

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL**

**Evaluación de la estabilidad de un extracto de interés biotecnológico de la  
microalga termoacidófila *Galdieria* sp. USBA -GBX 832**

**ANA SOFÍA PACHECO PEÑA**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial para obtener el título de:  
MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL**

**Bogotá, D.C  
2021**

Evaluación de la estabilidad de un extracto de interés biotecnológico de la microalga  
termoacidófila *Galdieria* sp. USBA -GBX 832

ANA SOFÍA PACHECO PEÑA

APROBADO

---

Alba Alicia Trespalacios Ph.D  
Decana Académica

---

Marcela Franco Correa. Ph.D  
Directora de Carrera

Evaluación de la estabilidad de un extracto de interés biotecnológico de la microalga  
termoacidófila *Galdieria* sp. USBA -GBX 832

ANA SOFÍA PACHECO PEÑA

APROBADO

---

María Paula Parada M. Sc  
Directora Trabajo de Grado

---

Leidy Ardila Leal Ph. D  
Jurado Trabajo de Grado

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres que me apoyaron incondicionalmente en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida y guiaron mi camino durante esta etapa. Adicionalmente a mi hermano que me ha acompañado y aconsejado durante años. ¡Los amo!

A mi directora María Paula Parada, por su paciencia, ayuda y confianza a lo largo de este proyecto, adicionalmente por su enseñanza en diferentes temas que me inspiraron a ampliar mi conocimiento en nuevas ramas de la microbiología. Asimismo, a Sandra Baena, Gina López y Balkys Quevedo por sus consejos y correcciones. A todas ustedes les doy las gracias por abrirme las puertas del grupo de investigación.

Finalmente, agradezco a mis amigos, por todas las horas de estudio, por ayudarme en las materias que se me dificultaron, por compartir mis logros y por estar para mí siempre que lo necesité, sin ustedes no hubiese disfrutado la universidad de la forma en qué lo hice. Los quiero y espero seguir compartiendo con ustedes nuevas experiencias.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>2. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
3.1. Microalgas extremófilas.....	8
3.2. <i>Galdieria</i> sp. ....	8
3.3. <i>Galdieria</i> sp. USBA-GBX 832.....	9
3.4. Extractos biológicos usados en cosmética.....	9
3.5. Procesos de extracción.....	11
3.6. Estudios de estabilidad.....	12
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
4.1. Objetivo general.....	14
4.2. Objetivos específicos.....	14
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
5.1. Obtención de biomasa algal y extracción.....	15
5.2. Pruebas de estabilidad.....	15
5.2.1. Estabilidad preliminar.....	16
5.2.2. Estabilidad natural.....	16
5.2.3. Estabilidad acelerad.....	16
5.3. Pruebas organolépticas.....	17
5.4. Pruebas microbiológicas.....	17
5.5. Actividad biológica.....	18
5.5.1. Curva patrón de Trolox.....	18
5.5.2. Preparación ABTS.....	18
5.5.3. Reacción ABTS.....	18
5.6. Análisis estadístico.....	19
5.7. Protocolo estabilidad.....	19
5.8. Informe estabilidad.....	19
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>20</b>
6.1. Obtención de la biomasa algal y extracciones.....	20
6.2. Pruebas de estabilidad.....	20
6.2.1. Características organolépticas.....	20
6.2.2. Pruebas microbiológicas.....	21

6.2.3. Actividad biológica.....	22
6.3. Protocolo de estabilidad.....	26
6.4. Informe de estabilidad.....	27
<b>7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>29</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>32</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Empresas de cosméticos que emplean extractos algales.

**Tabla 2.** Comparación de las características organolépticas iniciales y finales de los tres lotes y del TCC.

**Tabla 3.** Recuento de microorganismos en los lotes 1, 2, 3 y TCC a través del tiempo

**Tabla 4.** Protocolo de estabilidad del extracto de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832.

**Tabla 5.** Informe de estabilidad del extracto de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema general de muestreos de pruebas de estabilidad preliminar, natural y acelerada

**Figura 2.** Diagrama de siembra para pruebas microbiológicas.

**Figura 3.** Comparación del color de los lotes 1, 2 y 3 del extracto diluido en TCC

**Figura 4.** Actividad antioxidante residual del lote 1 tras someterlo a diferentes temperaturas (estabilidad preliminar) durante 4 semanas de muestreo

**Figura 5.** Actividad antioxidante residual del lote 1 tras someterlo a 20, 40 y 45°C (estabilidad natural y acelerada), durante 12 semanas de muestreo

**Figura 6.** Actividad antioxidante residual del lote 2 tras someterlo a diferentes temperaturas (estabilidad preliminar) durante 4 semanas de muestreo

**Figura 7.** Actividad antioxidante residual del lote 2 tras someterlo a 20, 40 y 45°C (estabilidad natural y acelerada), durante 12 semanas de muestreo

**Figura 8.** Actividad antioxidante residual del lote 3 tras someterlo a diferentes temperaturas (estabilidad preliminar) durante 4 semanas de muestreo

**Figura 9.** Actividad antioxidante residual del lote 3 tras someterlo a 20, 40 y 45°C (estabilidad natural y acelerada), durante 8 semanas de muestreo

## RESUMEN

Los microorganismos extremófilos son de alto interés en biotecnología ya que producen metabolitos que soportan diferentes condiciones como altos y bajas temperaturas, variaciones en el pH, altas presiones, otorgándoles estabilidad y resistencia a procesos realizados en la industria. Por otro lado, las condiciones en las que crecen disminuyen las probabilidades de contaminación. Estos metabolitos podrían ser usado en diferentes industrias como la energética, de alimentos, farmacéutica y cosmeceútica, gracias a las propiedades biológicas que presentan. En particular la microalga termoacidófila *Galdieria* sp. USBA -GBX 832, produce metabolitos como carotenoides, esteroles, ficocianinas, ácidos grasos poliinsaturados, fosfolípidos, entre otros, los cuales pueden presentar actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antienvjecimiento y protección a rayos UV, indicando el potencial que tiene este microorganismo en la industria cosmeceútica. Por lo tanto, para comprobar la estabilidad un extracto obtenido a partir de la biomasa de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832, se realizó la evaluación de la estabilidad preliminar, natural y acelerada de tres lotes de producción bajo temperaturas de 4, 25, 40, 45°C y ciclos de temperaturas entre 4 y 40°C durante 3 meses. Se realizaron muestreos periódicos de los lotes y se documentó los cambios en el color, olor, aspecto, sensación al tacto, así como pruebas microbiológicas para el recuento de microorganismos mesófilos, pruebas de presencia o ausencia de microorganismos patógenos y, finalmente se midió las variaciones en la actividad antioxidante usando la técnica del radical ABTS. Los resultados evidenciaron que los tres lotes de extractos de la microalga no presentaron cambios en sus características organolépticas a excepción del olor, el cual se intensificó a través del tiempo. Por otro lado, las pruebas microbiológicas determinaron ausencia de mesófilos, hongos, levaduras, y patógenos en todos los extractos. Finalmente, en cuanto a la actividad antioxidante, esta disminuyó en la semana 1 en todos los lotes, manteniéndose estable durante el resto del tiempo evaluado. Concluyendo que los extractos de sp. USBA -GBX 832 son estables en sus propiedades organolépticas, microbiológicas y de actividad biológica.



## 1. INTRODUCCIÓN:

La amplia biodiversidad que presenta Colombia es objeto de estudio para la identificación de diferentes microorganismos productores de compuestos de interés biotecnológico, como las microalgas, las cuales, gracias a su versatilidad metabólica producen moléculas con diversas aplicaciones como la producción de biocombustibles, de compuestos nutricionales como el glucógeno, en tratamiento de aguas residuales y en la producción de compuestos para uso farmacéutico o cosmético (1). En particular, para el sector cosmético, estos extractos algales ricos en proteínas, vitaminas, terpenoides, flavonoides, lípidos y ácidos grasos poliinsaturados son estudiados debido a sus propiedades biológicas como protección contra radiaciones UV, prevención de arrugas, flacidez y textura en la piel. Asimismo, se ha reportado que evitan el envejecimiento de la piel debido a la presencia de compuestos antioxidantes (2). Promoviendo el cuidado del cutis, la personalización de los productos según el tipo de piel, el uso de materias primas que optimicen las propiedades de los productos y las formulaciones limpias (3).

Estas fórmulas deben mantener sus propiedades a través del tiempo, por lo que es necesario evaluar su estabilidad, la cual consiste en comprobar que se cumplan las normas de calidad física, química y microbiológica, así como mantener la actividad biológica deseada del producto, cuando se almacena en condiciones apropiadas, permitiendo contribuir en la formulación final del producto y el envase necesario para este (4). Para esto, debido a que las condiciones climáticas de Colombia son diversas, es necesario exponer los extractos a evaluar a diferentes temperaturas, documentando de manera periódica los cambios producidos (5).

Es por esto, que este trabajo tiene como objetivo evaluar la estabilidad de un extracto de la microalga termoacidófila *Galdieria* sp. USBA -GBX 832, aislada de aguas termales del Parque Nacional Natural de los Nevados por la unidad de saneamiento y biotecnología ambiental (USBA).

## **2. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

Los extractos producidos por la microalga *Galdieria* sp. USBA -GBX 832, al ser ricos en metabolitos como carotenoides, esteroides, ficocianinas, ácidos grasos poliinsaturados, fosfolípidos, entre otros, se pueden ver afectados al someterlos a diferentes factores ambientales, cambiando así sus características organolépticas como olor, color, aspecto y sensación al tacto (5), además, se puede estimular la proliferación de diferentes microorganismos y presentar variaciones en su actividad biológica de interés. Estos cambios pueden afectar la vida útil de un producto cosmético terminado y ocasionar problemas en el consumidor, como irritación en la piel, dermatitis e infecciones.

Entre los factores que más intervienen en estos cambios está la temperatura, la cual puede acelerar reacciones fisicoquímicas, causando variaciones en la composición del extracto como la oxidación de este, provocando olores desagradables, cambios de color y por consiguiente productos de baja calidad (6). Asimismo, temperaturas extremas pueden degradar compuestos como tocoferoles, ficocianinas y fosfolípidos, provocando la pérdida de su actividad biológica

Por lo tanto, estudiar la estabilidad de los extractos de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832, permite comprender los posibles cambios, al ser expuesto a diferentes temperaturas durante un tiempo de estudio establecido. Esta información permite diseñar las formulaciones, estimar el tiempo de vida útil y maximizar los tiempos de almacenamiento de un producto cosmético a base de estos extractos, con el fin de comercializar productos seguros y que cumplan con las expectativas del consumidor (5).

### **3. MARCO TEORICO:**

#### **3.1. Microalgas extremófilas**

Los organismos extremófilos se caracterizan por vivir de manera óptima en condiciones extremas, a las cuales otros organismos solo pueden tolerar. Estos se clasifican según las condiciones de crecimiento (7), siendo las principales pH menores a 4 (acidófilos) o mayores a 9 (alcalófilos), temperaturas superiores a 50°C (termófilos) o inferiores a 5°C (psicrófilos), altas presiones hidrostáticas (barófilos) y salinidad alta (halófilos) (8). Para soportar estas condiciones, existen diferentes mecanismos de resistencia, en el caso de los termófilos estos producen chaperonas que protegen las estructuras propensas a dañarse por calor (9), asimismo producen proteínas más rígidas que soportan la desnaturalización (10); por otro lado, microorganismos acidófilos tienen una membrana permeable para restringir la entrada de protones para mantener el pH al interior casi neutral (11). Finalmente, los microorganismos halófilos en concentraciones salinas usan osmoprotectores que impiden la salida de protones de la membrana interna (12). Estas características confieren ventajas como mayor estabilidad y resistencia de sus metabolitos a condiciones severas, mayor solubilidad y disminución del riesgo de contaminación durante diferentes procesos industriales (13).

Estos organismos suelen ser procariotas. Sin embargo, microalgas rojas del orden Cyanidiales tienen la facultad de crecer a pH entre 0.05-3, temperaturas alrededor de 42 y 56°C, y altas concentraciones de sal. Estas algas se han encontrado en fuentes termales, zonas oceánicas profundas e incluso alrededor de humos ácidos de azufre (14). Los Cyanidiales tienen una morfología relativamente simple que consiste en células esféricas de paredes gruesas que contienen un plastidio, 1-3 mitocondrias, un núcleo, una vacuola y productos de almacenamiento (14). Los metabolitos producidos por estos organismos han sido cada vez más estudiados, debido al alto potencial biotecnológico y farmacéutico.

