basado en [16])

Reino	División	Filo	Nombre común	N°de especies	Ejemplos de géneros
Chromoalveolata	Heterokontophyta	Phaeophyta	Algas pardas	1.500-2.000	<i>Ascophyllum, Ecklonia, Eisenia, Fucus, Laminaria, Macrocystis, Saccharina, Sargassum, Undularia</i>
Archaeplastida		Rhodophyta	Algas rojas	4.000-10.000	<i>Chondrus, Gelidium, Gracilaria, Kappaphycus, Palmaria, Polysiphonia, Porphyra</i>
	Viridiplantae	Clorophyta	Algas verdes	7.000	<i>Caulerpa, Codium, Cladophora, Ulva.</i>
		Charophyta	Plantas vasculares		

1.2.2. Concepto de biorefinería en algas

Biorefinería es un procesamiento integrado de la biomasa en una variedad de productos finales. Pueden clasificarse por tipo de tratamientos en mecánicos (extracción, fraccionamiento y separación), conversiones termoquímicas, químicas, enzimáticas y fermentaciones microbianas (aeróbicas y anaeróbicas). Además, una biorefinería puede utilizar todo tipo de biomasa, desde cultivos especializados, madera, residuos orgánicos (derivados de plantas y animales, aguas residuales) y biomasa acuática (macroalgas, microalgas, quitina, etc.)[17-18]. Este tipo de industria produce un espectro de productos comerciales y energía. Esos productos pueden ser tanto intermediarios como productos finales e incluyen alimentos animales y humanos, químicos, materiales y energía (potencia, calor o combustible). El concepto de biorefinería reúne los ítems de sustentabilidad en todos sus aspectos: sociales, económicos y medioambientales [18-19].

En este sentido, las algas ofrecen una alta gama de subproductos potenciales debido a su variada composición química, alta cantidad de polisacáridos, proteínas, minerales y otros compuestos, pudiendo generar productos de alto valor comercial con múltiples aplicaciones industriales, además de energía. En la figura 4 se muestra un esquema de biorefinería de algas, con la obtención de diversos productos.

En la presente memoria se explotará este concepto utilizando como biomasa dos tipos de macroalgas y produciendo un primer producto que sería un antioxidante.

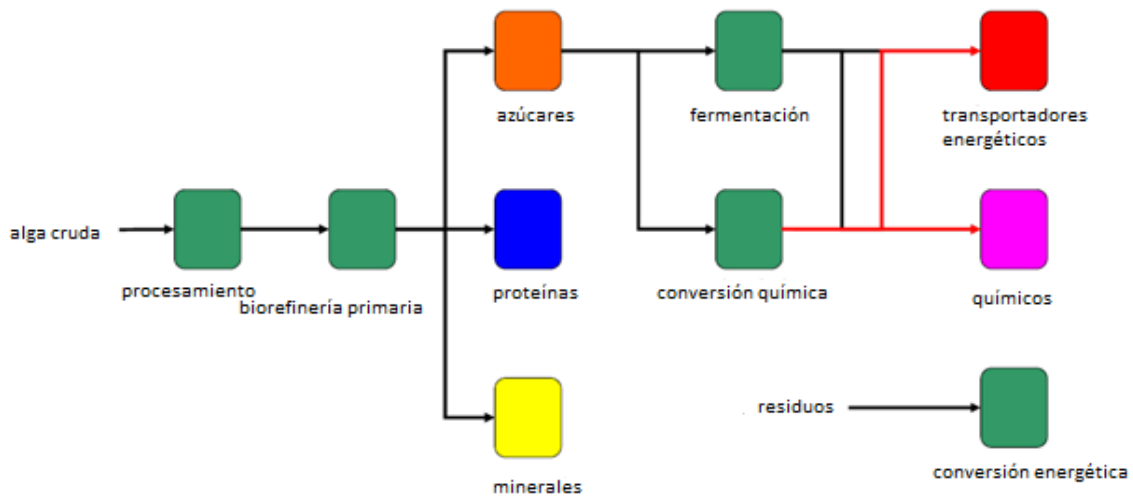


Figura 2. Ejemplo de biorefinería basada en biomasa de algas (basado en [20]).

1.2.3. Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos¹ son componentes químicos presentes en pequeñas cantidades originarios de diversas fuentes naturales que tienen una actividad biológica dentro del organismo (es decir influyen en la actividad celular y en los mecanismos fisiológicos), lo que se traduce en beneficios para la salud. Las condiciones ambientales a las que están expuestas las algas induce la producción de compuestos únicos que resisten el estrés oxidativo. Estos compuestos poseen actividades biológicas diversas entre las que se incluyen anticancerígenas, antiinflamatorias, protección a la radiación UV, antioxidantes, etc. Se han detectado además una gran variedad de compuestos bioactivos, entre los más importantes se encuentran polisacáridos, proteínas, ácidos grasos insaturados, compuestos polifenólicos, terpenos, pigmentos[21]. Los estudios muestran que existe una potente alternativa farmacológica y aplicación industrial de estos compuestos.[22,23]

1.2.3.1. Compuestos con actividad antioxidante

Los antioxidantes son sustancias, sintéticas o naturales, que protegen las células de los daños que causan los radicales libres² y que en pequeñas cantidades evitan o retrasan la oxidación de moléculas biológicas propensas a ello como son los lípidos, proteínas, ADN e hidratos de carbono[24]. Los radicales libres pueden ser en parte responsables de enfermedades del envejecimiento y neurodegenerativas. Entre los antioxidantes más conocidos están el betacaroteno, el licopeno, las vitaminas A, C y E, y otras sustancias naturales y manufacturadas. El mecanismo de acción y la eficacia de los antioxidantes dependen de sus características físicas y químicas y del sistema en el que actúan [24].

Existen diversos compuestos que se encuentran en forma natural en los alimentos y que presentan propiedades antioxidantes, protegiendo a los tejidos de procesos oxidativos a través de la dieta. Los principales antioxidantes naturales son los polifenoles, vitamina C, E y carotenoides [25]. Algunos de estos compuestos se utilizan como aditivos alimentarios, aunque debido a su inestabilidad, desde los años 40 se utilizan industrialmente antioxidantes sintéticos derivados de compuestos fenólicos como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y propilgalato (GP). Estos antioxidantes sintéticos actualmente son de uso restringido a ciertos alimentos, y en cantidades limitadas debido a los riesgos carcinogénicos que presentan [25,26].

Los antioxidantes pueden actuar a distintos niveles en el proceso oxidativo de los lípidos (peroxidación lipídica): a) evitando la formación de radicales o interaccionando con ellos; b) actuando como complejantes de iones metálicos como Fe (II) y Fe (III), lo que frena el efecto catalítico en la formación de lipoperóxidos; c) inhibiendo enzimas pro-oxidativas; d)

¹ Muchos organismos marinos y terrestres que incluyen bacterias, hongos, fitoplancton, algas, invertebrados y principalmente plantas son actualmente considerados como fuentes de sustancias bioactivas [21].

² Moléculas inestables generadas en el proceso de oxidación durante el metabolismo normal.

descomponiendo los peróxidos y otras especies reactivas del oxígeno (ROS, reactive oxygen species) y; e) interfiriendo reacciones en las que están implicados radicales peroxilo (ROO*) o alcoxilo (RO*)

La potencial toxicidad de los antioxidantes sintéticos ha dado lugar a que aumente el interés por estos compuestos de origen natural (ver figura 1 de Anexo 3) mostrando un alto número de publicaciones científicas relacionadas al tema durante la última década, a los que también se les atribuyen otras propiedades bioactivas como antivirales, antimicrobianos y antiinflamatorias. Uno de los grupos más representativos de antioxidantes naturales lo constituyen los compuestos fenólicos, al que pertenecen flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y lignanos [27-28-29]. Estos compuestos son metabolitos secundarios en plantas y algas, y se consideran responsables de la calidad sensorial y nutricional de frutas y verduras y alimentos derivados de los mismos, donde se encuentran ampliamente distribuidos.

Existe en la literatura gran información sobre los efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos en la salud, en particular para el caso de las algas los estudios de polifenoles de algas pardas presentan un extenso estudio [27-28-29]. Además del efecto antioxidante, los polifenoles presentan otros tipos de propiedades bioactivas como antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios, vasodilatadores, anticancerígenos y antisquémicos.

Los polifenoles previenen el daño de los componentes celulares producido por reacciones químicas en las que están implicados radicales libres. El oxígeno presente en el organismo en una importante fuente de radicales libres, como los radicales hidroxilo (*OH), hidroxiperoxilo, anión superóxido y peróxido de hidrogeno. Estas especies pueden interactuar con lípidos, enzimas y otras proteínas, y ácidos nucleicos, siendo la oxidación de ácidos grasos insaturados presentes en las membranas celulares el proceso oxidativo más frecuente en el organismo [24]. Los radicales libres de oxígeno formados durante el metabolismo pueden alcanzar niveles citotóxicos dañando las membranas de las células, provocando su ruptura, y a otros componentes celulares o extracelulares como enzimas, proteínas y lipoproteínas, colesterol y material genético del núcleo. Todo lo anterior puede dar lugar a procesos inflamatorios, arterioesclerosis, carcinogénesis y envejecimiento, entre otras enfermedades [29]

1.2.3.1.1 Compuestos polifenólicos en algas pardas y verdes

Los extractos de macroalgas son ricos en compuestos polifenólicos los cuales están bien documentados por sus propiedades antioxidantes [6]. Las macroalgas pardas han reportado poseer comparativamente mayor contenido de antioxidantes y también más activos que las verdes y rojas [6].

Los antioxidantes generalmente producidos por plantas incluyen compuestos polifenólicos como flavonoides, ácido cinámico, ácido benzoico, ácido gálico, florotaninos y quercetina. Los compuestos polifenólicos pueden actuar quebrando cadenas de reacción por donación de hidrógeno a los radicales libres y en consecuencia produciendo radicales antioxidantes relativamente no reactivos [12,19-22].

Los compuestos polifenólicos se refieren comúnmente a compuestos monoméricos, oligoméricos o poliméricos con un anillo aromático unido a uno o más sustituyentes hidroxil e incluye en este grupo fenoles simples, cumarinas, flavonoides, estilbenos, lignanos, taninos hidrolizables y condensados y florotaninos. Los compuestos fenólicos juegan un rol primario estructural como componente de la pared celular y pueden tener un rol secundario en señalización, defensa, o respuestas al estrés ambiental. Los florotaninos son producidos por el metabolismo secundario de las plantas en las algas pardas, ya sea por la vía acetato/malonato o por la del ácido shikímico [30], y no se encuentran en plantas terrestres. Corresponden a polímeros u oligómeros de floroglucinol conectado por enlaces aril-aril, enlaces éter, o ambos o con una unión a dibenzodioxina, siendo moléculas muy hidrofílicas (ver figura 3). Los florotaninos se distribuyen en un amplio rango de tamaños moleculares (400-400.000 Da) y pueden estar en concentraciones variables entre 0,5 y 20% del peso seco del alga [30]. Estos compuestos se presentan en compartimientos especializados de la pared llamados fisoides. Los flavonoides no se encuentran en algas pardas sin embargo se han descrito ácidos fenólicos y aldehídos. Los bromofenoles en algas marinas están asociados a la percepción del sabor y están presentes en algas rojas y verdes.

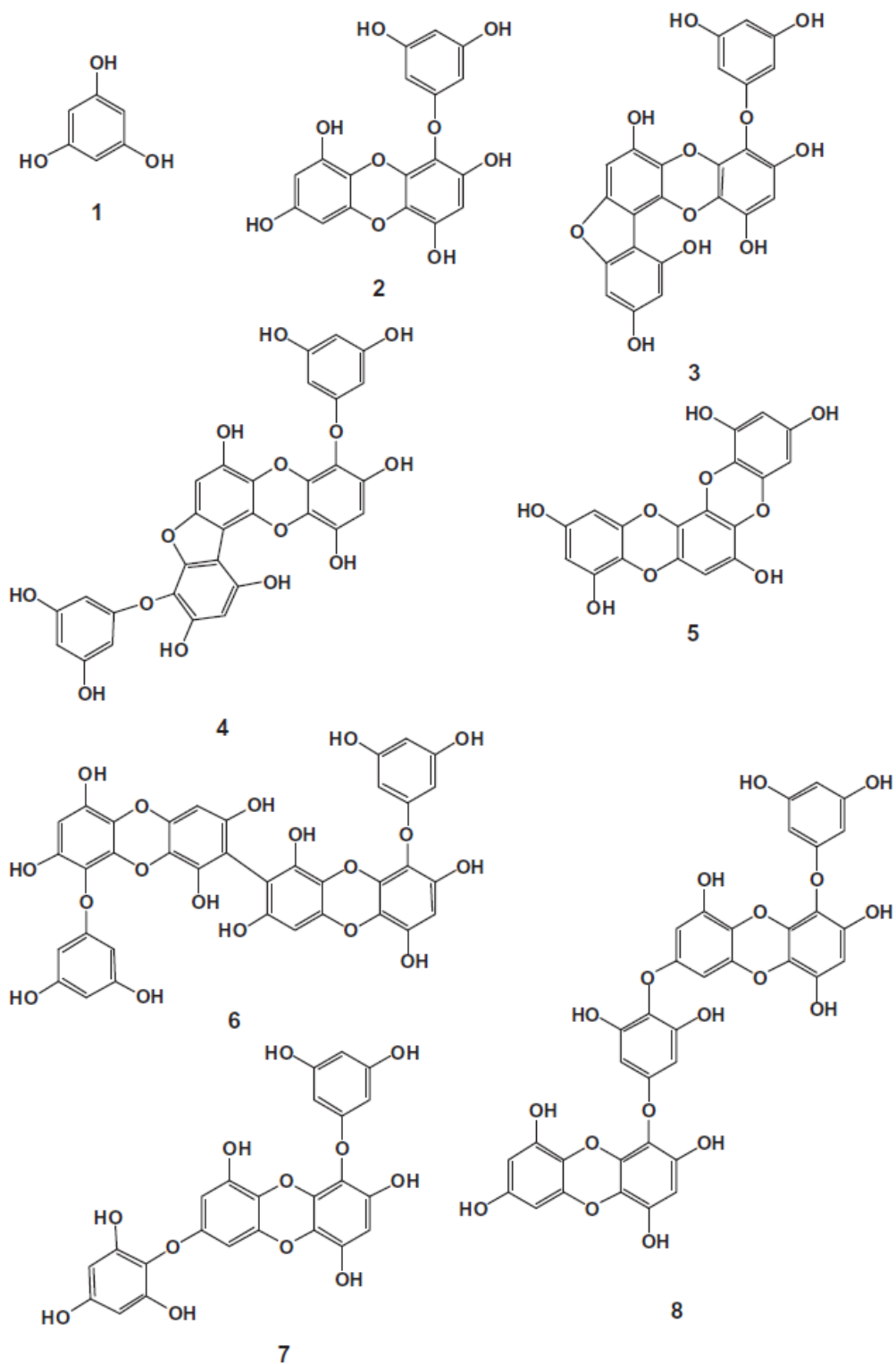


Figura 3. Estructuras de florotaninos derivados de algas marinas.(1) floroglucinol, (2)eckol, (3) fucofuroeckol-A,(4)florofucufurueckol-A,(5) dioxinodehidroeckol, (6)8,8 bieckol, (7) 7-floroeckol, (8)dieckol .Extraído de [30]

1.2.4. Métodos de extracción, caracterización y purificación de antioxidantes

El interés que existe por la relación entre los compuestos fenólicos y las propiedades organolépticas, antioxidantes y nutricionales de los alimentos, ha dado lugar al desarrollo de una gran variedad de métodos analíticos en los que se incluyen las correspondientes etapas de extracción, separación y cuantificación [31]. La extracción de estos compuestos de la matriz vegetal de la muestra en una etapa crítica, aunque no existe un método estándar para ello. Las técnicas más utilizadas corresponden a la extracción con solventes (orgánicos) y la extracción con fluidos supercríticos, aunque en ambos casos se produce la co-extracción de otros compuestos como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas, por lo que se necesitan procesos posteriores de purificación como por ejemplo extracción en fase sólida.

