



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE MATERIALES**

EXTRACCIÓN DE FUCOXANTINAS PRESENTES EN LAS ESPECIES
SARGASSUM NATANS Y *SARGASSUM FLUITANS* USANDO MÉTODOS
NO CONVENCIONALES

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA

Ingeniero Químico PAUL JONATHAN CONTRERAS CONTRERAS

Tutora: Doctora Miriam Rocío Estévez González

Centro de Física aplicada y Tecnología Avanzada

Juriquilla, Querétaro, Agosto, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE
MATERIALES

TEMA DE TESIS

EXTRACCIÓN DE FUcoxANTINAS PRESENTES EN LAS ESPECIES *SARGASSUM*
***NATANS* Y *SARGASSUM FLUITANS* USANDO MÉTODOS NO**
CONVENCIONALES

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

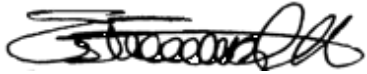
PRESENTA

I.Q. PAUL JONATHAN CONTRERAS CONTRERAS



C F A T A

Querétaro, Querétaro, México



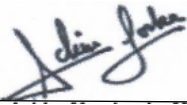
Dra. Miriam Rocío Estévez González

Tutora



Paul Jonathan Contreras Contreras

Alumno



Dr. Achim Max Loske Menling

Primer miembro del comité



Dra. Angelina Rodríguez Torres

Segundo miembro del comité

Declaro conocer el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, plasmado en la Legislación Universitaria. Con base en las definiciones de integridad y honestidad ahí especificadas, aseguro mediante mi firma al calce que el presente trabajo es original y eternamente de mi autoría. Todas las citas de, o en referencia a, las obras de otros autores aparecen debida y adecuadamente señaladas, así como acreditadas mediante recursos editoriales convencionales.



I.Q. Paul Jonathan Contreras Contreras

Agradecimientos

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número de becario 1083415, y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencia e Ingeniería de Materiales de la UNAM por la formación y enseñanza académica brindadas

A la Dra. Miriam Rocío Estévez González, por su asesoría, apoyo y colaboración para la realización de esta investigación. De igual manera, agradezco su ayuda brindada, y sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Al M. en CIM. Gustavo Andrés Molina Labastida, por su gentil ayuda y demás consejos técnicos de los cuales es experto, gracias por brindarme siempre ese apoyo aun en los tiempos más saturados del laboratorio.

Al Dr. Achim Max Loske Mehling y la Dra. Angelina Rodríguez Torres por sus asesorías y demás colaboración en la realización de este proyecto, gracias por brindarme siempre su apoyo.

A Paula Bernardino y al M. en C. Francisco Fernández por su apoyo en las extracciones con ondas de choque, al M. en I. en Gerardo Antonio Fonseca Hernández por su apoyo en caracterizaciones UV-Vis y DLS, a la Dra. Marlene Alexis González Reyna por su apoyo en las pruebas de electroquímica y al Dr. Rodrigo Alonso Esparza Muños por su apoyo con las imágenes de SEM.

A los miembros del jurado de examen de grado por su apoyo académico para la revisión de este documento y sus valiosas aportaciones.

A mis amigos, compañeros, y al personal académico y administrativo del Laboratorio de Biomateriales por su apoyo fraterno para la realización de esta investigación.

Al proyecto PAPIIT CG100321 "UNA ESTRATEGIA MULTIDISCIPLINARIA PARA LA RESTAURACIÓN NATURAL Y ASISTIDA DE ECOSISTEMAS COSTEROS" por el apoyo económico brindado para poder llevar a cabo este proyecto de tesis.

Esta tesis fue elaborada dentro de la línea Transversal de "Innovación y Desarrollo de Materiales, Subsistemas y Componentes, M-LT1" del Centro Mexicano de Innovación en Energía del Océano (CEMIE-Océano). Por lo que se extiende un agradecimiento a SENER-CONACyT y al CEMIE-Océano.

A mis padres, hermanos y a toda mi maravillosa familia por su incondicional apoyo y motivación para la culminación de este trabajo. ¡Gracias por impulsarme a seguir adelante!

