

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Caracterización química y bioquímica de la macroalga *Ulva sp* en 2
épocas del año

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Franchesca Melina Bone Murillo

Alondra Fernanda Domínguez Pilozo

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2023

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a los familiares, amigos y personas que me han alentado y apoyado a lo largo de mi desarrollo profesional y personal.

~Alondra Domínguez Pilozo

A mi abuela, mi madre y mi hermana quienes fueron los pilares fundamentales para cumplir este gran logro, a mi mejor amiga que me apoyó en cada paso y no me dejó rendirme.

A las personas especiales que aparecieron en mi camino y me acompañaron hasta el final.

-Franchesca Bone Murillo

AGRADECIMIENTOS

A Dios, familiares, amigos y a quienes formaron parte de la guía y apoyo para la culminación de este proyecto.

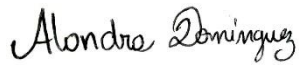
-Alondra Domínguez

A Dios que me dio la oportunidad de empezar y culminar este gran paso, a todos mis familiares y amigos quienes estuvieron presentes en el proceso, a mis compañeros académicos que me ayudaron en muchos aspectos. Al Ing. Iván Chóez y la PhD. Patricia Manzano por el tiempo, la confianza, el apoyo y la enseñanza.

-Franchesca Bone Murillo

DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Alondra Fernanda Domínguez Pilozo* y *Franchesca Melina Bone Murillo* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



Domínguez Pilozo
Alondra Fernanda



Bone Murillo Franchesca
Melina

EVALUADORES

.....
M.Sc. Nadia Flores

COORDINADOR DE LA MATERIA

.....
Q.F. Patricia Manzano, Ph.D.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

*El presente trabajo de investigación tiene como finalidad la caracterización química y bioquímica de la macroalga *Ulva sp* que crece en Puerto El Morro, durante la época seca de septiembre y época húmeda de enero para la comparación de los resultados y el análisis de la influencia del cambio climático en sus propiedades para su posible aplicación a nivel industrial, dado que, presenta un alto nivel de crecimiento en las costas ecuatorianas pero no existe información suficiente y completa dentro de Ecuador sobre su perfil químico, bioquímico y su aprovechamiento.*

Se siguieron los protocolos internos del CIBE-ESPOL para la realización de los análisis bromatológicos por métodos gravimétricos como contenido de agua, humedad, cenizas, grasas, fibra cruda, proteínas, carbohidratos y energía; también se aplica análisis químico por colorimetría para conocer el contenido de metabolitos secundarios presentes, tanto en extracto hexánico, metanólico como en acuoso mediante tamizaje fitoquímico y finalmente el análisis bioquímico por espectrofotometría que corresponde a la actividad antioxidante de los flavonoides a 415nm, fenoles a 760nm y DPPH a 517nm con extractos obtenidos por digestión acuosa, digestión etanólica 80:20 y sonicación etanólica 80:20.

*La macroalga *Ulva sp* cosechada en época húmeda presentó mejores resultados en el contenido de metabolitos primarios y secundarios, pero la mejor capacidad antioxidante correspondía a la época seca con extractos del método de digestión etanólica 80:20 seguida por la época húmeda con extractos de digestión acuosa, debido al clima Ecuador y el contacto con la luz solar, sin embargo, por el alto contenido de cenizas no puede ser implementado en industria alimenticia, pero tiene potencial para la industria cosmética y farmacéutica.*

Palabras Clave: *Extractos de la *Ulva*, tamizaje fitoquímico, actividad antioxidante, macroalga*

ABSTRACT

*The purpose of this research work is the chemical and biochemical characterization of the macroalgae *Ulva* sp that grows in Puerto El Morro during the dry season of September and the wet season of January for the comparison of the results and the analysis of the influence of climate change on its properties for its possible application at an industrial level since it presents a high level of growth in the Ecuadorian coasts but there is not enough and complete information within Ecuador on its chemical and biochemical profile and its use. Internal CIBE-ESPOL protocols were followed for carrying out bromatological analyzes by gravimetric methods such as water content, moisture, ash, fat, crude fiber, protein, carbohydrates, and energy; chemical analysis by colorimetry was applied to determine the content of secondary metabolites present, in both in hexanoic, methanolic and aqueous extracts through phytochemical screening and finally the biochemical analysis by spectrophotometry that corresponds to the antioxidant activity of flavonoids at 415nm, polyphenols at 760nm, and DPPH at 517nm with extracts obtained from the aqueous digestion method, 80:20 ethanolic digestion, and 80:20 ethanolic sonication. The macroalgae *Ulva* sp. harvested in the wet season presented better results in the content of primary and secondary metabolites, but the best antioxidant capacity corresponded to the dry season with extracts from the 80:20 ethanolic digestion method followed by the wet season with aqueous digestion extracts, due to the climate at Ecuador and contact with sunlight, however, due to the high ash content, it cannot be implemented in the food industry, but it has potential for the cosmetic and pharmaceutical industries.*

Keywords: *Ulva* extracts, phytochemical screening, antioxidant activity, macroalgae

INDICE GENERAL

EVALUADORES	4
RESUMEN	I
ABSTRACT.....	II
INDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XI
CAPÍTULO 1	12
1. Introducción.....	12
1.1 Descripción del Problema	13
1.2 Justificación del Problema	13
1.3 Objetivos.....	14
1.3.1 Objetivo General	14
1.3.2 Objetivos Específicos	14
1.4 Marco Teórico	14
1.4.1 Temporada Climática en Puerto El Morro, Ecuador	15
1.4.2 Características de la <i>Ulva sp.</i>	15
1.4.3 Componentes Químicos de la Macroalga <i>Ulva sp.</i>	16
1.4.4 Análisis Bromatológicos.....	17
1.4.4.1 Humedad	17
1.4.4.2 Cenizas	18
1.4.4.3 Proteínas.....	19
1.4.4.4 Grasas	20
1.4.4.5 Fibra Cruda.....	21
1.4.4.6 Carbohidratos	22

1.4.4.7	Energía	22
1.4.5	Análisis Químicos	23
1.4.5.1	Tamizaje Fitoquímico	23
1.4.5.1.1	Alcaloides	24
1.4.5.1.2	Flavonoides	25
1.4.5.1.3	Taninos	25
1.4.5.1.4	Saponinas	25
1.4.5.1.5	Glucósidos	25
1.4.5.1.6	Mucílagos	26
1.4.6	Análisis Bioquímicos	26
1.4.6.1	Actividad Antioxidante	26
1.4.6.1.1	Contenido Fenólico Total (TPC)	27
1.4.6.1.2	Contenido Total de Flavonoides (TFC)	28
1.4.7	Importancia y Aplicación	28
1.4.7.1	Ulva lactuca como Alimento en Ecuador	29
1.4.7.2	Ulva sp en Biorremediación	30
CAPÍTULO 2		32
2.	Metodología	32
2.1	Periodo de Cultivo y Recolección	32
2.2	Tratamiento Previo de la Ulva sp	32
2.3	Análisis Físicos	33
2.3.1	Color, Morfología y Olor	33
2.4	Análisis Bromatológicos	33
2.4.1	Ensayo de Humedad	34
2.4.2	Ensayo de Cenizas Totales	34
2.4.3	Ensayo de Grasas totales	35
2.4.4	Ensayo de Fibra Cruda	36
2.4.5	Proteínas	36
2.4.6	Carbohidratos y Energía	37
2.5	Análisis Químicos	38
2.5.1	Ensayo de Tamizaje Fitoquímico	38
2.5.1.1	Alcaloides	38
2.5.1.2	Saponinas	39
2.5.1.3	Taninos y Fenoles	39
2.5.1.4	Glucósidos y Azúcares reductores	39
2.5.1.5	Glucósidos Cardiotónicos	39

2.5.1.6	Flavonoides	39
2.5.1.7	Mucílagos y Resina	40
2.6	Análisis Bioquímicos	40
2.6.1	Obtención de Extractos	40
2.6.1.1	Digestión Acuosa.....	40
2.6.1.2	Digestión Etanólica 80%	41
2.6.1.3	Sonicación Etanólica 80%.....	41
2.6.2	Contenido Fenólico Total (TPC).....	41
2.6.3	Contenido Flavonoides Total (TFC)	42
2.6.4	Capacidad Antioxidante.....	43
Capítulo 3.....		44
3.	Resultados y Análisis.....	44
3.1	Pretratamiento y Características	44
3.2	Características físicas: Olor, Color y Morfología	46
3.3	Análisis bromatológicos	47
3.4	Tamizaje Fitoquímico	49
3.5	Actividad antioxidante	51
3.5.1	Análisis estadístico	55
CAPÍTULO 4		56
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	56
4.1	Conclusiones.....	56
4.2	Recomendaciones	57
BIBLIOGRAFÍA.....		58
ANEXOS		67
5.	Anexo 1: Recolección y limpieza de <i>Ulva sp</i>	67
6.	Anexo 2: Análisis Bromatológicos	68
6.1	Humedad – Método gravimétrico.....	68
6.2	Cenizas.....	68
6.3	Grasas	69
6.4	Fibras.....	69
6.5	Proteínas	70

7.	Anexo 3: Tamizaje Fitoquímico	71
7.1	Ensayo para Alcaloides.....	71
7.2	Ensayo para Fenoles/ Taninos	72
7.3	Ensayo para Glucósidos/azúcares reductores	73
7.4	Ensayo para Glucósidos cardiotónicos	73
7.5	Ensayo para Mucílagos.....	73
7.6	Ensayo para resinas	74
8.	Anexo 4: Análisis Bioquímico	74
8.1	Contenido Total de Fenoles (TPC)	74
8.2	Contenido Total de Flavonoides (TFC).....	75
8.3	DPPH.....	75

ABREVIATURAS

CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
DPPH	2,2- difenil-1-picril hidrazilo
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
TFC	Total Flavonoid Content (Contenido Total de Flavonoides)
TPC	Total Phenolic Content (Contenido Fenólico Total)
QE	Quercetin Equivalent
TE	Trolox Equivalent
GAE	Galic Acid Equivalent
PS	Peso seco

SIMBOLOGÍA

ml	Mililitro
mg	Miligramo
kg	Kilogramo
µg	Microgramo
pH	Potencial de Hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
FeCl ₃	Cloruro Férrico
µl	Microlitro
L	Litro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido gálico.	28
Figura 2. Principales componentes fenólicos presentes en la <i>Ulva</i>	28
Figura 3. Temperaturas del mes de cultivo durante la época seca	44
Figura 4. Temperaturas del mes de cultivo durante la época húmeda	44
Figura 5. Recolección de la <i>Ulva sp</i>	67
Figura 6. Limpieza de la <i>Ulva sp</i> en el laboratorio	67
Figura 7. <i>Ulva sp</i> en Puerto El Morro	67
Figura 8. Platillo de aluminio para secado en estufa	67
Figura 9. Conservación en bolitas para liofilización	67
Figura 10. Lavado y filtrado con agua destilada	67
Figura 11. Molido de las muestras secas.....	67
Figura 13. <i>Ulva sp.</i> después de secado en estufa.....	67
Figura 12. Secado por liofilización.....	67
Figura 14. Secado en desecador al final del proceso.....	68
Figura 15. Secado en estufa	68
Figura 16. Secado y Rotulación de capsulas de porcelana para humedad.....	68
Figura 17. Calcinación de la muestra en mufla a 750°C	68
Figura 18. Cenizas frías y pesadas.....	68
Figura 19. Rotaevaporación	69
Figura 20. Sistema Soxhlet para <i>Ulva sp</i>	69
Figura 21. Sistema Soxhlet para determinación de grasas.....	69
Figura 22. Secado en estufa a 105°C.	69
Figura 23. Muestras digeradas	70
Figura 24. Después de agregar agua destilada.....	70

Figura 25. Después de agregar hidróxido de sodio	70
Figura 26. Solución receptora de ácido bórico con indicador	70
Figura 27. Titulación	71
Figura 28. Destilación	71
Figura 29. Después de la titulación	71
Figura 30. Ensayo Dragendorft – <i>Ulva sp</i> mes de enero.....	71
Figura 31. Ensayo de Dragendorft – <i>Ulva sp</i> mes de septiembre.....	71
Figura 32. Ensayo de Wagner – <i>Ulva sp</i> mes de septiembre	72
Figura 33. Ensayo de Wagner – <i>Ulva sp</i> mes de enero	72
Figura 34. Ensayo de Mayer – <i>Ulva sp</i> mes de enero.....	72
Figura 35. Ensayo de Mayer – <i>Ulva sp</i> mes de septiembre.....	72
Figura 36. Ensayo FeCl ₃ – <i>Ulva sp</i> mes de enero	72
Figura 37. Ensayo FeCl ₃ – <i>Ulva sp</i> mes de septiembre	72
Figura 38. Ensayo Fehling- <i>Ulva sp</i> mes de septiembre	73
Figura 39. Ensayo Fehling - <i>Ulva sp</i> mes de enero.....	73
Figura 40. Ensayo Benedict - <i>Ulva sp</i> mes de enero.....	73
Figura 41. Ensayo Benedict - <i>Ulva sp</i> mes de septiembre.....	73
Figura 42. Ensayo para mucílagos - <i>Ulva sp</i> mes de septiembre	73
Figura 43. Ensayo para mucílagos - <i>Ulva sp</i> mes de enero.....	73
Figura 44. Ensayo resinas - <i>Ulva sp</i> mes de enero	74
Figura 45. Ensayo resinas - <i>Ulva sp</i> mes de septiembre	74
Figura 46. Placa para lectura	74
Figura 47. Lectura de curva estándar y muestras	74
Figura 48. Lectura de curva estándar y muestras	75
Figura 49. Placa para lectura	75
Figura 50. Placa para lectura	75
Figura 51. Lectura de curva estándar y muestras	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de cultivo reportadas para macroalgas y <i>Ulva lactuca</i>	16
Tabla 2. Análisis bromatológicos reportados de diferentes para <i>Ulva lactuca</i>	23
Tabla 3. Metabolitos secundarios reportados por el análisis de tamizaje fitoquímico	24
Tabla 4. Características de cosecha de la <i>Ulva sp</i>	45
Tabla 5 . Composición proximal de la macroalga <i>Ulva sp</i> recolectada en Puerto El Morro ..	48
Tabla 6. Análisis cualitativo de los metabolitos secundarios presentes en la macroalga <i>Ulva sp</i>	49
Tabla 7. Datos reportados de análisis bioquímico en dos épocas del año	53

CAPÍTULO 1

1. Introducción

Las macroalgas marinas son especies con estructuras multicelular macroscópica, su cultivo se concentra mayormente en océanos y, por lo general, son excelentes captadores de carbono inorgánico y, sirven como alimento y hábitat de la fauna marina (Garcia-Jimenez & Romero, 2022). Se encuentran distribuidas a lo largo del perfil continental ecuatoriano que incluye las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, El Oro y Guayas.

Las macroalgas se clasifican de acuerdo con su pigmentación y en Ecuador se registran en total 4 filum: *Rhodophyta* (rojas), *Chlorophyta* (verdes), *Ochrophyta* (pardas) y *Charophyta* (verdes) con un total de 92, 50, 24 y 1 especies por cada filum respectivamente. Debido a que el género de interés en este proyecto es *Ulva sp*, en la provincia del Guayas, Ecuador se reportan 3 tipos de Ulvas pertenecientes a la clasificación Chlorophyta: *Ulva flexuosa Wulfen 1803*, *Ulva lactuca Linnaeus 1753*, *Ulva lactuca Linnaeus 1754* encontradas en base de datos globales (Fajardo, 2021).