Extracción

La extracción con solventes corresponde a la técnica clásica de extracción y puede ser líquido-líquido, si la muestra está en estado líquido (ejemplo, vinos, aceites, jugos de frutas) o sólido-líquido, si la muestra está en estado sólido (como hojas, frutos, flores, tallos, algas). La eficacia de la extracción depende de las condiciones experimentales que pueden incluir el uso de calor y agitación en el proceso [31]. Los solventes más utilizados son metanol y etanol acidificados. Aunque el primero ha mostrado ser más eficaz [32], el etanol es más utilizado en la industria alimentaria para evitar la toxicidad del primero. Además se han utilizados otros disolventes como acetato de etilo, acetona, dietil-éter, n-hexano e isooctanos, entre otros [31-33]. Normalmente se utiliza una extracción secuencial, con una primera etapa de agua-disolvente orgánico para extraer los ácidos fenólicos solubles. Los ácidos fenólicos que están unidos a las células por enlaces glucocídicos o ésteres son necesario hidrolizarlos en medio ácido o básico [33]. Los mayores desafíos de la extracción convencional son los largos tiempos de extracción, costo de solventes con alto grado de pureza, evaporación de grandes cantidades de solvente, baja selectividad y descomposición de compuestos termolábiles [31-33]

Por otra parte, la extracción con fluidos supercríticos, en especial utilizando dióxido de carbono se ha descrito como alternativa al uso de solventes orgánicos [34-35], aunque en el caso de las extracciones de polifenoles es necesario la utilización de modificadores como metanol y etanol para aumentar la polaridad del medio. Otros mecanismos descritos incluyen ultrasonido [34] y extracción asistida por enzimas [34-36], los cuales son posibles de integrar a extracciones convencionales con solventes como con fluidos supercríticos, mejorando los rendimientos y disminuyendo tiempos de extracción, energía y cantidad de solventes.

Purificación y caracterización

La cromatografía líquida es la técnica más utilizada para la separación de compuestos fenólicos [6,21-24]. Típicamente se usa columnas de C18³ en fase reversa con un sistema binario de disolvente (fase móvil) que consiste en agua acidificada y un solvente orgánico polar. Es frecuente que sea

³ La columna C18 es la más utilizada para HPLC, consiste en gel de sílice modificada químicamente con un grupo funcional hidrófobo, en este caso ese grupo es una cadena recta de 18 carbonos.

necesaria la pre-concentración y purificación previa, especialmente en el caso de muestras con matriz vegetal compleja. Esta etapa puede realizarse con partición líquido-líquido con un disolvente inmisible o extracción en fase sólida. Para ello pueden usarse adsorbentes como C18, copolímeros de estireno-divinilbenceno o distintos tipos de resinas [24]. La fotometría es la técnica mayormente empleada como sistema de detección en estas separaciones cromatográficas, aunque la espectrometría de masas es la más apropiada para este fin [24]. La cromatografía de gases también se ha utilizado para la identificación de compuestos fenólicos. Sin embargo, esta metodología es compleja y requiere múltiples pasos previos como la liberación de los compuestos fenólicos de sus enlaces ésteres y glucocídicos antes de formar los compuestos volátiles [24]. Se ha descrito también la electroforesis capilar como técnica alternativa para la separación y determinación de compuestos fenólicos [24]

1.2.4.1. Determinación de la actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de un compuesto se puede medir tanto por test *in vitro* como *in vivo*. Los ensayos *in vitro* son los más utilizados, y en este sentido existen una amplia gama de ellos, los cuales se agrupan basados en sus mecanismos de acción. La capacidad antioxidante *in vitro* es útil para comparar el potencial de diferentes compuestos, pero no necesariamente predice el funcionamiento en sistemas vivos o alimentos. Estos métodos son, en general, más sencillos, rápidos y menos costosos económicamente que los métodos *in vivo* y permiten saber si los compuestos ensayados tienen o no la actividad buscada. Además, permiten obtener datos indicativos sobre la toxicidad celular de los distintos extractos, que pueden ser muy útiles a la hora del diseño de posteriores estudios.

En el presente estudio se abordará la actividad antioxidante basándose en la capacidad de captación de radicales libres que poseen los polifenoles, utilizando el radical DPPH*(α , α -Diphenilpicrilhidrazil). DPPH* es un radical libre estable ampliamente utilizado para evaluar antioxidantes naturales, algas o productos derivados de algas [6, 24,28-30] debido a su estabilidad, simplicidad y reproducibilidad. Extractos crudos de algas en agua o etanol y otros solventes mostraron capacidad antioxidante con este método, así como sus componentes purificados [28-30].

Existe una variedad de métodos fotométricos que permiten obtener una estimación aproximada del contenido total de polifenoles en una muestra, pero no dan información cuantitativa de los componentes individuales. El método más representativo de este grupo es el ensayo de Folin-Ciocalteu [6,28-29] que utiliza ácido gálico como polifenol estándar y se basa en el poder reductor de los polifenoles, sin embargo otras especies reductoras presentes en la muestra pueden contribuir a la medición alterando el valor obtenido. Para finalizar, se ha descrito en la literatura el uso de diversas técnicas tales como NMR, MS y NIR⁴ para la elucidación de estructuras y caracterización de compuestos fenólicos, aislados de la matriz vegetal pero sin una etapa de separación previa de

⁴ NMR: Resonancia magnética nuclear; MS: Espectroscopía de masas; NIR: Espectroscopía de infrarrojo cercano.

los compuestos individuales. En este sentido los polifenoles de algas pardas han sido ampliamente estudiados [22,28-31, 33,34].

1.3. Antecedentes del trabajo

Desde finales de los años 70 se han desarrollado diversos procesos para la obtención de extractos de algas, fundamentalmente pigmentos, basados en la extracción sólido-líquido con disolventes orgánicos, como por ejemplo, mezclas cloroformo: metanol o acetona[33]. Adicionalmente, algunas operaciones como la ultrafiltración se añaden al proceso para mejorar la selectividad del mismo. Otros estudios destinados a conseguir un adecuado fraccionamiento de compuestos de diversas polaridades emplean a su vez elevadas cantidades de disolventes orgánicos y complejas etapas posteriores de concentración [37].

Existen en la literatura muchos trabajos de investigación reciente acerca de compuestos bioactivos existentes en macroalgas verdes, pardas y rojas, así como los procesos de extracción de los mismos y metodologías de evaluación de bioactividad de los compuestos aislados y extractos crudos de algas [12,22-26]. La producción industrial de subproductos de algas tradicionalmente ha extraído ficocoidales dejando como residuo el resto de la materia orgánica. La producción en biorefinería de algas pretende aprovechar toda la biomasa en la obtención de productos comerciales y energía. Para ello es necesario definir los compuestos con potencial de extracción en las macroalgas y en especial énfasis en las especies seleccionadas para trabajar. Las macroalgas *Ulva rigida* y *Macrocystis pyrifera* son especies que crecen en el litoral de las costas Chilenas, y en especial *M. pyrifera* tiene importancia para producción de alginatos [4-5,38] y recientemente como alimento para cultivos de abalón [5,38]

Con respecto a las especies en estudio, existen pocos trabajos de extracción de antioxidantes en *M.pyrifera*, los cuales se reducen a la extracción de fucoídán (un polisacárido sulfatado). Sólo Kindleysides, 2012[27] presenta valores de actividad antioxidante de extractos polifenólicos en la especie. Este estudio cuantifica propiedades antioxidantes en aceite de pescado, de extractos lipídicos y acuosos de *M.pyrifera* originaria de Nueva Zelanda. Los tests de actividad mostraron un 92,3% de inhibición a la oxidación del radical DPPH y 461,84 [μmol TE/g extracto] en el ensayo ORAC, mayores al del antioxidante comercial BHT (62,4 % inhibición a DPPH*). El contenido fenólico medido según el ensayo Folin-Ciocalteu entregó valores de 7,5 [g PGE⁵/100 g extracto] en el extracto acuoso mientras que en el lipídico fue de 2(g PGE/100 g extracto). Para *Ulva rigida* existen estudios de composición y actividad de compuestos antioxidantes [1, 39-40]. Trigui et al, 2013[39] muestra un estudio de la variación de cantidad y actividad antioxidante e inhibición bacteriana para muestras de *U.rigida* recolectadas en las costas de Tunes durante 12 meses. Este estudio muestra capacidad de inhibición al radical DPPH entre 70 y 74% a finales de invierno (febrero) y comienzo de primavera (marzo) con un contenido fenólico máximo de 28 (mg PGE/ g extracto) en marzo. En los

⁵ PGE=floroglucinol equivalente

meses de otoño y verano el contenido fenólico bajó hasta 2(mg PGE/ g extracto) y la actividad a 40% de inhibición a DPPH*.

1.4. Objetivos

Objetivo general

- Diseñar un proceso de extracción de compuestos bioactivos con actividad antioxidante, específicamente polifenoles desde macroalgas *Ulva rígida* y *Macrocystis pyrifera* minimizando la degradación de los azúcares que éstas contienen.

Objetivos específicos

1. Seleccionar un alga que contenga altos contenidos de antioxidantes.
2. Determinar el conjunto de mejores condiciones de extracción de antioxidantes evaluando los parámetros solvente utilizado, temperatura y tiempo de extracción además de la relación sólido-líquido.
3. Determinar la presencia de azúcares en los extractos obtenidos bajo las condiciones previamente obtenidas.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Algas: ambas especies consideradas en el trabajo corresponden a donaciones de centros de cultivo especializado. *Ulva rígida* proviene de la bahía de la herradura de Guayacán, Coquimbo cosechada durante marzo de 2013, donada gentilmente por el Profesor Mario Edding de la Universidad Católica del Norte, sede Coquimbo, mientras que *Macrocystis pyrifera* corresponde a especies cosechadas 30 km al sudeste de Puerto Montt en la localidad de Metri en junio de 2013, donada gentilmente por el Profesor Alejandro Buschmann de la Universidad de Los Lagos, Puerto Montt.

Reactivos:

Todos los reactivos, estándares y solventes utilizados fueron de calidad analítica y se resumen en la Tabla 2. Para una correcta mantención los estándares DPPH y Trolox se mantuvieron a 4°C. Preparación de reactivo DNS según protocolo en anexo 4.

Tabla 2. Reactivos, estándares y solventes

Compuesto	Pureza	Marca
Ácido acético	100%	Merck
ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	98%	Sigma
Ácido gálico	97-102,5%	Sigma
Bicarbonato de sodio	100%	Sigma
DPPH* (α , α -Diphenilpicrilhidrazil)	100%	Sigma
Etanol	Absoluto	Merck
Fenol	100%	Merck
glucosa	100%	Merck
Hidróxido de sodio en pellet	98%	Sigma-Aldrich
Metanol	100% Analítico	Merck

Metabisulfito de sodio	>99%	Sigma-Aldrich
Na-K Tartrato	99%	Sigma-Aldrich
Reactivo folin	No visible	Merck
Trolox ((±)-6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid)	97%	Sigma-Aldrich

2.2. Métodos

2.2.1. Metodología de extracción

La metodología específica se basa en una búsqueda bibliográfica con lo que se obtuvo el proceso de extracción mostrados en el diagrama de la figura 4. La obtención de biomasa del alga no corresponde a un paso a realizarse en el presente trabajo, mientras que el secado de la biomasa se utilizó para determinar el grado de humedad de la muestra, dependiendo de las condiciones de la misma. Por otro lado, se evaluó la molienda del material previo a la extracción sólido-líquido. Esta etapa sólo se realizó en el alga *Macrocystis pyrifera* ya que el alga *Ulva rigida* fue proveída en forma de polvo fino. Durante la molienda se especificó el tamaño de partícula resultante variando desde polvo fino a partículas de 0,5 cm de diámetro.

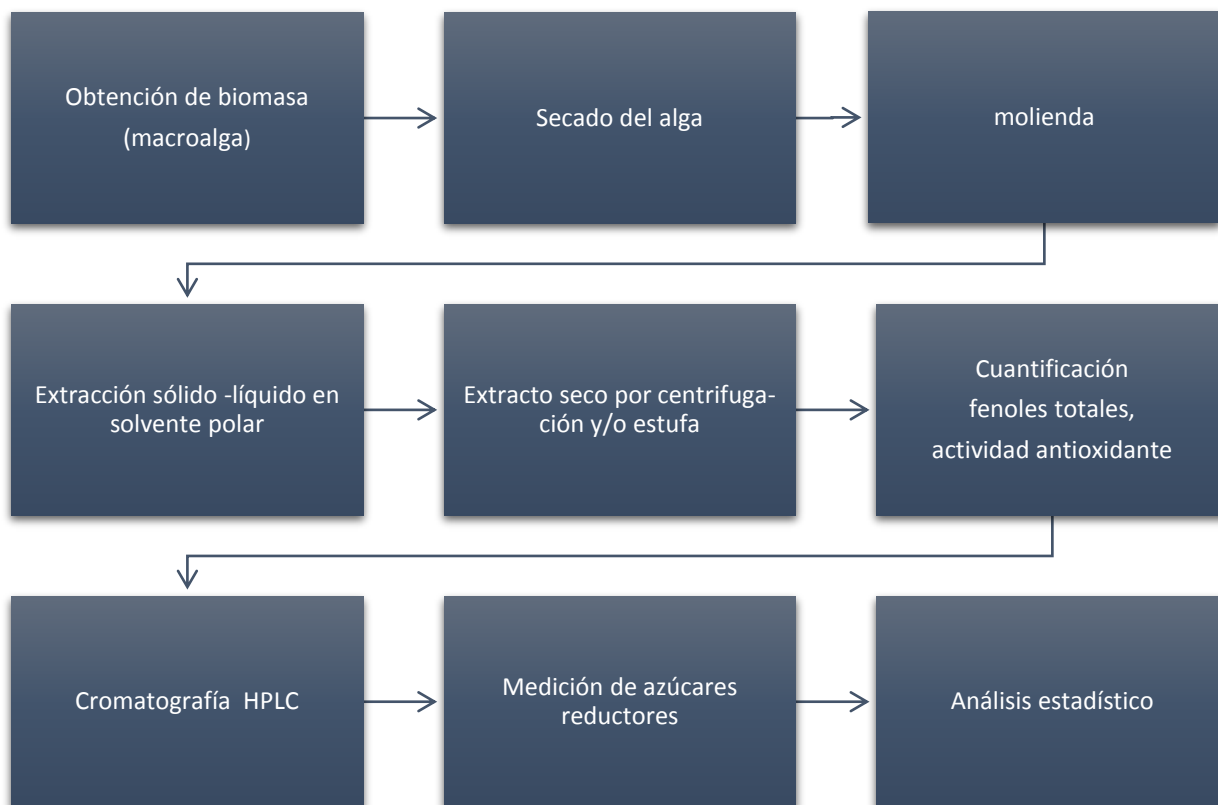


Figura 1. Diagrama del proceso de extracción sólido-líquido de antioxidantes

Extracción sólido-líquido: en esta etapa de la metodología se estudió el efecto de las variables: temperatura, relación sólido-líquido y tiempo de extracción para el solvente etanol a diferentes porcentajes (25,75 y 96% y agua destilada). Para el diseño experimental se consideró utilizar el método Taguchi [41] con la finalidad de reducir el número total de experimentos y evaluar todos los parámetros señalados. Los valores de temperatura considerados corresponden a 25, 37 y 70°C, tiempo de extracción de 50 minutos, 1,5 y 3 horas mientras que la relación sólido-líquido se seleccionó en 1:10, 1:50 y 1:100. El diseño final utilizando la metodología Taguchi se muestra en la Tabla 3. Se considera agitación a 200 rpm durante el tiempo de incubación en un baño termoregulado.

Obtención extracto seco: se considera Centrifugación 6000 g, 10 min, 4°C y secado en estufa a 40°C, pesar extracto y resuspender en agua para completar 10 ml. Con ello se puede obtener rendimiento en masa definido como:

$$\text{rendimiento} = \frac{\text{extracto seco} * 100}{\text{gr alga seca}}$$

Tabla 3. Diseño experimental de Taguchi, con las variables en estudio.

Experimento n°	Temperatura [°C]	Tiempo de extracción [min]	Razón sólido/líquido
1	25	50	1:10
2	25	90	1:50
3	25	180	1:100
4	37	50	1:50
5	37	90	1:100
6	37	180	1:10
7	70	50	1:100
8	70	90	1:10
9	70	180	1:50

2.2.2. Cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante

Determinación de compuestos polifenólicos totales (PT). Método Folin-Ciocalteu. (Adaptado a placas de 96 pocillos). Los PT se analizaron mediante colorimetría por medio del método Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton y Rossi, 1965[58] con algunas modificaciones.