Índice

CAPÍTULO I	1
PROBLEMÁTICA Y OBJETIVOS	1
1.1. Introducción	1
1.2. Justificación	5
1.3. Hipótesis	5
1.4. Objetivo	5
1.4.1. Objetivo general	5
1.4.2. Objetivos específicos	5
CAPÍTULO II	6
FUNDAMENTOS TEÓRICOS	6
2.1. Fucoxantina	6
2.1.1. Actividades biológicas	6
2.1.2. Actividad antioxidante	7
2.1.3. Actividad anticancerígena	7
2.1.4. Actividad antiinflamatoria	8
2.1.5. Efecto neuroprotector	8
2.2. Compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el sargazo	10
2.3. Métodos de extracción	11
2.4. Métodos de extracción convencionales	12
2.4.1. Extracción por maceración (ME)	12
2.4.2. Extracción asistida por vórtice (VAE)	13
2.4.3. Extracción asistida por soxhlet (SAE)	14
2.5. Métodos no convencionales	15
2.5.1. Extracción asistida por ultrasonido (UAE)	15
2.5.2. Ondas de choque	18
2.5.3. Ondas de choque en aplicaciones biomédicas	19

2.5.4. Generadores piezoeléctricos	20
2.5.5. Ondas de choque tándem	21
2.6. Solventes no convencionales	22
2.6.1. Solventes eutécticos profundos (DES)	22
2.6.2. Solventes eutécticos profundos naturales (NADES)	22
2.7. Cuantificación de las fucoxantinas	23
2.7.1. Prueba por espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis)	24
2.7.2. Cuantificación de las fucoxantinas por voltamperometría diferencial de pulsos (DPV)	24
2.8. Estabilidad de las fucoxantinas	24
2.8.1. Nanoencapsulación	25
2.8.2. Nanoencapsulado de las fucoxantinas	25
2.8.3. Nanopartículas de PLGA-PVA	26
2.8.4. Homogeneización ultrasónica	27
2.8.5. Potencial Z	28
2.8.6. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	28
2.8.7. Liberación del activo	30
CAPÍTULO III	31
METODOLOGÍA	31
3.1. Materiales y reactivos	31
3.1.1. Material biológico	31
3.1.2. Reactivos	31
3.2. Obtención de las muestras	31
3.3. Técnicas de extracción	32
3.4. Extracción por ondas de choque (Och)	32
3.5. Preparación de NADES	33
3.6. Extracción por baño ultrasónico (UAE-B)	35
3.7. Extracción por ultrasonido asistido (UAE-S)	35
3.8. Análisis cuantitativo de la fucoxantina por espectrometría ultravioleta UV-vis	36
3.9. Determinación de la capacidad antioxidante	36
3.10. Determinación de fenoles totales (TPC)	37
3.11. Determinación de flavonoides totales (TFC)	37
3.12. Contenido antioxidante electroquímico	37

3.13. Síntesis de nanopartículas poliméricas sólidas de PLGA-PVA	38
3.14. Determinación del tamaño de partícula	38
CAPÍTULO IV	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. Cantidad de fucoxantinas extraídas	39
4.1.1. Cantidad de fucoxantinas extraídas por las técnicas de UAE-B y UAE-S	39
4.1.2. Fucoxantinas extraídas por ondas de choque	40
4.2. Determinación de la capacidad antioxidante. Método DPPH	41
4.3. Determinación de fenoles y flavonoides totales (TPC y TFC)	43
4.3.1. Determinación de compuestos fenólicos totales (TPC)	43
4.3.2. Determinación de compuestos flavonoides totales (TFC)	44
4.3.3. Determinación de fenoles y flavonoides totales (TPC y TFC) por las técnicas de ondas de choque	45
4.4. Medición electroquímica de las fucoxantinas	46
4.5. Caracterización por DLS de las nanoesferas poliméricas de PLGA-PVA-FX	50
4.6. Caracterización por microscopia electrónica de barrido de las nanoesferas poliméricas de PLGA-PVA-FX	54
4.7. Caracterización electroquímica de las nanoesferas poliméricas de PLGA-PVA-FX	56
CAPÍTULO V	58
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	58
5.1. Conclusiones	58
5.2. Perspectivas	59
ANEXOS	60
Anexo 1. Metodologías específicas y curvas de calibración	60
A1-1. Preparación de los NADES	60
A1-2. Curva de calibración de ácido ascórbico para el método DPPH	60
A1-3. Curva de calibración de ácido gálico para la prueba de (TPC)	62
A1-4. Curva de calibración de quercetina para la prueba de (TFC)	63
Bibliografía	65

Índice de Tablas

Tabla 3-1. Técnicas de extracción utilizadas	32
Tabla 3-2. Parámetros para la extracción asistida por ondas de choque	33
Tabla 3-3. Disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) utilizados para las extracciones	34
Tabla 4-1. Comparación de las cuantificaciones electroquímicas con espectroscópicas de los extractos obtenidos con NADES	499
Tabla 4-2. Comparación de las cuantificaciones electroquímicas con espectroscópicas de los extractos obtenidos con ondas de choque	499
Tabla 4-3. Tamaño de las nanopartículas de PLGA-PVA-FX con 1% de surfactante	500
Tabla 4-4. Tamaño de las nanopartículas de PLGA-PVA-FX con 5% de surfactante	51
Tabla 4-5. Tamaño de las nanopartículas de PLGA-PVA-FX con 5% de surfactante y 40 mL de agua	52
Tabla A1-1. Datos de la curva de calibración de ácido ascórbico con DPPH	61
Tabla A1-2. Datos de la curva de calibración de ácido gálico para la prueba de (TPC)	62
Tabla A1-3. Datos de la curva de calibración de quercetina para la prueba de (TFC)	64