Este tipo de macroalga tiene facilidad de desarrollarse dentro de ríos y mares, muestra alta presencia de minerales, carbohidratos y proteínas lo que lo convierte en un condimento importante en las dietas alimenticias de algunos países de continente asiático como es el caso de Japón, China y algunos otros países occidentales. Además, tiene aplicaciones en el tratamiento de aguas de alcantarillado, industria y maricultura debido a su alta capacidad de remoción de nutrientes (Almeida AP, 2013).

Compuestos aislados de las macroalgas han demostrados funciones antioxidantes, antihipertensivas, anticoagulantes, antibacterianas, antitumorales y antidiabéticas (Belhadj et al., 2021). Son fuente de una gran variedad de metabolitos y compuestos bioactivos naturales tales como polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, florotaninos y otros compuestos fenólicos y carotenoides (Muñoz A. et al., 2020).

1.1 Descripción del Problema

En Ecuador, se reporta los estudios publicados por Rubira Carvache (2012) sobre el alto crecimiento de *Ulva lactuca* entre los meses de octubre- noviembre en las playas de Salinas, la Libertad y Ballenita; sin embargo, no hay estudios realizados acerca de las características físicas, químicas y bioquímicas en 2 épocas diferentes del año para su potencial aplicación en el sector industrial ecuatoriano, por eso se considera de gran interés realizar el estudio de su caracterización para la posible obtención de bioproductos que puedan ser implementados en las industrias farmacéuticas, cosméticas, alimenticia, entre otras.

1.2 Justificación del Problema

El elevado interés comercial e investigativo de la macroalga radica en la producción de fármacos anticancerígenos que, debido a mecanismos que controlan la exposición de la oxidación provocada por radicales libres, el interés farmacológico ha ido en aumento y se han evidenciado las actividades antibacterianas, antifúngicas, antivíricas, antiparasitarias, antialérgico, antitumoral, antitrombótico, inmunoestimulante, antiinflamatorias y antioxidante de sus extractos (Briceño Sevilla, 2021); otros usos importantes que se le emplean a la *Ulva sp.* se dan en la industria agrícola como elaboración de fertilizante, también en la industria textil para ácido algínico y engrudo (Carvache & Katuska, 2012). Además, estudios realizados demuestran que son alimentos bajos en calorías con alto contenido de vitaminas, minerales, proteínas y carbohidratos (D'Armas et al., 2019).

En particular, la *Ulva lactuca* ha sido utilizada en procesos de biorremediación y ha demostrado ser eficiente en la captación de nutrientes tanto en aguas residuales como en aguas de desecho (Sode et al., 2013). Actualmente, las macroalgas del género *Ulva*

son ampliamente utilizadas en la acuicultura terrestre para la extracción de nutrientes (Bartoli et al., 2005), (Copertino et al., 2009), (Msuya & Neori, 2008), (Robertson-Andersson et al., 2008).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar química y bioquímicamente la macroalga *Ulva sp* cultivada en la zona costera ecuatoriana "Puerto el Morro" mediante técnicas analíticas especializadas para su potencial aplicación de biocomponentes dentro de la industria con vistas a su posible explotación.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Analizar bromatológicamente la macroalga *Ulva sp* proveniente de dos épocas (septiembre y enero) mediante técnicas analíticas especializadas (espectrofotométricos y colorimétricos).
- Determinar el perfil químico y actividad antioxidante de la macroalga *Ulva sp* mediante métodos espectrofotométricos y cromatográficos.
- Comparar los resultados de las características físicas, químicas y bioquímicas de la macroalga *Ulva sp* en diferentes épocas del año para el análisis de su actividad antioxidante y su potencial en la industria.

1.4 Marco Teórico

Las macroalgas se clasifican de acuerdo con su pigmentación, se tienen las rojas, pardas y verdes, de manera taxonómica en *Rhodophyta* o rodófitos *Phaeophyta* o feófitos y *Chlorophyta* o clorófitos respectivamente, dentro de las macroalgas verdes se encuentra

el orden *Ulvales*, las cuales constan de varias especies como *lactuca*, *curvata*, *compressa*, *ardreana*, entre otras.

Según el análisis realizado en 2009 por la tesis de maestría desarrollada por Rubira-Carvache, dentro de la Bahía Salinas, Ecuador (2°15'0" S & 80°56'0" O) se encuentran varias especies de la macroalga *Ulva* y la de mayor interés es la *Ulva lactuca*, ya que hay un alto crecimiento entre los meses de octubre – noviembre.

1.4.1 Temporada Climática en Puerto El Morro, Ecuador

Ecuador se encuentra ubicado en América del Sur, limita en el norte con Colombia, en el sur y este con Perú y al oeste con el Océano Pacífico. Se divide en cuatro regiones: Costa o Litoral, Sierra o Interandina, Oriente o Amazonía y las Islas Galápagos. En Ecuador no se presentan las cuatro estaciones climáticas, solo existen temporada seca y temporada húmeda, las cuales pueden llegar a variar cada año, extendiendo su tiempo de duración (Ron & Varela, 2022).

El clima de la región costera se caracteriza por ser tropical y con una temperatura promedio de 24 a 25°C, durante la época húmeda (desde diciembre hasta abril-mayo), se presentan altas temperaturas acompañadas de lluvias, esto se debe a la presencia de la corriente cálida de El Niño, mientras que en la época seca (desde junio hasta noviembre-diciembre), se tienen temperaturas bajas y poca lluvia (Ron & Varela, 2022).

1.4.2 Características de la *Ulva sp*

Esta alga puede crecer tanto en primavera como en verano y en diferentes tipos de hábitats, ya sea por diferencia de salinidad, temperatura, turbidez, dureza del agua y exposición solar (Cano, 2022). Se caracteriza por su color verde, hojas lobuladas con bordes volantes que se asemeja a la forma de una hoja de lechuga y pueden crecer hasta 50cm. Habita en profundidades de hasta 75 m y de acuerdo con su pigmentación

se encuentra clasificado como *Chlorophyceae*, los cuales presentan pigmentos fotosintéticos como carotenos, xantofilas y clorofila (A y B) responsables de su coloración verde oscuro a amarillo verdosa (Briceño Sevilla, 2021).

En la Tabla 1 se describen las características de cultivo y recolección de los diferentes estudios realizados de *Ulva lactuca* y se presentan las características principales de la macroalga *Ulva sp* en época seca (junio – noviembre) y húmeda (diciembre – mayo) previo a realizar cualquier análisis.

Tabla 1. Características de cultivo reportadas para macroalgas y *Ulva lactuca*

	<i>Ulva lactuca</i>		
	D'Armas et al., 2019	Yaich et al., 2011 ^a	Aguilera Morales et al., 2018 ^b
Lugar de Cultivo	Bahía de Salinas, Santa Elena, Ecuador	Litoral entre Taboulba y Sayada (Monastir – Túnez).	Puerto de Veracruz, México
Fecha de cultivo	Mes no definido, 2021	Julio 2007	Abril - septiembre 2018
Clima: Temperatura máxima promedio	Temporada templada (enero – abril): 26 °C Temporada Fresca (julio – noviembre): 22 °C	29 °C	31 °C
Temperatura del agua promedio	Más caliente (enero – abril): mayor a 25 °C Más fría (julio – noviembre): menor a 23 °C	Más caliente (julio – octubre): mayor a 24 °C	Más caliente (junio – octubre): mayor a 28 °C

^aSuficiente insolación, profundidad débil (50 cm) y lugar rico en nutrientes (proliferación).

^bCrecimiento en la cuenca media del río Papaloapan.

1.4.3 Componentes Químicos de la Macroalga *Ulva sp*

Las macroalgas poseen alto nivel nutritivo que puede ser implementado y

aprovechado dentro de las industrias alimenticias. En el continente asiático, forma parte de las dietas alimenticias mientras que otros países tienen mayor interés en los extractos que pueden ser obtenidos de esta macroalga y aplicados en la industria medicinal y cosmética. Entre los componentes químicos mayoritarios de este grupo tenemos las proteínas, carbohidratos y fibra. Sin embargo, también cuenta con un contenido de grasas o lípidos, pero a menor proporción.

Particularmente la *Ulva lactuca* en g de peso seco contiene 7 – 38% de cenizas, 1.5 – 6.6% de lípidos, 8.65 – 31.6% de proteínas y hasta un 76% de cenizas (Kraan, 2013 & Costa et al., 2022). Esta macroalga ha demostrado tener alto contenido de metales en comparación con las algas utilizadas para consumo humano en la Unión Europea (Yaich et al., 2011), por lo que los componentes químicos de cualquiera de estas especies dependen de la zona del cultivo y la época del año en las que son cultivadas.

1.4.4 Análisis Bromatológicos

Cuando se realiza la caracterización de una muestra vegetal, se deben llevar a cabo los análisis bromatológicos para conocer en qué cantidad se encuentran los componentes orgánicos e inorgánicos, lo que permite conocer su posible aplicación en las industrias, siempre y cuando se cumplan las normas descritas en cada país. Entre los principales análisis se encuentra humedad, cenizas, proteínas, grasas, fibras, carbohidratos y energía.

1.4.4.1 Humedad

La mayoría de las algas marinas poseen un alto contenido de humedad, pueden llegar hasta 94% (Rodríguez, 2000). La humedad puede llegar a alterar la estabilidad química, estructura cristalina, velocidad de disolución, entre otras propiedades. Este

análisis nos permite conocer que tan humedad o seca está la muestra, además de la alta importancia a nivel industrial, debido a que algunas operaciones unitarias dependen de la calidad y cantidad de agua que se presente (Lad et al., 2022).

La industria farmacéutica es un ejemplo de su importancia, por ejemplo, en la consistencia y estabilidad de las tabletas logrando desmoronarlas, además, algunos de los ingredientes pueden cambiar su forma o cristalizarse. Para el proceso de secado hay algunos métodos como liofilización, secado en lecho fluidizado, compactación, granulación, entre otras. Cabe recalcar que otro parámetro a considerar es la calidad del agua que puede influenciar en la aplicación en cualquier industria, por eso es importante conocer el contenido de humedad de cierta materia (Lad et al., 2022).

1.4.4.2 Cenizas

Este análisis consiste en la calcinación de la materia orgánica presente en la muestra, donde las sales metálicas se convierten en óxidos o carbonatos o reaccionan formando fosfatos, sulfatos o haluros, obteniendo la materia inorgánica que corresponde a las sales minerales, sin embargo, esta no consta de todos los minerales presentes en el alga, ya que existen pérdidas debido a la volatilización, fusión, descomposición o cambio de estructuras (Rodríguez, 2000), pero si genera una idea de la proporción que se tiene, cabe recalcar que los minerales presentes en estas algas se encuentran relacionadas con las propiedades del agua donde fueron cosechadas debido a la propiedad absorbente que poseen. El contenido de cenizas es uno de los componentes en mayor proporción que puede ir desde el 8% hasta 40% en base seca (Rupérez, 2002).

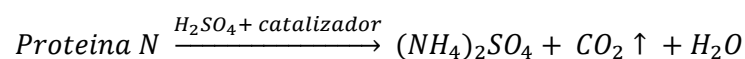
Del contenido mineral presente en la macroalga, se puede resaltar el sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo, hierro, zinc, manganeso y cobre (Gómez-Ordóñez et al., 2010). Entre estos compuestos los elementos halógenos son los que en su mayoría se pierden por volatilización (Rodríguez, 2000).

Las sales minerales cumplen un papel primordial en el cuerpo humano, por ejemplo, el fósforo, calcio y potasio tienen una función plástica dentro del organismo que se ve reflejado en los dientes, cartílagos, esqueleto, entre otras; mientras que el hierro forma parte de la sangre en la hemoglobina y así sucesivamente cada uno de los minerales cumplen con una función muy importante (Rodríguez, 2000).

1.4.4.3 Proteínas

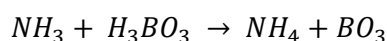
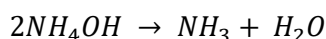
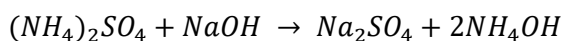
Las proteínas se consideran sustanciales para la vida ya que son las encargadas de la formación de los tejidos, por lo que su análisis es uno de los más importantes. A nivel químico, son polímeros grandes donde una sola molécula puede contener miles de aminoácidos de diferentes tipos (Rodríguez, 2000). Las algas marinas rojas y verdes contienen alto nivel de proteínas, entre 10 a 47% en base seca (Fleurence, 1999).

El método Kjeldahl es el más apropiado y utilizado para la obtención del nitrógeno orgánico. Este método consta de tres partes: digestión, destilación y titulación. En la primera parte se debe disolver la muestra con ácido sulfúrico concentrado para la liberación del dióxido de carbono (proveniente de la materia carbonosa como grasas, fibra y carbohidratos) mediante calentamiento, en este paso también se producen las sales sulfatadas y el nitrógeno se convierte en sulfato de amonio. La solución cambia de color a un verde esmeralda (Rodríguez, 2000).

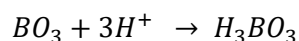


En la destilación se añade agua destilada a la mezcla digerida para la precipitación de los sulfatos y disminución de la concentración del ácido, también hidróxido de sodio para neutralizar la mezcla favoreciendo la liberación del amoníaco. Al llevarlo a calentamiento la mezcla se homogeniza y cambia de color a celeste oscuro, una vez que empieza a ebulir vuelve a cambiar de color a marrón (presencia de un

complejo cúprico) pero se elimina conforme el amonio va siendo liberado. El amonio es capturado por una solución de ácido bórico con indicador de rojo de metilo formando un complejo visible debido al cambio de color de rojo a amarillo (Rodríguez, 2000).



El último paso corresponde a la titulación con ácido clorhídrico hasta que se presente el cambio de color de amarillo a rojo y el volumen utilizado es tomado para los cálculos correspondientes (Rodríguez, 2000).



1.4.4.4 Grasas

Las grasas son uno de los nutrientes indispensables para el ser humano, estos se encuentran en los tejidos de las plantas y animales, son insolubles con el agua y solubles en disolventes no polares como el éter de petróleo (Rodríguez, 2000), se dividen en saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas. Las grasas saturadas contienen ácidos saturados, los cuales son sólidos a temperatura ambiente, en su mayoría provienen de animales como la manteca, caso contrario a las grasas vegetales que poseen en su mayoría ácidos monoinsaturados o poliinsaturados (Rodríguez-Cruz et al., 2005).

Las algas marinas se caracterizan por el bajo nivel de grasas que contienen, siendo este menor al 1%, sin embargo, los ácidos grasos presentes son de alta calidad. Entre los ácidos grasos saturados resaltan el palmítico, margárico y esteárico, mientras que en los monoinsaturados el ácido oleico, entre los ácidos de mayor interés en este tipo de análisis están los ácidos poliinsaturados como el linoleico y el α -linolénico (Rodríguez-Cruz et al., 2005).