Reactivos

- Reactivo Folin – Ciocalteu diluido 1:10 v/v. Se diluyó 10 mL del reactivo en 100 mL de agua desionizada.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3), a una concentración de 7,5% p/v

El patrón a utilizar fue ácido gálico en una concentración de 100 mg/L. Para prepararlo se disolvieron 0,0025 g de ácido gálico en agua desionizada en un matraz de aforo de 25 mL

Análisis de las muestras

A 20 μL de muestra se agregó 100 μL de reactivo Folin – Ciocalteu y se dejó reposar por 1 minuto, luego se adicionaron 80 μL de Na_2CO_3 7,5% p/v y la mezcla se incubó a 45°C por 15 minutos en baño seco. Se leyó absorbancia a 765 nm. El contenido fenólico se expresó como equivalente de ácido gálico y el rendimiento fue referido a la muestra inicial en base seca.

Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración se construyó con diluciones de la solución de ácido gálico 100 mg/L. Se tomaron 0; 0,04; 0,08; 0,12; 0,16 y 0,2 mL de la solución concentrada y se adicionó agua destilada hasta completar 0,2 mL y a continuación se procedió según lo describió anteriormente para la muestra. Todas las mediciones se realizaron en triplicado.

Determinación de actividad antirradicalaria. Método DPPH. (Adaptado a placa de 96 pocillos). Se determinó la capacidad donante de protones o de captación de radicales libres mediante el ensayo con el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), que se decolora en presencia de compuestos con capacidad de captación de radicales [59].

Preparación de los reactivos

Reactivo DPPH. Se preparó la solución de DPPH 400 mM, correspondiente a 0,00394 g de DPPH en 25 mL de etanol, luego se mezcló en oscuridad por 30 minutos en un agitador magnético.

Trolox. Se disolverá 0,0025 g de Trolox ((±)-6-hidroxy-2, 5, 7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid) en 10 mL de etanol al 50%.

Análisis de las muestras

Las muestras se diluyeron apropiadamente. A cada tubo de ensayo se adicionó 110 µL de etanol, 50 µL de muestra y 40 µL de DPPH. Se agitó la muestra y se dejó reposar por 30 minutos en un lugar oscuro. Se trabajó en triplicado y se midió la absorbancia a 520 nm en lector de placas de 96 pocillos. Posteriormente se procedió a construir la curva con el patrón Trolox. A partir de ésta, se calculó la actividad antioxidante de las muestras expresadas en mg de Trolox equivalente (TE) por g de muestra seca, además se determinará el porcentaje de inhibición de oxidación empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{(A_C - A_M)}{A_C} \times 100 \right]$$

Dónde:

AC: absorbancia registrada por la muestra control.

AM: absorbancia registrada por las muestras con extractos.

Preparación de la curva de calibración

Se preparó una curva de 0 a 0,3 mL de Trolox, completando con etanol hasta obtener 1,5 mL de volumen total, donde el blanco corresponde al valor 0. Preparadas las diluciones del estándar se procedió al igual que la muestra. Todas las determinaciones se realizaron en triplicado.

2.2.3. Medición de azúcares reductores

Se utilizó el método de reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para cuantificar azúcares reductores. Brevemente se puede indicar que se incubó 200 μ L de reactivo DNS con 200 μ L de muestra a 100°C por 20 minutos, luego se mantuvo por 5 minutos en hielo. Se realizó lectura de absorbancia a 550 nm. Todos los ensayos se realizaron en triplicado

Curva de calibración

Se preparó una solución de 3 gr/L de glucosa en agua desionizada, tomando 0,03 gr de glucosa en 10 ml de agua en matraz de aforo. Se realizaron diluciones de 0 a 3 mg/ml (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 mg/ml), utilizando como blanco agua destilada y reactivo DNS. Se procede igual que las muestras.

2.2.4. Extracción de antioxidantes por método control

Se realizó una hidrólisis ácida completa para la obtención de la totalidad de antioxidantes polifenólicos presentes en el alga y cuantificar el rendimiento real de la extracción.

La metodología se basó en Rodríguez-Bernaldo de Quirós [33], donde 0,1 g de alga seca se mezclaron con 10 ml de solvente de extracción formado por la mezcla (metanol-agua-ácido acético, 30:69:1) y 2 g de ácido cítrico/L. Todo ello se llevó a incubación a 70°C por 50 minutos con agitación de 200 rpm. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 6.000 g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se reservó para análisis del contenido de fenoles totales mediante el test Folin-Ciocalteu, mientras que el precipitado se sometió nuevamente al tratamiento de extracción.

2.2.5. Análisis Estadístico

Todos los resultados se expresaron como el promedio \pm desviación estándar de las mediciones en triplicado. Se realizó Análisis de Componentes Principales (ACP) con el paquete estadístico de Excel y el software comercial Unscrambler X, versión 10.3, con el objetivo de obtener los principales factores que afectan la variabilidad de los resultados obtenidos.

3. Resultados y Discusión

A continuación se presentan los resultados obtenidos al aplicar la metodología planteada en el capítulo 2 de Materiales y Métodos. Con estos resultados se muestra el conjunto de condiciones de cada muestra y la cantidad de polifenoles totales, actividad antioxidante, cantidad de azúcares reductores detectados en los extractos luego del tratamiento. También se presenta el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos comparados con el control propuesto descrito por Rodríguez-Bernaldo de Quirós [33].

La totalidad de los resultados de recuento de fenoles totales, actividad antioxidante, azúcares reductores para cada alga se presentan en detalle en las tablas 4 y 5, así como las condiciones de extracción y el código abreviado para el análisis de componentes principales (ACP). El análisis detallado de la relación entre variables experimentales y resultados obtenidos se analizará desde la sección 3.3 en adelante.

3.1. Actividad antioxidante en *Macrocystis pyrifera*

La tabla 4 muestra los contenidos de fenoles totales, actividad antioxidante del radical DPPH* (expresada en porcentaje de inhibición del radical), rendimiento de la extracción de polifenoles totales y azúcares reductores expresados en gramos equivalentes de glucosa/100 g PS para *Macrocystis pyrifera* tratada con diferentes solventes tal como se describen en el capítulo 2 de Materiales y Métodos. En negrita se destacan aquellos valores de fenoles totales, inhibición y azúcares reductores mayores para cada solvente junto a sus condiciones de extracción, lo cual sirve para posteriormente realizar la selección de las mejores condiciones. Para el rendimiento el total de Fenoles se determinó utilizando metodología propuesta por Rodríguez-Bernaldo de Quirós [33] metanol-agua-ácido acético (30-69-1), donde los fenoles totales fueron 400 [mg GAE/100gPS] aceptando este valor como control de 100%.

Tabla 4. Resultados Macrocyctis pyrifera. La tabla muestra el contenido total de fenoles expresado en mg ácido gálico equivalente(GAE)/100 g de peso seco del alga(g PS), actividad de inhibición del radical DPPH expresada en % de inhibición, rendimiento de fenoles totales comparado con control. En negrita los resultados con mayor cantidad de polifenoles y/o actividad antioxidante por solvente. ND=valor no detectado

solvente	T°	Código ACP	Tiempo [min]	Relación sólido/líquido [g/ml]	Fenoles totales $\left[\frac{\text{mg GAE}}{100 \text{ gPS}} \right]$	Inhibición DPPH* [%]	Rendimiento [%]	Azúcares reductores $\left[\frac{\text{g glucosa}}{100 \text{ gPS}} \right]$
Etanol 96%	25°C	MP1	50	1:10	3,1 ± 1,2	7,3	1	ND
		MP2	90	1:50	4,5 ± 0,2	5,9	3	ND
		MP3	180	1:100	ND	ND	0	ND
	37°C	MP4	50	1:50	2,8 ± 0,7	2,4	1	ND
		MP5	90	1:100	7,4 ± 3,4	1,5	2	ND
		MP6	180	1:10	2,2 ± 0,0	10,5	1	ND
	70°C	MP7	50	1:100	32,9 ± 10,7	22,3	8	ND
		MP8	90	1:10	45 ± 0,2	23,6	1	ND
		MP9	180	1:50	215,1 ± 8,7	85,6	54	ND
Etanol 75%	25°C	MP10	50	1:10	32 ± 0,7	87,3	8	ND
		MP11	90	1:50	48,5 ± 2,7	56,6	12	ND
		MP12	180	1:100	36,4 ± 3,7	33,9	9	0,18
	37°C	MP13	50	1:50	60,9 ± 2,8	66,3	15	ND
		MP14	90	1:100	122,7 ± 55,2	39,6	31	ND
		MP15	180	1:10	374,4 ± 27,4	84,9	94	ND
	70°C	MP16	50	1:100	19,6 ± 3,9	19,4	5	ND
		MP17	90	1:10	39 ± 0,8	87,8	10	ND
		MP18	180	1:50	170,4 ± 5,3	81	43	ND
Etanol 25%	25°C	MP19	50	1:10	105,1 ± 4,9	44	26	ND
		MP20	90	1:50	211,1 ± 1,6	76,4	53	ND
		MP21	180	1:100	208,2 ± 2,5	81,4	52	ND
	37°C	MP22	50	1:50	105,1 ± 7,1	82,4	26	ND

		MP23	90	1:100	360,9 ± 92,7	71,5	90	ND
		MP24	180	1:10	106,2 ± 2,4	20,2	27	0,09
	70°C	MP25	50	1:100	356 ± 10,6	ND	89	2,76
		MP26	90	1:10	62,3 ± 0,7	82	16	ND
		MP27	180	1:50	112 ± 7,0	75	28	ND
agua	25°C	MP28	50	1:10	40,4 ± 5,9	52,8	10	ND
		MP29	90	1:50	103,3 ± 3,7	68,9	26	0,08
		MP30	180	1:100	223,4 ± 10,7	70,6	56	0,84
	37°C	MP31	50	1:50	116,9 ± 1,8	65,7	29	0,84
		MP32	90	1:100	173,2 ± 4	63	43	0,25
		MP33	180	1:10	60,2 ± 2,1	ND	15	0,47
	70°C	MP34	50	1:100	366,3 ± 8,4	70	92	0,84
		MP35	90	1:10	37 ± 1,3	54,1	9	0,04
		MP36	180	1:50	212 ± 9,4	ND	53	1.76

Con respecto a los resultados obtenidos para *Macrocystis pyrifera*, se tienen antecedentes de trabajos desarrollados por otros investigadores en el marco del proyecto AKA-Conicyt para mejoramiento de biorefinería desde macroalgas, que muestran resultados de extracción para la misma alga en distintos solventes (etanol 100, 20 y 25%, agua y otros solventes). Las condiciones de extracción utilizadas fueron: 4 horas a 25°C, con agitación de 200 rpm, utilizando los mismos test de medición de actividad y polifenoles totales. En ese trabajo los resultados de la extracción en agua mostraron una cantidad de polifenoles totales de 147 [mg GAE/100 g peso seco] con actividad antioxidante de 92% de inhibición al radical DPPH, resultando la más alta de todos los solventes explorados. Comparando con los resultados obtenidos en el presente estudio la cantidad de fenoles totales (en solvente agua) es 59,9% mayor (366,3 [mg Gae/100 g peso seco de alga]) pero la actividad medida fue de 70% de inhibición posiblemente influenciado por el grado de purificación menor en el presente estudio, al no considerar etapas de filtración o precipitación de moléculas interferentes. En etanol se encontró similar actividad antioxidante a las presentadas en la Tabla 4 (84 [mg GAE/100 g peso seco de alga] con 80 % actividad versus 208 [mg GAE/100 g peso seco de alga] y actividad de inhibición de 81,4% del presente estudio). El único dato disponible en literatura para actividad antioxidante de *M. pyrifera* [27] muestra un 92,3% de inhibición del radical DPPH con un contenido fenólico de 7,5 g floroglucinol/100 g extracto, en el extracto acuoso mientras que en la fracción lipídica fue 2 gr floroglucinol/100 g extracto.

En cuanto al recuento de azúcares reductores, el trabajo de referencia entrega medición de 0,9 [g glucosa/100 g PS], mientras que el presente estudio extrae 0,84 [g glucosa/100 g PS] valores similares en condiciones experimentales similares (solvente agua). La cantidad máxima de azúcares reductores extraídos en el sobrenadante del presente estudio se evidenciaron a temperatura de 70°C siendo 1,76 [g glucosa/100 g PS] en agua y 2,76 [g glucosa/100 g PS] en etanol 25%. En muestras con mayor contenido etanólico prácticamente no se detectó azúcares reductores.

La mayor cantidad de fenoles totales fue de 374,4 [mg GAE/100 g peso seco de alga] con un rendimiento de 94% con respecto al control. Este extractó mostró además una de las actividades antioxidantes más altas (85% de inhibición al radical DPPH) siendo el extracto con mejor relación entre alta cantidad de polifenoles totales y alta actividad antioxidante.

3.2. Actividad antioxidante en *Ulva rigida*

La tabla 5 muestra los contenidos de fenoles totales, actividad de inhibición de la oxidación de DPPH*(expresada en porcentaje de inhibición del radical), rendimiento de la extracción de polifenoles totales y azúcares reductores para *Ulva rigida* tratada diferentes solventes tal como se describen en el capítulo 2 de materiales y métodos.

En negrita se destacan aquellos valores de fenoles totales y/o inhibición mayores para cada solvente junto a sus condiciones de extracción, lo cual sirve para posteriormente realizar la selección de las mejores condiciones. Para rendimiento total de Fenoles se determinó utilizando la metodología propuesta por Rodríguez-Bernaldo de Quirós [33] metanol-agua-ácido acético (30-69-1), donde los fenoles totales medidos fueron 155 [mg GAE/100gPS], aceptando este valor como control de 100%.

Tabla 5. Resultados Ulva rigida. La tabla muestra el contenido total de fenoles expresado en mg acido gálico equivalente(GAE)/100 g de peso seco del alga(g PS), actividad de inhibición del radical DPPH expresada en % de inhibición, rendimiento de fenoles totales y condiciones de extracción ordenadas por solvente. En negrita los resultados con mayor cantidad de polifenoles y/o actividad antioxidante por solvente. ND=valor no detectado

solvente	T°	Código ACP	Tiempo [min]	Relación sólido/líquido [g/ml]	Fenoles totales $\left[\frac{mg\ GAE}{100\ gPS}\right]$	Inhibición DPPH* [%]	Rendimiento [%]	Azúcares reductores $\left[\frac{g\ glucosa}{100\ gPS}\right]$
Etanol 96%	25°C	UR1	50	1:10	9,2 ± 2,2	6,1	6	ND
		UR2	90	1:50	19,2 ± 2	4,1	12	ND
		UR3	180	1:100	ND	0,3	0,0	ND
	37°C	UR4	50	1:50	23,4 ± 3,3	10,3	15	ND
		UR5	90	1:100	58 ± 40,6	0,7	37	ND
		UR6	180	1:10	37 ± 0,8	9,7	24	ND
	70°C	UR7	50	1:100	25,5 ± 2,1	4,1	16	ND
		UR8	90	1:10	14 ± 0,3	3,1	9	ND
		UR9	180	1:50	72,5 ± 1,4	35,1	47	ND
Etanol 75%	25°C	UR10	50	1:10	83,8 ± 4,3	79,5	54	ND
		UR11	90	1:50	111 ± 1,9	69,3	72	ND
		UR12	180	1:100	75,6 ± 3,2	29	49	ND
	37°C	UR13	50	1:50	102,7 ± 1,4	60,8	66	ND
		UR14	90	1:100	88,4 ± 8,1	36,3	57	ND
		UR15	180	1:10	87,3 ± 2,8	79,3	56	ND
	70°C	UR16	50	1:100	143,6 ± 9,4	44,1	93	0,1
		UR17	90	1:10	50,1 ± 1	66,5	32	ND
		UR18	180	1:50	65,2 ± 2,2	32,5	42	ND
Etanol 25%	25°C	UR19	50	1:10	21,2 ± 1,4	ND	14	ND
		UR20	90	1:50	88,4 ± 2,7	ND	57	0,46
		UR21	180	1:100	79,1 ± 20,4	ND	51	0,92
	37°C	UR22	50	1:50	74 ± 2,6	ND	48	0,60

	70°C	UR23	90	1:100	88,4 ± 18	ND	57	0,92
		UR24	180	1:10	17 ± 0,8	ND	11	ND
		UR25	50	1:100	61,3 ± 2,3	ND	40	ND
		UR26	90	1:10	17 ± 0,3	33,3	11	ND
		UR27	180	1:50	26,8 ± 0,8	1,4	17	ND
agua	25°C	UR28	50	1:10	7,2 ± 4	ND	5	0,18
		UR29	90	1:50	47,2 ± 3	ND	30	1,98
		UR30	180	1:100	42,3 ± 3	ND	27	4,66
	37°C	UR31	50	1:50	84,1 ± 1,8	ND	54	0,57
		UR32	90	1:100	95,7 ± 2	ND	62	2,90
		UR33	180	1:10	25 ± 3	ND	16	0,64
	70°C	UR34	50	1:100	56 ± 1,2	ND	36	2,64
		UR35	90	1:10	20,7 ± 0,6	21	13	0,29
		UR36	180	1:50	53,4 ± 5,1	ND	34	1,89

Para el caso del *Ulva rigida* no se tienen antecedentes de extracción de antioxidantes en el mismo grupo de trabajo, sin embargo existen reportes en la literatura de extracción de compuestos polifenólicos en esta alga [1, 39,40]. Uno de estos estudios muestra cuantificación de fenoles totales y actividad antioxidante a lo largo de un año en algas de la costa de Túnez [40], con valores que varían entre 2 y 28 [mg Floroglucinol/g alga seca], siendo mayores en los meses más fríos, con actividad antioxidante entre 50 y 75% de inhibición al radical DPPH. El presente estudio mostró rangos de actividad similares, sin embargo la cantidad de fenoles totales recuperada fue significativamente menor. El mejor rendimiento fue de 93% con respecto al control (143,6 [mg GAE/100 g peso seco de alga]), y se obtuvo en etanol al 75%, solvente en el que se obtuvieron también los mayores valores de actividad (79,5 % de inhibición al radical DPPH pero sólo con un rendimiento del 54%). La cantidad de polifenoles encontrados en el alga *U. rigida* fue menor al 50% respecto a lo medido en *M. pyrifera*, siendo ésta última seleccionada como mejor fuente de antioxidantes polifenólicos.