Índice de Figuras

Figura 1-1. Estructura molecular de la fucoxantina (Mikami et al., 2013)	2
Figura 2-1. Beneficios de la fucoxantina para la salud humana (Lourenço et al., 2020)	6
Figura 2-2. Descripción general de los métodos de extracción y cuantificación de la fucoxantina (Lourenço et al., 2020).	11
Figura 2-3. Modelo sistemático de extracción por maceración (Abd Aziz et al., 2021)	12
Figura 2-4. Representación esquemática de la extracción asistida por vórtice (Jiménez Fino et al., 2020)	13
Figura 2-5. Modelo sistemático de extracción de Soxhlet (Shahid et al., 2016)	14
Figura 2-6. Principio de cavitación acústica (Medina et al. 2017)	15
Figura 2-7. Representación gráfica del fenómeno de cavitación, colapso y liberación del material vegetal. (Medina et al., 2017)	16
Figura 2-8. Representación de un equipó de ultrasonido acoplado a una sonda (Medina et al., 2017)	17
Figura 2-9. Esquema de la formación de una onda de choque que muestra el pico de presión positiva ($p+$), el pico de presión negativa ($p-$), el tiempo de subida (t_r) y la duración del pulso de compresión (t_{FWHMp+}) (Loske, A. M. 2017)	19
Figura 2-10. Esquema de un generador experimental de ondas de choque piezoeléctrico (Loske, A. M. 2017)	21
Figura 2-11. Estructura molecular del poli(D,L-ácido láctico-co-glicólico) (Ansary et al., 2014)	26
Figura 2-12. Representación esquemática de estabilizadores estéricos en la formación de nanopartículas de PLGA y estiramiento de las cadenas de PVA (Ansary et al., 2014)	26
Figura 2-13. Diagrama representativo de un microscopio FE-SEM (Echlin, P., 2011)	29
Figura 3-1. Pipeta de transferencia	33
Figura 3-2. Estructura química de los distintos compuestos a utilizar para la preparación de los NADES	35
Figura 4-1. Cantidad de fucoxantina extraída por las técnicas de UAE-B y UAE-S con NADES	39
Figura 4-2. Cantidad de fucoxantina extraída por ondas de choque	40

Figura 4-3. Capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con NADES	41
Figura 4-4. Capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con ondas de choque	42
Figura 4-5. Concentración de compuestos fenólicos totales obtenidos con NADES	43
Figura 4-6. Concentración de compuestos flavonoides totales obtenidos con NADES	44
Figura 4-7. Concentración de compuestos fenólicos y flavonoides totales obtenidos con ondas de choque	45
Figura 4-8. Curva de calibración empleada en la cuantificación electroquímica	46
Figura 4-9. DPV de ChCl-ácido carboxílico	47
Figura 4-10. DPV de betaína-ácido carboxílico	47
Figura 4-11. DPV de los extractos obtenidos con ondas de choque	48
Figura 4-12. Distribución y tamaño de partícula de la muestra Nps1	51
Figura 4-13. Distribución y tamaño de partícula de la muestra Nps2	52
Figura 4-14. Distribución y tamaño de partícula de la muestra Nps3	53
Figura 4-15. Muestra Nps1: Nanopartículas de PLGA-PVA-FX con 1% de surfactante (PVA)	54
Figura 4-16. Muestra Nps2: Nanopartículas PLGA-PVA-FX con 5% de surfactante (PVA)	55
Figura 4-17. Muestra Nps3: Nanopartículas PLGA-PVA-FX con 5% de surfactante (PVA) 40 mL agua	56
Figura 4-18. Eficiencia de la encapsulación de fucoxantinas con nanopartículas poliméricas de PLGA-PVA	57
Figura A1-1. Diagrama de bloques para la preparación de los NADES	60
Figura A1-2. Diagrama de bloques para la preparación de la curva de calibración de ácido ascórbico para el método DPPH	60
Figura A1-3. Curva de calibración de ácido ascórbico para la prueba de (DPPH)	61
Figura A1-4. Diagrama de bloques para la preparación de la curva de calibración de ácido gálico para la prueba de (TPC)	62
Figura A1-5. Curva de calibración de ácido gálico para la prueba de (TPC)	63
Figura A1-6. Diagrama de bloques para la preparación de la curva de calibración de quercetina para la prueba de (TFC)	63
Figura A1-7. Curva de calibración de quercetina para la prueba de (TFC)	64