#### **3.2. *Galdieria* sp.**

*Galdieria* es un género de microalgas rojas con 5 especies identificadas, perteneciente a la familia Galdieriaceae, aislada de ambientes extremos como aguas ácidas calientes, calderas volcánicas y entornos ácidos creados por el hombre (8). Se caracterizan por tener una morfología simple como células esféricas de pared gruesa, las cuales contienen un cloroplasto, 1-3 mitocondrias, núcleo y vacuola (15). A diferencia de otros géneros,

*Galdieria* se caracteriza por crecer de manera fotoautótrofa, heterótrofa, y mixotróficas, siendo capaz de metabolizar más de 50 fuentes de carbono (16). También se diferencia de otros organismos, debido a las condiciones extremas en las que habita, ya que llegan a crecer en un pH de 0 a 5, a una temperatura máxima de 73°C y altas concentraciones de sal (17). Asimismo, estas microalgas toleran diferentes concentraciones de metales tóxicos como iones de aluminio, mercurio y cadmio (15).

### **3.3. *Galdieria* sp. USBA -GBX 832**

La microalga aislada del Parque Nacional de los Nevados, *Galdieria* sp. USBA -GBX 832 ha sido objeto de interés, debido a la gran variedad de metabolitos que presenta, entre los cuales se encuentran ácidos grasos poliinsaturados, glicolípidos, esteroides, fosfolípidos, carotenoides, entre otros. Es por esto, que los extractos de esta microalga son de interés en la industria cosmética, principalmente por sus propiedades biológicas como antioxidantes. Asimismo, se ha demostrado que este tipo de lípidos tienen propiedades preventivas y curativas de enfermedades inflamatorias crónicas y un posible uso en el tratamiento de enfermedades como cáncer, Alzheimer y diabetes, por lo cual, es necesario ampliar el conocimiento de este organismo.

Por otro lado, las condiciones en las que puede crecer, como pH entre 0,5- 3, temperaturas entre 50 y 55°C e incluso poco acceso a la luz solar, hacen de *Galdieria* una candidata de investigación, con el fin de encontrar compuestos nuevos, ya que los metabolitos que se producen a estas condiciones suelen ser termoestables y resistentes a factores desnaturizantes, asimismo las velocidades de reacción suelen ser más altas y se dificulta la contaminación de los cultivos (18). También se sabe que, al someter a la microalga a condiciones de estrés, puede fomentar la producción y acumulación de lípidos, estas condiciones pueden ser periodos de luz continuos, mayor tiempo de cultivo, concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, entre otros (19).

### **3.4. Extractos biológicos usados en cosmética**

En la cosmética actual, los ingredientes extraídos de organismos biológicos tienen múltiples usos, en el caso de las algas estas se usan como conservantes, aditivos o como principio activo. Hoy en día, la industria cosmética está enfocada en buscar nuevos productos a partir de microalgas pardas, rojas y verdes, esto debido a sus propiedades antienvjecimiento, antioxidantes y fotoprotectores, hidratantes y suavizantes (20). Según

un estudio de mercado realizado en el 2017, las propiedades sobre la piel, tanto preventivas como reparadoras de extractos de microalgas, han sido objetivo de diferentes empresas, por lo que cada vez son más aquellas que invierten en sus propios sistemas de producción de microalgas, como se puede observar en la Tabla 1 (21). Es por esto, que grandes empresas a nivel Latinoamérica, como Natura compra aceites de microalgas de la empresa estadounidense Solazyme, para mejorar sus productos.

**Tabla 1.** Empresas de cosméticos que emplean extractos algales (21).

<b>Empresa</b>	<b>País</b>	<b>Organismos usados</b>	<b>Propiedades</b>
Dermochlorella D- Codif	Francia	Extractos de <i>Chlorella vulgaris</i>	Estimulación de la síntesis de colágeno en la piel
Pentapharm	Suiza	Extractos de <i>Nannochloropsis oculata</i>	Efectos tensores en la piel
Greentech	Estados Unidos	Extractos de <i>Porphyridium cruentum</i> utilizando	Mejoramiento de la tonicidad vascular y disminución de la piel rosácea y enrojecimiento
Exsymol	Mónaco	Extractos de <i>Arthrospira</i> sp.	Efecto tensor, preventivo de estrías y del envejecimiento prematuro de la piel
Givaudan	Suiza	Proteínas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Antienvjecimiento
Solazyme Inc.	Estados unidos	Exopolisacáridos de <i>Parachlorella</i> sp.	Mejoramiento de la apariencia de la piel y el cabello

En el mercado colombiano actual, se pueden encontrar diversos productos de origen natural, los cuales incentivan la investigación de la biodiversidad del país. Estos productos derivan principalmente de extractos vegetales, siendo uno de estos los aceites de las nueces de Cacay, industrializado por la empresa Kahai para el cuidado del cabello y de la piel, también se encuentra Green Andina, que dentro de su portafolio se encuentran exfoliantes de coco negro, durazno, maracuyá, café verde y moringa, y aceites esenciales de cacao, flores de caléndula y semilla de mango. Por otro lado, la empresa Neyber, se centra en productos a partir de aloe vera, enfocando su mercado a Centroamérica, principalmente Guatemala y Costa Rica (22). Sin embargo, por el momento en Colombia no se presentan productos cosméticos con microorganismos aislados de su propia biodiversidad.

### **3.5. Procesos de extracción**

Para la extracción de lípidos de microalgas se han utilizado varios métodos, sin embargo, los más comunes son las extracciones líquido-líquido (por solventes), extracciones por fluidos supercríticos, microondas y ultrasonido. La extracción por solventes ha demostrado ser exitosa para la obtención de compuestos lipídicos intracelulares de microalgas, al usarse disolventes orgánicos, como n-hexano, acetona, cloroformo, metanol, isopropanol o etanol. El solvente destruye la pared celular de las algas y extrae los lípidos al medio acuoso debido a su alta solubilidad en estos reactivos. Seguido de esto, el extracto puede someterse a centrifugación para separar los residuos de biomasa y finalmente un proceso de destilación para eliminar el solvente de la muestra (23). En el caso de extractos usados en industria cosmética, estos solventes deben ser no tóxicos, por lo que se debe descartar el uso de cloroformo o metanol, ya que los residuos de estos pueden tener efectos negativos sobre la piel desde irritación y enrojecimiento hasta dermatitis (24), por lo que se recomiendan disolventes como etanol o isopropanol. Por otro lado, existen alternativas como fluidos supercríticos los cuales tienen la capacidad de difundirse como gases y solubilizar como líquidos, al modificar variables como la temperatura y presión se favorece la penetración de estos en los poros de la muestra, entre los fluidos más usados se encuentra el dióxido de carbono, cuyos valores críticos son de 30,95°C y 73,76 bares (25).

### **3.6. Estudios de estabilidad**

La estabilidad se define como es la propiedad que tiene un producto cosmético de mantener sus especificaciones de calidad dentro del rango establecido por el fabricante, durante el tiempo de vida útil asignado y en un material de envase determinado (5). Es por esto por lo que, el objetivo de evaluar la estabilidad de productos de uso humano, como los cosméticos, es comprobar que cumplan las normas de calidad física, química y microbiológica, así como la actividad deseada y estética cuando se almacena en condiciones apropiadas, permitiendo contribuir en la formulación final del producto y el envase necesario para este (4).

Entre los factores que afectan la estabilidad, se encuentran los extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos son aquellos que involucran condiciones de almacenamiento y ambientales, entre estos se encuentra la temperatura, la cual puede llegar a acelerar reacciones fisicoquímicas, microbiológicas y toxicológicas; la humedad, la cual puede desatar cambios en el aspecto físico, adicionalmente puede mejorar las condiciones de crecimiento de algunos microorganismos como hongos y levaduras (26). En estos factores también se encuentra el material del envase, el cual dependiendo de su porosidad, transparencia y grosor puede estimular los cambios del producto; entre los materiales más usados encontramos vidrio, metal o plástico (27). Por otro lado, entre los factores intrínsecos está la incompatibilidad química, la cual se caracteriza porque la interacción de los ingredientes puede generar reacciones indeseadas, anulando o alterando la actividad de cada uno (4).

Ahora bien, los aspectos principales considerados en las pruebas de estabilidad son las características organolépticas, las cuales son perceptibles por los sentidos, refiriéndose al aspecto sensorial como aspecto, color, olor y sabor; estas características determinan los parámetros de aceptación del producto, siendo las primeras que percibe el consumidor. También se encuentran las propiedades fisicoquímicas, las cuales permiten estudiar el comportamiento y/o alteraciones en la estructura del producto. Estas no son perceptibles a simple vista por lo que son requeridos métodos e instrumentos de medición para determinarlas; las principales son el pH, densidad, conductividad e índice de refracción (5). Asimismo, otra característica a evaluar es la estructura química, a través de espectroscopía infrarroja, la cual mide la absorción de la luz de las moléculas en la región infrarroja, convirtiéndola en vibración molecular (28). Otro aspecto importante es la

actividad antioxidante, la cual retarda el deterioro oxidativo de sustancias sensibles a la acción del oxígeno. Finalmente se espera que cumpla con las características microbiológicas, las cuales permiten evaluar la eficacia del sistema preservante y el cumplimiento de los límites microbiológicos establecidos para los productos cosméticos (5).

En estos estudios, es necesario realizar pruebas preliminares, aceleradas y naturales, con el fin de determinar los cambios en el producto según las condiciones en las que se encuentra. En los estudios preliminares las formulaciones se someten a condiciones de estrés, las cuales permiten entender su comportamiento y confirmar si conservan las características deseadas. Estas pruebas no son usadas para estimar el tiempo de vida útil, sino para estimar si es necesario una reformulación del producto (5). Por otro lado, los estudios acelerados buscan aumentar la probabilidad de degradación, al someter el producto a condiciones como temperaturas elevadas, altos niveles de humedad y exposición a la luz intensa (29), favoreciendo y/o acelerando la alteración de los parámetros organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos o posibles cambios en su estructura (5). Finalmente, las pruebas naturales buscan conocer las variaciones que se presentan en el producto en condiciones reales de uso y almacenamiento, con el fin de definir así su vida útil (29).



#### **4. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general:**

Evaluar la estabilidad de los extractos de la microalga termoacidófila *Galdieria* sp. USBA -GBX 832.

##### **Objetivos específicos:**

- Identificar los cambios de tres extractos de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832, a través de pruebas organolépticas y pruebas microbiológicas.
- Evaluar la estabilidad de la actividad biológica antioxidante de tres extractos de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832.

## **5. METODOLOGÍA:**

### **5.1. Obtención de biomasa algal y extracción.**

Para el desarrollo de este trabajo se empleó un extracto obtenido de la cepa *Galdieria* sp. USBA-GBX 832, cepa depositada en la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana (WDCM 857) con el número de identificación CMPUJ U832.

La biomasa de *Galdieria* sp. USBA-GBX 832 se cultivó en medio líquido M991 modificado, suplementado con glucosa 4.5 g/L (19). El cultivo se incubó a 45°C con agitación de 170 rpm, intensidad de luz constante de 1000 lux durante 10 días. Seguido de esto, la biomasa se recuperó por centrifugación, congeló a -80°C y liofilizó para la obtención del extracto. La extracción se realizó por disolventes orgánicos como bio etanol, usando el protocolo de Bligh & Dyer (30) con modificaciones de López et al. (31).