Las grasas saturadas aportan al cuerpo humano energía, pero también son reguladores metabólicos (Rodríguez-Cruz et al., 2005). Los ácidos poliinsaturados en particular poseen propiedades antivirales, antimutagénico y cardioprotector (Syad et al., 2013).

El método de extracción Soxhlet con éter de petróleo genera un proceso intermitente donde el disolvente se evapora y se condensa en forma de gotas sobre la muestra colocada dentro de un dedal. La eficiencia del proceso depende del disolvente utilizado, debido a que con algunos solventes no solo se obtienen grasas y el valor total no corresponde al real (Rodríguez, 2000).

1.4.4.5 Fibra Cruda

Las fibras son importantes a nivel alimenticio para las dietas humanas debido a que disminuye las posibilidades de sufrir de diabetes, problemas cardíacos y cáncer. Este componente no es digerido por el cuerpo por lo que aporta a la salud intestinal y reduce niveles de colesterol (Almeida-Alvarado, Aguilar-López & Hervert-Hernández, 2014).

Es un análisis estándar, pero con resultados que no describen la cantidad de fibra total presente en la muestra de interés, su valor está tan subestimado que en la actualidad este método sólo es empleado en nutrición animal. Este análisis muestra las sustancias orgánicas no nitrogenadas que se disuelven después de hidrólisis continuas. La fibra cruda se encuentra compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (Ochoa, Infante & Rivera, 2008).

El análisis consta de una digestión ácida y una básica. En la digestión ácida se extraen los azúcares y el almidón, mientras que en la digestión alcalina se eliminan las proteínas presentes, en este paso se elimina parte de la hemicelulosa y lignina, provocando un valor de fibras muy lejano a la realidad. Luego de las digestiones es necesario realizar lavados con alcohol o acetona para la eliminación de las grasas, cabe

recalcar que el análisis de fibras se debe realizar con la muestra desengrasada previamente, sin embargo, este último paso de lavado es muy esencial para asegurar la eliminación completa de grasas. Luego de cada digestión se realizan lavados con agua caliente para eliminar residuos del solvente ácido y básico además de neutralizar el pH de la muestra (RAFER, 2019).

1.4.4.6 Carbohidratos

Al igual que las proteínas, los carbohidratos también son una fuente fundamental de nutrición para la dieta humana. Entre los cuales se tienen los azúcares, polisacáridos almidonados y no amiláceos y fibra dietética. Los carbohidratos recomendados son los provenientes de legumbres y frutas, ya que estos no contienen azúcar añadida que producen obesidad, siendo más beneficiosos evitando riesgos cardiovasculares (Stylianopoulou, 2022).

Según (D'Armas et al., 2019), el contenido de carbohidratos se obtiene por diferencia del contenido proximal porcentual de todos los componentes mayoritarios tales como humedad, cenizas totales, grasas totales, fibra cruda y proteínas.

1.4.4.7 Energía

El ser humano por naturaleza necesita de energía para poder vivir y llevar a cabo todas sus actividades. La energía se obtiene a partir de la oxidación de lípidos, proteínas y carbohidratos, de esta manera, los alimentos que ingresan al cuerpo se transforman en energía (Julianera, 2018).

En la Tabla 2 se presenta una recopilación bibliográfica de los resultados proximales de la *Ulva lactuca*.

Tabla 2. Análisis bromatológicos reportados de diferentes para *Ulva lactuca*

Fuente	<i>Ulva lactuca</i>		
	D'Armas et al., 2019	Yaich et al., 2011	Aguilera Morales et al., 2018
Contenido de			
Agua *	92.31	85.05 ± 0.15	-
Humedad **	20.67 ± 0.27	-	-
Ceniza **	26.99 ± 0.26	19.59 ± 0.51	33.07 ± 0.45
Grasa **	0.33 ± 0.01	7.84 ± 0.10	1.7 ± 0.37
Proteína **	5.54 ± 0.02	8.46 ± 0.01	17.2 ± 0.60
Fibra **	0.96 ± 0.03	-	-
Carbohidrato ***	45.52 ± 0.04	-	-
Energía *** (kcal kg⁻¹)	2 071.45 ± 0.15	-	-

* Sobre la base del peso húmedo

** Los valores son medias de dos repeticiones ± desviaciones estándar sobre la base del peso seco

*** Valores calculados

1.4.5 Análisis Químicos

1.4.5.1 Tamizaje Fitoquímico

El estudio fitoquímico es un análisis que permite detectar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes dentro de un extracto vegetal (Toledo Nauto, 2015). Los metabolitos secundarios presentes son: alcaloides, antraquinonas, naftoquinonas, esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas y lactonas terpénicas. Por lo que, se emplean diferentes extracciones con solventes de polaridades diferentes, como es el caso de metanol, agua y hexano. Los resultados para este análisis se presentan por el cambio de coloración y formación de precipitados

(Broncado Basurto & Mero Alcívar, 2019).

Debido a que se trata de análisis cualitativos, cantidad de metabolitos de representará de la siguiente manera: poca presencia (+), presencia regular (++), alta presencia (+++), ausencia del metabolito (-) y análisis no realizado en el extracto (NA). En la tabla de a continuación, se muestran los datos bibliográficos que fueron reportados de la *Ulva lactuca* para análisis fitoquímico (Manzano & Orellana, 2009).

Tabla 3. Metabolitos secundarios reportados por el análisis de tamizaje fitoquímico

Metabolito secundario	<i>Ulva lactuca</i>		
	Anjali et al., 2019		Briceño Sevilla, 2021
	Extracto metanólico	Extracto acuoso	Extracto alcohólico
Azúcares Reductores	NA	NA	-
Terpenos	+	-	++
Antiocianinas	NA	NA	++
Flavonoides	+	-	+
Saponinas	+	+	++
Taninos	-	-	+
Alcaloides	+	+	+++

1.4.5.1.1 Alcaloides

Son conocidos alrededor de 2000 tipos diferentes de alcaloides. Pueden encontrarse tanto en microorganismos como en fauna y flora, como es el caso de las algas marinas. Estos compuestos tienen aplicaciones e interés en la industria farmacológica, mayormente, estos compuestos se encuentran en drogas de abuso (p.ej., morfina, heroína, cocaína), compuestos dopantes (p.ej., cafeína) y venenos (p.ej., nicotina, tetrodotoxina) (Verpoorte, 2005).

1.4.5.1.2 Flavonoides

Son compuestos que al igual que los compuestos fenólicos tienen importantes actividades biológicas con potencial antiinflamatorio, efectos cardioprotectores y anticancerígenos por lo que son utilizados en el desarrollo de nutracéuticos y fármacos. Son considerados altamente seguros y con baja toxicidad y son excelentes agentes quimiopreventivos (Hernández-Rodríguez et al., 2019).

1.4.5.1.3 Taninos

Son parte de los compuestos fenólicos, y por lo general se encuentran en abundancia en las plantas y vegetales. Estos compuestos tienen aplicaciones médicas, cosméticas y biotecnológicas, ya que tienen características antioxidantes, antitumorales y antimicrobianas (Petchidurai et al., 2019).

1.4.5.1.4 Saponinas

Se encuentran mayormente presentes en material vegetal e invertebrados marinos. Tiene efectos altamente tóxicos debido a que son malas para absorber y da paso a la formación de compuestos insolubles. Sin embargo, presentan algunas características beneficiosas como el reducir el colesterol en especies de animales, el efecto hipocolesterolémico y las propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antitumorales, antivirales, anti hepáticas, antidiabéticas y hepatoprotectora (Mohan et al., 2016).

1.4.5.1.5 Glucósidos

Está dividido por una parte azucarada y una parte no azucarada llamada glicón y aglicón respectivamente. En la materia vegetal los glucósidos y los compuestos fenólicos

se distribuyen en la mayor parte de su composición, por lo que, los glucósidos fenólicos tienen efecto antipirético, antiinflamatorio y antirreumático. Los ácidos fenólicos y sus glucósidos son principalmente usados para molestias digestivas y los glucósidos de aldehído son ampliamente utilizados como agentes aromatizantes (Bartnik & Facey, 2017).

1.4.5.1.6 Mucílagos

Compuestos presentes en materia vegetal. Estos compuestos son polisacáridos muy ramificados que secretan las plantas frente a lesiones. Son parte de las fibras solubles y su composición varía de acuerdo con el grado de maduración de la planta, siendo menor la cantidad de este compuesto a mayor maduración de la planta (Moroni, 2011).

1.4.6 Análisis Bioquímicos

1.4.6.1 Actividad Antioxidante

Las macroalgas pasan por factores climáticos diferentes como temperaturas y el contacto con la luz directa, entre otros, estos factores forman radicales libres que a lo largo del tiempo deberían deteriorarla, sin embargo, estudios reportan que no poseen daños oxidativos, lo cual indica la presencia de actividad antioxidante (Balboa et al., 2013).

La influencia climática en el análisis de actividad antioxidante es muy importante, ya que, la exposición a la luz solar produce los fitoquímicos, es decir, a mayor contacto con la luz directa, mayor capacidad antioxidante tendrá la *Ulva sp*, sin embargo, cabe recalcar que la exposición por largos periodos de luz solar provoca daños en la estructura física y química de la macroalga (Prasedya et al., 2019).

Según los resultados de una investigación realizada en Grecia sobre las técnicas de extracción de los componentes bioactivos de la *Ulva lactuca*, se presentaron mejores

resultados con los solventes etanol/agua con 70:30 v/v a 60°C, 3 horas de extracción y con una proporción de 1:10 entre biomasa y solvente con una estabilidad de resultados por 5 días a condiciones frescas y oscuras. Los extractos derivados de disolventes orgánicos son más bioactivos a diferencia de los disolventes polares que generan actividad antibacteriana. (Pappou et al., 2022)

Una de las funciones que cumple la actividad antioxidante presente en los compuestos bioactivos de la *Ulva*, es la prevención de propagación oxidativa de los radicales libres, ya que estos son moléculas inestables que provocan daños en el ADN, membranas celulares y los tejidos corporales (Slater, 1984). La actividad antioxidante se encarga de capturar estos radicales libres por la capacidad del átomo de hidrógeno de estos compuestos (Bravo, 1998).

A partir del estudio sobre la actividad antioxidante en macroalgas, se concluyó que la *Ulva lactuca* puede ser explotada grandemente debido a su composición, siendo los compuestos bioactivos de mayor interés industrial los fenólicos y flavonoides (Caf et al., 2015).

1.4.6.1.1 Contenido Fenólico Total (TPC)

Los compuestos fenólicos poseen estructuras moleculares con varios grupos hidroxilos incluidos, un ejemplo claro es el ácido gálico, el cual tiene efectos biológicos altamente implementados en la industria como la actividad antiinflamatoria y antibiótica, en la industria medicinal se ha evidenciado que este compuesto activa especies reactivas de oxígeno y causa el estrés oxidativo, además, deteriora las células cancerosas (Belmares-Cerda et al., 2013).

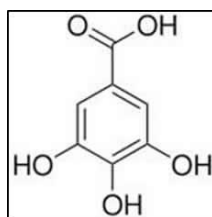


Figura 1. Estructura química del ácido gálico.

Fuente: Belmares-Cerda et al., 2013

1.4.6.1.2 Contenido Total de Flavonoides (TFC)

Los extractos de estos componentes pueden ser altamente aplicados para la prevención de varias enfermedades importantes a nivel mundial como el cáncer, obesidad, síndrome metabólico y Alzheimer, dado que poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Jiménez-López et al., 2021). Entre los componentes fenólicos más abundantes se tiene: miricetina, morina y quercetina.

Miricetina	Morina	Quercetina

Figura 2. Principales componentes fenólicos presentes en la *Ulva*

Quercetina es uno de los flavonoides más abundantes, entre 60-75% del total, siendo fundamental en las dietas diarias consumidas por las personas. Además de su alta capacidad de capturar radicales libres, puede inhibir enzimas para evitar la muerte celular (Vicente-Vicente et al., 2013).

1.4.7 Importancia y Aplicación

La *Ulva* tiene múltiples y variadas aplicaciones ya que contiene componentes valiosos, como compuestos bioactivos, alimentos o biocombustibles (Prasedya et al.,

2019) y principalmente, en el área de farmacología ha generado interés investigativo por su acción bactericida, fungicida, anti protozoaria, y para tratar diversas enfermedades humanas como es el asma, arterioesclerosis, hipertensión (Briceño Sevilla, 2021).

Además, en China la especie *Ulva lactuca* es altamente consumida tradicionalmente, y su consumo se ha ampliado a países europeos debido a su alto contenido vitamínico y nutricional como es la fibra y debido a estos componentes a su vez podrían según Yaich et al. (2011), reducir la incidencia de enfermedades como la obesidad, la diabetes, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares.

Debido a su alta capacidad antioxidante es que tienen un gran potencial a nivel industrial y por lo tanto su interés en el área biotecnológica va en aumento, junto a su producción a nivel mundial que incrementa un 8.7% anual. Es una de las capacidades más estudiadas en la actualidad, ya que es de vital interés para el cuidado y prevención de enfermedades terminales como el cáncer, por lo cual, se investigan técnicas para el desarrollo de la capacidad antioxidante presente en alimentos de origen vegetal, entre los más conocidos se encuentran las vitaminas C y E, y los polifenoles (Pérez-Jiménez et al., 2008).

Los extractos de la *Ulva* ricos en carotenoides y compuestos fenólicos exhiben una potente actividad antioxidante (Pappou et al., 2022), siendo estos extraídos mediante disolventes orgánicos como el etanol, agua y sus mezclas, provocando que estos sean más bioactivos (Monteiro et al., 2020), cuando se usan disolventes polares para la extracción se obtiene una alta actividad bacteriana (Suchinina et al., 2011).

1.4.7.1 *Ulva lactuca* como Alimento en Ecuador

De acuerdo con Li et al. 2018, el comer *Ulva* de marea verde o también conocidas como *Ulva lactuca* es seguro ya que es un nutriente valioso y rico en proteínas y Fe, además, es un buen ácido lipídico insaturado con una baja proporción de grasas y también tiene la presencia de aminoácidos esenciales. Sin embargo, parte de su valor

como alimento y la incorporación en la dieta alimentaria, es necesario verificar que las concentraciones de metales pesados, pesticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos se encuentren dentro de los límites reglamentarios de consumo humano y dentro de los límites permisibles que establezca cada país (Dominguez & Loret, 2019).

Según *Novel Food catalogue* (sitio web oficial de la Comisión Europea), la *Ulva lactuca* estaba clasificada en el mercado como alimento o ingrediente alimentario y se consumía antes del 15 de mayo de 1997. Por lo tanto, su acceso al mercado no está sujeto al Reglamento sobre nuevos alimentos (UE- Unión Europea) 2015/2283". Sin embargo, destaca que cualquier estado miembro de la UE puede restringir su comercialización tanto para alimento como producto. Por lo que, recomienda consultar con las autoridades nacionales competente.