Resumen

La comunidad científica ha corroborado numerosas propiedades benéficas de la fucoxantina, entre las que destacan sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos o neuroprotectores, entre otros. Estas propiedades tienen un alto potencial en la industria cosmética, farmacéutica o alimenticia, dando lugar a diversas aplicaciones de gran impacto; sin embargo, los métodos de extracción usados actualmente para su obtención, como la extracción por maceración (ME), extracción asistida por vórtice (VAE) o extracción por soxhlet (SAE), presentan los inconvenientes de largos tiempos de procesamiento, la contaminación por disolventes y la degradación de los analitos. Este estudio demuestra que la extracción asistida por ondas de choque y ultrasonido asistido (UAE) junto con el uso de solventes eutécticos profundos naturales (NADES) pueden utilizarse como métodos alternativos y eficientes, para la obtención de fucoxantinas. Nuestros resultados revelaron que la extracción de fucoxantinas por ondas de choque (1500 ondas de choque) produjo un 95.7% más contenido de estas, en comparación a lo obtenido usando UAE. Para proteger la fucoxantina extraída de degradarse, se sintetizaron partículas poliméricas de ácido láctico-co-glicólico (PLGA) con poli (alcohol vinílico) (PVA) en las cuales se encapsuló a las fucoxantinas (PLGA-PVA-FX). Las partículas poliméricas presentaron un diámetro de alrededor de 115 nm. Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron nanopartículas de 100 a 500 nm con formas esféricas. Se demostró por el método de voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) que las nanopartículas de PLGA-PVA-FX lograron encapsular a las fucoxantinas al no mostrar la señal de oxidación característica de estas.

Palabras clave: fucoxantina, extracción asistida por ondas de choque, cavitación acústica, NADES, nanopartículas de PLGA

Abstract

The scientific community has corroborated numerous beneficial properties of fucoxanthin, such as its antioxidant, anti-inflammatory, anticancer or neuroprotective effects, among others. These properties have high potential in the cosmetic, pharmaceutical or food industry, giving rise to various high-impact applications; however, the extraction methods currently used to obtain it, such as maceration extraction (ME), vortex assisted extraction (VAE) or soxhlet extraction (SAE), have the drawbacks of long processing times, contamination by solvents and degradation of the analytes. This study demonstrates that shock wave and ultrasound assisted extraction (UAE) together with the use of natural deep eutectic solvents (NADES) can be used as alternative and efficient methods for obtaining fucoxanthins. Our results revealed that shock wave extraction of fucoxanthins (1500 shock waves) produced 95.7% more fucoxanthin content, compared to that obtained using UAE. To protect the extracted fucoxanthin from degrading, polymeric lactic-co-glycolic acid (PLGA) particles were synthesized with polyvinyl alcohol (PVA) in which fucoxanthin was encapsulated (PLGA-PVA-FX). The polymer particles had a diameter of about 115 nm. Micrographs obtained by scanning electron microscopy (SEM) showed nanoparticles from 100 to 500 nm with spherical shapes. It was demonstrated by the differential pulse voltammetry (DPV) method that the PLGA-PVA-FX nanoparticles were able to encapsulate the fucoxanthins by not showing their characteristic oxidation signal.

Keywords: fucoxanthin, shock wave-assisted extraction, acoustic cavitation, NADES, PLGA nanoparticles

CAPÍTULO I

PROBLEMÁTICA Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

Las algas marinas constituyen una fuente importante de compuestos beneficiosos para la salud humana. Tradicionalmente las algas se han utilizado como alimentos y medicinas debido a su alto contenido de nutrientes principalmente en países orientales, como China, Japón o Indonesia. En años anteriores, numerosos estudios han informado que estos organismos podrían ser una posible fuente de compuestos con potencial bioactivo (Lee et al., 2008). Entre los diferentes tipos de algas, destaca la familia del sargazo, principalmente las especies *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*, siendo estas últimas abundantes en las playas del Caribe.

Estas algas constituyen un recurso natural diverso y abundante, prometiéndole numerosas aplicaciones en diferentes áreas como la farmacéutica, cosmética y alimenticia. El sargazo es un género de macroalga planctónica pluricelular de la clase *Phaeophyceae* (algas pardas) del orden fucales, incluidas en el reino protista. Tienen láminas en las que ocurre la mayor parte de la fotosíntesis, estipes parecidos a tallos y rizoides de anclaje parecidas a raíces (Cervantes et al., 2015). Las algas pardas son una buena fuente de aminoácidos, proteínas, vitaminas, minerales y polisacáridos, además contienen pigmentos fundamentales (carotenoides). Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides, que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como las algas. De acuerdo con su estructura química, se pueden clasificar en carotenos y xantófilas. Los carotenos son carotenoides no oxigenados mientras que las xantófilas son derivados oxigenados (Rao et al., 2007).