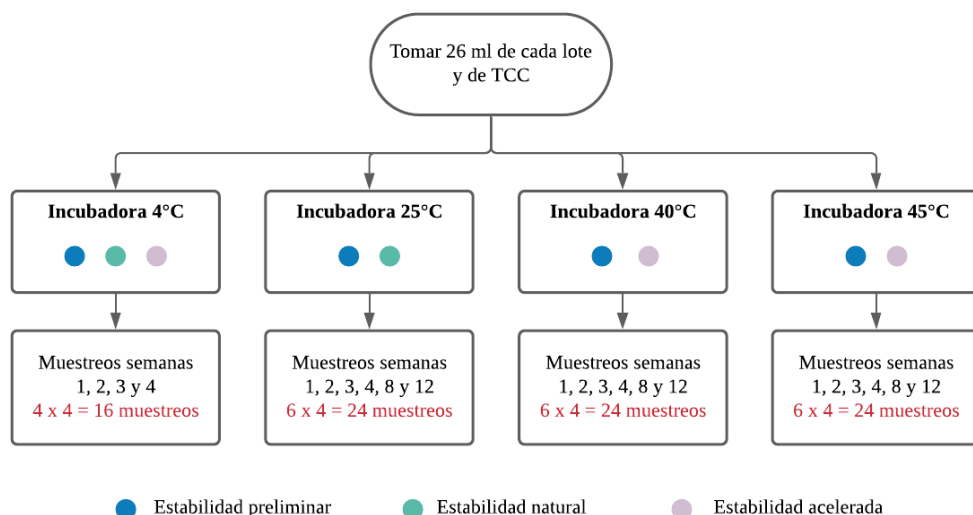
Los extractos se solubilizaron en triglicérido caprílico cáprico (TCC) y se produjeron tres lotes, cada uno a partir de un lote diferente de biomasa algal liofilizada. Posteriormente se examinaron las características organolépticas, se realizaron pruebas microbiológicas y se midió la actividad biológica de los lotes 1, 2 y 3.

### **5.2. Pruebas de estabilidad**

Para el desarrollo de las pruebas de estabilidad, se agregó 1ml de extracto algal en frascos de vidrio ámbar con tapa rosca, y se realizaron muestreos destructivos del lote 1, 2 y 3 a lo largo de las pruebas, con el fin de mantener la esterilidad de estas. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento con TCC.

Posteriormente, los tres lotes se sometieron a diferentes temperaturas, tales como:

- Estabilidad preliminar: 4, 25, 40 y 45°C
- Estabilidad natural: 25°C
- Estabilidad acelerada: 40 y 45°C



**Figura 1.** Esquema general de muestreos de pruebas de estabilidad preliminar, natural y acelerada

### 5.2.1. Estabilidad preliminar

Con el fin de evaluar variaciones en los extractos en condiciones de estrés, las muestras se almacenaron en incubadoras a temperaturas de 4, 25, 40 y 45°C durante un mes. Semanalmente se retiró un frasco por cada lote y un frasco de TCC para realizar pruebas organolépticas, microbiológicas y medición de la actividad antioxidante por la técnica del radical ABTS.

De manera paralela, se realizaron ciclos de temperatura de 24 horas a 4°C y 24 horas a 40°C durante un mes, y se realizaron muestreos semanales para realizar las pruebas organolépticas, microbiológicas y medición de la actividad antioxidante (5).

### 5.2.2. Estabilidad natural

Para simular condiciones reales de uso y almacenamiento, las muestras se almacenaron en incubadora a temperatura de 25°C durante 3 meses. Se tomó un frasco de cada lote y un frasco con TCC en las semanas 1, 2, 3, 4, 8 y 12, para realizar pruebas organolépticas, microbiológicas y medición de la actividad antioxidante. (5).

### 5.2.3. Estabilidad acelerada

Para aumentar la probabilidad de degradación, las muestras se almacenaron en incubadoras a temperaturas de 40 y 45°C durante 3 meses. En las semanas 1, 2, 3, 4, 8 y 12, se retiró un frasco de cada lote y un frasco con TCC para realizar las pruebas

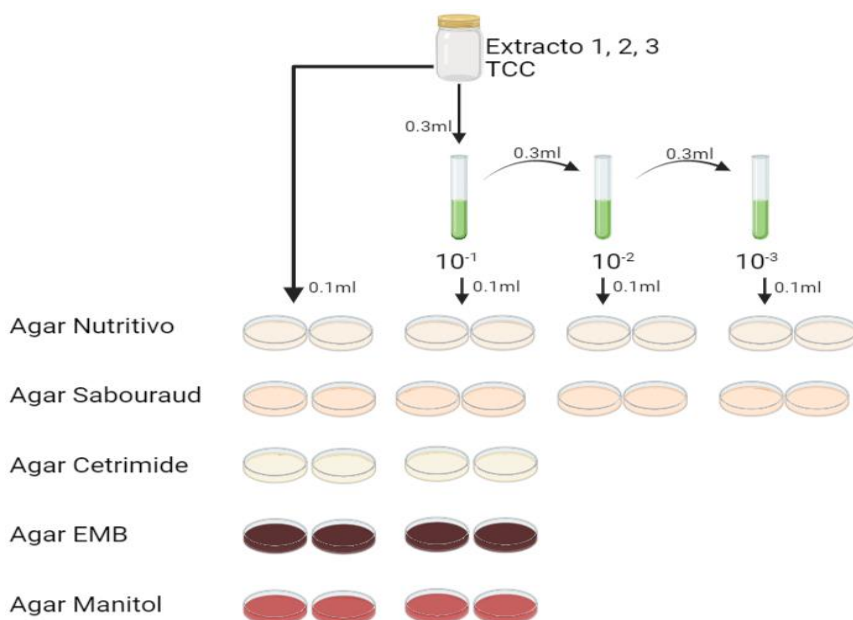
organolépticas, microbiológicas y actividad antioxidante, con el objetivo de evaluar si estas temperaturas aceleran reacciones indeseadas en los extractos (5).

### 5.3. Características organolépticas

Se examinó el color, olor, aspecto, textura al tacto y homogeneidad de los tres extractos y del TCC. Esto se realizó en cada muestreo de las pruebas de estabilidad preliminar, acelerada y natural (5).

### 5.4. Pruebas microbiológicas

Bajo condiciones de esterilidad, se tomó una alícuota de 300  $\mu$ L del extracto y se adicionó en solución salina (0.9% p/v), realizando diluciones seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , a un volumen final de 3 ml. Posteriormente se sembró por superficie como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Diagrama de siembra para pruebas microbiológicas.

Consecutivamente, las placas de agar nutritivo, EMB, cetrimide y salado manitol se incubaron a 35°C durante 72 horas y las placas de agar sabouraud se incubaron a 25°C durante 7 días. Pasado este tiempo, se observó si hubo crecimiento de microorganismos como mesófilos, hongos y levaduras, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, y se hizo el recuento de estos.

## 5.5. Actividad biológica

### 5.5.1. Curva patrón de trolox

Debido a que el Trolox es un análogo de la vitamina E, su elevada capacidad antioxidante permite usarse como patrón para hallar la capacidad antioxidante de los equivalentes trolox (TEAC) de los tres lotes de extractos. Para esto, se disolvieron 0.0013g de trolox en 5ml de etanol absoluto, obteniendo una concentración de 250mg/L. Posteriormente, la solución stock se diluyó con el mismo etanol, obteniendo concentraciones de 50, 25, 12,5 y 6,25  $\mu\text{M}$ . Se agregó 30  $\mu\text{L}$  de cada concentración por triplicado en 970  $\mu\text{L}$  de ABTS y se leyó la absorbancia a 734nm. Finalmente, las concentraciones obtenidas se graficaron en función de la concentración, para calcular la ecuación de la recta (32).

### 5.5.2. Preparación Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS)

La reducción del radical catiónico  $\text{ABTS}^+$  por acción de agentes antioxidantes, produce una decoloración de la solución debido a que el  $\text{ABTS}^{-2}$  es incoloro. Para llevar a cabo esta técnica se adicionó 0.0194g de ABTS a 5mL de agua tipo I, obteniendo una solución 7mM, posteriormente se adicionó 0.0033g de persulfato de potasio a la solución para obtener una concentración 3.5mM. La mezcla se almacenó en oscuridad durante 12-16 horas (33).

### 5.5.3. Reacción ABTS

La solución stock previamente preparada se diluyó en etanol absoluto hasta obtener una absorbancia de  $0,7 \pm 0,2$  a 734nm. Seguido de esto, se mezclaron 30  $\mu\text{L}$  por triplicado de cada lote de extracto (diluidas previamente 1/3) con 970  $\mu\text{L}$  de la solución de ABTS. Una vez homogenizado, se dejó reaccionar por 30 minutos y se leyó la absorbancia a 734nm. Como control negativo se usó el TCC. Finalmente, se determinó la actividad antioxidante transformando las absorbancias a concentración ( $\mu\text{M}$ ), usando la ecuación de recta de la curva patrón de Trolox. Este dato (en mM) se dividió sobre los g de extracto presentes en 30  $\mu\text{L}$  obteniendo el TEAC. Por último, se halló el % de actividad residual como se muestra en la Ecuación 1 (33).

$$\% \text{ actividad residual} = \frac{TEAC \times 100}{TEAC t_0} \quad (1)$$

## **5.6. Análisis estadístico**

Los resultados de la actividad antioxidante fueron procesados estadísticamente utilizando el programa estadístico GraphPad Prism versión 9.3.0, con la realización de un análisis de varianza 2 way-ANOVA y la prueba de comparación múltiple de medias utilizando la prueba de Tukey con un alfa de 0.05 y un P value <0.0001.

## **5.7. Protocolo de estabilidad**

Se seguirá el siguiente protocolo de estabilidad

- Nombre del producto
- Lote
- Condiciones ambientales
- Envase
- Frecuencia de análisis
- Parámetros de calidad a analizar
- Cantidad de muestra (5).

## **5.8. Informe de estabilidad**

El informe final de estabilidad tendrá la siguiente información.

- Nombre producto
- Lote
- Objetivo de estudio
- Referencia al número de protocolo utilizado en el estudio.
- Análisis de datos
- Conclusiones y recomendaciones (Tiempo de vida útil)
- Firma de responsable técnico (5).

NOTA ACLARATORIA: La estabilidad del lote 3 se evaluó hasta la semana 8 (mes 2) de tratamiento, debido a que las extracciones se realizaron un mes después de la obtención de los lotes 1 y 2.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. Obtención de biomasa algal y extracciones**

Las extracciones se realizaron en bioetanol, obteniéndose un extracto pastoso de color verde, el cual se solubilizó en TCC hasta obtener una concentración aproximada de 3,5%.

Las características organolépticas en el tiempo 0 de cada lote fueron similares, obteniendo un color verde claro, verde-amarillo y verde oliva de los lotes 1, 2 y 3, respectivamente, así como un olor a aceite oxidado, aspecto traslucido y textura al tacto aceitosa sin grumos. En cuanto a las pruebas microbiológicas, se obtuvo ausencia de mesófilos, hongos y patógenos. Por otro lado, el TEAC es mayor en el extracto 2, seguido del extracto 1 y finalmente el extracto 3, presentando valores de 416.19 mmol/g, 374.57 mmol/g y 307.619 mmol/g respectivamente.

### **6.2. Pruebas de estabilidad**

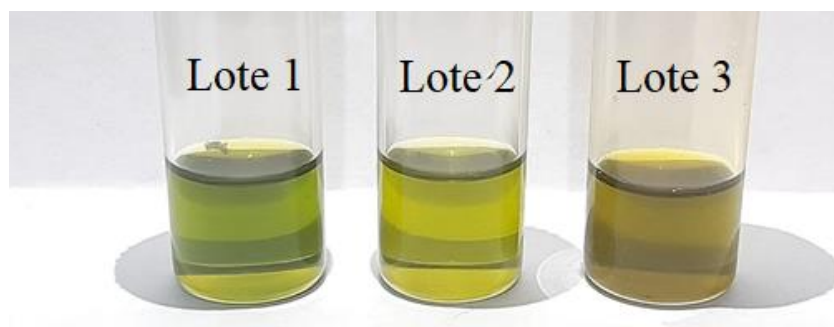
#### **6.2.1. Características organolépticas**

Las propiedades organolépticas de los extractos de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832, demostró que no existen cambios a través del tiempo en el color, aspecto, textura y homogeneidad tras someter los extractos a diferentes temperaturas. Entre las características descritas en la Tabla 2, se destaca la textura aceitosa del extracto debido a la selección del TCC como vehículo, en el cual se solubilizó, debido a sus propiedades dispersivas y emolientes, así como su naturaleza polar. Por otro lado, en cuanto al olor, este fue intensificándose a lo largo del tiempo, lo que puede indicar un deterioro oxidativo por autooxidación de los lípidos presentes en el extracto, debido a la disponibilidad de oxígeno en los frascos (34).