Con respecto a Ecuador, el Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN-CODEX 193:2013 establece que el arsénico se encuentra especialmente en el entorno marino, a menudo en grandes concentraciones de formas orgánicas, en cantidades que pueden llegar hasta 50 mg/kg arsénico en peso fresco en algunos productos del mar, como es el caso de algas marinas, pescado, mariscos y crustáceos. En los crustáceos, los moluscos y las algas se presentan derivados del dimetilarsinoilribosido ("arsenoazúcares"), cuya posible toxicidad no se conoce con detalle (INEN, 2013). De manera general, las mineras presentes en las macroalgas se pueden englobar en el contenido de cenizas, lo cual sirve como guía para conocer si un producto puede entrar al mercado como alimento, el contenido de cenizas debe suponer un valor menor al 5% en peso seco (Holden, Harnly, & Beecher, 2003).

1.4.7.2 *Ulva sp* en Biorremediación

Las macroalgas tienen potencial en la biorremediación y como bioindicador para el tratamiento de aguas contaminadas, en especial, la *Ulva lactuca* ha demostrado

capacidad para remover metales pesado y otros oligoelementos sin afectar la salinidad, factor que suele afectar otros organismos en su capacidad de remoción. Además, este organismo vegetal la característica de absorber compuestos orgánicos e inorgánicos debido a la estructura interna de su pared celular. Tiene alta resistencia a contaminantes y es una especie que se encuentra en muchas partes del mundo lo que la convierte en un bioindicador ideal de contaminantes (Areco et al., 2021).

CAPÍTULO 2

2. Metodología

2.1 *Periodo de Cultivo y Recolección*

El presente proyecto se realizó entre los meses de septiembre – enero. El trabajo de investigación junto con los análisis correspondientes fue realizado en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) y en laboratorios pertenecientes a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

La macroalga *Ulva sp* fue cosechada durante 28 días en Puerto El Morro, Guayaquil, Ecuador (2°36'0" S y 80°16'60" W) en las épocas de septiembre y enero del año 2022-2023. La primera muestra fue receptada el 1 de septiembre 2022 que contenía 1 kilo del cultivo 100% sumergido y expuesto al aire en cada marea baja proveniente de la entrada de la boca del Puerto El Morro, la segunda que contenía 10 kilos fue recolectada y transportada al laboratorio el 16 de enero de 2023. Ambas muestras siguieron el mismo protocolo de recolección, almacenamiento, conservación y transporte, es decir, las muestras fueron lavadas en el mismo sector, almacenadas en fundas ziploc con su respectiva etiqueta y transportadas hacia los Laboratorios del CIBE-ESPOL donde se las conservó bajo congelación a -17°C, sin embargo, las muestras recolectadas en enero fueron analizadas de manera inmediata, mientras que las muestras de septiembre fueron conservadas durante 1 mes y luego analizadas.

2.2 *Tratamiento Previo de la Ulva sp*

El kilo de *Ulva sp.* del mes de septiembre fue completamente descongelado en aproximadamente 4 horas, mientras que la *Ulva sp.* de enero llegó fresca al laboratorio para limpieza, cuyo proceso consiste en colocarla en una bandeja plana grande para quitarle todo tipo de micro y macroorganismos que contenían como gusanos, camarones

y cangrejos. Luego se colocó en un cedazo para evitar pérdidas durante el lavado con agua destilada y se pesó la muestra total. Una vez pesado, se formaron bolitas para guardar en fundas ziploc pequeñas y congelarlas para su conservación.

Para los análisis bromatológicos (excepto humedad) y químicos, se necesita la muestra seca y pulverizada, por lo que, se procedió a tomar parte de la muestra fresca descongelada, distribuirla en platillos de aluminio y llevarla a estufa para su posterior secado a 50 – 60°C para evitar quemar la muestra o perder su composición inicial. Una vez seca se trituró con ayuda de un molino de café y se almacenó en una funda ziploc.

Para el análisis químico se usa la muestra liofilizada y pulverizada, por lo que, se tomaron algunas bolitas congeladas y se las colocó en el liofilizador por 4 días, luego se las trituró de la misma manera que las secadas en estufa.

2.3 *Análisis Físicos*

2.3.1 *Color, Morfología y Olor*

Este es un análisis cualitativo donde se colocó una pequeña parte de la muestra sobre una hoja blanca para la apreciación de su color, tamaño y forma para poder compararlo con la teoría revisada.

2.4 *Análisis Bromatológicos*

Cada uno de los análisis se realizaron por triplicado siguiendo los protocolos fijados en el CIBE y los laboratorios internos de FCNM-ESPOL, los resultados fueron expresados en base seca, excepto por el ensayo de humedad que se realiza con la muestra fresca.

2.4.1 Ensayo de Humedad

A partir del manual de prácticas de laboratorio, farmacognosia y productos naturales de la Dra. Migdalia Miranda Martínez y Dr. Armando Cuéllar, se pesaron 2.0g de muestra, se colocaron en crisoles pesados y se secaron en estufa con aireación a 105°C por 3 horas. Se dejaron reposar y enfriar en el desecador por 1 hora y se repitió el proceso, pero con un tiempo de secado en estufa de 1 hora y enfriamiento de 30 min hasta que la masa fuera constante o difiera por menos de 0.005g. (Cuéllar & Miranda, 2014).

Para el cálculo de humedad se presenta la siguiente ecuación donde:

Hg: Humedad

M₂: Masa de la cápsula con la muestra (g)

M₁: Masa de la cápsula con la muestra desecada (g)

$$\%Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100 \quad [1]$$

2.4.2 Ensayo de Cenizas Totales

El análisis consistió en pesar aproximadamente 2.0g de muestra pulverizada en una cápsula de porcelana previamente tarada. Se carbonizó la muestra en una mufla a una temperatura de 750°C durante 2 horas. Se dejó reposar y enfriar la cápsula dentro de un desecador por 1 hora, se pesó y se repitió el proceso hasta que la diferencia de dos pesos consecutivos sea menor a 0.5mg o se mantenga constante (Cuéllar & Miranda, 2014).

Para determinar el porcentaje de cenizas, se aplicó la siguiente ecuación donde:

C: porcentaje de cenizas totales en base seca.

M: Masa del crisol vacío (g)

M₁: Masa del crisol con la muestra seca pulverizada (g)

M₂: Masa del crisol con las cenizas (g)

$$\%Cenizas = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100 \quad [2]$$

2.4.3 Ensayo de Grasas totales

Este análisis se realizó mediante extracción Soxhlet siguiendo el procedimiento del manual de Técnicas de análisis químico de alimentos de la Dra. Margot Vélez, cuyo sistema se forma por un balón de 250ml tarado donde se depositaron 60ml de disolvente de extracción (éter de petróleo), un sifón que contiene el cartucho de celulosa donde se colocó la muestra y un refrigerante de serpentín. Dado que la muestra corresponde al tipo vegetal, se pesaron aproximadamente 2.0g de *Ulva sp* pulverizada sobre papel filtro previamente tarado y es colocó dentro del dedal (cartucho de celulosa).

Se dio inicio al calentamiento de la plancha para la extracción con una velocidad de 5-6 gotas por segundo durante 4 horas a partir de la primera sifonada. Una vez cumplido el tiempo se apagó la plancha de calentamiento y se retiró el balón para la recuperación del disolvente utilizado mediante un rotaevaporador una velocidad de 30 RPM y una temperatura de 35°C.

Luego de recuperar todo el solvente, se procedió a secar el balón en la estufa a 105°C por 1 hora, se dejó reposar y enfriar en el desecador para finalmente tomar el peso.

Para determinar el porcentaje de grasas, se aplicó la siguiente ecuación donde:

N: Peso de las grasas (peso balón final – peso balón inicial) (g)

P: Peso de la muestra (g)

$$\%GRASAS = \frac{N \times 100}{P} \quad [3]$$

2.4.4 Ensayo de Fibra Cruda

Se pesaron 2.0g de la macroalga *Ulva sp* previamente desengrasada, utilizando el protocolo que indican (Manzano & Orellana, 2011) de acuerdo con las Normas INEN 0542-82, se colocaron dentro de un balón de 100ml y se realizó una digestión ácida y luego una digestión básica a reflujo por 30 min con 200 ml de H₂SO₄ al 1.25% y 200ml de NaOH al 1.25%. Después de cada digestión, la muestra es lavada hasta alcanzar pH neutro. Una vez terminado el lavado básico, se realiza al menos 3 lavados con alcohol caliente. Luego se colocó la muestra en un crisol previamente tarado en la estufa a 105°C por 2 horas y finalmente en la mufla a 600°C por una hora.

Para realizar el porcentaje de fibras, se aplicó la siguiente ecuación. Siendo:

P₁: Peso del Crisol + muestra de *Ulva sp* antes de la mufla (g)

P₂: Peso del Crisol + muestra de *Ulva sp* después de la mufla (g)

W: Peso de la muestra de *Ulva sp* libre de grasa (g)

$$\%Fibra = \frac{P_1 - P_2}{W} \times 100 \quad [4]$$

2.4.5 Proteínas

Se pesaron 0.5g de muestra pulverizada y se siguió el procedimiento establecido por (Lim, 1987) pero a menor cantidad. Se añadió la muestra a los tubos digestores y se realizó un blanco, se agregaron 10ml de H₂SO₄ concentrado y 3.0g del catalizador de K₂SO₄ y CuSO₄, se llevaron al equipo digestor por 90 minutos y se dejó enfriar por alrededor de 1 hora.

Una vez fría la mezcla se agregaron 50 ml de agua destilada y 30 ml de NaOH al 40%. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se colocaron 50ml de H₃BO₃ al 4% con 2-3 gotas del indicador rojo de metilo. Se colocó el tubo digestor neutralizado al equipo destilador y el matraz para la recepción y se dejó destilar por 10-15 minutos.

Se tomó el matraz receptor y se tituló con HCl 0.1N hasta el punto de viraje de color amarillo a rosáceo. Se Anotó el volumen consumido de HCl.

Se procede a calculó el porcentaje de proteínas mediante la siguiente ecuación donde:

W: Peso de la muestra (g)

N: Normalidad del HCl

a: Volumen del HCl usado en el blanco (ml)

b: Volumen del HCl usado (ml)

14.00: Peso atómico del nitrógeno

1000: Conversión de mgN/100 g a gN/100 g muestra

6.25: Factor de conversión

$$\%Proteínas = \frac{(b - a) \times N \times 14.00}{W} \times 100 \times \frac{6.25}{1000} \quad [5]$$

2.4.6 Carbohidratos y Energía

El análisis de porcentaje de carbohidratos y energía en unidades kcal/g se realiza utilizando la ecuación indicada por (D'Armas et al., 2019). Las ecuaciones incluyen los resultados de los ensayos bromatológicos de fibra cruda, humedad, cenizas totales, grasas totales y proteínas.

Ecuación para calcular el porcentaje de carbohidratos.

%Carbohidratos

= 100

– (%Humedad + %Cenizas + %Grasas totales + %Fibra Cruda
+ %Proteínas) [6]

Ecuación para calcular el porcentaje de energía.

$$\%Energía = \left(9 \frac{kcal}{g} \times \%Grasas\ totales\right) + 4 \frac{kcal}{g} (\%Proteínas + \%Carbohidratos) \quad [7]$$

2.5 Análisis Químicos

2.5.1 Ensayo de Tamizaje Fitoquímico

Previamente se prepararon extractos con hexano, metanol y agua destilada, donde se tomaron 2.0 g de muestra y se colocaron dentro de un matraz Erlenmeyer de 100 ml. Se humectó previamente la muestra con gotas de hexano debido a la capacidad absorbente de las algas, luego se agregaron los 20 ml del disolvente y se los llevó al shaker por 1 hora a una temperatura de 15°C y 120RPM, luego se filtró el extracto en tubos falcon y se repitió el proceso con la misma muestra y matraz, cambiando únicamente el solvente a metanol y posteriormente al agua destilada.

Para el tamizaje fitoquímico se utilizó entre 0.5 ml y 1 ml de cada extracto. Se realizó el análisis para la muestra de *Ulva sp* con los tres tipos de extractos, siguiendo la metodología establecida por (Cuéllar & Miranda, 2014) y los cambios modificados por (Manzano & Orellana, 2009). El ensayo es completamente cualitativo.

2.5.1.1 Alcaloides

Se realizaron los ensayos de Dragendorff, Wagner y Mayer para analizar el contenido de alcaloides, en este ensayo se miden 0.5 ml de la muestra por cada extracto (extracto acuoso, metanólico y hexanólico) y se le agregan 0.25 ml de HCl al 10% junto con 0.2 ml del reactivo a analizar. La presencia del metabolito se observa en un rango de opalescencia a precipitado.

2.5.1.2 Saponinas

Para este ensayo, se mide 0.5 ml de cada extracto de *Ulva sp* y se lo lleva a agitación por aproximadamente 1 min al agitador de tubos vórtex. La espuma formada debe durar como mínimo 30 segundo para indicar la presencia del metabolito.

2.5.1.3 Taninos y Fenoles

Se determinó la presencia de compuestos fenólicos y taninos usando una alícuota de 0.5ml de la muestra de *Ulva sp* con 0.125 ml FeCl₃ al 10%. Se homogeniza la mezcla y se identifica la presencia de reacción. Presencia de fenoles (coloración rojo- vino), taninos del tipo pirocatecólicos (coloración verde intensa) y taninos del tipo pirogalatánicos (coloración azul).

2.5.1.4 Glucósidos y Azúcares reductores

Para determinar la presencia del metabolito, se realizó el ensayo con reactivos Fehling. Se usa 1 ml de la muestra problema del extracto acuoso y metanólico, a esta alícuota se le agregó 0.5 ml de los reactivos Fehling A y B. Estas mezclas fueron llevadas a calentamiento por baño maría por 15 min. Precipitado color rojizo o ladrillo.

2.5.1.5 Glucósidos Cardiotónicos

Se utilizó 1 ml de la muestra de *Ulva sp* de los extractos con agua y metanol, a estas alícuota se le agregó 0.5 ml del reactivo Benedict y se lo llevó a calentamiento por baño maría durante 15 min aproximadamente. Precipitado color rojizo o ladrillo.

2.5.1.6 Flavonoides

Para el ensayo de flavonoides se utilizaron 0.5 ml del extracto acuoso y extracto metanólico. En este ensayo se agregaron inicialmente una limadura de Mg y luego 0.25ml de HCl concentrado. Coloración a violeta.

2.5.1.7 Mucílagos y Resina

En el ensayo para identificación de Mucílagos, una alícuota de la muestra de alga de extracto acuoso y metanólico se llevó a refrigeración durante 30 min. El aspecto gelatinoso determinó la presencia del metabolito. Para determinar presencia de Resinas, se midió una alícuota de 0.5 ml para cada extracto y se agregó 2.5 ml de H₂O.

2.6 Análisis Bioquímicos

Se realizó análisis para determinar el contenido de fenoles totales (TPC), contenido de flavonoides totales (TFC) y el potencial o capacidad antioxidantes de la macroalga *Ulva sp.* Se evaluó por el método de eliminación de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según la metodología establecida por (Zhong et al., 2020). Se aplicó herramientas estadísticas para la comparación de los resultados, como es ANOVA de un solo factor, ANOVA de dos factores para muestras variadas y prueba de Tukey utilizando el software MINITAB.

2.6.1 Obtención de Extractos

Para la obtención de extractos, se realizó dos métodos de extracción, por digestión y sonicación resultando en extracciones por digestión acuosa y etanólica al 80% y sonicación etanólica al 80%. Para cada método de extracción, se realizaron réplicas biológicas por triplicado y fueron identificadas R1, R2 y R3 para la *Ulva sp* de época seca y húmeda. Para este ensayo se utilizó la masa de macroalga seca por liofilización.