3.3. Análisis de componentes principales (ACP)

El análisis de componentes principales ayuda a saber cuáles son las variables que más contribuyen a la diferencia entre dos muestras, y si esas variables contribuyen de la misma manera (es decir, están correlacionadas) o de forma independiente una de la otra. También, permite detectar patrones de muestra, como cualquier agrupación particular. Por último, cuantifica la cantidad de información útil -en contraposición al ruido - contenida en los datos. Este tipo de análisis reduce el número de variables originales a un número menor de variables sintetizadas ortogonales (llamados componentes principales y abreviados de la forma PC-N°) [43].

Los principales resultados del análisis de componentes principales (ACP) se muestran en los Gráficos 1 a 5. Este modelo de ACP fue construido con el promedio de los datos de las mediciones (valores presentados en Tablas 4 y 5 del capítulo N°3 de Resultados y Discusiones). Para una mejor lectura de los gráficos obtenidos se destacan los grupos de muestras con mejor comportamiento de acuerdo a las variables destacadas en cada eje (muestras en círculo rojo). Se muestran dos tipos de gráficos en los resultados de cada alga: el primero permite la detección de similitudes y diferencias entre las diferentes muestras de acuerdo a los componentes principales indicados en cada eje (ver Gráficos 1, 2 y 4)), el segundo tipo de gráfico muestra la correlación medida entre las variables para el par de componentes principales que reúne la mayor variabilidad del total de muestras (ver Gráficos 3 y 5)), donde aquellas variables con mejor nivel de correlación se muestran cercanos al valor 1 en cada eje. Ambos gráficos resumen las principales conclusiones del modelo y los códigos para identificar cada muestra se muestran en las tablas 4 y 5 del capítulo N°3 de Resultados y Discusiones.

3.3.1. Análisis Componentes Principales en *Macrocystis pyrifera*

En el caso de *M.pyrifera* los dos primeros componentes principales (PC-1 y PC-2 relacionados con las variables fenoles totales y tiempo respectivamente) explican el 93% de la variabilidad de los datos (el aporte individual de cada componente principal se indica entre paréntesis en el gráfico 1). Se aprecia en el gráfico 1, además de la tendencia de las muestras ordenadas de acuerdo al tiempo de extracción en la dirección de PC-2(aumentando desde los cuadrantes inferiores hacia los superiores) y de acuerdo a la cantidad de fenoles totales en la dirección de PC-1 (aumentando desde los cuadrantes izquierdos hacia los derechos).Destacan inmediatamente las muestras con mayor contenido de fenoles totales como un grupo aislado a la derecha del diagrama y destacado con un círculo rojo.

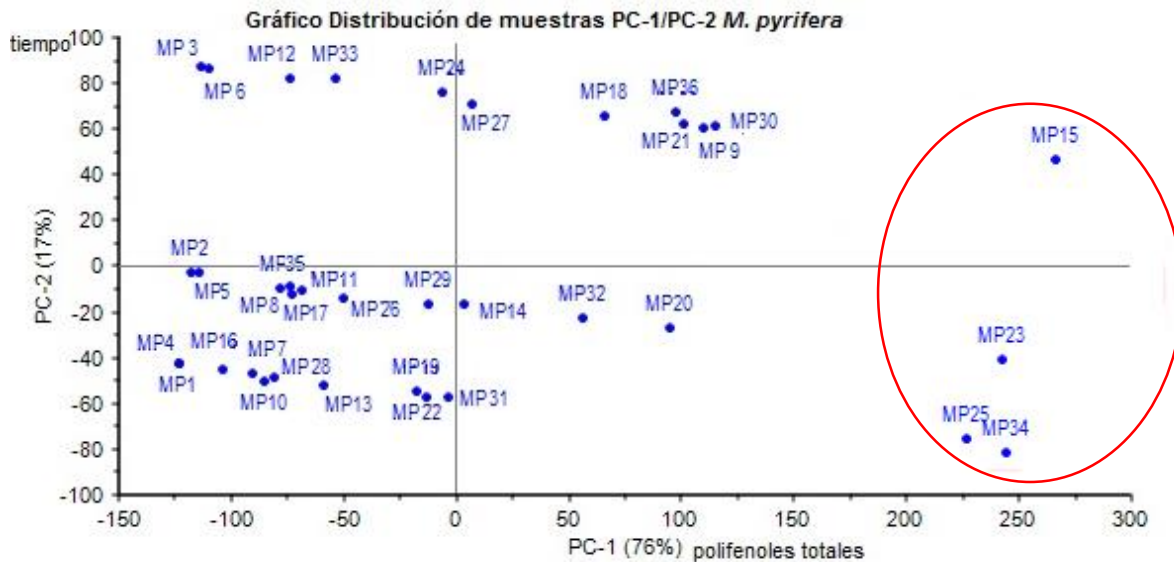


Gráfico 6. Gráfico de distribución de muestras PC1 vs PC2 en *M. pyrifera*. Se muestra el comportamiento de las 36 muestras de *Macrocystis pyrifera*. Las muestras de la derecha indican mayor contenido fenólico, mientras que las superiores indican mayor tiempo de extracción. Los números entre paréntesis indican la variabilidad explicada por cada componente principal. La variable mejor correlacionada con cada componente principal se indica en cada eje.

Al realizar el gráfico 2, donde se muestra la distribución de las muestras de acuerdo a los componentes principales PC-1 Y PC-3, se puede apreciar el ordenamiento de las muestras según el contenido de fenoles totales en PC-1 (aumentando de izquierda a derecha) y la actividad de inhibición del radical DPPH en PC-3 (aumentando hacia arriba), ubicándose en el cuadrante superior derecho las muestras con alto contenido fenólico y alta actividad antioxidante. Ambos gráficos permiten seleccionar las mejores muestras para determinar el conjunto de mejores condiciones que se analizará posteriormente en sección 3.9 del presente capítulo.

Finalmente, del gráfico 3 es posible visualizar la correlación entre las variables experimentales (temperatura y tiempo de extracción, contenido de etanol en el solvente, relación sólido/líquido) y los test experimentales (contenido de fenoles totales, actividad antioxidante y contenido de azúcares reductores). El componente principal PC-1 muestra alta correlación con el contenido de fenoles totales (valor cercano a 1) y en menor medida con el contenido de agua en el solvente, actividad antioxidante (% inhibición a radical DPPH) y temperatura. Por otra parte, el PC-2 muestra alta correlación con el tiempo de extracción (valor cercano a 1) y en menor medida con el contenido de azúcares reductores en los extractos. Estos resultados eran esperables por cuanto los mayores contenidos fenólicos se midieron en las muestras tratadas por 90 y 180 minutos. Las variables ubicadas a la derecha del gráfico son aquellas que influyen mayoritariamente en las actividades antioxidantes de las muestras analizadas y se encuentran destacadas en el gráfico (círculo rojo).

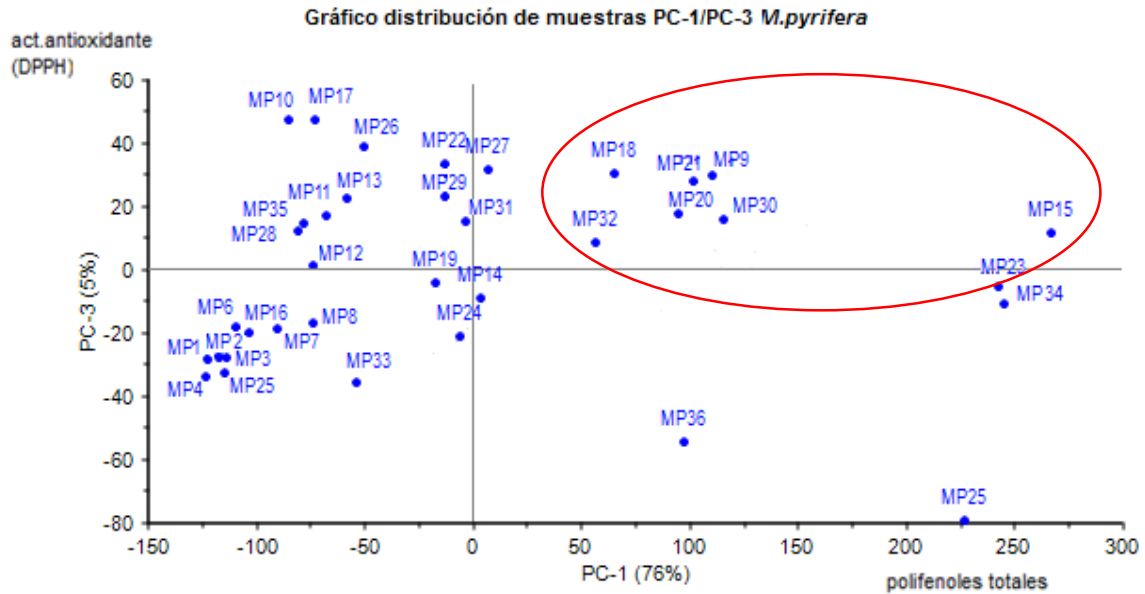


Gráfico 7. Gráfico de distribución de muestras PC1 vs PC3 en *M.pyrifera*. Se muestra el comportamiento de las 36 muestras de *Macrocystis pyrifera*. Las muestras de la derecha indican mayor contenido fenólico, mientras que las superiores indican mayor actividad antioxidante. Los números entre paréntesis indican la variabilidad explicada por cada componente principal. La variable mejor correlacionada con cada componente principal se indica en cada eje.

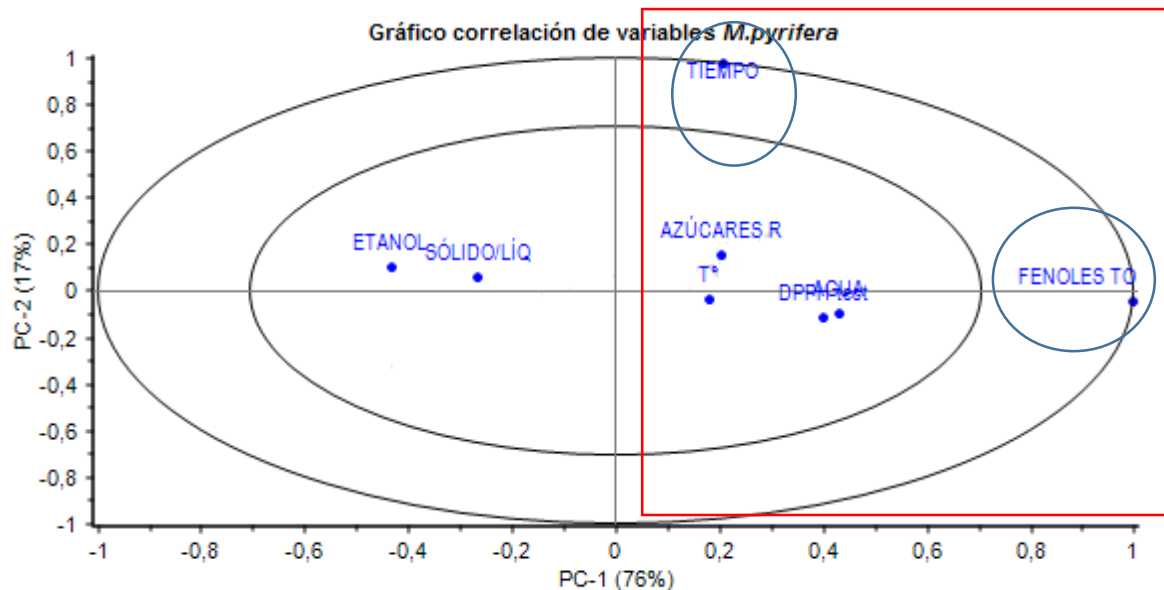


Gráfico 8. Correlación de variables para *M.pyrifera*. Indica correlación entre las variables y los componentes principales más relevantes. Las variables con valor cercano a 1 en cada eje son las más influyentes en la variabilidad de las muestras. Cuadrantes derechos indican correlación positiva, mientras que hacia la izquierda indican correlación negativa.

3.3.2. Análisis Componentes Principales en *Ulva rigida*.

Para *Ulva rigida* los dos primeros componentes principales explican el 85% de la variabilidad de los datos (gráfico 4), obteniéndose alto contenido fenólico y actividad antioxidante en los cuadrantes superiores con una misma tendencia para cada tiempo de extracción (de menor a mayor en la dirección de PC-1). Este gráfico sirvió para determinar las mejores condiciones de extracción de antioxidantes para esta alga verde, las cuales coinciden con los menores tiempos de extracción y se encuentran destacadas en el gráfico con un círculo rojo. La variabilidad explicada por los dos primeros componentes principales es menor que para *M. pyrifera*, lo cual podría deberse a la mayor correlación de las variables tiempo y fenoles totales (en *M. pyrifera*) lo que indicaría la existencia de información redundante o compartida por más de una variable original en las muestras del alga parda y por tanto menos factores pueden explicar la mayor variabilidad observada [43]. En otras palabras existe redundancia si hay alta correlación entre las variables y por tanto muchas variables están midiendo la misma información. Mientras más información compartida existe, la información útil para describir el fenómeno se sintetiza en un número menor de componentes principales.

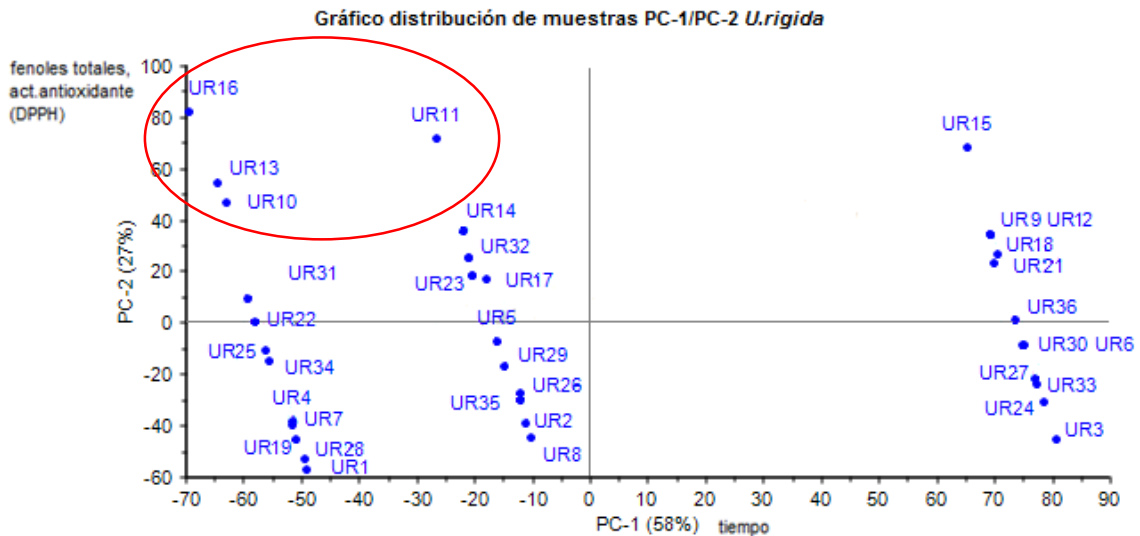


Gráfico 9. Gráfico de puntuaciones principal ACP (PC1 vs PC2). Se muestra el comportamiento de las 36 muestras de *Ulva rigida*. Las muestras de la derecha indican mayor tiempo de extracción, mientras que las superiores muestran mayor contenido fenólico y actividad antioxidante. Los números entre paréntesis indican la variabilidad explicada por cada componente principal. La variable mejor correlacionada con cada componente principal se indica en cada eje.