Por otra parte, al comparar los tres lotes entre sí, se puede observar una diferencia en el color de cada uno (Figura 3), esto se puede deber a variaciones de la intensidad y frecuencia de la luz sobre los cultivos, lo que provocó diferencias en la pigmentación de la biomasa algal. Entre los metabolitos asociados al color se encuentran los carotenos, cuya concentración según un estudio realizado con la microalga *Galdieria sulphuraria*, varían si estas se cultivan bajo condiciones autótrofas o heterótrofas, obteniendo entonces concentraciones más altas de carotenoides y pigmentos en condiciones de autotrofia, debido también a que su producción está asociada a la fotosíntesis (35).

**Tabla 2.** Comparación de las características organolépticas iniciales y finales de los tres lotes y del TCC

	Color		Olor		Aspecto		Textura al tacto		Homogeneidad		Cambios en el tiempo
	T <sub>0</sub>	T <sub>f</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>f</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>f</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>f</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>f</sub>	
<b>Lote 1</b>	Verde claro		Aceite oxidado		Traslucido		Aceitoso sin gránulos		Homogéneo		Intensidad del olor
<b>Lote 2</b>	Verde - amarillo		Aceite oxidado		Traslucido		Aceitoso sin gránulos		Homogéneo		Intensidad del olor
<b>Lote 3</b>	Verde oliva		Aceite oxidado		Traslucido		Aceitoso sin gránulos		Homogéneo		Intensidad del olor
<b>TCC</b>	Incoloro		Inoloro		Traslucido		Aceitoso sin gránulos		Homogéneo		No



**Figura 3.** Comparación del color de los lotes 1, 2 y 3 del extracto diluido en TCC

### 6.2.2. Pruebas microbiológicas

Los resultados de los parámetros de calidad microbiológica de los extractos sometidos a diferentes temperaturas se encuentran dentro de los límites permitidos por la normatividad colombiana (36) y la ONUDI (5), debido a que se presentó ausencia de bacterias mesófilas, hongos, levaduras y microorganismos patógenos como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* como se observa en la Tabla 3, indicando que las condiciones de extracción y almacenamiento de los extractos evitaron la contaminación de estos, demostrando ser estables durante los 3 meses evaluados.

Por otro lado, en diferentes estudios se ha demostrado la capacidad de inhibición del crecimiento de diferentes microorganismos a partir de los metabolitos que componen el extracto algal. En una investigación realizada con flavonoides extraídos de las algas *Cystoseira compressa* y *Padina pavonica*, se observó que esta molécula tiene potencial antimicrobiano contra bacterias Gram negativas como *E. coli* y *S. entérica*, y bacterias



Gram positivas como *S. aureus*, *B. cereus* y *B. pumilus* (37). Asimismo, se estudió el efecto antibacteriano de las ficocianinas obtenidas de *Anabaena oryzae*, las cuales inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *K.pneumoniae*, *B.cereus* y *E.coli* (38).

**Tabla 3.** Recuento de microorganismos en los lotes 1, 2, 3 y TCC a través del tiempo

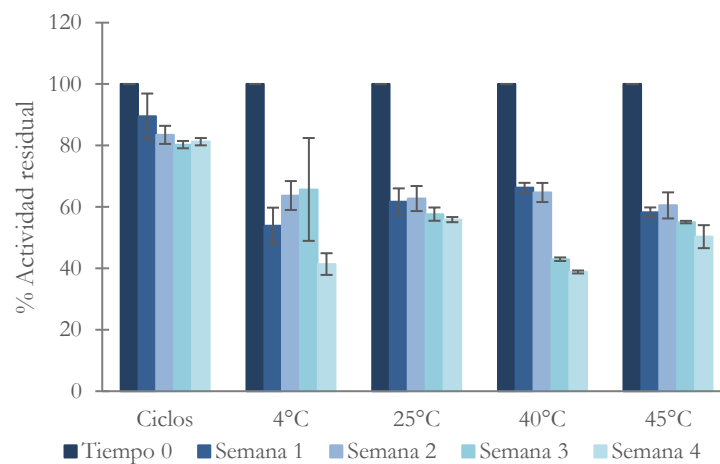
	Microorganismo	Recuento (UFC/ml)					
		Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 8	Semana 12
<b>Lote 1</b>	Mesófilos	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Hongos y levaduras	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	<i>Candida albicans</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
	<b>Lote 2</b>	Mesófilos	<10	<10	<10	<10	<10
Hongos y levaduras		<10	<10	<10	<10	<10	<10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Candida albicans</i>		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<b>Lote 3</b>		Mesófilos	<10	<10	<10	<10	<10
	Hongos y levaduras	<10	<10	<10	<10	<10	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	
	<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	
	<i>Candida albicans</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	
	<b>TCC</b>	Mesófilos	<10	<10	<10	<10	<10
Hongos y levaduras		<10	<10	<10	<10	<10	<10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Candida albicans</i>		Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

### 6.2.3. Actividad biológica

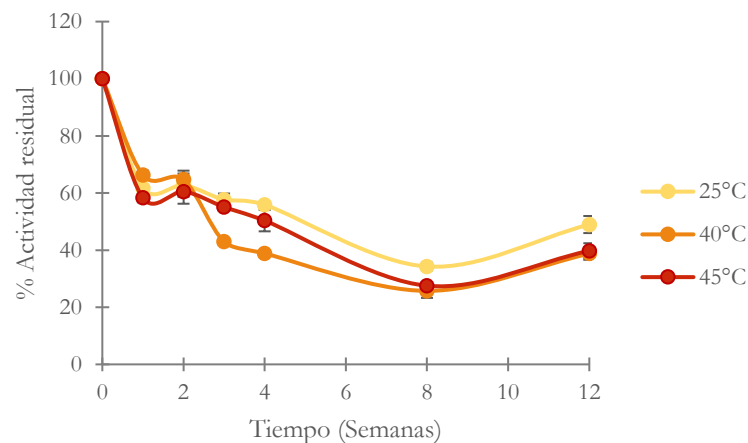
Los resultados obtenidos indicaron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ) entre el tiempo 0 y los diferentes tiempos de muestreo de los extractos sometidos las diferentes temperaturas, observándose una disminución de la actividad antioxidante del lote 1 del 46.17% (4°C), 38.28% (25°C), 33.67% (40°C) y 41.71% (45°C) en la semana 1, mientras que los valores en la semana 4 llegaron a decrecer en un 58.60%, 44.13%, 61.18% y 49.67% respectivamente. Sin embargo, para el tratamiento de ciclos, la disminución de la actividad no fue significativa, presentando valores constantes desde el tiempo 0 hasta la

semana 4, mostrando una reducción de la actividad del 18.76% al final de las pruebas de estabilidad preliminar como se observa en la Figura 4. Por otro lado, se puede observar que posterior a la disminución de la actividad, esta suele aumentar entre un 1 y un 12% según la temperatura, es posible que esto se deba a que el extracto se siga emulsionando en el TCC, siendo en el tratamiento a 4°C donde más se observa este cambio.

En cuanto a la estabilidad acelerada y natural (Figura 5), se puede observar que el comportamiento del lote 1 es similar en las tres temperaturas evaluadas durante las 12 semanas (mes 3) de muestreo, obteniéndose una actividad antioxidante residual del 48.96%, 38.79%, 39.768% a 25, 40 y 45°C respectivamente.



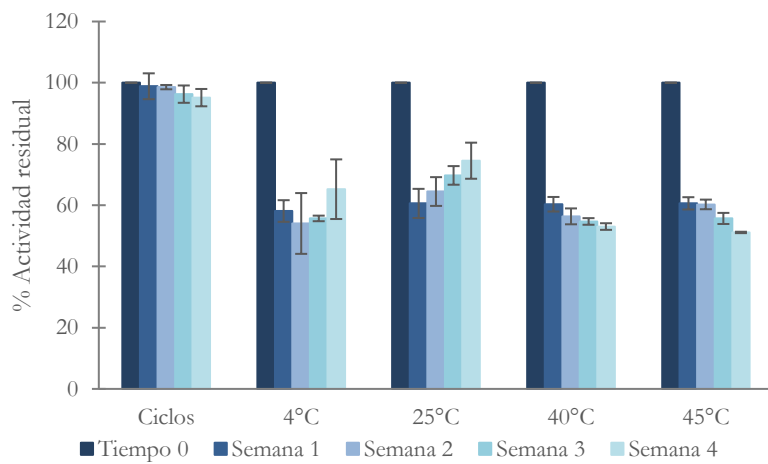
**Figura 4.** Actividad antioxidante residual del lote 1 tras someterlo a diferentes temperaturas (estabilidad preliminar) durante 4 semanas de muestreo



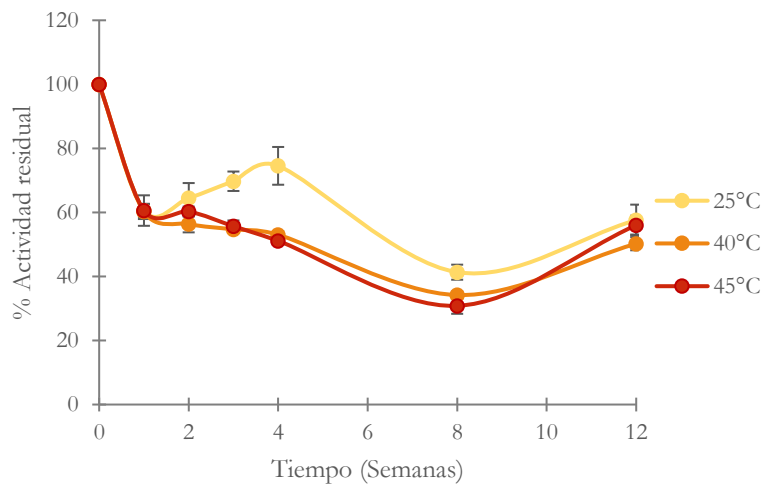
**Figura 5.** Actividad antioxidante residual del lote 1 tras someterlo a 25, 40 y 45°C (estabilidad natural y acelerada), durante 12 semanas de muestreo

Respecto a la actividad antioxidante del lote 2, no hubo variación significativa entre los tratamientos, durante la prueba de estabilidad preliminar a partir de la semana 1, sin embargo, al comparar estos valores con el tiempo 0, se observa una disminución de la actividad del 41.89% (4°C), 39.42% (25°C), 39.68% (40°C) y 39.38% (45°C), mientras que en los ciclos la máxima diferencia es del 4.86% en la semana 4 (Figura 6).

Por otro lado, los resultados de las pruebas de estabilidad natural y acelerada indican que al medir la actividad antioxidante en la semana 12 de muestreo (Figura 7), se observó que el lote 2 se comporta similar a 25, 40 y 45°C, obteniendo que la disminución de este desde el muestreo inicial ronda el 40-50%.