2.6.1.1 Digestión Acuosa

Se pesó 0.25 g de la macroalga *Ulva sp* en un vaso de precipitación de 40 ml. Para la preparación del extracto, se humectó el polvo seco de macroalga con gotas de solvente y se añadió 10 ml de agua destilada. Esta mezcla fue llevada a una plancha de

calentamiento, manteniendo a una temperatura de 43°C con agitación constante por 38 min. Por último, el extracto es filtrado al vacío para la separación del sólido del extracto.

2.6.1.2 Digestión Etanólica 80%

Al igual que en la digestión acuosa, se pesó 0.25 g del *Ulva sp* seca polvorizada en un vaso de precipitación de 40 ml, seguidamente, se humectó con gotas de solvente y se añadió 5 ml de etanol al 80%. Para el proceso de digestión, se mantuvo a una temperatura de 43°C con agitación constante durante 38 min. Finalmente, en un sistema de filtración al vacío se separa el sólido del extracto etanólico.

2.6.1.3 Sonicación Etanólica 80%

Se pesó 0.25 g de *Ulva sp* pulverizada en un tubo falcon de 50 ml, la muestra fue humectada con gotas de solvente y añadió 5 ml de etanol al 80%. La mezcla fue llevada al equipo sonicador durante 1 h manteniendo la temperatura entre 24 – 30°C. La temperatura fue controlada por un termómetro, y en caso de exceder el rango establecido se apagaba el equipo durante 10 min. La mezcla fue filtrada al vacío para la obtención del extracto.

2.6.2 Contenido Fenólico Total (TPC)

Inicialmente, en tubos falcon de 15 ml se preparó la solución madre de ácido gálico de 100 ppm, la cual se disolvió 1 mg de ácido gálico en 10 ml de etanol al 80%, el reactivo Folin Ciocalteu diluido 1:10 y una solución de Na₂CO₃ saturado al 10% (w/v).

El ensayo sigue la metodología planteada por (Avramova et al., 2017), se preparó la curva estándar de ácido gálico con etanol al 80% en 11 tubos Eppendorf de 1.5 ml. Las concentraciones de la curva varían entre un rango de 0-250 ppm, se preparó 1 ml para cada concentración en los tubos Eppendorf, la cual se forma por la variación de la solución

madre de ácido gálico de 0-1000 μ l y soluciones al 80% de etanol con concentraciones de 1000-0 μ l.

Se realizaron 4 réplicas técnicas. En una microplaca, se añadieron 20 μ l de cada extracto con sus respectivas réplicas biológicas y en otra se agrega 20 μ l de la solución de ácido gálico para la curva estándar, a esto se le añade 80 μ l de la dilución del reactivo Folin Ciocalteu, esto se dejó reaccionar durante aproximadamente 5 min en frío, por lo que fue colocado dentro del refrigerador. Luego, se agregó 100 μ l de solución saturada de Na₂CO₃ al 10% y se dejó reposar en la oscuridad durante 1 hora. La absorbancia de la mezcla de reacción se midió a 725 nm utilizando un lector de microplacas Biotek y el TPC se expresó como equivalente de ácido gálico en mg/g de peso seco.

2.6.3 Contenido Flavonoides Total (TFC)

Se realizó el ensayo de TFC siguiendo la metodología establecida por (Avramova et al., 2017). Se preparó una solución madre de quercetina (100 ppm) y se realizó inicialmente la curva estándar de quercetina, donde se prepararon alrededor de 11 tubos y se colocaron soluciones de quercetina con concentraciones de 0-100 ppm. También se realizó la mezcla de reactivos dentro de los tubos falcon de 50 ml para 150 muestras, la solución incluía etanol absoluto (100%), AlCl₃ (10% w/v), Acetato de potasio (1M) y agua destilada formando un total de 30 ml con indica la bibliografía.

Para la curva estándar, se preparó 1 ml para cada concentración en los tubos Eppendorf, la cual se formó a partir de solución madre de quercetina 0-1000 μ l y etanol al 80% 1000-0 μ l. En una microplaca se mezcló 20 μ l de cada extracto con sus réplicas biológicas y en otra se mezcló 20 μ l de la solución estándar con 200 μ l de mezcla de reactivos y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia fue medida a 415 nm y el TFC se expresó como equivalente de quercetina (QE) en mg/g de peso seco.

2.6.4 Capacidad Antioxidante

Se evaluó por el método DPPH (2,2- difenil-1-picril hidrazilo) siguiendo la técnica de (Bohórquez, 2016) para identificar el potencial antioxidante de los compuestos presentes dentro de la macroalga *Ulva sp* Para el método DPPH, se preparó una solución de DPPH en etanol absoluto a una concentración de 0.15mM. La solución madre obtenida se diluyó en etanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 a 0.8 ± 0.05 medidos a 517nm. Para la curva de calibración se utilizó 11 tubos Eppendorf y se realizó usando Trolox en un gradiente de concentración de 0 a 1000 ppm disuelto en metanol absoluto.

Se utilizó 2 microplacas y se colocaron cuatro réplicas en cada microplaca. En una de ellas se preparó la curva estándar agregando 50 μ l de cada concentración y en otra se colocó 50 μ l de los extractos de la *Ulva sp* junto a sus réplicas biológicas. A esto se le agregó 200 μ l de la solución de DPPH. Luego, se determinó la capacidad inhibitoria de la absorbancia del blanco después de que haya reaccionado la mezcla de solución DPPH con la muestra Trolox durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Capítulo 3

3. Resultados y Análisis

3.1 Pretratamiento y Características

En Puerto “El Morro” se reportan las temperaturas de los meses de cultivo de la macroalga, en la época seca las temperaturas varían entre 20°C y 32°C, mientras que en la época húmeda es de 23°C a 34°C. Las Figura 1 y Figura 2 muestran el cambio de temperatura promedio máxima y mínima de en las dos temporadas de interés.

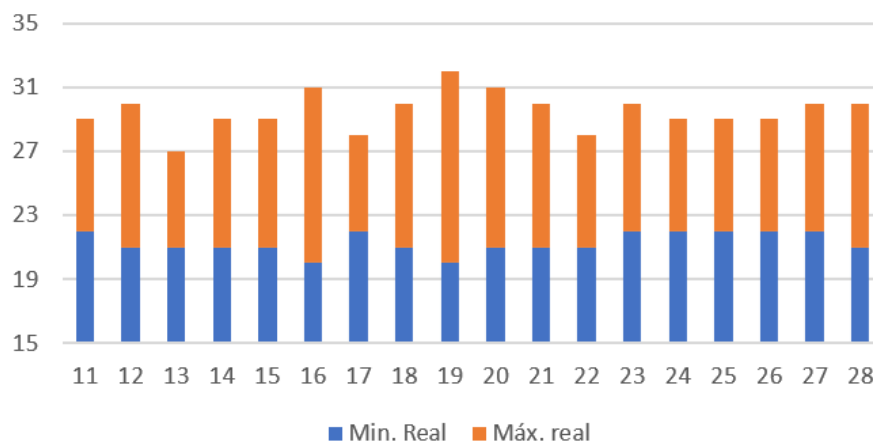


Figura 3. Temperaturas del mes de cultivo durante la época seca

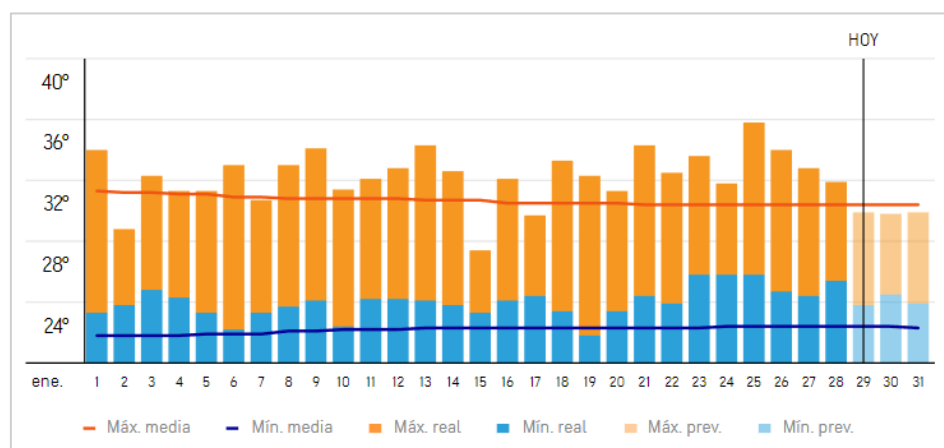


Figura 4. Temperaturas del mes de cultivo durante la época húmeda

En la Tabla 4 se presentan las características de la macroalga *Ulva sp* en la cosecha para los meses de septiembre 2022 y enero 2023.

Tabla 4. Características de cosecha de la *Ulva sp*

<i>Ulva sp</i>		
	Septiembre 2022	Enero 2023
Clima: Temperatura máxima promedio	31 °C	34°C
Temperatura del agua promedio	25°C	27°C
Lugar de Cultivo	Puerto “El Morro” Guayas, Ecuador	
Características de cosecha	<i>Ulva sp</i> 100% sumergida y expuesta al solo cada marea baja	

En comparación a la información reportada (D’Armas et al., 2019; Yaich et al., 2011; Aguilera Morales et al., 2018) en la Tabla 1, las características de cosecha tienen cierta similitud con (Aguilera Morales et al., 2018) para la época seca, sin embargo, para el mes de enero la temperatura máxima es mucho más alta que cualquiera de los datos de la información consultada.

La temperatura influye en el cultivo del alga de tal manera que a mayor temperatura esta necesita mayor cantidad de nutrientes y su vez más agua para mantener su metabolismo, por lo que la cantidad de componentes y nutrientes que absorbe el material vegetal a estas condiciones es mayor.

El cultivo de la macroalga variaba entre estar 100% sumergida y expuesta al sol en cada marea baja, lo que le permitió a la *Ulva sp* evitar la excesiva radiación solar y tener a su disposición la cantidad de agua necesaria para su crecimiento, debido a esto, se puede inferir que, en el mes de enero, la muestra de *Ulva sp* tiene la mayor cantidad de

compuestos de interés ya que, en las costas ecuatorianas la temporada húmeda se caracteriza por la presencia de lluvias y su clima cálido con las mayores temperaturas promedio en aguas.

3.2 Características físicas: Olor, Color y Morfología

La macroalga *Ulva sp* caracterizada por su pigmentación verde, perteneciente a la clasificación Chlorophyta del género *Ulva*. Las muestras de macroalga cosechadas en ambas épocas mantenían su coloración verde, pero se diferenciaban en su intensidad, siendo el mes de septiembre 2022 la cosecha con menor intensidad cuya coloración se asemejaba a un verde oscuro; y, la del mes de enero a un verde más claro o intenso.

También, tenía un olor particular a mar para las muestras de ambas épocas parte de ello fue a que su cultivo fue el mismo lugar. Sin embargo, para la cosecha del mes de enero este particular olor fue mayormente intenso. La diferencia radica principalmente en el tiempo de conservación y cosecha, la muestra de *Ulva sp* de septiembre 2022 fue conservada a -17°C durante casi un mes antes de iniciar con el pretratamiento y cualquier análisis, por otro lado, la muestra de enero debido al tiempo limitado no fue conservada, es decir, el tratamiento previo de la muestra, los análisis bromatológicos, químicos y bioquímicos fueron realizados una vez transportada la muestra del Puerto “El Morro” al laboratorio CIBE.

Con respecto a su morfología, ambas muestras de *Ulva sp* fueron cosechadas al 100% sumergida y expuesta al sol en cada marea baja. En la época seca correspondiente al mes de septiembre su forma no pudo ser distinguida en la mayor parte de la macroalga teniendo cierta apariencia a cabello humano, aun así, una pequeña cantidad se podía identificar hojas lobuladas con bordes volantes, tal como lo describe la bibliografía para la *Ulva lactuca*. Para la muestra de enero (época húmeda), La muestra estaba totalmente fresca, por esta razón su apariencia fue mayormente distinguible asemejándose a la llamaba “lechuga de mar”.

En ambas épocas, la principal diferencia entre las muestras fue su tiempo de conservación antes de iniciar cualquier análisis cualitativo y cuantitativo. No obstante, esto no afecta las propiedades físicas, químicas y bioquímicas de la macroalga, debido a que su conservación fue a temperatura menor del punto de congelamiento del agua, por lo que, al existir diferencias significativas en olor, color y forma de la macroalga en las dos épocas del año es un indicio de variación en los resultados de los ensayos realizados.

3.3 Análisis bromatológicos

Los componentes mayoritarios presentes en la macroalga *Ulva sp* de septiembre y enero se detallan en la Tabla 5., y se muestra en la Gráfica 1, donde se puede ver la variación de la composición proximal entre una época y otra, siendo la humedad en base seca junto a fibras y carbohidratos los únicos análisis que disminuyen en época húmeda, mientras que el resto de los análisis aumenta considerablemente, la razón de esta variación se relaciona con los cambios climáticos de la zona y la frescura de la muestra.

Se conoce que la energía es la oxidación de las grasas, proteínas y carbohidratos, mientras que carbohidratos es lo que queda del 100% del resto de análisis, por lo tanto, si la humedad en base seca y las fibras disminuyen, los carbohidratos aumentan y al tener menor cantidad de fibras, la energía disminuye debido a que posee menor proporción de fibras para oxidar.

En un análisis más detallado, el porcentaje de cenizas totales depende también de la calidad y propiedades del agua donde fue cosechada la *Ulva sp* por el contenido de minerales que puede absorber, sin embargo, no se contaba con esta información en el momento de la recolección, pero dado los resultados obtenidos, es posible inferir que época húmeda la *Ulva sp* posee mayor contenido de minerales (20.93 ± 0.29) debido a las propiedades del agua y el cambio climático, a diferencia de la *Ulva sp* de la época seca (19.90 ± 0.36), sin embargo, a partir de investigaciones realizadas, se puede mencionar que el porcentaje de cenizas en ambas épocas es menor en comparación con

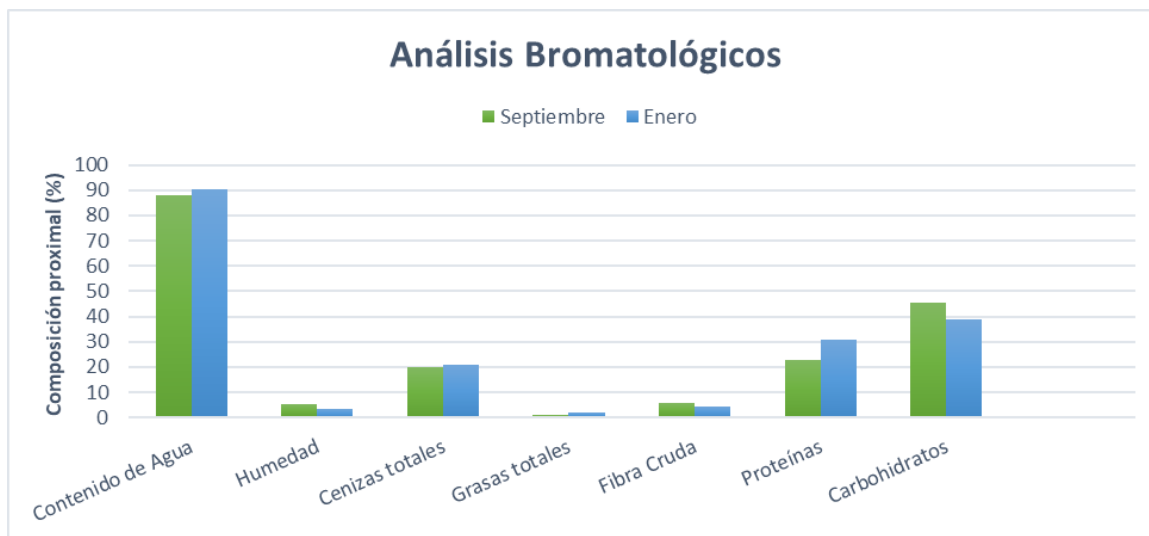
estudios realizados por Aguilera (33.07 ± 0.45), a pesar que se asemejan en la temperatura del cultivo, y D'Armas (de 26.99 ± 0.26), este último se realizó también dentro de Ecuador, pero sus reportes muestran una ineficiencia en el proceso de secado de la muestra, por lo que existe esa diferencia en los valores, los resultados del presente proyecto en ambas épocas se encuentran cercanas con el estudio de Yaich (19.59 ± 0.51) el cual presenta característica de crecimiento similares a las de la *Ulva sp* en Puerto El Morro, como la suficiente insolación y una profundidad débil ya que la *Ulva* fue expuesta en cada marea baja, además del agua rica en nutrientes, pero, su ubicación geográfica es muy lejana y diferente a la de Ecuador.