Por otra parte, el gráfico 5 indica las correlaciones entre las variables de extracción y los test evaluados para contenido de fenoles, actividad y contenido de azúcares reductores, mostrando una alta correlación entre actividad antioxidante (DPPH) contenido de fenoles totales y PC-2; y una menor correlación entre PC-2 el contenido de etanol y temperatura de extracción. El tiempo de extracción muestra una alta correlación con PC-1 con un valor cercano a 1.

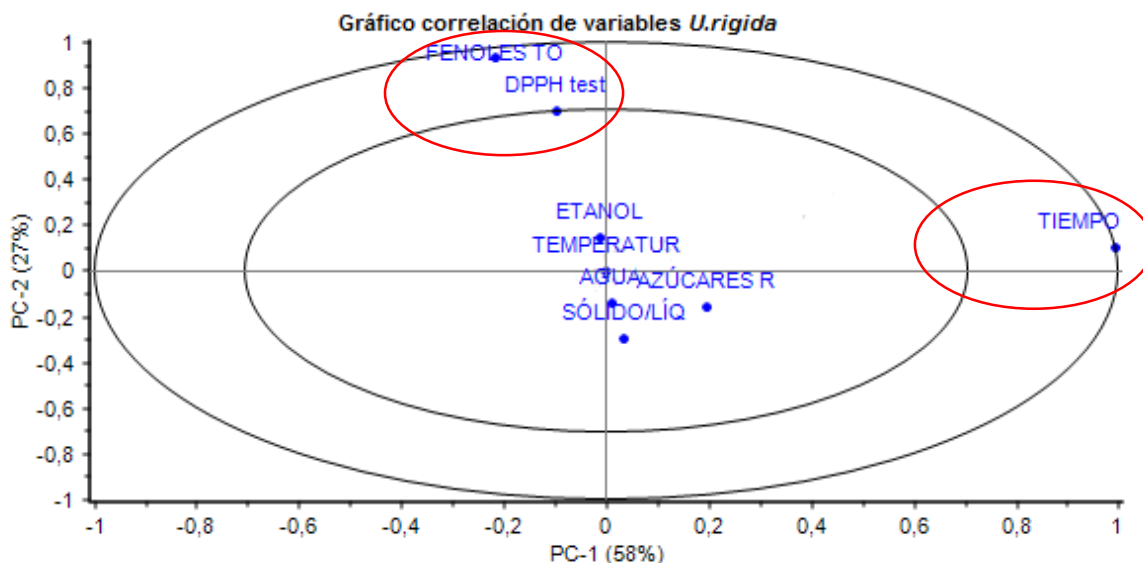


Gráfico 10. Correlación de variables para *U. rigida*. Indica correlación entre las variables y los componentes principales más relevantes. Las variables con valor cercanos a 1 en cada eje son las más influyentes en la variabilidad de las muestras.

3.4. Efecto del solvente

Al diseñar la metodología de extracción se optó por solventes aprobados para uso alimentario (etanol y agua) por sobre otros como metanol, que si bien han reportados mejores resultados en términos de extracción [44], se debe tomar cuidadosas medidas de las trazas residuales. La polaridad del solvente es la principal característica a analizar, ya que el desempeño de la extracción dependerá de la afinidad de las moléculas por el solvente. La polaridad de un solvente se cuantifica en términos de su constante dieléctrica⁶ siendo más polares mientras mayor sea el valor de esta constante. Para etanol puro su constante dieléctrica es 24, para metanol puro 33 y para agua 84, mientras que las mezclas de agua y etanol pueden abarcar un amplio rango de polaridades [44]. La literatura indica que los compuestos polifenólicos presentan gran afinidad por compuestos polares por cuanto se presentan enlaces del tipo C-OH en su estructura.

3.4.1. Efecto del solvente sobre la extracción en *Macrocytis pyrifera*

En el alga parda el solvente utilizado mejora la extracción de polifenoles totales en cuanto aumenta la polaridad del mismo (menos polar mientras mayor contenido de etanol en el solvente).

En algas pardas existen moléculas polifenólicas únicas llamada florotaninos, los cuales estructuralmente son dehidropolimerizados de floriglucinol algunas veces con grupos adicionales del tipo hidroxilo o halogenado [44]. Estos compuestos se presentan en forma de polímeros,

⁶ Constante dieléctrica: se define como $k = \epsilon / \epsilon_0$, siendo un valor adimensional.
 $\epsilon =$ permitividad del material, $\epsilon_0 =$ permitividad del vacío

oligómeros, los cuales se clasifican en 4 tipos según el enlace de los monómeros. Una misma alga puede presentar distintos tipos de florotaninos. La polaridad de estas moléculas y, también su actividad como antioxidantes dependen de la cantidad de grupos hidroxilo presentes en la estructura [44], por ejemplo el dieckol (con 11 enlaces -OH) y 6,6'-bieckol (con 12 -OH) han mostrado mejor actividad que floroglucinol (con 3 -OH) and eckol (con 6 -OH) [44] de esta forma los compuestos más activos son también los más polares y con mayor peso molecular. Para Los resultados obtenidos se calcularon en promedio mejores resultados en etanol 25% y agua corroborando lo anterior, aunque la mejor combinación de parámetros (polifenoles totales, % inhibición y rendimiento) se obtuvo a 75% de etanol. Este resultado pudo verse influenciado por la presencia de otros compuestos con una polaridad menor que deberían ser corroborado con los resultados de HPLC. El agua a altas temperaturas posee una polaridad mayor que a temperatura ambiente [44] por lo que en agua a 70°C como solvente posiblemente se pudo acceder a florotaninos de alto peso molecular los cuales se encuentran formando enlaces con ácido algínico en compartimientos especializados llamados fisoides [44].

Un caso interesante de analizar es el de la extracción en etanol al 96%, en que la recuperación fue menor de 10 [mg GAE/100 g ps de alga] a 25 y 37°C. Sin embargo, a una temperatura de 70 °C se recuperó mayor cantidad de fenoles totales, siendo la mejor a 3 horas de extracción (220 [mg GAE/100 g ps]) donde la actividad antioxidante medida fue también alta (86%) lo que podría corresponder a la formación de nuevos compuestos fenólicos sintetizados por reacción química a esa temperatura. La literatura reporta que el agua a altas temperaturas se puede comportar como reactante y catalizador en reacciones iónicas durante procesos de licuefacción hidrotermal, aunque estos efectos son pronunciados sobre 100°C [45]. Sin embargo para corroborar esta hipótesis son necesarios más estudios de los efectos de altas temperaturas en los compuestos bioactivos de macroalgas.

3.4.2. Efecto del solvente sobre la extracción en *Ulva rigida*

La cantidad de polifenoles totales extraídas es, en promedio, menor en el caso de alga verde en comparación con alga parda, mostrando un menor contenido de estos compuestos acorde a lo reportado en la literatura [44]. Sin embargo las condiciones de polaridad en la que se extrae la mayor cantidad de polifenoles difieren del alga parda, debido posiblemente a moléculas polifenólicas de distinta naturaleza. En algas verdes no existen florotaninos, los cuales son compuestos fenólicos altamente polares, sin embargo se han reportado otros fenoles, principalmente ácido gálico como principal responsable de la actividad antioxidante medida, además de la presencia de bromofenoles [44], los cuales presentan una polaridad menor acorde a los resultados encontrados.

Los mejores resultados para esta alga se encuentran a 75% de etanol, disminuyendo en etanol 25%, agua pura y etanol 96% (en ese orden), las cantidades de polifenoles totales se correlacionan con la actividad de inhibición DPPH solo en etanol 75% y 96%, no pudiendo medir actividad en los otros solventes. Se puede observar alta correlación en los casos con alta extracción de fenoles totales y alta actividad, siendo 110 [mg GAE / ps alga] la mayor cantidad extraída correspondiente a un 72 %

de rendimiento con respecto al control en metanol-agua acidificado según Rodríguez-Bernaldo de Quirós [33]. La mayor actividad corresponde a un 80% de inhibición del radical DPPH.

La ausencia de actividad antioxidante en las muestras con mayor contenido de agua puede deberse a la interferencia en la medición de fenoles totales por moléculas capaces de reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu, tales como azúcares reductores o proteínas [44]. Las mediciones de azúcares reductores en estas muestras fueron las mayores en las muestras tratadas en el test de DNS con un valor de 4,7 [g glucosa/100 g ps] (ver Tabla 5, última columna). También puede deberse a moléculas que, si bien son antioxidantes, posean un mecanismo de acción distinto a la captura de radicales libres, lo cual podría ser verificado realizando otros ensayos de actividad, tales como ORAC. ORAC es capaz de medir la capacidad antioxidante de todas las moléculas para inhibir especies reactivas de oxígeno ROS, incluyendo moléculas pro oxidantes y enzimas [44]. Además, se hace necesaria la incorporación de pasos de precipitación de moléculas interferentes como lípidos (con lavado de n-hexano, por ejemplo) polisacáridos con precipitación en etanol y proteínas y filtración de las muestras para una mejor separación de compuestos de distinto peso molecular. Estos pasos podrían incorporarse en trabajos futuros para una mejor caracterización de los extractos obtenidos, sin embargo adicionan pasos que deben ser costeados en una futura aplicación industrial.

3.5. Efecto de la temperatura

3.5.1. Efecto de la temperatura en *Macrocytis pyrifera*

Se ha demostrado que altas temperaturas mejoran la recuperación de compuestos fenólicos en la extracción, sin embargo temperaturas sobre 80°C pueden causar epimerización de catequinas, las que se han encontrado en extractos de algas pardas [33]. Para *M. pyrifera*, el aumento de temperatura mejora la extracción, tal como lo indica la literatura. Debido a la mayor polaridad que alcanza el agua a medida que aumenta la temperatura [44] los solventes como etanol 25% y agua permiten extracciones sobre 90% de rendimiento en cortos tiempo de extracción. Sin embargo, en tiempos prolongados de extracción a 70°C podría haber un aumento de la oxidación de compuestos extraídos durante la primera hora de extracción [33], lo cual explicaría la pérdida de actividad en la extracción en etanol 25% y agua a 70°C por 3 horas. . Para evitar este tipo de efectos se puede agregar preservantes como ácido ascórbico [33] o realizar extracciones a alta temperatura por periodos cortos de tiempo.

3.5.2. Efecto de la temperatura en *Ulva rigida*

En el caso de esta alga verde la temperatura de extracción no tiene mayor incidencia en los compuestos extraídos, si bien el óptimo de cantidad de polifenoles totales se da a 70°C, el óptimo en actividad se da a 25°C, siendo los rendimientos entre 50 y 70% para todas las temperaturas.

A 70°C la actividad de inhibición del radical DPPH se ve disminuida, no tanto así la cantidad de polifenoles totales, lo cual puede indicar algún grado de termolabilidad de los compuestos extraídos que no afecta mayormente la capacidad reductora pero sí la capacidad de captura del radical libre.

3.6. Efecto de la relación sólido-líquido

3.6.1. Efecto de la relación sólido-líquido en *Macrocystis pyrifera*

En el caso de la extracción desde el alga parda en etanol 25% en general hay mejor extracción a medida que aumenta la cantidad de líquido en la relación, lo cual genera un alto consumo en solvente para lograr la extracción de estos compuestos, tal como se reporta en la literatura, afectando un desarrollo industrial del método. Sin embargo, la muestra con mayor relación polifenoles totales y alta actividad antioxidante se logró con la menor relación sólido-líquido empleada (1:10) en etanol 75%, siendo un caso único ya que las muestras con rendimiento similar (90%) se obtuvieron con una relación de 1:100.

3.6.2. Efecto de la relación sólido-líquido en *Ulva rigida*

En el caso del alga verde el aumento de la fracción líquida en la extracción se da en las relaciones 1:10 y 1:50, con un óptimo en esta última y disminuyendo en menor medida para la relación sólido líquido de 1:100. Por consiguiente se pueden obtener mejor extracción utilizando una menor cantidad de solvente en comparación al alga parda. Esto se debe probablemente a la menor complejidad de la pared celular de algas verdes, siendo más fácil el acceso del solvente a los polifenoles; no se ha reportado que los polifenoles se encuentren en algún compartimiento especializado como ocurre en algas pardas.

3.7. Efecto del tiempo de extracción

3.7.1. Efecto del tiempo de extracción en *Macrocystis pyrifera*

En el caso de alga parda los tiempos de extracción más largos producen una mayor liberación de compuestos fenólicos. Esto puede explicarse por la complejidad de la pared celular en este tipo de algas. Además, los florotaninos, el mayor compuesto polifenólico producido por estas algas, se encuentra en compartimientos especializados dentro de la pared celular (fisoides), por lo que es necesario degradar una estructura compleja para acceder a ellos[44].

En los solventes más polares el comportamiento es distinto: a mayor temperatura y tiempo de extracción se obtiene una menor cantidad de polifenoles a medida que transcurre el tiempo de incubación a 70°C. Como se discutió anteriormente el agua a altas temperaturas aumenta su polaridad [44] pudiendo tener acceso a florotaninos de mayor peso molecular. Sin embargo, tiempos prolongados de extracción podrían causar oxidación de los polifenoles extraídos [33]. De esta forma sólo es factible la extracción de estos compuestos a alta temperatura con cortos tiempos de extracción (50 min).

3.7.2. Efecto del tiempo de extracción en *Ulva rigida*

Para esta alga verde no existe relación significativa con la cantidad de polifenoles totales extraídos, actividad y tiempo de extracción pudiendo obtenerse un 63% de polifenoles totales al menor tiempo experimentado (50 minutos). En el caso de las algas verdes los compuestos polifenólicos se encuentran en la pared celular pero no se ha reportado la existencia de estructuras especializadas como en las algas pardas [44].

3.8. Otros efectos

Otros efectos no medidos experimentalmente en esta memoria, que pueden afectar la cantidad y calidad de los compuestos obtenidos son el tamaño de partícula del alga a utilizar, las condiciones de secado y almacenado, tanto del alga fresca como de los extractos fenólicos, el pH del solvente, las condiciones ambientales de crecimiento y cosecha, etc. Algunos de estos se explicarán a continuación.

3.8.1. Tamaño de partícula

Con respecto al tamaño de partícula, si bien este no se midió por tamizado se pueden notar las siguientes observaciones con respecto a cada alga:

M. pyrifera: el alga se secó en estufa a 40°C y se pulverizó el mortero, por lo que los tamaños de partículas no fueron homogéneos variando entre polvo fino y 0,5 cm de diámetro. Además se utilizaron distintas partes del alga como frondas y estipes, las cuales tienen distintas concentraciones de metabolitos, dado que están dispuestas en distintos lugares físicos del alga [44]. Las partículas más finas mostraron mejor comportamiento durante la extracción en cuanto las más grandes presentaron mayor hidratación y formación de gel, posiblemente debido a los polisacáridos complejos del alga como el ácido algínico [44], dificultando la extracción del sobrenadante. En este caso se pudo haber agregado una etapa posterior de precipitación con etanol [26].

U. rigida: Esta alga fue provista en forma de polvo fino, no necesitando ningún tratamiento previo de molienda, así también el aspecto de partículas era uniforme en cuanto a estructura debido a la existencia solo de la fronda del alga, que además estructuralmente es más simple que las algas pardas (ver anexo N°2)

3.8.2. Condiciones de secado

El secado del alga fresca fue realizado por los donantes respectivos, no pudiendo manejar el experimentador las condiciones. Sólo se tienen antecedentes que el material se secó en malla plástica protegida del sol directo por 24 horas.

Se ha demostrado que las condiciones de secado de los extractos etanólicos influyen en la cantidad y actividad de los antioxidantes medida posteriormente [48]. En este caso se realizó el secado a 40°C, el cual se ha demostrado que no influye en la calidad de los compuestos extraídos; sin embargo, por razones ajenas al experimentador, muchas muestras se secaron a temperaturas de 60°C; al haber compuestos termolábiles la alta temperatura pudo afectar los resultados obtenidos.