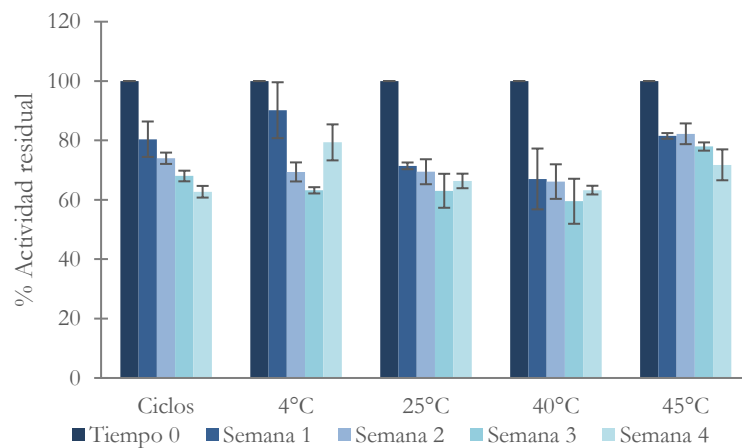


**Figura 6.** Actividad antioxidante residual del lote 2 tras someterlo a diferentes temperaturas (estabilidad preliminar) durante 4 semanas de muestreo

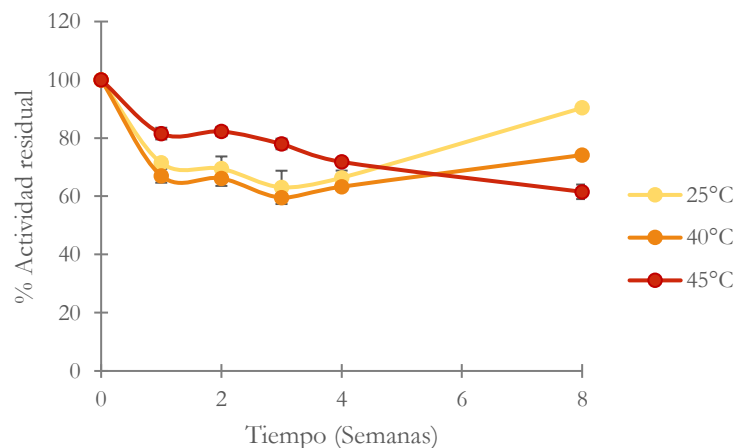


**Figura 7.** Actividad antioxidante residual del lote 2 tras someterlo a 25, 40 y 45°C (estabilidad natural y acelerada), durante 12 semanas de muestreo

Finalmente, al evaluar el lote 3 se observó que no hay diferencias significativas entre los 5 tratamientos a partir de la semana 1 hasta la semana 4, mientras que entre el tiempo 0 y la semana 1 se observó disminución del 19.58% (ciclos), 9.81% (4°C), 28.55% (25°C), 32.96% (40°C) y 18.47% (45°C). Los valores finales del estudio de estabilidad preliminar del lote 3 presentaron una disminución de la actividad entre el 20 y el 40% (Figura 8). En cuanto a la estabilidad acelerada y preliminar (Figura 9), no hay variaciones significativas entre las temperaturas, entre la semana 4 y 8. El lote 3 presentó valores finales de actividad antioxidante residual del 90.33%, 74.14% y 61.52% al someterse a 25, 40 y 45°C respectivamente.



**Figura 8.** Actividad antioxidante residual del lote 3 tras someterlo a diferentes temperaturas (estabilidad preliminar) durante 4 semanas de muestreo



**Figura 9.** Actividad antioxidante residual del lote 3 tras someterlo a 25, 40 y 45°C (estabilidad natural y acelerada), durante 8 semanas de muestreo

La estabilidad de la actividad antioxidante de los tres lotes de extractos de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832 no presenta variaciones significativas entre sí al someter los extractos a diferentes temperaturas en función del tiempo, por lo que el protocolo usado para los ensayos de estabilidad preliminar, natural y acelerada presenta resultados reproducibles, observándose que la actividad biológica del extracto es estable a partir de la primera semana, después de su extracción.

Estas variaciones en la actividad antioxidante entre el tiempo 0 y la semana 1, pueden estar relacionadas con el tiempo de emulsión de los lotes en el TCC antes de empezar las pruebas, por lo que cada frasco que contiene 1 ml de extracto puede tener una concentración inicial diferente según los gramos de extracto disueltos en esa fracción. Finalmente, es clave que las condiciones de cultivo de la biomasa y extracción sean iguales, ya que estas pueden afectar los metabolitos presentes en cada lote.

### 6.3 Protocolo de estabilidad

Para describir brevemente las condiciones y procedimiento a seguir para desarrollar un estudio de estabilidad, este debe responder a los ítems descritos en la Tabla 4.


**Tabla 4.** Protocolo de estabilidad del extracto de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832.

<b>Nombre del producto</b>	Extracto de <i>Galdieria</i> sp. USBA -GBX 832.		
<b>Lote</b>	Lote 1	Lote 2	Lote 3
<b>Objetivo de estudio</b>	Evaluar la estabilidad de los extractos de la microalga termoacidófila <i>Galdieria</i> sp. USBA -GBX 832.		
<b>Condiciones ambientales</b>	Temperaturas de 4, 25, 40 y 45°C		
<b>Envase</b>	Frascos de vidrio color ámbar con tapa rosca		
<b>Frecuencia de análisis</b>	Semanal y mensual		
<b>Parámetros de calidad</b>	Color, olor, aspecto, sensación al tacto, homogeneidad, pH, actividad antioxidante e inocuidad microbiana.		
<b>Cantidad de muestra</b>	1 ml por muestra		

#### 6.4. Informe de estabilidad

El informe de estabilidad resume la información obtenida de los ensayos de estabilidad realizados, respondiendo a los ítems que se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Informe de estabilidad del extracto de *Galdieria* sp. USBA -GBX 832.

<b>Nombre del producto</b>	Extracto de <i>Galdieria</i> sp. USBA -GBX 832.		
<b>Lote</b>	Lote 1	Lote 2	Lote 3
<b>Objetivo de estudio</b>	Evaluar la estabilidad de los extractos de la microalga termoacidófila <i>Galdieria</i> sp. USBA -GBX 832.		
<b>Protocolo utilizado</b>	Estudios de estabilidad de productos cosméticos - ONUDI		
<b>Análisis de datos</b>	Los extractos de <i>Galdieria</i> sp. USBA -GBX 832 no presentaron cambios en sus características organolépticas a excepción del olor, el cual se intensificó. Por otro lado, las pruebas microbiológicas determinaron ausencia de mesófilos, hongos y levaduras, y patógenos. Finalmente, en cuanto a la actividad antioxidante, esta disminuyó, sin embargo, a partir de la semana 1, la variación no es significativa.		
<b>Conclusiones</b>	El extracto de <i>Galdieria</i> sp. USBA -GBX 832 no es estable en sus propiedades organolépticas. Sin embargo, el extracto mantiene su estabilidad microbiológica durante los meses evaluados. En cuanto a la actividad antioxidante, esta fue estable a partir de la primera semana, posterior a su extracción y solubilización en el vehículo.		
<b>Recomendaciones</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto</li><li>- Medir actividad antioxidante por otros métodos como DPPH</li><li>- Dejar emulsionar el extracto por más tiempo en el TCC antes de empezar las pruebas de estabilidad</li></ul>		
<b>Firma responsable técnico</b>			

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A partir de este estudio fue posible determinar que los extractos de la microalga termoacidófila *Galdieria* sp. USBA -GBX 832 no es estable en sus propiedades organolépticas, debido a la variación del olor. Sin embargo, el extracto mantiene su estabilidad microbiológica debido a la ausencia de hongos, levaduras y patógenos durante los meses evaluados. Finalmente, en cuanto a la actividad antioxidante, esta fue estable a partir de la primera semana, posterior a su extracción y solubilización en el vehículo.

Adicional a este estudio, se recomienda realizar pruebas de actividad antimicrobiana, con el fin de determinar si la ausencia de microorganismos en estas pruebas se debe a la forma de almacenamiento de los extractos, o a su capacidad de inhibir el crecimiento microbiano. En segunda instancia, se propone realizar las mediciones de actividad antioxidante por otros métodos como DPPH, debido a que el reactivo ABTS llega a ser inestable. Asimismo, se recomienda dejar emulsionar el extracto por más tiempo en el vehículo seleccionado, para asegurar la homogeneidad de este antes de las pruebas de estabilidad y que los parámetros en el tiempo 0 sean los mismos en todas las muestras. Finalmente, es necesario realizar pruebas fisicoquímicas que permitan determinar las variaciones estructurales de los tres lotes de los extractos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Maamoun I, Bensaida K, Eljamal R, Falyouna O. Innovative Biotechnological Applications of *Galdieria Sulphuraria*-Red Microalgae ( GS-RMA ) in Water Treatment Systems. 2020;(October).
2. Ariede MB, Candido TM, Jacome ALM, Velasco MVR, de Carvalho JCM, Baby AR. Cosmetic attributes of algae - A review. Vol. 25, *Algal Research*. Elsevier B.V.; 2017. p. 483–7.
3. Bolivar P. Belleza en el 2021: más autocuidado que vanidad [Internet]. *EL Tiempo*. 2021 [cited 2021 Jul 5]. Available from: <https://www.eltiempo.com/vida/belleza-en-el-2021-mas-autocuidado-que-vanidad-567562>
4. López F, Daniela Tituaña. Estudios de estabilidad cremas faciales elaboradas con Matico e Ishpingo. Universidad Politécnica Salesiana; 2017.
5. ONUDI. Estudios de estabilidad de productos cosméticos [Internet]. Programa de Calidad para el Sector Cosmético (Safe+). 2018. 90. Available from: [https://www.unido.org/sites/default/files/files/2019-02/ONUDI\\_Guía de Estabilidad\\_FINAL \(003\).pdf](https://www.unido.org/sites/default/files/files/2019-02/ONUDI_Guía de Estabilidad_FINAL (003).pdf)
6. Poyato C, Thomsen BR, Hermund DB, Ansorena D, Astiasarán I, Jónsdóttir R, et al. Antioxidant effect of water and acetone extracts of *Fucus vesiculosus* on oxidative stability of skin care emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2017;119(3):1–11.
7. Ciniglia C, Pollio A, Pinto G. Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae. *Biology Building*. 2004;13:1827–38.
8. Barbier GG, Zimmermann M, Weber APM. Genomics of the thermo-acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. 2005;5906:1–12.
9. Annamalai N, Rajeswari MV, Balasubramanian T. Thermostable and Alkaline Cellulases from Marine Sources. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications*. 2016 Jan 1;91–8.
10. Chakravorty D, Khan MF, Patra S. Multifactorial level of extremostability of proteins: can they be exploited for protein engineering? *Extremophiles* 2017 21:3. 2017 Mar 10;21(3):419–44.
11. Zhang X, Liu X, Liang Y, Fan F, Zhang X, Yin H. Metabolic diversity and adaptive mechanisms of iron- and/or sulfur-oxidizing autotrophic acidophiles in extremely acidic environments. *Environmental Microbiology Reports*. 2016 Oct 1;8(5):738–51.
12. Zhu D, Cui S, Nagata S. Isolation and Characterization of Salt-Sensitive Mutants of the Moderately Halophilic Bacterium *Salinivibrio costicola* subsp. *yaniae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2008 Aug 23;72(8):1977–82.
13. Zhu D, Adebisi WA, Ahmad F, Sethupathy S, Danso B, Sun J. Recent Development of Extremophilic Bacteria and Their Application in Biorefinery. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020 Jun 12;8:483.



14. Weber APM, Horst RJ, Barbier GG, Oesterhelt C. Metabolism and Metabolomics of Eukaryotes Living Under Extreme Conditions. 2007;256(07):1–34.
15. Malavasi V, Soru S, Cao G. Extremophile Microalgae: the potential for biotechnological application. *Journal of Phycology*. 2020;56:559–73.
16. Reeb V, Bhattacharya D. The Thermo-Acidophilic Cyanidiophyceae (Cyanidiales). *Red Algae in the Genomic Age*. 2010;13:409–26.
17. Furuki T, Maeda S, Imajo S, Hiroi T, Amaya T, Hirokawa T, et al. Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *Journal of Applied Phycology*. 2003;15:319–24.
18. Oliart-Ros R, Manresa-Presas Á, Sánchez-Otero M. Utilization of microorganisms from extreme environments and their products in biotechnological development. *CienciaUAT*. 2016;11(1):79–90.
19. López G, Yate C, Ramos FA, Cala MP, Restrepo S, Baena S. Production of Polyunsaturated Fatty Acids and Lipids from Autotrophic, Mixotrophic and Heterotrophic cultivation of *Galdieria* sp. strain USBA-GBX-832. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1–13.
20. Kim S-K. *Encyclopedia of Marine Biotechnology*. Ltd. JW& S, editor. 2020. 65–85.
21. Lourdes Mourelle M, Gómez CP, Legido JL. The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy. *Cosmetica*. 2017;4(4):46.
22. Pro Colombia. Ingredientes naturales colombianos con los ojos puestos en conquistar el mercado [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 29]. Available from: [https://procolombia.co/noticias/ingredientes-naturales-colombianos-con-los-ojos-puestos-en-conquistar-el-mercado?\\_\\_cf\\_chl\\_jschl\\_tk\\_\\_=95ebe0d5c87236c320590042e9f86131edc08a07-1625058169-0-AbDEi4trDxecEZOxcLIPV3-7r3tjsbz1Zzu9foUP07z6E34k1Du-1p2hN1FoPISbUu4A](https://procolombia.co/noticias/ingredientes-naturales-colombianos-con-los-ojos-puestos-en-conquistar-el-mercado?__cf_chl_jschl_tk__=95ebe0d5c87236c320590042e9f86131edc08a07-1625058169-0-AbDEi4trDxecEZOxcLIPV3-7r3tjsbz1Zzu9foUP07z6E34k1Du-1p2hN1FoPISbUu4A)
23. Basily H, Nassar M, Diwani G, El-Enin S. Extraction of algal lipid as a natural cosmetic component. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2018;17(1):13–20.
24. Health Protection Agency. Chloroform Toxicological overview [Internet]. 2007 [cited 2021 Nov 26]. p. 1–12. Available from: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/338535/Chloroform\\_Toxicological\\_Overview.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/338535/Chloroform_Toxicological_Overview.pdf)
25. Páez M, Román A, Narváez CM, Cardona LM, Muñoz LM, Gómez DD, et al. GUÍA DE EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES. SENA; 2016.
26. Jurado V, Pacheco K. Determinación de los factores extrínsecos e intrínsecos que afectan la vida útil de la malteada Nutrángel en Cúcuta en el año 2018 - 2019. Universidad de Santander; 2019.
27. Stanpa. Guía declaración de envases de productos de. Asociación Nacional de Perfumería y Cosmética. 2019;
28. Bruker. Guía de espectroscopía infrarroja [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 7]. Available from: <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>