Los carotenoides generalmente se dividen en dos grupos principales:

1. Carotenos (α/β -caroteno y licopeno) que se derivan del hidrógeno y el carbono.
2. Xantofilas (fucoxantina, flavoxantina y luteína), que son compuestos oxigenados.

Según la función, se pueden asignar como xantofilas primarias o secundarias. Las xantofilas primarias son partes estructurales y funcionales del sistema fotosintético de las células de las algas y también antenas recolectoras de luz. Mientras que, las xantofilas secundarias son los metabolitos que producen las células de las algas después de su exposición a estímulos ambientales particulares (Galasso et al., 2017).

De acuerdo con varios autores (Satomi et al., 2017), una de las xantofilas más importantes del alga sargazo es la fucoxantina. La fucoxantina es un carotenoide característico de color naranja presente en algas pardas, pertenece a la familia de carotenoides provitamínicos (xantofilas secundarias), dentro de los cuales destacan las especies *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*.

En particular, la fucoxantina tiene una estructura característica, incluye un enlace alénico, un carbonilo conjugado en la cadena de polieno, un 5,6-monoepoxido y residuos hidroxilados y carboxilados lo cual le confiere propiedades benéficas para la salud (Lourenço et al., 2020).

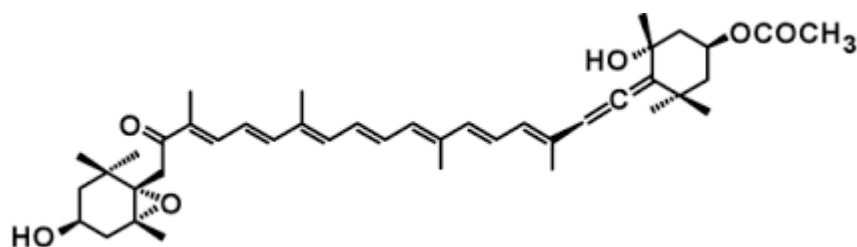


Figura 1-1. Estructura molecular de la fucoxantina (Mikami et al., 2013)

Además, la fucoxantina es el pigmento más abundante dentro del grupo de los carotenoides, llegando a representar más del 10% de la producción total (Zarekarizi et al., 2018).

En las últimas décadas, numerosos estudios han informado sobre la amplia gama de efectos biológicos de la fucoxantina, como su capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, antiobesidad, neuroprotectora entre otras. Las excelentes propiedades antioxidantes de la fucoxantina contra el estrés oxidativo se conocen desde hace muchos años y numerosos estudios las han confirmado. El enlace alénico y el grupo funcional acetilo presente en su estructura se consideran responsables de sus propiedades antioxidantes en la eliminación de radicales libres.

Se ha demostrado que la fucoxantina tiene la capacidad de atrapar diferentes radicales libres, como DPPH, ABTS, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, anión superóxido, oxígeno singlete, y también el ácido 12-doxil-esteárico y nitrobenzeno con ácido linoleico. Es importante destacar que la fucoxantina actúa como antioxidante en condiciones anóxicas, es decir, en condiciones de escaso oxígeno disuelto, mientras que otros carotenoides, como el β -caroteno y la luteína, muestran poca o ninguna actividad en estas condiciones extremas (Chuyen et al., 2017).

En un estudio llevado a cabo por Heo et al. (2010), se analizó el potencial antiinflamatorio que mostraba la fucoxantina aislada a través de la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO), uno de los factores determinantes de la inflamación. Se logró demostrar los efectos inhibitorios de la fucoxantina sobre las citocinas inflamatorias y los mediadores en macrófagos RAW 264.7 estimulados por lipopolisacáridos. Además, se ha demostrado que la fucoxantina inhibe las expresiones de óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasa 2, y redujo los niveles de óxido nítrico, prostaglandina E2, factor de necrosis tumoral α , a través de la fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógeno. También demostraron que la fucoxantina era capaz de inhibir la inflamación producida por obesidad. La fucoxantina también se considera un carotenoide anticancerígeno y su actividad se ha demostrado contra una amplia gama de líneas celulares, tanto en animales como en humanos. Varios estudios han informado que la fucoxantina ejerce diferentes mecanismos de acción contra el cáncer, como la inhibición de la proliferación celular, la detención