3.8.3. Variaciones estacionales y ambientales de las algas.

Las especies utilizadas en el presente estudio corresponden a cosechas realizadas en marzo y julio de 2013 (ver anexo 2), lo cual no es un dato menor ya que la concentración de metabolitos y en particular antioxidantes difieren según las condiciones de crecimiento y cosecha [39,42, 44, 47, 50, 51].

El contenido de florotaninos puede variar dentro de un individuo dependiendo del tejido que se analice y entre diferentes individuos de una población de algas. Los florotaninos muestran variaciones drásticas debido a las diferencias genéticas y los estímulos ambientales y ecológicos. Factores intrínsecos responsables de esas variaciones incluyen la historia, el escenario, la planta el tamaño, la edad y el estado reproductivo del alga. Factores ambientales que influyen en los niveles de florotaninos incluyen salinidad, disponibilidad de nutrientes y de luz, intensidad de la radiación ultravioleta y la presencia de depredadores, etc.

Se ha reportado que el nivel de compuestos polifenólicos, proteínas, polisacáridos y otros metabolitos presenta variaciones diarias y estacionales, lo cual es determinante al momento de decidir el momento de cosecha o recolección de las algas, ya sea para uso alimenticio, suplementos nutricionales o medicinales [39,42, 50, 51]. Paris, 2009 [49] ha reportado variaciones a lo largo de un año en el contenido de florotaninos en *A. nodosum* con un máximo de concentración en verano e invierno del hemisferio norte. Variaciones similares se han relacionado con la calidad y cantidad de luz recibida por las algas [44].

La exposición a la radiación ultravioleta o a la radiación solar también ha reportado afectar el nivel de polifenoles en las algas. Estudios de exposición de radiación artificialmente sobre algas mostraron aumento en los niveles de florotaninos comparados con muestras recolectados del fondo marino [44]. Estudios simulando situaciones de herbivoría en las algas [44] han mostrado la inducción a la producción de florotaninos en los tejidos afectados, sugiriendo un rol de defensa en las algas. De esta forma la persistencia de depredadores o efectos mecánicos sobre las partes de las algas podría influenciar la cantidad de polifenoles en los tejidos más expuestos.

3.8.4. Moléculas interferentes en los test

La literatura reporta interferencias en el test de Folin-Ciocalteu para el recuento de fenoles totales por otras moléculas con capacidad reductora tal es el caso de azúcares reductores y proteínas principalmente. Los resultados para la medición de azúcares reductores mostró mayor cantidad en casos donde el recuento de polifenoles también fue alto (sobre 100 mg GAE/100 g ps) con un máximo de 2,76 g en *M. pyrifera* y 4,7 g en *U. rigida* medidos en equivalente de glucosa. En el caso de las proteínas, éstas están presentes en las algas en diversas formas y estructuras: como componentes de la pared celular, como enzimas, o unidas a pigmentos y carbohidratos [44]. Especial atención merecen los aminoácidos tipo micospirinas (MAAs), los cuales son componentes polares solubles en agua con una estructura basada en el anillo ciclohexanona con substituyentes aminioacídicos [44] con máximos de absorbancia entre 310 y 350 nm y actividad antioxidante. Las extracciones acuosas comúnmente arrastran proteínas en conjunto con polisacáridos y compuestos fenólicos [44]. La literatura muestra fuertes interacciones entre polifenoles y proteínas, las cuales pueden formar complejos mediante enlaces de puente de hidrógeno [44]. El análisis proximal entregó un recuento de 10% en proteínas para *M. pyrifera* y 20% para *U. rigida*, sin embargo no se realizaron test para verificar la cantidad de proteínas en los extractos etanólicos y acuosos obtenidos, los cuales podrían incluirse en estudios posteriores. La literatura reporta observaciones tales como que debido al alto contenido de fenoles la disponibilidad de proteínas en algas pardas podría estar limitada, hecho que no ocurre en algas verdes y rojas cuyo contenido fenólico es menor mientras que el contenido de proteínas es mayor[44].

3.8.5. Diseño experimental

Es importante considerar que los resultados obtenidos podrían no ser el óptimo global del problema, ya que la metodología empleada no realiza todos los experimentos posibles. Sin embargo, los resultados obtenidos pueden ser utilizados como punto de partida en un siguiente paso de optimización. Los resultados obtenidos sirven como un “screening” inicial de las actividades antioxidante en extractos etanólicos de macroalgas y por ningún motivo significan el valor antioxidante real en un sistema biológico complejo como puede ser un alimento o el cuerpo humano.

Los test utilizados para detectar actividad antioxidante en este caso corresponde a la capacidad de capturar un radical sintético como el DPPH, el cual no es producido en animales ni vegetales y por lo demás es incapaz de detectar actividad de moléculas pro antioxidantes, u otras con mecanismos de acción distinta [44]. Sin embargo, existen resultados en la literatura que indican una alta correlación entre la actividad medida por este test con otros métodos directos como ORAC [44]. En ese caso para caracterizar de mejor forma el comportamiento de los antioxidantes pueden usarse ORAC como test de actividad.

Sobre el esquema de biorefinería

En el presente estudio se realizó extracción de antioxidantes suponiendo un esquema de biorefinería, donde primero se separan los componentes principales del alga y luego se fermenta el extracto con azúcares para producir bioetanol. Sin embargo, también es posible un esquema donde primero ocurren la sacarificación y fermentación simultánea del alga y luego se recuperan subproductos del residuo, y podría estudiarse en trabajos futuros. En este tipo de esquema la materia prima se somete a un pre tratamiento con ácido diluido (usualmente ácido sulfúrico al 1 ó 5%) a alta temperatura (120°C) por corto tiempo (50 min), o concentrado (77%) a menor temperatura (30°C) con la finalidad de degradar el material lignocelulósico en plantas; sin embargo se ha reportado como procedimiento recomendado en algas[45]. Luego del pre tratamiento el material se somete a hidrólisis enzimática o sacarificación para la fragmentación de los polisacáridos complejos en azúcares capaces de ser utilizados por microorganismos en la fermentación. La condición del pre tratamiento se exploró como motivo de búsqueda de un control para cálculo de rendimiento: se agregó ácido diluido 1% en el solvente de extracción por la metodología propuesta por Rodríguez-Bernaldo de Quirós [33], la cual consiste en metanol-agua-ácido acético (30-69-1) descrita en detalle en capítulo 2 de Materiales y Métodos, que es una condición de hidrólisis levemente ácida. Además se utilizó otro ensayo reemplazando ácido acético por ácido sulfúrico, también al 1%. La metodología propuesta por Rodríguez-Bernaldo de Quirós [33] arrojó mediciones de fenoles totales de 400,1 [mg GAE/100 g ps] para *M. pyrifera* y 155[mg GAE/100 g ps] para *U. rigida* mientras que la hidrólisis fuerte arrojó mediciones de 150[mg GAE/100 g ps] y 45[mg GAE/100 g ps] respectivamente. Estos resultados indican una disminución de la cantidad de fenoles totales recuperados realizando extracción de antioxidantes posterior al preparamiento con ácido fuerte aproximadamente un 60% menor a lo extraído con un ácido débil o sin ácido según la metodología propuesta en el presente estudio.

3.9. Mejores condiciones

Resumiendo, el conjunto de mejores condiciones de extracción se seleccionó en base a la correlación entre cantidad de polifenoles totales y actividad antioxidante como primera selección. Entre ellas se optó por aquellas condiciones que utilizan menor tiempo de extracción, menor temperatura y menor cantidad de fracción líquida, con la finalidad de obtener condiciones que economicen recursos como energía y solvente, sin afectar significativamente las cantidades y actividades obtenidas. Fueron de gran ayuda para estos efectos los grupos seleccionados mediante el Análisis de Componentes Principales. En base a lo anterior los mejores dos conjuntos de condiciones se presentan en la Tabla 6 para ambas algas. Los resultados seleccionados privilegiaron una mayor actividad de los extractos aunque el rendimiento de extracción fuese algo menor, con el objeto de analizar la presencia de compuestos más purificados, resultados que podrían ser corroborados con los análisis HPLC – MS en estudios posteriores. El alga con mayor cantidad y actividad de antioxidantes extraídos fue *Macrocystis pyrifera*, seleccionándose como mejor fuente de polifenoles antioxidantes. Las condiciones que entregan una mayor cantidad de antioxidantes polifenólicos ($374,4 \pm 27,4$ [mg GAE/100gPS]) y mayor actividad (84,9 % inhibición de oxidación al

radical DPPH) fueron en solvente etanol al 75%, relación sólido-líquido de 1:10 P/temperatura de extracción de 37°C por 180 minutos (destacado en negrita en Tabla 6)

La cantidad de azúcares reductores presentes en las muestras seleccionadas aporta una idea de la calidad de los polisacáridos luego del proceso de extracción. La presencia de este tipo de azúcares en los extractos etanólicos es una condición indeseada dado que los mismos dejan de estar disponibles para futuros pasos de fermentación de la biomasa, además de afectar la cuantificación de fenoles totales en el test Folin-Ciocalteu. Sin embargo, este mismo proceso puede ser utilizado como un pre tratamiento en condiciones menos agresivas que los tradicionales para los pasos de fermentación en la obtención de biocombustibles desde algas. Bajo las mejores condiciones seleccionadas como mejor tratamiento en el presente estudio, no se detectó la presencia de azúcares reductores, tal como se planteó en los objetivos específicos.

Si bien el rendimiento con respecto al control pudo llegar al 94 % la cantidad recuperada es insuficiente para aplicaciones industriales con antioxidantes como único producto y muy por debajo del máximo teórico encontrado en otras algas pardas (20% del peso seco del alga para algunos casos). La literatura indica que la presencia de florotaninos en *M. pyrifera* es baja, sin embargo no reporta cifras, dificultando la comparación. En el caso de *M. pyrifera* éste llegó a ser 0,4% del peso seco del alga, mientras que en *Ulva rigida* 0,1% del peso seco del alga.

Tabla 6. Mejores condiciones de extracción de polifenoles identificadas en este trabajo.

alga	solvente	T°	Tiempo [min]	Relación solido/liquido [g/ml]	Fenoles totales [mg GAE/100gPS]	Inhibición DPPH* [%]	Rendimiento [%]	Azúcares reductores [g glucosa/100gPS]
<i>M.pyrifera</i>	ETOH25%	25°C	180	1:100	208,2 ± 2,5	81,4	52	ND
<i>M.pyrifera</i>	ETOH75%	37°C	180	1:10	374,4 ± 27,4	84,9	94	ND
<i>U.rigida</i>	ETOH75%	25°C	50	1:10	83,8 ± 4,3	79,5	54	ND
<i>U.rigida</i>	ETOH75%	37°C	180	1:10	87,3 ± 2,8	79,3	56	ND

3.10. Aspectos económicos de la extracción de antioxidantes en *Macrocystis pyrifera*.

Un aspecto importante de analizar en el presente estudio es la forma en que la metodología propuesta puede integrarse en un proceso de biorefinería. Por este motivo es interesante calcular cuánta biomasa de macroalgas es necesaria para sostener una producción de antioxidantes de carácter industrial. Brevemente se analizará económicamente la producción conjunta de antioxidantes y etanol en un esquema simple de biorefinería con miras a la factibilidad de su aplicación industrial y no constituye una evaluación económica detallada.

Las industrias con posibles aplicaciones de antioxidantes incluyen nutraceuticos, cosméticos, farmacéuticos, alimentos, cuya principal diferencia radica en la concentración y purificación del antioxidante utilizado. La demanda de antioxidantes en cada una de estas industrias es distinta y depende de las características del producto final al cual serán aplicados estos antioxidantes, incluso muchos productos utilizan combinaciones de antioxidantes u otros aditivos. Los antioxidantes más utilizados en la industria de alimentos utilizan concentraciones entre 100 y 200 mg/kg de alimento procesado con un grado de pureza mayor al 95% del compuesto, mientras que para aplicaciones de nutraceuticos y alimentos funcionales se utilizan purezas que van desde 10-45% y dosis de 200-400 mg /g en el caso de cápsulas nutraceuticas[44]. Un compuesto nutraceutico puede definirse como “un suplemento dietético, presentado en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), de una sustancia natural bioactiva concentrada, presente usualmente en los alimentos y que, tomada en dosis superior a la existente en esos alimentos, presumiblemente, tiene un efecto favorable sobre la salud mayor que el que podría tener el alimento normal” [44]. Dado que existen antecedentes en la literatura acerca de las diversas bioactividades de los florotaninos de algas pardas, algunos de los cuales poseen pruebas en modelos animales, es posible utilizarlos como excelentes candidatos a compuestos nutraceuticos con doble funcionalidad (antioxidante, antibacteriano, antidiabetes, etc.)[44].

El mejor rendimiento de extracción explorado es 374,4 [mg/100 g ps] de alga *Macrocystis pyrifera*, por lo que para producir 1 kg GAE de antioxidante es necesario procesar 267,1 kg de alga seca (0,4% rendimiento másico de alga seca)

La producción de etanol tiene por literatura rendimientos de 0,1 g etanol/g biomasa, lo que procesando la cantidad anterior da como resultado la obtención de 26,7 kg de etanol.

Una planta pequeña de algas produce aproximadamente 15 ton /año (peso seco) [45], por lo que los rendimientos para antioxidante y etanol con esta cantidad de materia prima es de 550 kg y 1.500 kg respectivamente. En el caso de la producción de antioxidantes esta cantidad es suficiente para sostener una producción industrial del producto dado que la utilización es en pequeñas cantidades, dejando una gran cantidad de biomasa que se puede tratar para la obtención de biocombustibles.

Mercado global de antioxidantes polifenólicos

El mercado global de polifenoles fue avaluado en 580 millones de dólares el 2011 y se espera que crezca a 873,7 millones de dólares para el 2018 a una tasa de crecimiento del 6,1 %. En términos de volumen el consumo mundial fue de 12.200 toneladas el 2011 y se espera aumenten a 21.000 para el 2018. En particular, el mercado de polifenoles como antioxidantes para diversas industrias está dominado por los derivados de semilla de uva (50% del mercado) seguido de extractos de té verde y manzana (32 % entre ambos). El 18% restante se lo reparten los polifenoles de oliva, granada, cacao y otras fuentes, muchas de las cuales poseen una participación menor al 1% en el mercado [45]. Las bebidas funcionales son el segmento más grande de aplicaciones de los polifenoles y representaron el 44% de la demanda total de polifenoles durante el 2011, seguido de los alimentos funcionales con más del 33 % del consumo total el 2011. La demanda de polifenoles para suplementos dietéticos fue 2.056 toneladas en 2011 y se espera que crezca a una tasa compuesta anual del 7,8 % a partir de 2012 al 2018. En términos de volumen, se espera que las bebidas funcionales sean el segmento de más rápido crecimiento a una tasa compuesta anual estimada de 8,5 % a partir de 2012 al 2018.

La región Asia-Pacífico representó el 40,3 % de la demanda global en polifenoles el 2011, seguido de Europa con el 27,8 %. Se espera que la demanda de polifenoles para América del Norte pueda llegar a 5,294.3 toneladas el 2018. También se proyecta que Asia-Pacífico sea el segmento de consumo con más rápido crecimiento a una tasa del 8,8% entre 2012 y 2018.

El mercado de polifenoles globales está altamente concentrado, con tres principales empresas que reúnen más del 80 % del total del mercado. Naturex representó más del 35% del total del mercado el 2011. Algunas de las otras empresas que operan en el mercado global son ADM, Ajinomoto Omnicem Natural Specialities, Chr.Hansen, Diana Natural, DSM, DuPont-Danisco, Frutarom , FutureCeuticals , Indena , LaynNatural, Martin Bauer, Sabinsa Corporation , Tianjin Jianfeng Natural Products y Prinova[45].

*Producción actual de *M.pyrifera* en Chile*

Según estadísticas de operación SERNAPESCA para concesiones de Huiro (entre las que se cuenta *M.pyrifera*) por región para el periodo 2010-2011 en Chile [46], éstos se concentran en la III (destinadas a alimentación de abalón) y X región (destinadas a biocombustibles).