29. González PML. ANÁLISIS COMPARATIVO DE ESTABILIDAD ACELERADA Y ESTABILIDAD A LARGO PLAZO DE JARABE DE AMBROXOL. Universidad de San Carlos de Guatemala; 2006.
30. Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959;37(8):911–8.
31. López G, Baena S. Evaluación de *Galdieria* sp. USBA-GBX-832 microalga termoacidófila, como biofábrica de compuestos bioactivos como terpenoides, tocoferoles y pigmentos. Informe final de Investigación. 2019;
32. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, A. Flanagan J, L. Prior R. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002 Jul 3;50(16):4437–44.
33. Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*. 2005;25(4):726–32.
34. Riaz M, Rokey G. Impact of particle size and other ingredients on extruded foods and feeds. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. 2012;55–63.
35. Graziani G, Schiavo S, Nicolai MA, Buono S, Fogliano V, Pinto G, et al. Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food & Function* [Internet]. 2013 Dec 19 [cited 2021 Nov 28];4(1):144–52. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/fo/c2fo30198a>
36. Secretaría General De La Comunidad Andina. Resolución 1482 [Internet]. Límites de contenido microbiológico de productos cosméticos . 2012 [cited 2021 Nov 28]. Available from: <http://www.comunidadandina.org/StaticFiles/DocOf/RESO1482.pdf>
37. Alghazeer R, Elmansori A, Sidati M, Gammoudi F, Azwai S, Naas H, et al. Antibacterial Activity of Flavonoid Extracts of Two Selected Libyan Algae against Multi-Drug Resistant Bacteria Isolated from Food Products. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2017;05(01):26–48.
38. Kumar D, Dhar DW, Pabbi S, Kumar N, Walia S. Extraction and purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology* [Internet]. 2014 Jun 16 [cited 2021 Nov 28];19(2):184–8. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/286322033\\_Antibacterial\\_phycoyanin\\_from\\_Anabaena\\_oryzae\\_SOS13](https://www.researchgate.net/publication/286322033_Antibacterial_phycoyanin_from_Anabaena_oryzae_SOS13)

## 9. ANEXOS

### 10.1. Composición agares usados en pruebas microbiológicas

**Tabla 1.** Componentes Agar Nutritivo

Componentes	g/L
Extracto de carne	1.00
Extracto de levadura	2.00
Peptona	5.00
Cloruro de sodio	5.00
Agar	15.00

**Tabla 2.** Componentes Agar Sabouraud

Componentes	g/L
Glucosa	40.00
Peptona de carne	5.00
Peptona de caseína	5.00
Agar	15.00

**Tabla 3.** Componentes Agar Cetrimide

Componentes	g/L
Peptona de gelatina	20.00
Cloruro de magnesio	1.40
Sulfato potásico	10.00
Glicerol	10.0mL
Cetrimide	0.30
Agar	13.60

**Tabla 4.** Componentes Agar EMB

Componentes	g/L
Lactosa	10.00
Peptona	10.00
Fosfato dipotásico	2.00
Eosina amarilla	0.40
Azul de metileno	0.065
Agar	15.00

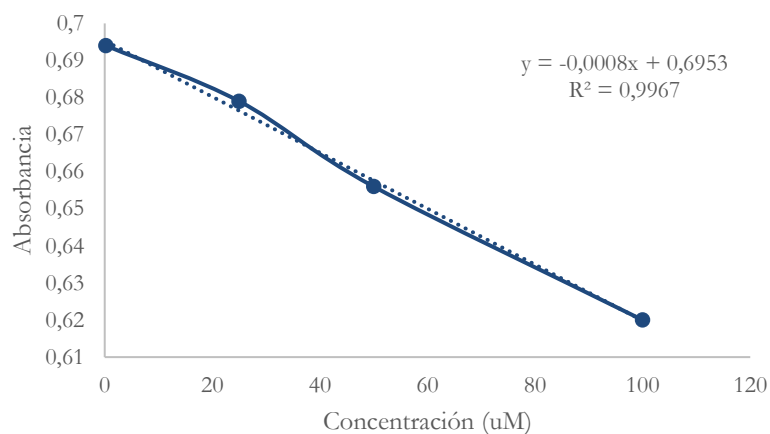
**Tabla 5.** Componentes Agar salado manitol

Componentes	g/L
Extracto de carne	1.00
Peptona de caseína	5.00
Peptona de carne	5.00
Cloruro de sodio	75.00
D-Manitol	10.00
Rojo fenol	0.025
Agar	15.00

## 10.2. Curvas patrón trolox y equivalentes de trolox tiempo 0

**Tabla 6.** Absorbancias para curva patrón de trolox en el tiempo 0 de extractos 1 y 2

Concentración μM	DO inicial			DO final		
	0.25	0.72	0.719	0.718	0.694	0.693
25	0.719	0.72	0.719	0.679	0.678	0.677
50	0.719	0.719	0.72	0.656	0.652	0.655
100	0.717	0.718	0.719	0.62	0.628	0.622



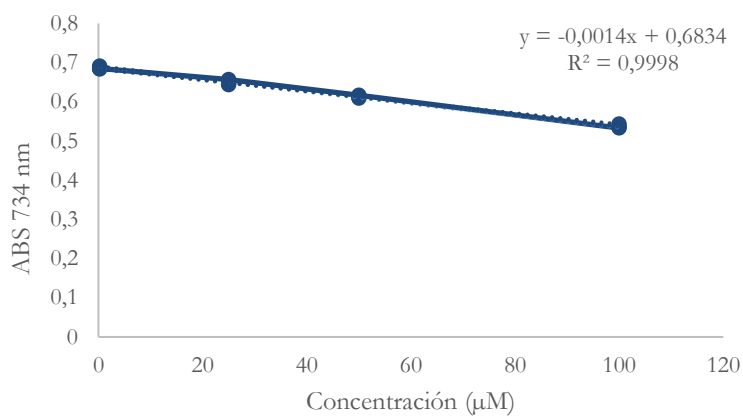
**Figura 1.** Curva patrón trolox en el tiempo 0 de extractos 1 y 2

**Tabla 7.** Actividad antioxidante Extracto 1 y 2 en el tiempo 0

Extracto Algal	Tiempo 0										
	DO inicial			DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en μM			DS	TE en μM
<b>Control TCC</b>	0.720	0.719	0.718	0.664	0.661	0.661	39.1	42.9	42.9	1.76776695	41.6
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.711	0.711	0.711	0.59	0.591	0.557	394.9	391.1	518.6	59.2399781	434.9
<b>TE</b>											393.3
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.71	0.712	0.712	0.566	0.562	0.575	484.875	499.875	451.125	20.386883	478.6
<b>TE</b>											437.0

**Tabla 8.** Absorbancias para curva patrón de trolox en el tiempo 0 de extracto 3

Concentración μM	DO inicial			DO final		
	0.25	0.707	0.703	0.703	0.691	0.684
25	0.706	0.701	0.702	0.644	0.647	0.657
50	0.704	0.704	0.703	0.609	0.613	0.617
100	0.702	0.703	0.704	0.536	0.543	0.533



**Figura 2.** Curva patrón trolox en el tiempo 0 de extracto 3

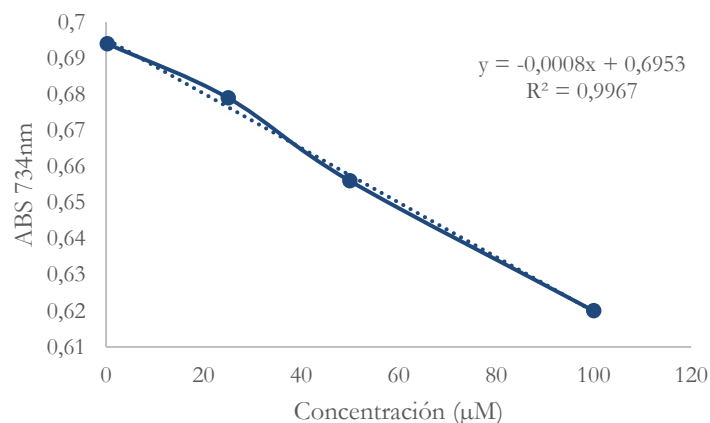
**Tabla 9.** Actividad antioxidante Extracto 3 en el tiempo 0

Extracto Algal	Tiempo 0						Equivalentes de Trolox (TE) en uM			DS	TE en uM
	DO inicial			DO final							
<b>Control TCC</b>	0.704	0.704	0.704	0.649	0.657	0.651	24.6	18.9	23.1	2.428	22.190
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.703	0.702	0.704	0.506	0.539	0.522	380.1	309.4	345.9	28.873	345.143
<b>TE</b>											322.952381

### 10.3. Curvas patrón trolox y equivalentes de trolox - Ciclos

**Tabla 10.** Absorbancias para curva patrón de trolox- ciclos

Concentración en $\mu\text{M}$	DO inicial			DO final			% de captación de ABTS			X	DS
0.25	0.72	0.719	0.718	0.694	0.693	0.693	3.6	3.6	3.5	3.6	0.1
25	0.719	0.72	0.719	0.679	0.678	0.677	5.6	5.8	5.8	5.7	0.2
50	0.719	0.719	0.72	0.656	0.652	0.655	8.8	9.3	9.0	9.0	0.3
100	0.717	0.718	0.719	0.62	0.628	0.622	13.5	12.5	13.5	13.2	0.6



**Figura 3.** Curva patrón trolox – Ciclos

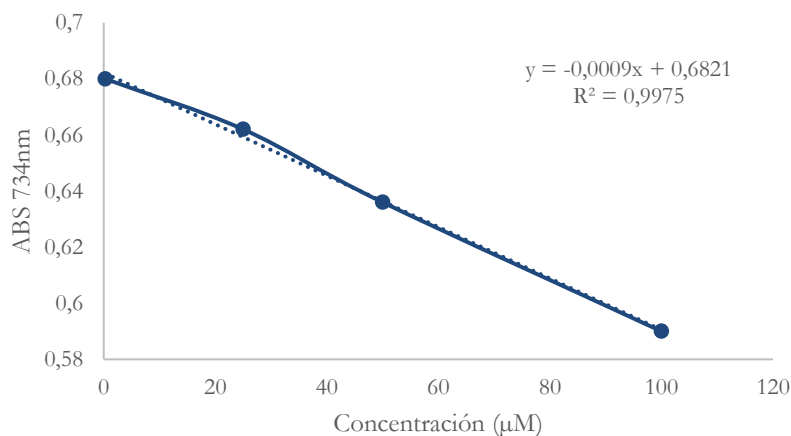
**Tabla 11.** Actividad antioxidante Extracto 1, 2 y 3 – Ciclos