El bajo porcentaje de humedad en base seca que oscila entre 3.40 ± 0.41 y 5.20 ± 0.09 para época húmeda y seca respectivamente, indica la estabilidad química de la macroalga, siendo de mayor interés a nivel industrial por el desarrollo de microorganismos que alteran calidad de los productos finales, como en la industria farmacéutica para la elaboración de píldoras, con el contenido de agua mayor al 80% en ambas épocas se conoce la alta propiedad absorbente de esta alga.

Tabla 5 . Composición proximal de la macroalga *Ulva sp* recolectada en Puerto El Morro

Análisis Bromatológicos	Época seca Septiembre 2022	Época Húmeda Enero 2023
Contenido de agua*	88.20 ± 0.24	90.49 ± 0.17
Humedad**	5.20 ± 0.09	3.40 ± 0.41
Cenizas**	19.90 ± 0.36	20.93 ± 0.29
Grasas**	0.88 ± 0.01	1.82 ± 0.07
Fibras**	5.53 ± 0.27	4.46 ± 0.27
Proteínas**	22.92 ± 0.42	30.68 ± 0.09
Carbohidratos***	45.57 ± 0.66	38.81 ± 0.47
Energía (kcal/g) ***	281.89 ± 2.26	293.97 ± 1.43

*El ensayo fue realizado en base seca
 **El ensayo fue realizado en base húmeda
 ***Valores calculados



Gráfica 1. Composición Proximal de análisis Bromatológicos en época seca y húmeda

3.4 Tamizaje Fitoquímico

Los resultados del análisis cualitativo de los extractos acuoso, metanólico y hexánico de la *Ulva sp* en las dos épocas (seca y húmeda) se presentan en la Tabla 6. Entre los metabolitos fitoquímicos secundarios, se reveló alta presencia de alcaloides en los 3 tipos de ensayos (Dragendorff, Wagner y Mayer), la cual se destaca en el extracto metanólico. Al mismo tiempo, indica presenta regular de Glucósidos y presencia mínima de metabolitos glucósidos cardiotónicos y resinas.

Tabla 6. Análisis cualitativo de los metabolitos secundarios presentes en la macroalga

Ulva sp

Metabolito ensayado	Época seca Septiembre 2022			Época húmeda Enero 2023		
	Extracto Acuoso	Extracto Metanólico	Extracto Hexánico	Extracto Acuoso	Extracto Metanólico	Extracto Hexánico

Alcaloides (Dragendorff)	++	+++	-	+	++	-
Alcaloides (Wagner)	++	+++	+	+	+++	-
Alcaloides (Mayer)	-	+++	-	+	+++	-
Espuma (Saponinas)	-	-	-	-	-	-
Fenoles/Taninos	+++	+	-	++	+++	-
Fehling (Glucósidos)	++	++	NA	-	++	NA
Benedict (Glucósidos cardiotónicos)	-	+	NA	-	+	NA
Flavonoides	-	-	NA	-	-	NA
Mucílagos	+	-	NA	+	-	NA
Resinas	NA	++	NA	NA	+	NA

Los metabolitos secundarios se caracterizan principalmente por su actividad biológica ya que tienen potencial antiinflamatorio, anticancerígeno, antitumorales y antimicrobianas en la presencia de compuestos polifenólicos, saponinas, entre otros.

Si se comparan los resultados de ambas épocas, en el mes de enero se observó una disminución de alcaloides, glucósidos y compuestos fenólicos encontrados en el extracto acuoso y aumento de taninos del tipo pirocatecólicos en extracto metanólico, la presencia y ausencia de compuestos bioactivos se diferencian por la época del año, variando su concentración en las diferentes extracciones, no obstante, al tratarse de un método cualitativo, el aumento o disminución del metabolito no es significativo para ambas épocas. Además, se puede observar falta de presencia de metabolitos en el extracto hexánico, parte de ello es debido a la diferencia de polaridad del extracto y de los ensayos aplicados.

Los resultados obtenidos se diferencian de los datos reportados en la Tabla 3 por (Anjali et al., 2019; Briceño Sevilla, 2021) en la presencia de flavonoides y saponinas en extracciones con acuosa y alcohólica para la *Ulva lactuca*. Sin embargo, coincide en la presencia de compuestos alcaloides, caracterizados por contener compuestos dopantes y venenosos. Esto puede ser a causa del método de extracción, así como el lugar y época de cultivo de la macroalga.

3.5 Actividad antioxidante

A partir de los resultados del análisis de TPC, TFC y DPPH presentados en la Tabla 7, se tiene que, entre los tres métodos realizados para la época seca, la digestión etanólica al 80% (ratio 0.25:10, muestra: solvente) posee mayor cantidad de fenoles, flavonoides y mayor porcentaje de inhibición (15.78 ± 20.35) en comparación con la digestión acuosa quien tiene los TPC y TFC más bajo.

Con respecto a la época húmeda, la muestra recolectada en enero 2023 presentó mayor TPC (4.06 ± 0.12 mg GAE/g peso seco) y TFC (28.94 ± 4.49 mg QE/g peso seco) en el método de digestión etanólica 80%, sin embargo, el porcentaje de inhibición es mayor en el método de digestión acuosa (11.98 ± 1.21), además, la concentración de TPC y TFC son mucho más bajos para esta extracción, esto significa que a pesar de su poca cantidad los compuestos bioactivos presentes en este método poseen un alto poder antioxidante capaces de capturar la mayor cantidad de radicales libres a diferencia de los compuestos presentes en la digestión alcohólica 80%.

La diferencia del contenido total de fenoles y flavonoides entre las dos épocas como se representa en la Gráfica 2 y 3, parte de ello fue causado por la diferencia de temperatura en Puerto El Morro ya que en la época seca oscila entre los 20°C - 32°C según se reporta, mientras que en la época húmeda llegó hasta 23°C - 34°C, esto influye en los resultados debido a que, a mayor temperatura y presencia de luz solar, la macroalga posee mayor

cantidad compuestos fenólicos y flavonoides, esto se ve reflejado en el mes de enero para cada método de extracción.

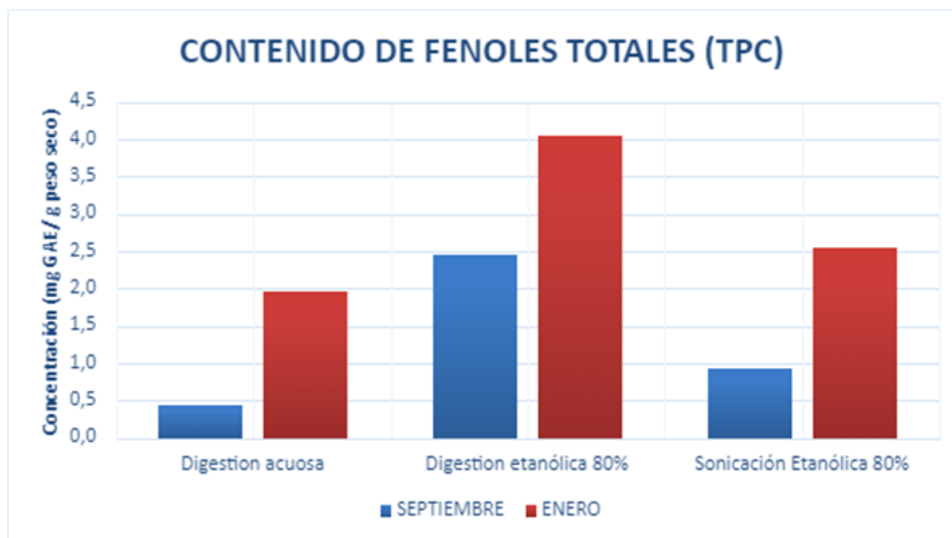
En el método extracción de sonicación alcohólica al 80% se obtuvieron los resultados más bajos en cada temporada a pesar de ser conocido como un método eficiente que tiene mejor rendimiento en el aislamiento de compuestos bioactivos, esto puede ser a causa del método empleado, ya que el control de la temperatura fue ineficiente en comparación con el método de digestión.

Dado los resultados presentados en la Gráfica 2, 3 y 4, las condiciones óptimas para obtener extracciones con mayor concentración de TPC, TPF y potenciales antioxidantes por el método DPPH es en la época seca por extracción etanólica al 80%. Sin embargo, si el interés radica en la capacidad antioxidante por sus propiedades y aplicaciones en industrias, la temporada húmeda también presenta un alto potencial, pero en la extracción por digestión acuosa dado que sus resultados no difieren significativamente tal como se presentan en la Tabla 7.

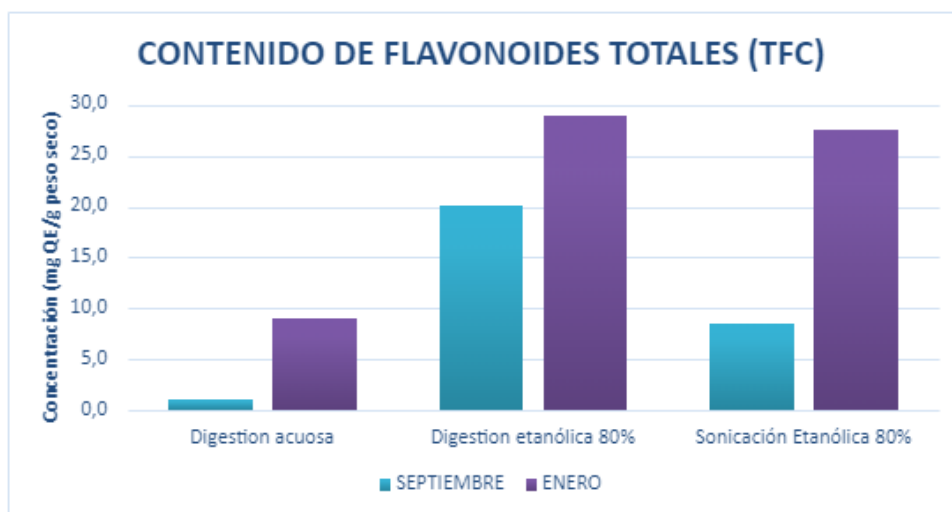
Tabla 7. Datos reportados de análisis bioquímico en dos épocas del año

Método	Época Seca (septiembre 2022)				Época Húmeda (enero 2023)			
	TFC	TPC	DPPH		TFC	TPC	DPPH	
	mgGAE/gPS	mgQE/gPS	%Inhibición	mgTE/gPS	mgGAE/gPS	mgQE/gPS	%Inhibición	mgTE/gPS
Digestión acuosa	0.44± 0.07	1.08± 0.27	9.65± 1.68	15.47 ± 3.67	1.95±0.31	2.19±0.54	11.98±1.21	20.34± 2.55
Digestión etanólica 80%	2.45± 0.51	20.08± 3.00		14.38 ± 21.94	4.06±0.12	28.94±4.49	8.81±1.74	6.82± 1.85
Sonicación etanólica 80%	0.94± 0.19	8.44± 1.64	1.89± 1.15	---	2.54±1.31	27.60±3.35	8.42±1.44	6.29± 1.51

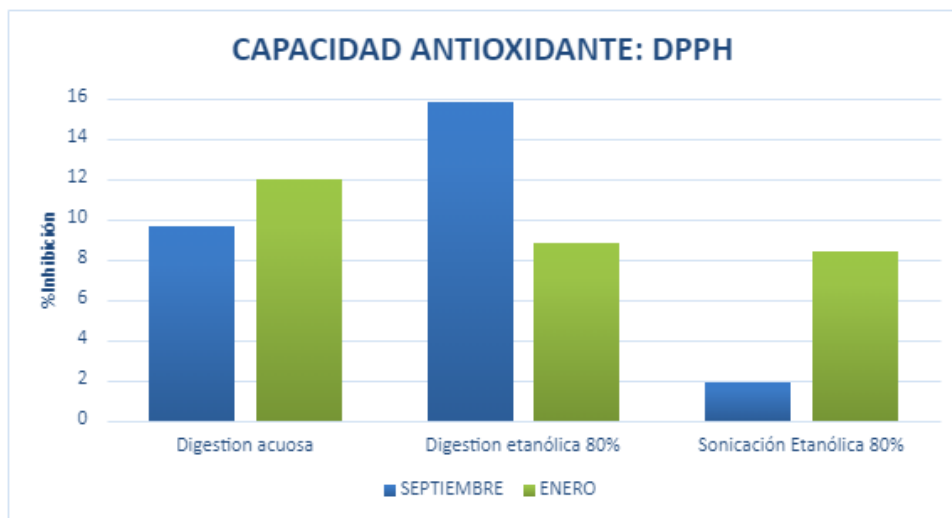
Todos los valores fueron realizados por triplicado con muestras biológicas y reportados con su respectiva desviación estándar (n=3). Los valores del contenido total de fenoles están expresados en mg de equivalentes de ácido gálico / g de peso seco del extracto. Los valores del contenido total de flavonoides están expresados en mg de equivalentes de quercetina / g de peso seco del extracto. Los valores de la actividad de eliminación de radicales libres DPPH están expresado en mg de equivalentes de Trolox / g de peso seco del extracto



Gráfica 22. TPC en época seca y húmeda.



Gráfica 33. TFC en época seca y húmeda



Gráfica 44. Potencial antioxidante en época seca y húmeda

3.5.1 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos aplicados fueron realizados en el software para herramientas estadísticas MINITAB. Los resultados tanto para época húmeda como época seca con respecto al método de extracción aplicado (Digestión y Sonicación) comparados aplicando el análisis estadístico de ANOVA de un solo factor y prueba de Tukey con significancia estadística $p < 0.05$, donde se obtuvo que no existen diferencias significativas entre las épocas de ensayo y el método aplicado con respecto a los resultados obtenidos, indicando que los métodos de extracción tienen un valor promedio que son estadísticamente iguales por lo que los resultados obtenidos en los ensayos son significativos.