En la X región se cultivan alrededor de 470 toneladas de algas al año, lo cual utilizando los niveles de rendimientos determinados en esta memoria, permitirán obtener una producción anual de 1,88 toneladas de antioxidantes polifenólicos que representa el 0,015% de la producción mundial al año 2011 (ver detalles en anexo 5) . En la Subsecretaría de Pesca existen solicitudes por más de 8.000 ha de cultivo de *M.pyrifera* asociadas al proyecto de biocombustibles de BAL, Ltda., lo cual posicionaría la producción chilena de polifenoles (y bioetanol) de forma competitiva en el mercado mundial. La producción al año 2011 en la X región contempla el cultivo de unas 29 ha. Escalando si las solicitudes para biocombustibles son otorgadas, se obtendrían 518,6 toneladas de antioxidantes que representarían un 4,2% de participación en el mercado global. Este escenario representa una importante posición para el país a nivel de competitividad internacional en un mercado creciente

y con gran cantidad de productos orientados al sector alimentario, principalmente nutraceuticos y alimentos funcionales. Si bien un 4,2% de participación global en el mercado de antioxidantes es ambicioso, no es imposible de lograr con una adecuada concesión de hectáreas de cultivo de *M.pyrifera* no solo en la X región sino también considerando la XI y XII como ya ocurre en la acuicultura de salmón. Estas concesiones, por otro lado plantean un nuevo desafío de sustentabilidad y manejo ambientalmente responsable por parte de las empresas y la autoridad, quién ya encargó estudios para evaluar el impacto ambiental y sanitario del cultivo masivo de algas y la prohibición de entrada de nuevas concesiones hasta el año 2015 en la X región [46]. Es necesario también incluir este cultivo adecuadamente en la normativa acuícola (Ley General de Pesca y Acuicultura) con la importancia que realmente le merece.

4. Recomendaciones

A continuación se resumen las recomendaciones planteadas en el análisis además de algunas mejoras en la recuperación de los antioxidantes.

4.1. Condiciones de extracción

Tamaño de partículas

Se recomienda utilizar las algas lo más pulverizadas posible y de ser necesario separar frondas de estipes antes de la molienda, ya que dado la posición física de las mismas, la mayor concentración de productos fotosintéticos y por ende la mayor parte de tejido expuesta a la acción oxidante de la luz solar se encuentra en esta parte de la planta (ver anexo 2), lo cual ha mostrado en la literatura influir en la inducción de producción de polifenoles [44].

Las fracciones de mayor tamaño mostraron cualitativamente formar gel al hidratarse dificultando la separación del sobrenadante. La disminución del tamaño de partícula permitiría un mayor acceso del solvente a los antioxidantes mejorando la recuperación de compuestos. En aplicaciones industriales se requeriría la implementación de un equipo de molienda, como puede ser un molino de bolas.

Precipitación de moléculas interferentes

Se recomienda una etapa de precipitación y eliminación de moléculas que pudieran alterar las mediciones de antioxidantes, para ello es posible incluir una etapa de lavado con n-hexano para eliminar lípidos, previo a la extracción. Para eliminar polisacáridos y proteínas comúnmente se realiza precipitación en etanol puro a 4°C posterior a la etapa de extracción [26].

Prevenir la oxidación durante la extracción

Para tiempos de extracción de una hora o más la oxidación de los compuestos extraídos podría evitarse añadiendo ácido ascórbico u ácido cítrico durante el tratamiento [33], sin embargo también es posible utilizar tiempos cortos durante la extracción empleando mayores temperaturas.

Agregar etapa de filtración

Los florotaninos de algas pardas, posiblemente responsables de gran parte de la actividad medida en los extractos de *M.pyrifera* poseen una distribución de tamaños entre 400-400.000 Da, por lo que el uso de microfiltros con tamaños adecuados para seleccionar estos compuestos permitiría la obtención de extractos purificados con la actividad buscada [33].

4.2. Uso de test adicionales

Uso de cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)

Como forma de validar la extracción de los compuestos deseados a los cuales atribuir la actividad antioxidante medida se recomienda la realización de un ensayo de HPLC para las muestras seleccionadas con mejor desempeño. Por motivos de tiempo los ensayos de HPLC enviados a análisis a laboratorio externo no se obtuvieron en la presente investigación, sin embargo esos resultados podrían enriquecer la discusión en cuanto a los compuestos polifenólicos encontrados en los extractos de algas, así como servir de etapa de purificación de los mismos en estudios posteriores. El tipo de cromatografía recomendado y más utilizado corresponde a un HPLC - MS (Cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de masas) en una columna C18.

4.3. Utilización de mejoras en la recuperación

El uso de grandes cantidades de solvente para la extracción de compuestos bioactivos se ha reportado como uno de los principales problemas de esta metodología [44,47], para lo que se han propuesto soluciones que van desde la optimización de la recuperación de compuestos en un solo paso utilizando conjuntamente ultrasonido, enzimas y las condiciones de extracción como temperatura y tiempo, hasta la utilización de solventes inocuos como CO₂ o fluidos supercríticos y equipamiento especializado [44,47]. En este sentido se recomienda el uso conjunto de ultrasonido y enzimas aisladas de bacterias que hidrolicen la pared de algas pardas, la que al ser más complejas pueden mejorar la recuperación permitiendo un mayor acceso del solvente a los compartimientos donde se encuentran los antioxidantes.

En general, las concentraciones de florotaninos en las algas pardas han sido determinadas en más del 2% en zonas templadas y tropicales del Atlántico y Regiones templadas del Pacífico. En algunos casos, estos pueden acumularse hasta un 25-30% del peso seco del talo o fronda (estructura similar a las hojas en plantas superiores). En algas, se conoce que los florotaninos existen en forma soluble o enlazada a la pared celular. Los florotaninos solubles se almacenan en las membranas unidas a vesículas llamadas fisoides. Cuando los fisoides se fusionan con las paredes celulares, los florotaninos forman un complejo con el ácido algínico presente en la pared celular [44]. Dado estos antecedentes se han utilizado enzimas que degradan parcialmente ácido algínico (alginato liasas) y otros compuestos polisacáridos de la pared de algas, además de proteasas [36,57]. Algunos ejemplos utilizados en algas pardas y verdes se presentan en Tabla 7.

Tabla 7. Enzimas utilizadas para extraer antioxidantes en algas. Basado de [36]. ND: información no disponible

Tipo de alga	especie	Enzima(s) utilizada(s)	Bioactividad de extracto
verde	<i>Ulva pertusa</i>	Enzimas digestivas obtenidas del intestino de abalón	ND
	<i>Ulva armoricana</i>	Endo-peptidasa, endo-proteasa, celulasa, xylanasa,	ND

	<i>Ulva rotundata</i>	β -glucanasa, arabanasa (todas comerciales)	
parda	<i>Laminaria japonica</i>	Un extracto de intestino de abalón, además de la misma mezcla enzimática utilizada para las algas verdes	ND
	<i>Sargassum horneri</i>	carbohydrazas y proteasas Comerciales	antioxidante
	<i>Scytosiphon lomentaria</i>	carbohydrazas y proteasas Comerciales	Antioxidante
	<i>Ecklonia cava</i>	proteasas	Antioxidante
	<i>Hizikia fusiformis</i>	Alcalasa y ultraflo (enzimas comerciales)	Antioxidante

5. Conclusiones

Se logró diseñar satisfactoriamente un proceso de extracción de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante, desde las macroalgas *Ulva rígida* y *Macrocystis pyrifera* minimizando la degradación de los azúcares que éstas contienen.

Se seleccionó el alga parda *Macrocystis pyrifera* como fuente de antioxidantes entre las algas tratadas, con un rendimiento de polifenoles de 0,4 % del peso seco del alga utilizada y una actividad antioxidante de 85% de inhibición de la oxidación del radical DPPH sin detección de azúcares reductores en el extracto obtenido.

Se obtuvo las mejores condiciones de extracción para ambas algas las cuales se resumen a continuación, donde además se muestra la ausencia de azúcares reductores en el extracto obtenido, según lo planteado en los objetivos:

Tabla 8. Mejores condiciones de extracción *M.pyrifera* y *U. rigida*

alga	solvente	T°	Tiempo [min]	Relación solido/liquido [g/ml]	Fenoles totales [mg GAE/100gPS]	Inhibición DPPH* [%]	Rendimiento [%]	Azúcares reductores [g glucosa/100gPS]
<i>M.pyrifera</i>	ETOH75%	37°C	180	1:10	374,4 ± 27,4	84,9	94	ND
<i>U.rigida</i>	ETOH75%	25°C	50	1:10	83,8 ± 4,3	79,5	54	ND

Las variables con mayor influencia en la obtención de una gran cantidad de compuestos polifenólicos fueron el tiempo de extracción y la polaridad del solvente para ambas algas, determinados según el análisis de componentes principales. En el caso de *M.pyrifera* se favoreció la extracción a mayores tiempos de extracción mientras que para *U. rigida* los mejores resultados se obtuvieron en 50 minutos de extracción. Esta diferencia se debe a la mayor complejidad de la pared celular de *M.pyrifera*. El método desarrollado sirve como primera aproximación al potencial del alga parda como fuente de antioxidantes industriales y pueden utilizarse como punto de partida en un proceso de optimización.

Con el objetivo de mejorar la actividad antioxidante y la obtención de extracto más puros se recomiendan seleccionar el tamaño de partícula de las muestras a tratar, la eliminación de moléculas interferentes como lípidos y polisacáridos previo a la extracción en solvente y una etapa de filtración posterior a la misma. Para aumentar el rendimiento de los polifenoles extraídos se recomienda la utilización de enzimas como alginato liasas y proteasas durante la extracción.

A pesar del bajo rendimiento másico de los polifenoles extraídos, es posible combinar la producción de los antioxidantes y etanol debido a la gran cantidad de biomasa procesada para la obtención de una producción industrial. La producción actual de *M.pyrifera* en la X región del país permite la obtención de 1,88 toneladas de antioxidantes polifenólicos desde el alga, representando un 0,015% del mercado global de polifenoles al año 2011.

6. Bibliografía

- [1] Frikha F. et al. "Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Tunez". *Ciencias Marinas* (2011) ,37(2):113-124
- [2] van Hal, J."ECN. Presented at the 4th International Algae Congress, 1- 2 December 2010, Amsterdam, the Netherlands
- [3] Lenstra J. et al "Economic perspectives of seaweed". ECN. Presented at the 4th International Algae Congress, 1- 2 December 2010, Amsterdam, the Netherlands
- [4] Instituto de fomento pesquero, algas pardas [en línea] <www.ifop.cl/wp-content/uploads/recursos_amerb/Algas_2012.pdf> [consulta: 20 julio 2013].
- [5] Mumtaz A. "Algas, crece la demanda" *Acqua*. Febrero 2011.92-95
- [6] Gupta S. et al. "Bioactive potencial and posible health effects of edible Brown seaweeds". *Trend in Food Science and Technology* 22(2011) 315-326
- [7] Edwards M. "Green Algae Strategy .End Oil Imports and Engineer Sustainable Food and Fuel" (2008) Mark R. Edwards .257p
- [8] Gupta S., Abu-Ghannam N." Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods". *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12(2011)600-609
- [9] Astorga M. et al." Origin, diversification, and historical biogeography of the giant kelps genus *Macrocystis*: Evidences from Bayesian phylogenetic analysis" *Revista de Biología Marina y Oceanografía*.(2012)Vol. 47, N°3: 573-579
- [10] Aulados, Botánica. Algas [en línea] <http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas/4_Algas_texto.pdf> [consulta: 20 julio 2013].
- [11] Aulados, Botánica. Phaeophytas (algas pardas) [en línea] <http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_pardas/7_Phaeophyta_texto.pdf> [consulta: 20 julio 2013].
- [12] Wei N, et al." Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals" *Trends Biotechnol.* 2013 Feb; 31(2):70-7
- [13] Acuariofilia. Algas rojas, Rodofitos [en línea] <<http://www.acuariofilia.net/tipos-dealgas/algas-rojas-rodofitos.html>> [consulta: 20 julio 2013].

- [14] Aulados, Botanica. Rhodophytas (algas rojas) [en línea] <
http://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_rojas/8_Rhodophyta_texto.pdf>
[Consulta: 20 julio 2013].
- [15] Aulados, Botanica. Chlorophytas (algas verdes) [en línea]
<www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_verdes/9_Chlorophyta_texto.pdf>
[Consulta: 20 julio 2013].
- [16] Burg, S. van den et al. "A triple P review of the feasibility of sustainable offshore seaweed production in the North Sea". 2012, Wageningen, Wageningen UR (University and Research Centre). LEI report 13-077.106 pag.
- [17] Subhadra B. et al." Algal biorefinery-based industry: an approach to address fuel and food insecurity for a carbon-smart world" *Journal of the Science of Food and Agriculture* 15(1), (2010)2-13
- [18] Cherubini F. et al." Modeling and Analysis: Biorefinery classification" .*Biofuels, Bioprod. Bioref.* 3(5): 534 - 546 (2009)
- [19] Van Iersel et al. "Algae-based biofuels: applications and co-products" *FAO Environmental and Natural Resources Service Series*, No. 44 – FAO, Rome 2010.117 p.
- [20] van Hal, J. et al. "More than sushi and agar. Developing a seaweed biorefinery". 9th European Congress of Chemical Engineering, 25 April 2013, The Hague
- [21] Stengel D., Connan S., Popper Z." Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application". *Biotechnology Advances* 29 (2011) 483–501
- [22] Vinay N. et al". Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae" *environmental toxicology and pharmacology* 32 (2011)325–335
- [23] Nwosu F. et al. "Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae" *Food Chemistry* 126 (2011) 1006–1012
- [24]. Garrido D., Parada R." Propiedades antioxidantes y funcionales de cinco algas chilenas Sobre la calidad de pasta de salmón". (2012) Memoria para optar al título de ingeniero en alimentos, Universidad de Chile.123 p.
- [25] Zhang Z, et al." In vitro antioxidant activities of acetylated, phosphorylated and benzoylated derivatives of porphyran extracted from *Porphyra haitanensis*". *Carbohydrate Polymers* 78 (2009) 449–453
- [26] Wijesekara I." Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae" *Carbohydrate Polymers* 84 (2011) 14–21

- [27] Kindleysides S. et al. "Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts" *Food Chemistry* 133 (2012) 1624–1631
- [28] Balboa e. et al "In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae" *Food Chemistry* 138 (2013) 1764-1785
- [29] Andrade P. et al." Valuable compounds in macroalgae extracts".*Food Chemistry* 138 (2013) 1819–1828
- [30] S-H Eom et al, antimicrobial effect of phlorotannins from marine Brown algae, *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012) 3251-3255
- [31] Anaëlle T. et al." Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model". *Talanta* 104 (2013) 44–52
- [32] Tierney M. et al "Enrichment of polyphenol contents and antioxidant activities of Irish brown macroalgae using food-friendly techniques based on polarity and molecular size" *Food Chemistry* 139 (2013) 753–761
- [33] Rodríguez-Bernaldo de Quirós A. et al. " Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption" .*Food Chemistry* 121 (2010) 634–638
- [34] Azmir, J. et al" Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review" *Journal of Food Engineering* 117 (2013) 426–436
- [35]Herrero, M. et al "Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds" *Trends in Analytical Chemistry*, (2013) Vol. 43.67-83
- [36] Wijesinghe W. et al "Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review" *Fitoterapia* 83 (2012) 6–12
- [37]Ignat I.et al."A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables" *Food Chemistry* 126 (2011) 1821–1835
- [38] Vásquez J. et al." Economic valuation of kelp forests in northern Chile: values of goods and services of the ecosystem" (2013) *J Appl Phycol.*8 p
- [39] Trigui M. et al." Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential" *Journal of Applied Phycology* (2013), 25(1) pp 319-328
- [40]Gopal G. et al"Biochemical composition and lipid characterization of marine green alga *Ulva rigida*-a nutritional approach".*J. of Algal Biomass Utln.* (2011), 2(4):10-13

[41] Wu Y, et al. "Diseño robusto utilizando los métodos Taguchi". Ediciones Díaz de Santos. (1996)293 pag.

[42] Westermeier R. et al. "Variations of chemical composition and energy content in natural and genetically defined cultivars of *Macrocystis* from Chile" *Journal of Applied Phycology*. (2012), Volume 24, Issue 5, pp 1191-1201.

[43] Camo software AS. "The Unscrambler. Methods". Camo software AS, (2006). 278 p.

[44] Dominguez, H. et al. "Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals". Woodhead Publishing Limited, 2013, 754p.

[45] Polyphenols Market by Product (Grape seed, Green tea, Apple and Others), by Application (Functional beverages, Functional food, Dietary supplements and others) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2012 – 2018 (Mercado polifenoles) [en línea] <<http://www.transparencymarketresearch.com/polyphenol-market.html>> [consulta: 22 abril, 2014]

[46] Situación de la acuicultura de algas, 3 y 4 de diciembre de 2012. Pontificia Universidad Católica de Chile. Subsecretaría de pesca, Gobierno de Chile. 36 p.

[47] Pandey, A. et al. "Biofuels from algae". Elsevier (2014). 338 p.