Semana 1														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.664	0.661	0.661	39.1	42.9	42.9								
Ext 1 (dln 1/3)	0.58	0.595	0.596	432.4	376.1	372.4	374.52381	317.380952	313.809524	99.9872871	84.7317569	83.7782863	89.4991101	7.42646926
Ext 2 (dln 1/3)	0.564	0.568	0.575	492.375	477.375	451.125	431.666667	413.809524	388.809524	103.718535	99.4279176	93.4210526	98.8558352	4.22334756
Ext 3 (dln 1/3)	0.54	0.546	0.56	319.93	307.07	277.07	267.431973	251.615646	223.044218	86.9360902	81.7945599	72.5066342	80.4124281	5.97132126
Semana 2														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.664	0.661	0.661	39.1	42.9	42.9								
Ext 1 (dln 1/3)	0.6	0.598	0.592	357.4	364.9	387.4	303.095238	306.666667	328.095238	80.9178744	81.871345	87.5921688	83.4604628	2.9473743
Ext 2 (dln 1/3)	0.571	0.569	0.568	466.125	473.625	477.375	406.666667	410.238095	413.809524	97.7116705	98.5697941	99.4279176	98.5697941	0.70065496
Ext 3 (dln 1/3)	0.56	0.554	0.561	277.07	289.93	274.93	226.615646	235.289116	221.003401	73.6676249	76.4871738	71.843211	73.9993366	1.91034416
Semana 3														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.664	0.661	0.661	39.1	42.9	42.9								
Ext 1 (dln 1/3)	0.599	0.6	0.601	361.1	357.4	353.6	306.666667	299.52381	295.952381	81.871345	79.9644038	79.0109331	80.2822273	1.18918681
Ext 2 (dln 1/3)	0.577	0.568	0.571	443.625	477.375	466.125	385.238095	413.809524	403.095238	92.5629291	99.4279176	96.8535469	96.2814645	2.83166331
Ext 3 (dln 1/3)	0.571	0.563	0.568	253.50	270.64	259.93	204.166667	216.921769	206.717687	66.369969	70.5163644	67.1992481	68.0285272	1.79144756
Semana 4														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.664	0.661	0.661	39.1	42.9	42.9								
Ext 1 (dln 1/3)	0.6	0.6	0.597	357.4	357.4	368.6	303.095238	299.52381	310.238095	80.9178744	79.9644038	82.8248157	81.2356979	1.18918681
Ext 2 (dln 1/3)	0.577	0.572	0.571	443.625	462.375	466.125	385.238095	399.52381	403.095238	92.5629291	95.9954233	96.8535469	95.1372998	2.83166331
Ext 3 (dln 1/3)	0.58	0.571	0.575	234.21	253.50	244.93	185.79932	200.595238	192.431973	60.3991597	65.2089783	62.5552853	62.7211411	1.96709939

## 10.4. Curvas patrón trolox y equivalentes de trolox – Tratamiento 4°C

**Tabla 12.** Absorbancias para curva patrón de trolox- Tratamiento 4°C

Concentración en $\mu\text{M}$	DO inicial			DO final			% de captación de ABTS			X	DS
0.25	0.719	0.709	0.717	0.68	0.672	0.686	5.4	5.2	4.3	5.0	0.6
25	0.723	0.728	0.721	0.662	0.672	0.662	8.4	7.7	8.2	8.1	0.4
50	0.72	0.72	0.717	0.636	0.638	0.636	11.7	11.4	11.3	11.4	0.2
100	0.726	0.728	0.727	0.59	0.591	0.588	18.7	18.8	19.1	18.9	0.2



**Figura 4.** Curva patrón trolox – Tratamiento 4°C

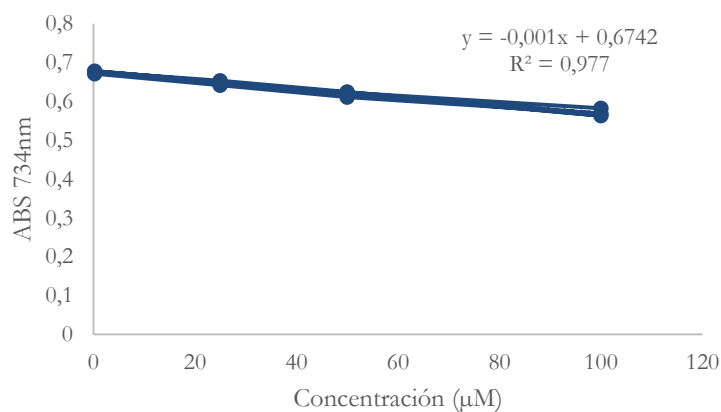
**Tabla 13.** Actividad antioxidante Extracto 1, 2 y 3 – Tratamiento 4°C

Semana 1														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
<b>Control TCC</b>	0.669	0.67	0.657	14.6	13.4	27.9								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.608	0.611	0.62	247.0	237.0	207.0	221.375661	212.910053	170.582011	59.1010538	56.8409752	45.5405825	53.8275372	5.93195873
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.602	0.596	0.603	267.0	287.0	263.7	240.42328	260.529101	224.550265	57.7676074	62.5985253	53.9537249	58.1066192	3.53735685
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.527	0.553	0.554	347.79	292.07	289.93	317.362056	265.359033	249.561602	103.167232	86.2622242	81.1268367	90.1854309	9.41588789
Semana 2														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
<b>Control TCC</b>	0.669	0.67	0.657	14.6	13.4	27.9								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.601	0.597	0.606	270.3	283.7	253.7	243.597884	257.354497	215.026455	65.0337599	68.7063875	57.4059949	63.7153808	4.70661318
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.625	0.601	0.591	190.3	270.3	303.7	167.407407	244.656085	262.645503	40.2237478	58.7846428	63.107043	54.0384778	9.9265926
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.577	0.573	0.578	240.64	249.21	238.50	215.32124	224.542706	200.582011	69.9960686	72.9937589	65.2046784	69.3981686	3.20786089
Semana 3														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
<b>Control TCC</b>	0.669	0.67	0.657	14.6	13.4	27.9								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.578	0.597	0.622	347.0	283.7	200.3	316.613757	257.354497	164.232804	84.5269373	68.7063875	43.8455236	65.6929495	16.744252
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.558	0.562	0.556	271.2	261.9	275.8	244.379324	236.646317	236.076516	58.7181443	56.860099	56.7231904	57.4338112	0.90987897
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.586	0.59	0.58	221.36	212.79	234.21	196.953893	189.848828	196.500378	64.0252592	61.7155634	63.8778318	63.2062182	1.05576903
Semana 4														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
<b>Control TCC</b>	0.669	0.67	0.657	14.6	13.4	27.9								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.627	0.635	0.621	183.7	157.0	203.7	161.058201	136.719577	167.407407	42.9979942	36.5002684	44.6930531	41.3971052	3.5310588
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.582	0.613	0.588	333.7	230.3	313.7	303.915344	206.560847	272.169312	73.0231376	49.6313247	65.3953725	62.6832782	9.74032233
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.566	0.551	0.566	264.21	296.36	264.21	237.770219	269.440665	225.071807	77.2937245	87.5890707	73.1657575	79.3495176	6.06507514

## 10.5. Curvas patrón trolox y equivalentes de trolox – Tratamiento 25°C

**Tabla 14.** Absorbancias para curva patrón de trolox- Tratamiento 25°C

Concentración en $\mu\text{M}$	DO inicial			DO final			% de captación de ABTS			X	DS
0.25	0.705	0.703	0.705	0.671	0.676	0.678	4.8	3.8	3.8	4.1	0.6
25	0.704	0.706	0.705	0.642	0.653	0.65	8.8	7.5	7.8	8.0	0.7
50	0.705	0.705	0.705	0.611	0.624	0.623	13.3	11.5	11.6	12.1	1.0
100	0.705	0.707	0.713	0.568	0.563	0.582	19.4	20.4	18.4	19.4	1.0



**Figura 5.** Curva patrón trolox – Tratamiento 25°C

**Tabla 15.** Actividad antioxidante Extracto 1, 2 y 3 – Tratamiento 25°C

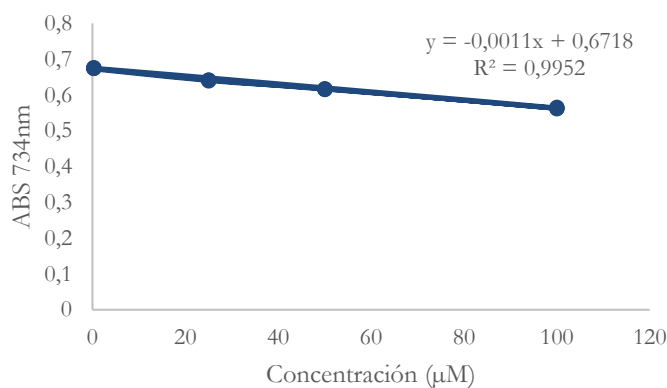
Semana 1														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.646	0.654	0.648	28.2	20.2	26.2								
Ext 1 (dln 1/3)	0.59	0.588	0.577	252.6	258.6	291.6	213.714286	227.047619	252.761905	57.0556827	60.6153064	67.4802949	61.7170947	4.32655276
Ext 2 (dln 1/3)	0.571	0.589	0.573	309.6	255.6	303.6	268	224.190476	264.190476	64.3935927	53.8672769	63.4782609	60.5797101	4.76109429
Ext 3 (dln 1/3)	0.57	0.573	0.567	255.64	249.21	262.07	216.612245	218.108844	224.639456	70.4157452	70.9022556	73.0252101	71.447737	1.13298694
Semana 2														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.646	0.654	0.648	28.2	20.2	26.2								
Ext 1 (dln 1/3)	0.575	0.589	0.587	297.6	255.6	261.6	256.571429	224.190476	224.190476	68.4973303	59.8525299	59.8525299	62.73413	4.07519799
Ext 2 (dln 1/3)	0.577	0.564	0.575	291.6	330.6	297.6	250.857143	295.619048	258.47619	60.2745995	71.0297483	62.1052632	64.4698703	4.69835655
Ext 3 (dln 1/3)	0.565	0.573	0.581	266.36	249.21	232.07	226.816327	218.108844	196.068027	73.7328616	70.9022556	63.7372844	69.4574672	4.20661788
Semana 3														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.646	0.654	0.648	28.2	20.2	26.2								
Ext 1 (dln 1/3)	0.592	0.593	0.586	246.6	243.6	264.6	208	212.761905	227.047619	55.5301297	56.8014238	60.6153064	57.6489533	2.16078461
Ext 2 (dln 1/3)	0.568	0.567	0.558	318.6	321.6	348.6	276.571429	287.047619	307.047619	66.4530892	68.9702517	73.7757437	69.7330282	3.03772811
Ext 3 (dln 1/3)	0.571	0.584	0.593	253.50	225.64	206.36	214.571429	195.659864	171.578231	69.752322	63.6045997	55.7762052	63.0443756	5.71946083
Semana 4														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.646	0.654	0.648	28.2	20.2	26.2								
Ext 1 (dln 1/3)	0.593	0.593	0.592	243.6	243.6	246.6	205.142857	212.761905	209.904762	54.7673532	56.8014238	56.0386473	55.8691415	0.83901135
Ext 2 (dln 1/3)	0.56	0.567	0.545	342.6	321.6	387.6	299.428571	287.047619	344.190476	71.9450801	68.9702517	82.7002288	74.5385202	5.89759932
Ext 3 (dln 1/3)	0.581	0.579	0.573	232.07	236.36	249.21	194.163265	205.863946	212.394558	63.1180893	66.9217161	69.0446705	66.361492	2.45173127
Mes 2														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.663	0.669	0.641	12.8	9.2	25.7								
Ext 1 (dln 1/3)	0.599	0.601	0.598	151.2	147.7	153.0	131.876751	131.876751	121.232493	35.2073705	35.2073705	32.3656541	34.2601317	1.33959796
Ext 2 (dln 1/3)	0.571	0.573	0.576	200.6	197.1	191.8	178.935574	178.935574	158.207283	42.9936734	42.9936734	38.0131915	41.3335128	2.34782168
Ext 3 (dln 1/3)	0.539	0.539	0.535	315.00	315.00	324.23	287.843137	291.204482	284.309416	93.5712985	94.6639956	92.4225656	93.5526199	0.91515529
Mes 3														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.65	0.642	0.632	19.6	25.8	33.5								
Ext 1 (dln 1/3)	0.579	0.588	0.575	222.7	201.9	231.9	193.406593	167.765568	189.010989	51.634102	44.7886718	50.4605997	48.9611245	2.98901299
Ext 2 (dln 1/3)	0.548	0.553	0.564	294.2	282.7	257.3	261.538462	244.688645	213.186813	62.8410491	58.7924661	51.2233762	57.6189638	4.81493592