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones Y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

- A partir de métodos gravimétricos se pudieron realizar los análisis bromatológicos, los cuales muestran mejores resultados en época húmeda, con mejor estabilidad en seco y mayor cantidad de proteínas, sin embargo, por el alto contenido de cenizas en ambas épocas que oscila de 19.90 ± 0.36 a 20.93 ± 0.29 , representando un alto contenido de minerales pesados, la *Ulva sp* no puede ser aplicada en industrias alimenticias, ya que este parámetro supone valores menores al 5% para ser introducidos en el mercado. Pero, debido a la alta cantidad de proteínas presentes en la macroalga en ambas épocas (22.92 ± 0.42 y 30.68 ± 0.09), la *Ulva sp* puede ser utilizada en la biorremediación, es decir, para el tratamiento de aguas contaminadas en su mayoría por petróleo, ya que esta macroalga posee una alta absorbancia de compuestos nitrogenados, siendo una opción viable por su facilidad de cosecha, crecimiento en abundancia, se adapta fácilmente a su entorno, crece durante todo el año sin importar la época su capacidad sigue siendo alta.
- Mediante el análisis cualitativo de tamizaje fitoquímico se pudo obtener el perfil químico de la *Ulva sp* que muestra la presencia de metabolitos secundarios importantes en las grandes industrias como los alcaloides con aplicaciones a nivel farmacológico y medicinal a partir del extracto metanólico por su polaridad, en este análisis, ambas épocas no presentaron gran diferencia de resultados, únicamente en la presencia de fenoles y taninos, ya que en época seca los fenoles tienen mayor presencia en extracto acuosa mientras que los taninos tipo pirocatecólicos en época húmeda en extracto metanólico.

- De acuerdo al análisis realizado sobre actividad antioxidante presente en la macroalga *Ulva sp*, se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición en la época seca mediante digestión etanólica 80% que en la época húmeda por digestión acuosa, sin embargo, ambas presentan potencial para las industrias ya que no difieren sus resultados de manera significativa y sus extractos pueden ser aplicados en la elaboración de cosméticos, medicamentos, tratamientos para el cáncer por su capacidad de captura de radicales libres que provocan daños en la estructura celular.

4.2 Recomendaciones

- Desarrollar el estudio de la calidad del agua donde se obtiene la *Ulva sp* durante la época de cosecha hasta la recolección, para conocer la influencia del pH y salinidad con el contenido de minerales presentes en la macroalga y en cada uno de los otros análisis bromatológicos, químicos y bioquímicos.
- Estudio de los métodos y tiempos de conservación de la macroalga y su relación con sus propiedades físicas, químicas y actividad antioxidante.
- Realizar todos los análisis con muestra seca por el método de liofilización, ya que evita la pérdida de propiedades y biomasa significativa en el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera Morales, M., Canales Martinez, M., Avila González, E., & Flores Ortiz, C. (2018).

Nutrients and bioactive compounds of the *Lemna gibba* and *Ulva lactuca* as ingredients to functional foods. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(4), 709–716.

<https://doi.org/10.3856/vol46-issue4-fulltext-8>

ZLa fibra y sus beneficios a la salud. *Anales venezolanos de nutrición*, 27(1), 73–76.

https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-07522014000100011

Almeida AP, V. L. (2013). The marine macroalgae of the genus *Ulva*: Chemistry, biological activities, and potential applications. *Oceanography Open Access*, 01(01).

<https://doi.org/10.4172/2332-2632.1000101>

Avramova, V., AbdElgawad, H., Vasileva, I., Petrova, A. S., Holec, A., Mariën, J., Asard, H., &

Beemster, G. T. S. (2017). High antioxidant activity facilitates maintenance of cell division in leaves of drought tolerant maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*, 8, 84.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00084>

Anjali, K. P., Sangeetha, B. M., Devi, G., Raghunathan, R., & Dutta, S. (2019). Bioprospecting

of seaweeds (*Ulva lactuca* and *Stoechospermum marginatum*): The compound characterization and functional applications in medicine-a comparative study. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 200(111622), 111622.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111622>

Areco, M. M., Salomone, V. N., & Afonso, M. D. S. (2021). *Ulva lactuca*: A bioindicator for anthropogenic contamination and its environmental remediation capacity. *Marine Environmental Research*, 171(105468), 105468.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105468>

Balboa, E.M., E. Conde, A. Moure, E. Falque, H. Dominguez. 2013. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem.* 138: 1764-1785.

Bartnik, M., & Facey, P. C. (2017). Glycosides. In *Pharmacognosy* (pp. 101–161). Elsevier.

Bartoli, M., Nizzoli, D., Naldi, M., Vezzulli, L., Porrello, S., Lenzi, M., & Viaroli, P. (2005). Inorganic nitrogen control in wastewater treatment ponds from a fish farm (Orbetello, Italy): denitrification versus *Ulva* uptake. *Marine Pollution Bulletin*, 50(11), 1386–1397.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.06.011>

Belhadj, S., Gargouri, M., Guerriero, G., & Hentati, O. (2021). Polysaccharides from the Green alga *Ulva lactuca* improve antioxidant balance and bone mineral density in diabetic rats. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 34(8), 637–640.
<https://doi.org/10.3967/bes2021.088>

Belmares-Cerda, R. E., Garza-Villasana, D. A., Garza-García, Y., Rodríguez-Herrera, R., M., M.-V., & N., y. A. C. (2013). Actividad Citotóxica de Extractos de *Turnera diffusa* Fermentada y no Fermentada. *AQM*.
<http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/articulos/AQM9/1.%20Actividad.pdf>

Bravo L. Polyphenols. (1998). "Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutr. Rev.*

- Briceño Sevilla, J. M. (2021). *Evaluación de la fitoquímica y del carácter antioxidante de variedades de algas marinas Chlorophyta, Phaeophyta y Rodophyta procedentes de la zona costera de Manabí - Ecuador*. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE).
- Broncado Basurto, K., & Mero Alcívar, K. (2019). *Determinación de las características fisicoquímicas del alga parda Sargassum ecuadoreanum en la zona intermareal, ubicada en Santa Elena* [Universidad de Guayaquil].
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/39888/1/BCIEQ-T-0353%20Broncano%20Basurto%20Bryan%20Kevin%3b%20Mero%20Alc%c3%advar%20Kendy%20Ximena.pdf>
- Bohorquez, R. (2016). Determinación de actividad antioxidante de los extractos de hojas de *Diplostegium phylloides* (Kunth) Wedd. Universidad de Ciencias aplicadas y ambientales U.D.C.A.
- Caf, F.; Yilmaz, Ö.; Durucan, F.; Özdemir, N. S. (2015). Biochemical components of three marine macroalgae (*Padina pavonica*, *Ulva lactuca* and *Taonia atomaria*) from the Levantine Sea coast of Antalya, Turkey. *J. Biodivers. Environ. Sci.* 6, 401–411.
- Caravaca Rodríguez, F. P. (2003). *Bases de la producción animal*. Universidad de Sevilla.
- Copertino, M. da S., Tormena, T., & Seeliger, U. (2009). Biofiltering efficiency, uptake, and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Chlorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture wastewater. *Journal of Applied Phycology*, 21(1), 31–45.
<https://doi.org/10.1007/s10811-008-9357-x>
- Costa, M. M., Pio, L. B., Bule, P., Cardoso, V. A., Duarte, M., Alfaia, C. M., Coelho, D. F., Brás, J. A., Fontes, C. M. G. A., & Prates, J. A. M. (2022). Recalcitrant cell wall of *Ulva lactuca* seaweed is degraded by a single ulvan lyase from family 25 of polysaccharide lyases. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 9, 184–

192. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.01.004>

Cuéllar Cuéllar, A. y Miranda Martínez, M. (2014). *Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales*. Plaza de la Revolución, Cuba: Empresa Editorial Poligráfica Félix Varela

D'Armas, H., Jaramillo, C., D'Armas, M., Echavarría, A., & Valverde, P. (2019). Proximate composition of several green, brown, and red seaweeds from the coast of Ecuador. *Revista de Biología Tropical*, 67(1), 61–68.
<https://doi.org/10.15517/rbt.v67i1.33380>

Domínguez, H.; Loret, E. (2019). *Ulva lactuca, a source of troubles and potential riches*. *Mar. Drugs*, 17, 357.

Fajardo, N. C. (2021). *Revisión actualizada de la sistemática de las macroalgas del Ecuador continental*. Universidad de Guayaquil.

García-Jimenez, P., & Romero, R. R. (2022). Hormonas vegetales y macroalgas marinas. *Revista de La Sociedad Española de Biología de Plantas*, 71, 13–16.

García Ochoa, O. E., Infante, R. B., & Rivera, C. J. (2008). Hacia una definición de fibra alimentaria. *Anales venezolanos de nutrición*, 21(1), 25–30.
https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-07522008000100005

Gómez-Ordóñez, E.; Jiménez-Escrig, A.; Rupérez, P. (2010). Dietary fiber and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, 43, 2289-2294.

Hernández-Rodríguez, P., Baquero, L. P., & Larrota, H. R. (2019). Flavonoids. In *Bioactive Compounds* (pp. 265–288). Elsevier.

Holden JM, Harnly JM & Beecher CR (2003). Composición de los alimentos. Conocimientos actuales sobre nutrición. En. Bowmann BA, Russell RM. Washington: ILSI, 645-657.

Jimenez-López, C.; Pereira, A.G.; Lourenço-Lopes, C.; Garcia-Oliveira, P.; Cassani, L.; Fraga-Corral, M.; Prieto, M.A.; SimalGandara, J. (2021). Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food Chem*, 341, 128262.

Julianera, P., & Gratton, R. (2018). Conservación de alimentos. Edu.Ar.
<https://users.exa.unicen.edu.ar/catedras/tecnoambiente/CAP02.pdf>

Kraan, S. (2013). Pigments and minor compounds in algae. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (pp. 205–251). Elsevier.

Lad, S., Narkhede, D. S., Luhar, D. S., & Prajapati, D. A. (2022). Review on Moisture Content: A stability problem in pharmaceuticals. *EPRA International Journal of Research & Development (IJRD)*, 27–33. <https://doi.org/10.36713/epra11911>

Lim, P. Y. (1987). Protein determination by Kjeldahl method. Aquadocs.org.
<https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/40994/B-1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Manzano, P., & Orellana, T. (2009). *Tamizaje Químico*. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

Manzano, P., & Orellana, T. (2011). *Fibra Cruda*. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Francisco J., H. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 54(2), 149–155.
https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200003
- Mohan, V. R., Tresina, P. S., & Daffodil, E. D. (2016). Antinutritional factors in legume seeds: Characteristics and determination. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 211–220). Elsevier.
- Monteiro, M.; Santos, R.A.; Iglesias, P.; Couto, A.; Serra, C.R.; Gouvinhas, I.; Barros, A.; Oliveira, A.P.; Enes, P.; Díaz-Rosales, P. (2020). Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro-and microalgae extracts. *J. Appl. Psychol*, 32, 349–362
- Morais, T.; Cotas, J.; Pacheco, D.; Pereira, L. (2021). *Seaweeds compounds: An Eco sustainable source of cosmetic ingredients?* *Cosmetics*, 8, 8
- Moroni, B. (2011). *Queso unttable a base de ulva lactuca* [Universidad FASTA].
<http://redi.ufasta.edu.ar:8082/jspui/handle/123456789/3351>
- Msuya, F. E., & Neori, A. (2008). Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *Journal of Applied Phycology*, 20(6), 1021–1031. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9300-6>
- Muñoz A., R., Santome, S., & León Q., J. (2020). Actividad antibacteriana de extractos hexánico y etanólico de macroalgas marinas de la Bahía de Ancón, Lima – Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(2), e17829.
<https://doi.org/10.15381/rivpe.v31i2.17829>
- Pappou, S.; Dardavila, M.M.; Savvidou, M.G.; Louli, V.; Magoulas, K.; Voutsas, E. (2022). Extraction of Bioactive Compounds from *Ulva lactuca*. *Appl. Sci.*, 12, 2117.
<https://doi.org/10.3390/app12042117>

- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNEIRO, M.; DÍAZ-RUBIO, M.E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. (2008). *Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils, and beverages: Extraction, measurement and expression of results*. Food Research International, 41, 274-285.
- Petchidurai, G., Nagoth, J. A., John, M. S., Sahayaraj, K., Murugesan, N., & Pucciarelli, S. (2019). *Standardization and quantification of total tannins, condensed tannin and soluble phlorotannins extracted from thirty-two drifted coastal macroalgae using high performance liquid chromatography*. Bioresource Technology Reports, 7(100273), 100273. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100273>
- Pappou, S., Dardavila, M. M., Savvidou, M. G., Louli, V., Magoulas, K., & Voutsas, E. (2022). *Extraction of bioactive compounds from Ulva lactuca*. Applied Sciences (Basel, Switzerland), 12(4), 2117. <https://doi.org/10.3390/app12042117>
- RAFER. (2019). *DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA EN PIENSO*. https://www.rafer.es/sites/default/files/determinacion_de_fibra_cruda_en_pienso.pdf
- Robertson-Andersson, D. V., Potgieter, M., Hansen, J., Bolton, J. J., Troell, M., Anderson, R. J., Halling, C., & Probyn, T. (2008). *Integrated seaweed cultivation on an abalone farm in South Africa*. Journal of Applied Phycology, 20(5), 579–595. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9239-7>
- Rodríguez-Cruz, M., Tovar, A. R., del Prado, M., & Torres, N. (2005). *Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud*. Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion, 57(3), 457–472. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000300010
- Rodríguez Renuncio, J. A. (2000). *Termodinámica Química*. Síntesis Editorial.

Ron S. & Varela A. (2022). *Geografía y Clima del Ecuador. Bioweb.Bio.*

<https://bioweb.bio/funjiweb/GeografiaClima/>

RUPÉREZ, P. (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79, 23-26.

Slater, T. (1984). "Free radical mechanisms in tissue injury." *Journal Biochemistry*.

Sode, S., Bruhn, A., Balsby, T. J. S., Larsen, M. M., Gotfredsen, A., & Rasmussen, M. B.

(2013). Bioremediation of reject water from anaerobically digested wastewater sludge with macroalgae (*Ulva lactuca*, Chlorophyta). *Bioresource Technology*, 146, 426–435.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.062>

Stylianopoulou, C. (2022). Carbohydrates: requirements and dietary importance. In Reference Module in Food Science. Elsevier.

Suchinina, T.; Shestakova, T.; Petrichenko, V.; Novikova, V. Solvent polarity effect on the

composition of biologically active substances, UV spectral characteristics, and antibacterial activity of *Euphrasia brevipila* herb extracts. *Pharm. Chem. J.* 2011, 44, 683–686

SYAD, A.N.; SHUNMUGIAH, K.P.; KASI, P.D. (2013). Seaweeds as nutritional supplements:

Analysis of nutritional profile, physicochemical properties, and proximate composition of *G. acerosa* and *S. wightii*. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3, 139-144.