del ciclo celular, el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares, la inducción de apoptosis y los efectos antiangiogénicos (Satomi et al., 2017). Con respecto a las líneas celulares humanas, la fucoxantina afecta a un gran número de líneas celulares como las células de leucemia humana HL60, las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2, el carcinoma colorrectal humano HCT116, la célula de cáncer de próstata humano líneas PC-3, cáncer de mama MCF-7, fibroblastos de cordón umbilical masculino humano HUC-Fm, cáncer de vejiga urinaria EJ-1, neuroblastoma humano GOTO, cáncer de hígado humano Hep G2, hepatoma SK- Hep-1 y línea celular de cáncer de pulmón H1299. Con respecto a los estudios in vivo, se ha demostrado que la administración de fucoxantina en diferentes formas podría inhibir muchos tipos de cáncer (Kim et al., 2012). Otro estudio concluyó que la fucoxantina ingerida por ratones en su dieta se acumula en el corazón y en el hígado a través de su metabolito fucoxantinol. Los lípidos, que contienen un 9.6% de fucoxantina, redujeron significativamente el peso del tejido adiposo blanco abdominal, siendo significativamente menor que el de los ratones que se tenían de referencia. Estos resultados sugieren que la fucoxantina podría usarse en suplementos dietéticos con potencial antiobesidad, para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con el exceso de peso (Lourenço et al., 2020).

La fucoxantina ha mostrado una disminución del daño celular de las neuronas corticales cuando se producen condiciones de hipoxia y reperusión de oxígeno. Ya que durante estos procesos suele producirse una cantidad excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares, el mecanismo de acción de la fucoxantina se asocia con una actividad captadora de radicales, produciendo un efecto antioxidante. Esto es especialmente interesante en la protección de las neuritas, ya que son componentes muy importantes de las neuronas, necesarios para el desarrollo neuronal durante el estado embrionario y también en el cerebro humano adulto (Khodosevich et al., 2010).

Teniendo en cuenta estas propiedades, la molécula de fucoxantina tiene un gran potencial de aplicaciones en varios sectores industriales como el alimenticio, cosmético y farmacéutico. De hecho, se espera una expansión del mercado de la fucoxantina que podría alcanzar los 120 millones de dólares para el año 2022. Sin embargo, la producción y comercialización de este compuesto aún tiene que enfrentar ciertos desafíos como su biodisponibilidad, métodos efectivos de extracción y su baja solubilidad en agua (Lourenço et al., 2020). Aunque la fucoxantina es un ingrediente adecuado en aplicaciones medicinales y nutricionales, su estabilidad química y biodisponibilidad pueden reducirse en condiciones reales debido a la estructura lipofílica y rica en electrones, así como a la escasa solubilidad en agua y al alto punto de fusión (Hindupur et al., 2017).

En consecuencia, la fucoxantina se degrada durante los procesos de extracción, purificación, almacenamiento y utilización como resultado de los ácidos, la luz, el calor, el oxígeno, las enzimas, los metales, las moléculas prooxidantes y los lípidos insaturados (Zhang et al., 2015). La estabilidad de la fucoxantina también disminuye en valores de pH bajos y altos; la presencia de ácido causa degradación y promueve la isomerización cis-trans (Kawee et al., 2013). La fucoxantina muestra una baja movilidad molecular a 25°C, las altas temperaturas pueden inducir la rotura de los dobles enlaces en la molécula y, en consecuencia, la degradación del pigmento. Además, la fucoxantina se degrada oxidativamente durante la exposición aérea, y su fotodegradación e isomerización se

producen al aumentar la intensidad de la luz (Yip et al., 2014). Por lo tanto, la fucoxantina debe mantenerse a pH neutro, temperatura ambiente e incluso baja temperatura en condiciones de oscuridad. Teniendo en cuenta todos los factores que influyen en la obtención de fucoxantina, es deseable desarrollar un proceso para obtener el mayor estrato posible, de manera fácil y económica, ya que su síntesis química es un proceso complejo e ineficiente, y el método de extracción de organismos marinos aún no se ha estandarizado. Por otro lado, los avances en tecnologías verdes ofrecen actualmente un amplio panorama de procedimientos que son bastante útiles para la extracción de los compuestos de interés. Algunas de estas tecnologías emergentes involucran extracción asistida por microondas, extracción de fluidos supercríticos o extracción asistida por ultrasonido, entre otras. Todos estos métodos pueden denominarse técnicas de extracción no convencionales.

La extracción asistida por ultrasonido es considerada una técnica rentable y eficiente. Esta técnica utiliza sonidos de alta frecuencia para crear microburbujas dentro del solvente con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica. Como resultado de ello, el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente. Esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas. El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos (Azuola et al., 2005). Por otro lado, la litotricia extracorpórea por ondas de choque (ESWL o SWL), es decir, el uso no invasivo de ondas de choque para romper concreciones formadas en el interior del cuerpo revolucionó el tratamiento de la urolitiasis a principios de los años 80 y motivó una considerable investigación.