## 10.6. Curvas patrón trolox y equivalentes de trolox – Tratamiento 40°C

**Tabla 16.** Absorbancias para curva patrón de trolox- Tratamiento 40°C

Concentración en $\mu\text{M}$	DO inicial			DO final			% de captación de ABTS			X	DS
0.25	0.705	0.704	0.702	0.674	0.676	0.674	4.4	4.0	4.0	4.1	0.2
25	0.703	0.702	0.7	0.641	0.641	0.639	8.8	8.7	8.7	8.7	0.1
50	0.695	0.698	0.697	0.615	0.617	0.616	11.5	11.6	11.6	11.6	0.1
100	0.699	0.701	0.699	0.565	0.561	0.562	19.2	20.0	19.6	19.6	0.4



**Figura 6.** Curva patrón trolox – Tratamiento 40°C

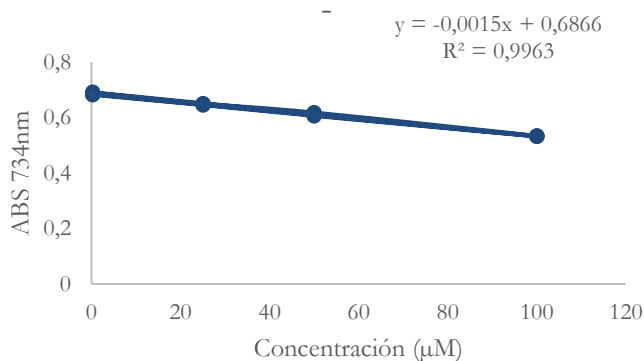
**Tabla 17.** Actividad antioxidante Extracto 1, 2 y 3 – Tratamiento 40°C

Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
<b>Control TCC</b>	0.636	0.64	0.648	32.5	28.9	21.6								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.564	0.563	0.571	294.0	296.7	274.9	249.004329	255.064935	241.212121	66.4771283	68.095139	64.3968287	66.323032	1.51375561
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.567	0.566	0.562	285.8	288.5	299.5	241.212121	247.272727	264.588745	57.9571458	59.4133555	63.5739546	60.3148187	2.38000171
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.562	0.564	0.6	272.79	268.50	191.36	228.800247	228.181818	161.638837	74.3777894	74.176752	52.5451329	67.0332248	10.2449568
<b>Semana 2</b>														
<b>Extracto Algal</b>	<b>DO final</b>			<b>Equivalentes de Trolox (TE) en <math>\mu\text{M}</math></b>			<b>TEAC</b>			<b>Actividad residual</b>			<b>Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>Control TCC</b>	0.636	0.64	0.648	32.5	28.9	21.6								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.562	0.574	0.569	299.5	266.7	280.4	254.199134	226.493506	246.406926	67.8639946	60.467374	65.7836951	64.7050212	3.1144986
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.564	0.572	0.578	294.0	272.2	255.8	249.004329	231.688312	223.030303	59.8294154	55.6688163	53.5885167	56.3622495	2.59458941
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.562	0.582	0.586	272.79	229.93	221.36	228.800247	191.447124	190.210266	74.3777894	62.2351333	61.8330586	66.1486604	5.82118767
<b>Semana 3</b>														
<b>Extracto Algal</b>	<b>DO final</b>			<b>Equivalentes de Trolox (TE) en <math>\mu\text{M}</math></b>			<b>TEAC</b>			<b>Actividad residual</b>			<b>Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>Control TCC</b>	0.636	0.64	0.648	32.5	28.9	21.6								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.599	0.599	0.601	198.5	198.5	193.1	158.095238	161.558442	163.290043	42.2069667	43.1315443	43.5938331	42.977448	0.57657542
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.571	0.576	0.575	274.9	261.3	264.0	230.822511	221.298701	230.822511	55.4607864	53.1724568	55.4607864	54.6980098	1.07872888
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.579	0.602	0.579	236.36	187.07	236.36	194.10637	150.630798	204.49598	63.0995939	48.966668	66.4770214	59.5144278	7.5847734
<b>Semana 4</b>														
<b>Extracto Algal</b>	<b>DO final</b>			<b>Equivalentes de Trolox (TE) en <math>\mu\text{M}</math></b>			<b>TEAC</b>			<b>Actividad residual</b>			<b>Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>Control TCC</b>	0.636	0.64	0.648	32.5	28.9	21.6								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.603	0.606	0.608	187.6	179.5	174.0	147.705628	143.376623	145.108225	39.4332339	38.277512	38.7398008	38.8168489	0.47495658
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.578	0.573	0.579	255.8	269.5	253.1	212.640693	229.090909	220.4329	51.0921573	55.0447264	52.9644269	53.0337702	1.07872888
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.579	0.583	0.581	236.36	227.79	232.07	194.10637	189.406308	200.414348	63.0995939	61.57171	65.1501749	63.2738263	1.46608786
<b>Mes 2</b>														
<b>Extracto Algal</b>	<b>DO final</b>			<b>Equivalentes de Trolox (TE) en <math>\mu\text{M}</math></b>			<b>TEAC</b>			<b>Actividad residual</b>			<b>Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>Control TCC</b>	0.663	0.669	0.641	12.8	9.2	25.7								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.621	0.615	0.619	112.4	123.0	115.9	94.9019608	108.347339	85.9383754	25.3361451	28.9256816	22.9431208	25.7349825	2.45859879
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.595	0.591	0.587	158.3	165.4	172.4	138.59944	148.683473	139.719888	33.3019249	35.724862	33.5711401	34.199309	1.08431336
<b>Ext 3 (dln 1/3)</b>	0.547	0.57	0.564	296.5	243.5	257.3	270.26072	223.072614	220.573152	87.8556519	72.5158651	71.7033467	77.3582879	7.4301653
<b>Mes3</b>														
<b>Extracto Algal</b>	<b>DO final</b>			<b>Equivalentes de Trolox (TE) en <math>\mu\text{M}</math></b>			<b>TEAC</b>			<b>Actividad residual</b>			<b>Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>Control TCC</b>	0.65	0.642	0.632	19.6	25.8	33.5								
<b>Ext 1 (dln 1/3)</b>	0.603	0.593	0.598	167.3	190.4	178.8	140.659341	156.776557	138.461538	37.5520742	41.854916	36.965323	38.7907711	2.1798788
<b>Ext 2 (dln 1/3)</b>	0.573	0.564	0.57	236.5	257.3	243.5	206.593407	220.512821	200	49.639148	52.9836296	48.0549199	50.2258992	2.0544671

## 10.7. Curvas patrón trolox y equivalentes de trolox – Tratamiento 45°C

**Tabla 18.** Absorbancias para curva patrón de trolox- Tratamiento 45°C

Concentración en $\mu\text{M}$	DO inicial			DO final			% de captación de ABTS			X	DS
0.25	0.714	0.714	0.725	0.682	0.684	0.691	4.5	4.2	4.7	4.5	0.2
25	0.715	0.715	0.715	0.645	0.65	0.649	9.8	9.1	9.2	9.4	0.4
50	0.714	0.713	0.713	0.606	0.618	0.611	15.1	13.3	14.3	14.2	0.9
100	0.711	0.715	0.714	0.532	0.533	0.533	25.2	25.5	25.4	25.3	0.1



**Figura 7.** Curva patrón trolox – Tratamiento 45°C

**Tabla 19.** Actividad antioxidante Extracto 1, 2 y 3 – Tratamiento 45°C

Semana 1														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.645	0.644	0.651	27.7	28.4	23.7								
Ext 1 (dln 1/3)	0.559	0.561	0.556	255.2	251.2	261.2	216.634921	212.190476	226.15873	57.83540978	56.64886855	60.3779981	58.2874255	1.55560075
Ext 2 (dln 1/3)	0.544	0.549	0.555	303.5	291.9	278.1	262.598291	250.974359	242.23199	63.09569911	60.3027636	58.2021944	60.5335524	2.00441921
Ext 3 (dln 1/3)	0.548	0.549	0.553	294.23	291.92	282.69	253.807082	250.974359	246.627595	82.5069461	81.58609193	80.1730571	81.4220317	0.95984246
Semana 2														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.645	0.644	0.651	27.7	28.4	23.7								
Ext 1 (dln 1/3)	0.543	0.563	0.557	287.2	247.2	259.2	247.111111	208.380952	224.253968	65.97169252	55.63183321	59.8694805	60.4910021	4.24404598
Ext 2 (dln 1/3)	0.545	0.552	0.55	301.2	285.0	289.6	260.400488	244.380952	253.221001	62.56762307	58.71853547	60.8425747	60.7095777	1.57419503
Ext 3 (dln 1/3)	0.589	0.581	0.596	214.93	232.07	199.93	178.281179	193.972789	167.804989	57.95518207	63.05616984	54.5496093	58.5203204	3.49570489
Semana 3														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.645	0.644	0.651	27.7	28.4	23.7								
Ext 1 (dln 1/3)	0.565	0.563	0.567	243.2	247.2	239.2	205.206349	208.380952	205.206349	54.78430375	55.63183321	54.7843038	55.0668136	0.39952922
Ext 2 (dln 1/3)	0.563	0.556	0.557	259.6	275.8	273.5	220.840049	235.589744	237.836386	53.0622543	56.6062313	57.1460424	55.6048427	1.81133756
Ext 3 (dln 1/3)	0.557	0.554	0.554	273.46	280.38	280.38	234.026862	239.985348	244.429792	76.07684369	78.01381281	79.4586013	77.8497526	1.38546211
Semana 4														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.645	0.644	0.651	27.7	28.4	23.7								
Ext 1 (dln 1/3)	0.584	0.57	0.569	205.2	233.2	235.2	169.015873	195.047619	201.396825	45.12246801	52.07220951	53.7672684	50.3206486	3.7402422
Ext 2 (dln 1/3)	0.567	0.567	0.568	250.4	250.4	248.1	212.04884	211.413919	213.660562	50.94995013	50.79739482	51.3372059	51.0281836	0.22721408
Ext 3 (dln 1/3)	0.564	0.561	0.581	268.50	274.93	232.07	229.301587	234.789116	198.417234	74.54076367	76.32463512	64.5009583	71.7887857	5.20447696
Mes 2														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.663	0.669	0.641	12.8	9.2	25.7								
Ext 1 (dln 1/3)	0.618	0.614	0.611	117.7	124.8	130.1	99.9439776	110.028011	99.3837535	26.68222132	29.3743737	26.5326573	27.5297508	1.30577375
Ext 2 (dln 1/3)	0.593	0.61	0.595	161.8	131.8	158.3	141.960784	116.7507	126.27451	34.1095706	28.05222776	30.3405573	30.8341185	2.49740567
Ext 3 (dln 1/3)	0.579	0.577	0.578	222.7	227.3	225.0	199.931049	207.687998	189.803922	64.99306558	67.51467436	61.7009652	64.7362351	2.38037461
Mes 3														
Extracto Algal	DO final			Equivalentes de Trolox (TE) en $\mu\text{M}$			TEAC			Actividad residual			Promedio	DS
Control TCC	0.65	0.642	0.632	19.6	25.8	33.5								
Ext 1 (dln 1/3)	0.594	0.596	0.599	188.1	183.5	176.5	160.43956	150.18315	136.263736	42.83283459	40.09466252	36.3785718	39.7686897	2.64500418
Ext 2 (dln 1/3)	0.554	0.565	0.555	280.4	255.0	278.1	248.351648	218.315018	232.967033	59.67259285	52.4555536	55.9760606	56.0347357	2.94663605

## 10.7. Medición pH

Como se puede observar en la Tabla 3, el pH de los extractos 1, 2 y 3 mantuvo un valor igual a 5, así como el pH del TCC. Esta tendencia, indica que las diferentes temperaturas en las que se almacenó el extracto a través del tiempo no generan reacciones indeseadas, las cuales puede llegar a alterar el pH.

**Tabla 20.** pH inicial y final del TCC y extracto 1, 2 y 3

	<b>Control TCC</b>	<b>Extracto 1</b>	<b>Extracto 2</b>	<b>Extracto 3</b>
<b>T<sub>0</sub></b>	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>T<sub>final</sub> ciclos</b>	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>T<sub>final</sub> 4°C</b>	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>T<sub>final</sub> 25°C</b>	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>T<sub>final</sub> 40°C</b>	5.0	5.0	5.0	5.0
<b>T<sub>final</sub> 45°C</b>	5.0	5.0	5.0	5.0