Toledo Nauto, M. (2015). *Estudio fitoquímico, evaluación de la actividad antioxidante y*

antimicrobiana de la corteza de "triumfetta semitriloba" jacq (motecepo) y análisis de parámetros reológicos del mucílago [Universidad Nacional Mayor de San Marcos].

https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/4615/Toledo_nm.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Vélez, M. (2005). Técnicas de Análisis Químico de Alimentos.

Vicente-Vicente, L., Prieto, M., & Morales, A. I. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Aetox.Es*. <http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/hemeroteca/vol30-2/555-2067-2-PB.pdf>

Verpoorte, R. (2005). ALKALOIDS. In *Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 56–61). Elsevier.

Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chemistry*, 128(4), 895–901.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.114>

Zhong, B., Robinson, N. A., Warner, R. D., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2020). LC-ESI-QTOF-MS/MS characterization of seaweed phenolics and their antioxidant potential. *Marine Drugs*, 18(6), 331. <https://doi.org/10.3390/md18060331>

ANEXOS

5. Anexo 1: Recolección y limpieza de *Ulva sp*

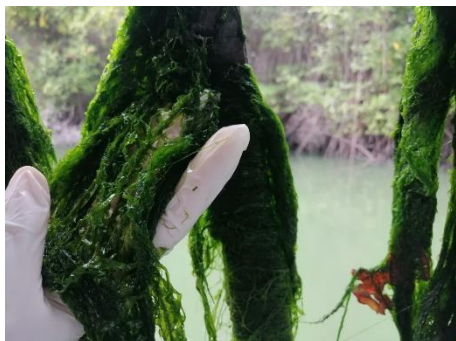


Figura 7. *Ulva sp* en Puerto El Morro



Figura 5. Recolección de la *Ulva sp*



Figura 6. Limpieza de la *Ulva sp* en el laboratorio



Figura 10. Lavado y filtrado con agua destilada



Figura 9. Conservación en bolitas para liofilización



Figura 8. Platillo de aluminio para secado en estufa



Figura 13. *Ulva sp*. después de secado en estufa



Figura 12. Secado por liofilización



Figura 11. Molido de las muestras secas

6. Anexo 2: Análisis Bromatológicos

6.1 Humedad – Método gravimétrico



Figura 16. Secado y Rotulación de capsulas de porcelana para humedad.



Figura 15. Secado en estufa



Figura 14. Secado en desecador al final del proceso

6.2 Cenizas



Figura 17. Calcinación de la muestra en mufla a 750°C



Figura 18. Cenizas frías y pesadas

6.3 Grasas



Figura 21. Sistema Soxhlet para determinación de grasas.

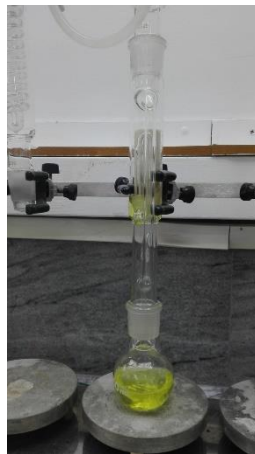


Figura 20. Sistema Soxhlet para *Ulva sp*



Figura 19. Rotaevaporación

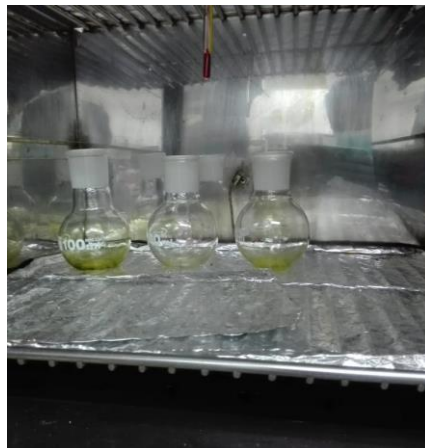


Figura 22. Secado en estufa a 105°C.

6.4 Fibras



Ilustración 14. Digestión ácida y alcalina



Ilustración 15. Lavado con agua caliente para neutralizar muestra



Ilustración 16. Lavado con alcohol



Ilustración 17. Secado de muestra

6.5 Proteínas

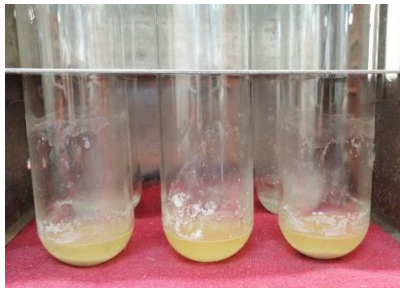


Figura 23. Muestras digeridas



Figura 24. Después de agregar agua destilada

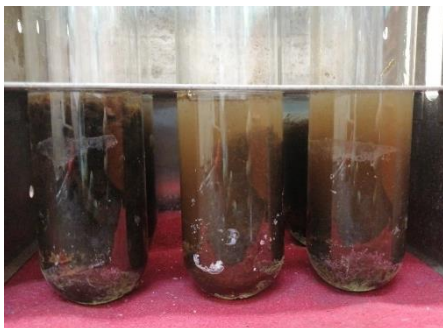


Figura 25. Después de agregar hidróxido de sodio



Figura 26. Solución receptora de ácido bórico con indicador



Figura 28. Destilación



Figura 27. Titulación



Figura 29. Después de la titulación

7. Anexo 3: Tamizaje Fitoquímico

7.1 Ensayo para Alcaloides

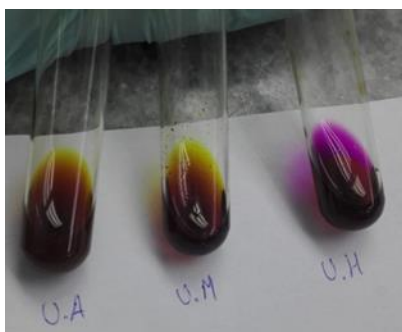


Figura 31. Ensayo de Dragendorff – *Ulva* sp mes de septiembre.

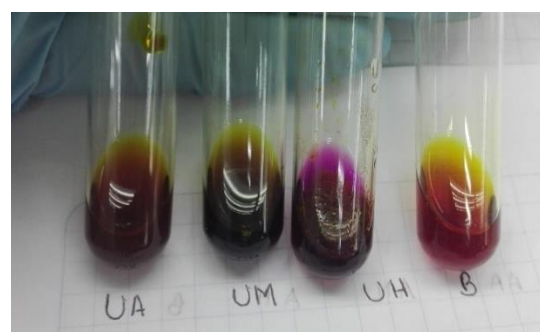


Figura 30. Ensayo Dragendorff – *Ulva* sp mes de enero.

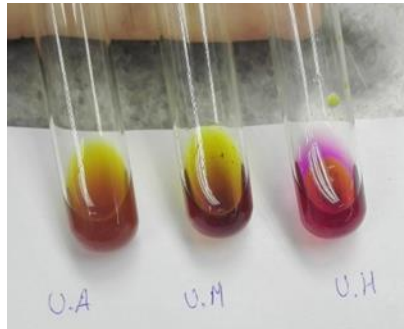


Figura 32. Ensayo de Wagner – *Ulva sp* mes de septiembre

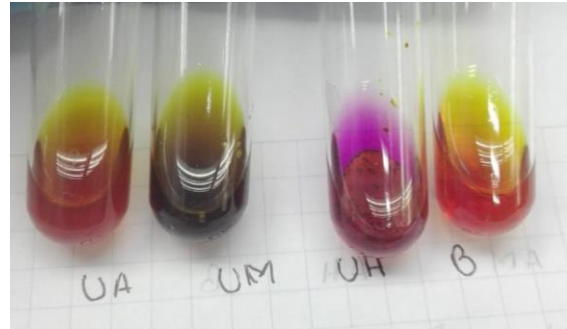


Figura 33. Ensayo de Wagner – *Ulva sp* mes de enero

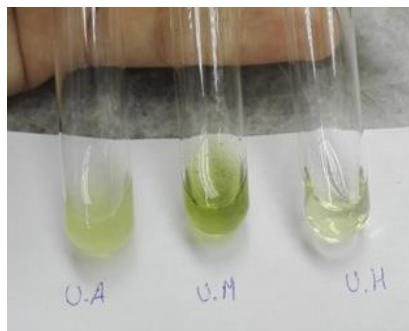


Figura 35. Ensayo de Mayer – *Ulva sp* mes de septiembre.



Figura 34. Ensayo de Mayer – *Ulva sp* mes de enero

7.2 Ensayo para Fenoles/ Taninos

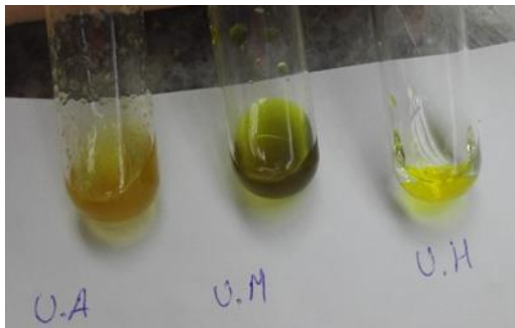


Figura 37. Ensayo FeCl₃ – *Ulva sp* mes de septiembre



Figura 36. Ensayo FeCl₃ – *Ulva sp* mes de enero

7.3 Ensayo para Glucósidos/azúcares reductores

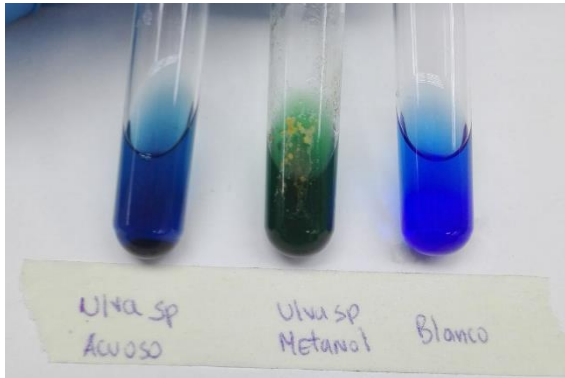


Figura 38. Ensayo Fehling- *Ulva sp* mes de septiembre

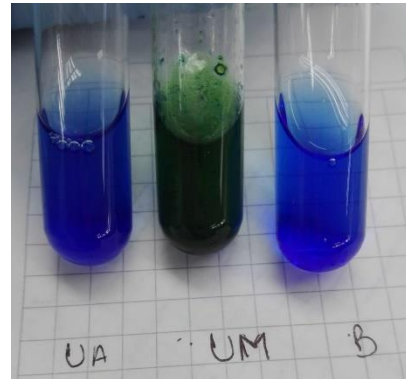


Figura 39. Ensayo Fehling - *Ulva sp* mes de enero

7.4 Ensayo para Glucósidos cardiotónicos

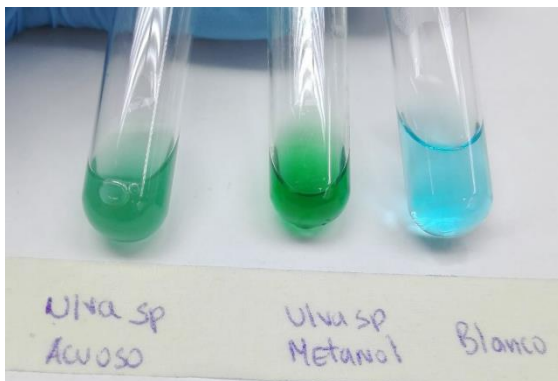


Figura 41. Ensayo Benedict - *Ulva sp* mes de septiembre



Figura 40. Ensayo Benedict - *Ulva sp* mes de enero

7.5 Ensayo para Mucílagos



Figura 42. Ensayo para mucílagos - *Ulva sp* mes de septiembre



Figura 43. Ensayo para mucílagos - *Ulva sp* mes de enero

7.6 Ensayo para resinas



Figura 45. Ensayo resinas - *Ulva sp* mes de septiembre

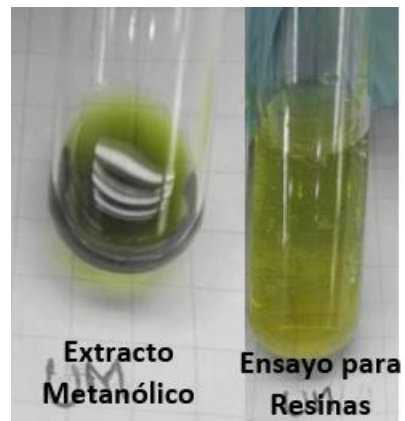


Figura 44. Ensayo resinas - *Ulva sp* mes de enero

8. Anexo 4: Análisis Bioquímico

8.1 Contenido Total de Fenoles (TPC)

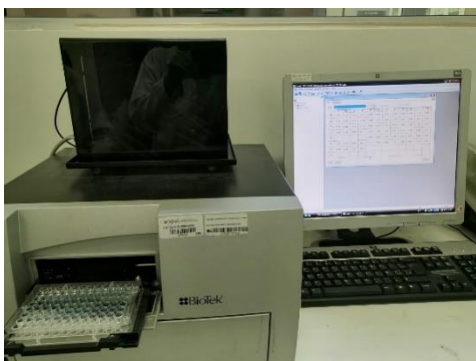


Figura 47. Lectura de curva estándar y muestras



Figura 46. Placa para lectura

8.2 Contenido Total de Flavonoides (TFC)



Figura 48. Lectura de curva estándar y muestras

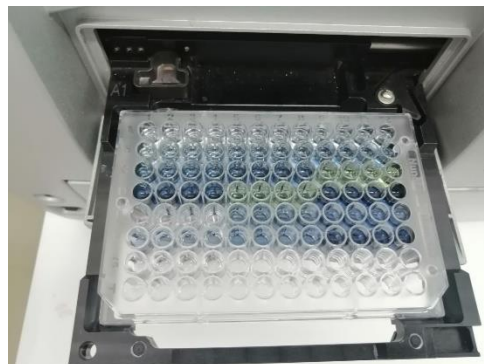


Figura 49. Placa para lectura

8.3 DPPH

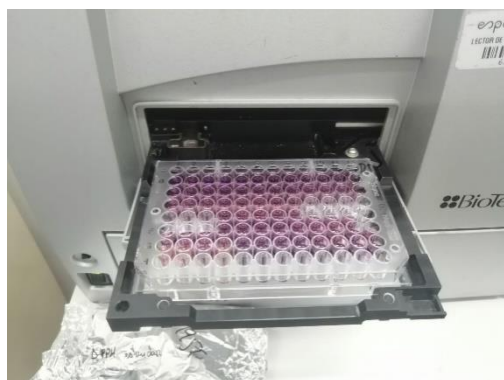


Figura 51. Lectura de curva estándar y muestras

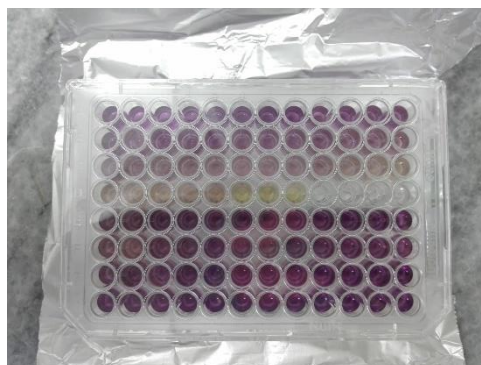


Figura 50. Placa para lectura