A más de cuatro décadas del primer tratamiento clínico, el uso de las ondas de choque con fines biomédicos se ha extendido a campos como la traumatología, la ortopedia, la dermatología e incluso para la modificación genética de hongos microscópicos. Las ondas de choque son pulsos de presión que surgen cuando se deposita una gran cantidad de energía en un espacio muy pequeño y en un tiempo muy corto. Las que se utilizan para aplicaciones biomédicas, se producen y transmiten a través del agua debido a que sus propiedades acústicas son parecidas a las del tejido blando humano (Cordova et al., 2018). En este rubro, destacan las investigaciones en la modificación genética de hongos microscópicos y en la transfección de células, obteniendo proteínas útiles para la producción de antibióticos, insulina, vacunas y son esenciales en la fabricación de cosméticos y alimentos. Actualmente, la ciencia e ingeniería de materiales nos brinda diferentes tecnologías existentes de nanoencapsulación que permiten aportar propiedades avanzadas a los ingredientes y principios activos, como protección de compuestos sensibles, liberación prolongada, liberación selectiva en determinadas condiciones, modificación de propiedades fluidodinámicas, enmascaramiento de aromas y sabores o combinación de compuestos incompatibles (Pinzon et al., 2010). Para lograr las propiedades deseadas, existen diferentes tecnologías de nanoencapsulación y cada una de ellas permite emplear determinados tipos de materiales de recubrimiento. La selección de estos materiales de recubrimiento, junto con la tecnología de encapsulación, son aspectos fundamentales para la protección y estabilidad de la fucoxantina (Yip et al., 2014).

1.2. Justificación

El alga sargazo contiene carotenoides fundamentales entre los que destacan las fucoxantinas, las cuáles presentan efectos benéficos en la salud, otorgándoles un potencial de aplicación en varios sectores industriales. Sin embargo, su estabilidad química y biodisponibilidad limitan una posible aplicación de gran impacto, por lo tanto, es importante un método de extracción eficiente para la obtención de fucoxantinas y con ello sus aplicaciones biomédicas.

1.3. Hipótesis

La extracción de fucoxantinas presentes en las especies *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*, usando métodos no convencionales como ondas de choque y ultrasonido asistido, permitirá contar con alternativas rápidas y efectivas en comparación a los métodos tradicionales. Adicionalmente la encapsulación de éstas, usando PLGA, aumentará su estabilidad química.

1.4. Objetivo

1.4.1. Objetivo general

Obtener un material compuesto de fucoxantinas/ PLGA, estable y libre de solventes tóxicos.

1.4.2. Objetivos específicos

- Obtener una muestra homogénea de las algas *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans* mediante procesos de selección, lavado, pulverizado y tamizado.
- Establecer los parámetros y condiciones de trabajo adecuados que permitan llevar a cabo la extracción de las fucoxantinas.
- Realizar la extracción de fucoxantinas usando el método de ultrasonido asistido, el método de ondas de choque y solventes eutécticos profundos naturales (NADES).
- Evaluar los extractos obtenidos después de la aplicación de ultrasonido asistido y baño ultrasónico utilizando espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis) y métodos electroquímicos.
- Realizar la síntesis de nanopartículas de PLGA-PVA para la encapsulación de las fucoxantinas y pruebas de dispersión de luz (DLS) para determinar el tamaño de partícula.
- Caracterizar los composites de fucoxantina-PLGA por dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía electrónica de barrido y pruebas electroquímicas.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Fucoxantina

Las algas pardas, en particular *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*, son fuentes importantes de metabolitos biológicamente activos: aminoácidos, fucoxantina y otros carotenoides, clorofilas, fucoidan, ácidos grasos poliinsaturados y polifenoles. Las algas pardas en comparación con otras algas contienen niveles más altos de fucoxantinas, un pigmento color naranja que muestran una potente actividad antioxidante debido a una estructura única que incluye enlaces alénicos y restos funcionales de carbonilo, hidroxilo y carboxilo (Figura 1-1) con diversas propiedades. La fucoxantina presenta varias actividades biológicas, como efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antiobesidad, neuroprotector y fotoprotector (Figura2-1).