[48] Tello-Ireland, C. et al. "Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*" *LWT - Food Science and Technology* 44 (2011) 2112-2118.

[49] Parys, S. et al. "Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae)". (2009), *Eur. J. Phycol.*, 44, 331–338.

[50] Connan, S. et al. "Influence of day–night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds" *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 349 (2007) 359–369

[51] Adams, J. "Seasonal variation in the chemical composition of the bioenergy feedstock *Laminaria digitata* for thermochemical conversion". *Bioresource Technology* 102 (2011) 226–234

[52] Conama. "Biodiversidad de Chile. Patrimonio y desafíos" (2008), tercera edición. 640p

[53] Seaweed industry association, seaweed [en línea] <<https://seaweedindustry.com/seaweed/type/macrocystis-pyrifera>> [consulta :2 diciembre 2013]

[54] Seaweed industry association, seaweed [en línea] <<https://seaweedindustry.com/seaweed/what-is-seaweed>> [consulta :2 diciembre 2013]

[55] Seaweed industry association, seaweed [en línea] <<https://seaweedindustry.com/seaweed/type/ulva-rigida>> [consulta :2 diciembre 2013]

[56] Edwards, M. et al. "Macroalgae fact-sheets". ISRG. Ryan Institute, 2012, 40p.

[57] Hardouin K. et al. "Biological activities of *Ulva sp.* enzymatic hydrolysates: relation between observed activities and composition of extracts". Abstracts. 21 International Seaweed Symposium April 21–26, 2013 Bali, Indonesia: 131

[58] Singleton V.L. y Rossi J.A jr. "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungsti acid reagents "(1965) Amer.J.Enol.Viticult.16:144-58,

[59] Von Gadow et al., "Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), r-Tocopherol, BHT, and BHA". J. Agric. Food Chem. (1997), 45,632-638.

7. Anexos

Anexo N°1

Exportaciones de algas chilenas.

TIPO DE PRODUCTO	CANTIDAD (t netas)			MONTO (miles de US\$ FOB)			PRECIO (US\$/kg FOB)		
	2009	2010	Var. (%)	2009	2010	Var. (%)	2009	2010	Var. (%)
TOTAL	64.049,6	74.095,0	15,7	160.914,6	183.321,3	13,9	2,5	2,5	-1,5
ALGAS SECAS	56.160,7	65.000,9	15,7	60.641,4	70.443,1	16,2	1,1	1,1	0,4
CHASCÓN O HUIRO NEGRO	35.066,3	40.278,0	14,9	31.795,4	34.828,2	9,5	0,9	0,9	-4,6
HUIRO PALO	8.775,1	10.961,3	24,9	9.552,9	13.050,1	36,6	1,1	1,2	9,4
LUGA NEGRA	2.711,8	5.090,5	87,7	4.696,6	10.125,2	115,6	1,7	2,0	14,8
LUGA ROJA	1.766,1	1.116,2	-36,8	3.580,9	2.708,9	-24,4	2,0	2,4	19,7
OTRAS	7.554,9	-3,7	11.015,6	9.730,7	-11,7	1,4	1,3	-8,3	
PRODUCTOS DERIVADOS	7.888,9	9.094,0	15,3	100.273,2	112.878,3	12,6	12,7	12,4	-2,3
AGAR	1.985,1	2.169,6	9,3	33.329,5	36.602,5	9,8	16,8	16,9	0,5
PELILLO	1.979,1	2.169,6	9,6	33.219,1	36.602,5	10,2	16,8	16,9	0,5
CHASCA	6,0	S/E	N/C	110,4	S/E	N/C	18,4	N/C	N/C
POLÍMERO NATURAL	785,6	1.082,7	37,8	12.506,3	17.045,2	36,3	15,9	15,7	-1,1
CHASCÓN O HUIRO NEGRO	785,6	1.082,7	37,8	12.506,3	17.045,2	36,3	15,9	15,7	-1,1
COLAGAR	33,0	170,8	417,5	165,7	743,7	349,0	5,0	4,4	-13,3
PELILLO	33,0	170,8	417,5	165,7	743,7	349,0	5,0	4,4	-13,3
CARRAGENINA	4.506,9	4.997,9	10,9	47.727,5	50.552,9	5,9	10,6	10,1	-4,5
LUGA LUGA	4.505,4	4.997,9	10,9	47.719,8	50.552,9	5,9	10,6	10,1	-4,5
ALGAS S/E	1,5	S/E	N/C	7,7	S/E	N/C	5,1	S/E	N/C
ALGINATOS I	578,3	673,1	16,4	6.544,2	7.933,9	21,2	11,3	11,8	4,2
CHASCÓN O HUIRO NEGRO	578,3	673,1	16,4	6.544,2	7.933,9	21,2	11,3	11,8	4,2

1/ Incluye Ácido Algínico, Alginato de Sodio y Alginato de Potasio.

Figura 2. Exportaciones algas chilenas 2009,2010.

Anexo N°2

Macrocystis pyrifera

Esta alga parda presenta una distribución geográfica que incluye ambos hemisferios localizándose principalmente a lo largo de las costas del Pacífico en América del norte y del Sur, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda. En Chile se encuentra desde Tocopilla hasta el Cabo de Hornos, sus poblaciones forman cordones continuos paralelos a la costa, de hasta 100 metro de ancho, habitando preferentemente zonas protegidas y semiprotegidas del oleaje. La especie se caracteriza por formar densos bosques con ejemplares de hasta 30 metros de longitud, creciendo fijas al sustrato mediante un granpón o disco adhesivo de hasta 40 cm de diámetro y 35 cm de altura [52]. Este espécimen juega un rol principal ecológico productivo, siendo la base de la cadena trófica (como otras grandes algas pardas del género *Lessonia*, *Durvillacea* y *Macrocystis*) en ambientes marinos al ser alimento de moluscos y peces herbívoros. Además sirve de sustrato, lugar de refugio, de asentamiento larval y crianza de juveniles para invertebrados y peces [52].



Figura 3. *Macrocystis pyrifera* en su ambiente natural. a. muestra la gran longitud que puede alcanzar el alga. b. muestra el detalle de los aerocistos y comienzo de las frondas del alga.[53]

Las algas tienen muchas formas diferentes, pero hay algunos términos para describir las diferentes partes comunes a muchos tipos de algas. Las algas no tienen raíces que transportan agua y nutrientes como las plantas terrestres. En cambio, poseen un "disco adhesivo" que ancla las algas a un sustrato. Los "hapterios" similares a dedos pueden ser parte del disco adhesivo, asegurando el alga contra corrientes muy fuertes y rompeolas. Las algas absorben gases, minerales y nutrientes

directamente de las aguas que las rodean en vez de a través de las raíces y los tejidos internos, y la fotosíntesis utilizando clorofila. Muchas, pero no todas las algas marinas tienen un " estipe", que corresponde al tallo en las plantas terrestres, y puede haber estipes o láminas o frondas (símil a hojas de las plantas) que se extienden ya sea desde un estipe o directamente desde el disco adhesivo. [54]

Basándose en la descripción anterior, esta alga presenta 4 o 5 estipes ramificados cerca del disco adhesivo, Láminas inclinadas largas se desarrollan en intervalos irregulares a lo largo de cada estipe, con un solo aerocisto ovalado y alargado (vejiga llena de gas) en la base de cada lámina (ver figura 2). Estos ayudan a mantener las algas en posición vertical, lo que maximiza la cantidad de luz del sol que las hojas reciben. Las palas aplanadas, que se desarrollan a través de la separación de una pequeña hoja terminal, son onduladas o arrugadas con dientes marginales, y pueden crecer hasta 70 centímetros de longitud. Las frondas de *Macrocystis pyrifera*, especialmente hojas maduras que están cerca de la superficie, tienen las más altas tasas de fotosíntesis mientras que los discos de fijación no realizan fotosíntesis. Los estipes unidos a las frondas contienen tubos cribosos, que son estructuras que transportan los productos de la fotosíntesis y minerales en una forma análoga a los movimientos de la savia de las plantas vasculares. A través del uso de los tubos cribosos, productos fotosintéticos en exceso pueden moverse hacia abajo a las porciones basales de poca luz del alga donde se necesitan. Estructuras reproductivas llamadas esporófilos están situados justo encima del disco adhesivo. [54]

Ulva rigida

Ulva rigida es un alga de color verde brillante, del género ulvales, con una variedad de formas de crecimiento conocidas comúnmente como lechugas de mar (todas comestibles). Las hojas laminares poseen dos capas de células y pueden crecer en forma de pequeñas hojas que forman céspedes parecidas a una alfombra, o como racimos de varias hojas grandes, o en solitario. En su forma más grande, *Ulva rigida* puede alcanzar hasta 10 centímetros de altura, pero el tamaño y la forma de la hoja son a la vez altamente variable. Las láminas pueden ser planos o con volantes, a veces teniendo muchos pequeños agujeros (perforaciones). Sin embargo, las características definitorias de *Ulva rigida* son comunes entre todas las formas de crecimiento: las dos capas de células de las hojas son fácilmente separables, y los discos de fijación se componen de muchas rizoides pequeñas y oscuras que están ausentes en otras especies de *Ulva*. *Ulva rigida* es común en aguas intermareales y submareal somera, a menudo se encuentran en pozas. Esta alga es capaz de soportar la alta variación en la salinidad y química del agua y en realidad parece preferir zonas con aporte de agua dulce, con una distribución mundial en los mares templados y cálidos. *Ulva rigida*, como todas las especies de *Ulva*, es un colonizador temprano, de rápido crecimiento. Si se mantiene bajo control por la herbívora y el agua limpia, *Ulva rigida* es un importante productor primario en los ecosistemas intermareales. Sin embargo, cuando los niveles de nutrientes se incrementan, a menudo debido a la contaminación, *Ulva rigida* puede crecer a niveles molestos y formar floraciones de macroalgas denominadas " mareas verdes" [55]. Existen estrategias de reproducción para estas algas en consumo humano y como biofiltro en piscicultura [56]



Figura 4. *Ulva rigida* sobre roca.[45]

Un análisis proximal realizado a las muestras de algas utilizadas, da cuenta del aporte De los principales componentes. Dentro del extracto no nitrogenado (E.N.N) se agrupan todos los nutrientes no evaluados en los ítems anteriores del análisis proximal, constituido principalmente por carbohidratos digeribles, así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados, entre los que se encontrarían los compuestos polifenólicos.

3. RESULTADOS				
PARÁMETRO	METODOLOGÍA	FECHA ANÁLISIS	UNIDAD	RESULTADO
HUMEDAD*	Gravimetría, secado a 103°Cx 3 hrs hasta peso constante (1)	08-07-2013	%	10,52
MATERIA GRASA	Hidrólisis Ácida ISP-2009 (2)(4)	07/08-08-2013	%	2,04
PROTEINA (Nx6,25)	Kjeldahl (6) (4)	14-08-2012	%	19,63
FIBRA CRUDA	Hidrólisis ácida-alcalina (4)	14/15-08-2013	%	5,10
CENIZAS*	Gravimetría, calcinación a 550° +/- 25°C x 8 hrs (1) (4)	19/20-08-201	%	16,51
EXTRACTO NO NITROGENADO	Fórmula (3) (4)	n/a	%	46,2
Kcalorias	Formula Atwater (5)	n/a	Kcl/100g	281,68

Figura 5. Análisis proximal para *Ulva rigida*. Cosecha marzo 2013

3. RESULTADOS

PARÁMETRO	METODOLOGÍA	FECHA ANÁLISIS	UNIDAD	RESULTADO
HUMEDAD*	Gravimetría, secado a 103°Cx2 hrs hasta peso constante (1)	20-08-2013	%	15,99
MATERIA GRASA	Hidrólisis Ácida ISP-2009 (2)(4)	26/27-08-2013	%	5,42
PROTEINA (Nx6,25)	Kjeldahl (5) (4)	19-08-2013	%	9,59
FIBRA CRUDA	Hidrólisis ácida-alcalina (4)	26/27-08-2013	%	7,62
CENIZAS*	Gravimetría, calcinación a 550° +/- 25°C x 8 hrs (1) (4)	20/21-08-2013	%	25,16
EXTRACTO NO NITROGENADO	Fórmula (3) (4)	n/a	%	36,22
Kcalorías	Formula Atwater (6)	n/a	Kcl/100g	232,02

Figura 6. Análisis proximal para *Macrocytis pyrifer*. Cosecha junio 2013

Anexo N°3

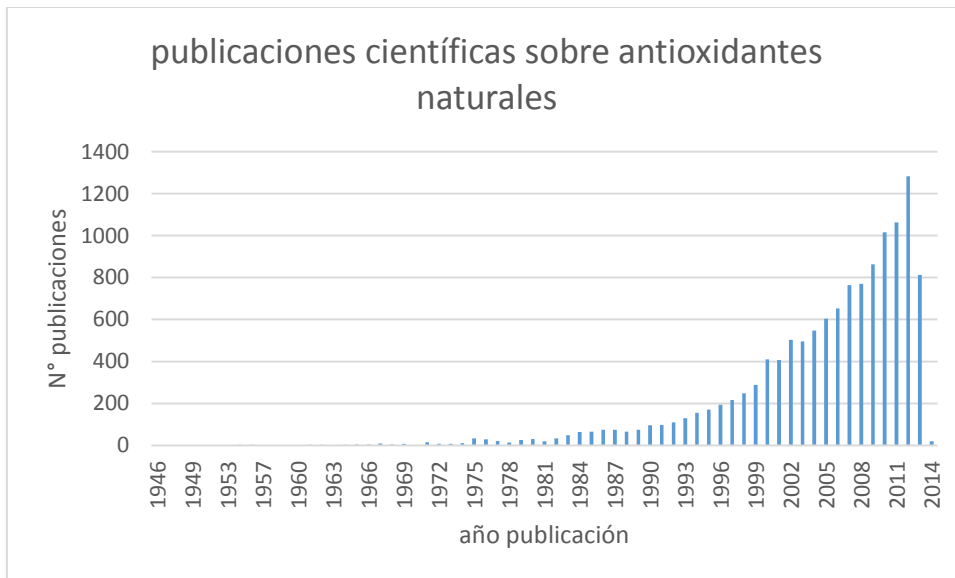


Figura 7. Número de publicaciones científicas relacionadas con antioxidantes naturales. Fuente: www.pubmed.com

Anexo 4

Preparación reactivo DNS

1. Disolver bajo agitación magnética:

3,53 [g]	3-5-ácido dinitrosalicílico
6,60 [g]	Hidróxido de sodio en pellet
472 [ml]	H ₂ O mili-Q

2. Luego agregar:

102[g]	Na-K Tartrato
2,53 [ml]	Fenol (parcialmente fundido a 50[°C] en baño María)
2,77 [g]	Metabisulfito de sodio

Guardar tapado de la luz.

Anexo 5

Cálculo participación en el mercado mundial de polifenoles

En la X región de Chile, se producen 470 toneladas al año de alga *M.pyrifera*.

El rendimiento másico máximo obtenido en la presente memoria corresponde a un 0,004% en peso de polifenoles totales. La producción anual de polifenoles de algas en la X región se calcula como:

$$470[\text{ton/año}] * 0,004\% = 1,88 [\text{ton/año}] \text{ polifenoles totales}$$

El consumo mundial de antioxidantes al año 2011 fueron de 12.200 ton. Por tanto la participación de Chile, considerando sólo la producción de la X región se calcula como:

$$\frac{1,88[\frac{\text{ton}}{\text{año}}]}{12.200[\frac{\text{ton}}{\text{año}}]} * 100 = 0,0156\%$$

Para obtener la participación esperada en el caso en que se otorguen la totalidad de concesiones de cultivo de *M.pyrifera* asociadas al proyecto BAL S.A. se realizó el siguiente escalamiento:

El área de cultivo al año 2011 correspondiente al alga parda en la X región es de 29 hectáreas, con una producción de 470 [ton/año].

Las concesiones en tramitación la SubPesca corresponden a 8.000 ha de cultivo. Si la producción por área es en promedio la misma que para el año 2011, entonces la producción escalada se calcula como:

$$\frac{8.000[\text{ha}] * 470[\frac{\text{ton}}{\text{año}}]}{29[\text{ha}]} = 129.655,17 [\frac{\text{ton}}{\text{año}}] \text{ algas}$$

$$129.655[\text{ton/año}] * 0,004\% = 518,6 [\text{ton/año}] \text{ polifenoles totales}$$

Cuya participación en el mercado global corresponde a:

$$\frac{518,6[\frac{\text{ton}}{\text{año}}]}{12.200[\frac{\text{ton}}{\text{año}}]} * 100 = 4,25\%$$