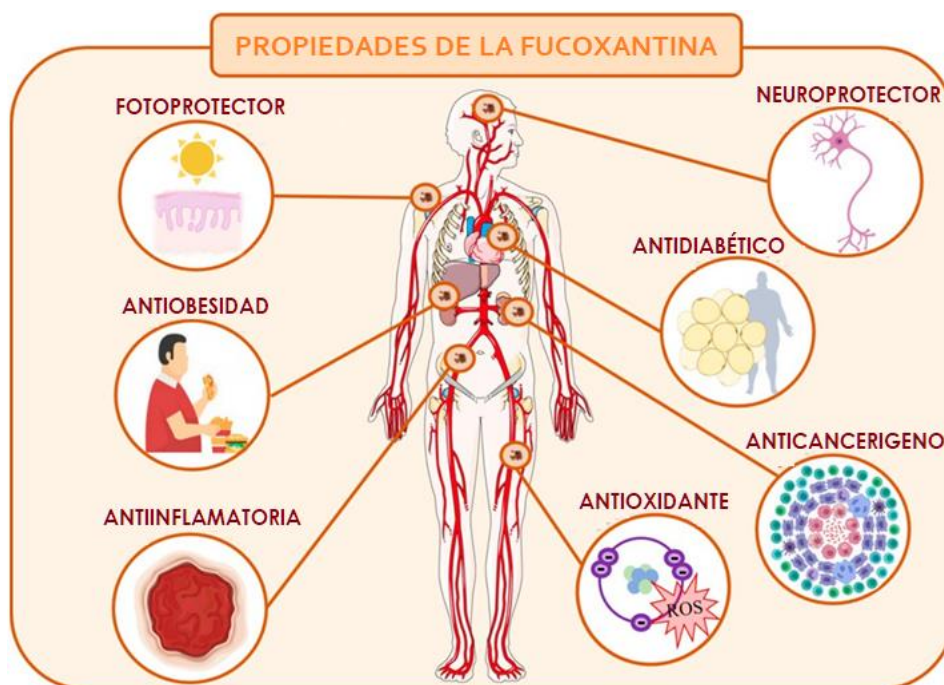


Figura 2-1. Beneficios de la fucoxantina para la salud humana (Lourenço et al., 2020)

2.1.1. Actividades biológicas

En las últimas décadas, numerosos estudios han informado sobre la amplia gama de actividades biológicas de la fucoxantina, como la capacidad antioxidante, antiinflamatorios, antitumorales, antiobesidad, neuro protectores, entre otras (Chuyen et al., 2017).

2.1.2. Actividad antioxidante

Las excelentes propiedades antioxidantes de la fucoxantina contra el estrés oxidativo se conocen desde hace muchos años y numerosos estudios las han confirmado. El enlace alénico y el grupo funcional acetilo presente en su estructura se consideran responsables de sus propiedades antioxidantes (Liu et al., 2011). Se ha demostrado que la fucoxantina tiene la capacidad de atrapar diferentes radicales libres, como DPPH, ABTS, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, anión superóxido y oxígeno singlete, y también el ácido 12-doxil-esteárico y nitrobenzono con ácido linoleico (Wang et al., 2018). La fucoxantina y su metabolito, el fucoxantol, han mostrado actividades antioxidantes atribuidas a la eliminación de radicales libres y la inactivación del oxígeno singlete in vitro. Además, tiene la capacidad de atrapar radicales hidroxilos de fucoxantina y fucoxantol significativamente mayor a la que presentó el α -tocoferol, aunque la capacidad de inactivación de oxígeno singlete de fucoxantina y fucoxantol fue menor que la de β -caroteno. Es importante destacar que, la fucoxantina actúa como antioxidante en condiciones anóxicas, es decir, en condiciones de escaso oxígeno disuelto, mientras que otros carotenoides, como el β -caroteno y la luteína, muestran poca o ninguna actividad en estas condiciones extremas (Neumann et al., 2019).

2.1.3. Actividad anticancerígena

La fucoxantina se considera un carotenoide anticancerígeno y su actividad se ha demostrado contra una amplia gama de líneas celulares de cáncer, tanto en humanos como en animales. Varios estudios han informado que la fucoxantina ejerce diferentes mecanismos de acción contra el cáncer, como la inhibición de la proliferación celular, la detención del ciclo celular, el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares, la inducción de apoptosis y los efectos antiangiogénicos (Satomi et al., 2017). Se ha descubierto que la fucoxantina inhibe el crecimiento e induce la apoptosis en el melanoma B16-F10, el hígado embrionario BNL CL.2 y las líneas celulares murinas de neuroblastoma Neuro2a (Chuyen et al., 2017). Con respecto a las líneas celulares humanas, la fucoxantina afecta a un gran número de líneas celulares como las células de leucemia humana HL-60, las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2, DLD-1 y HT-29, el carcinoma colorrectal humano HCT116, la célula de cáncer de próstata humano líneas PC-3, DU145 y LNCaP, cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, fibroblastos de cordón umbilical masculino humano HUC-Fm, cáncer de vejiga urinaria EJ-1, neuroblastoma humano GOTO, cáncer de hígado humano Hep G2, hepatoma SK- Hep-1 y línea celular de cáncer de pulmón H1299.

Con respecto a los estudios in vivo, se ha demostrado que la administración de fucoxantina en diferentes formas podría inhibir muchos tipos de cáncer. En ratones, la administración oral de fucoxantina redujo el crecimiento de carcinogénesis duodenal y hepática y también el número de focos de criptas aberrantes en colon sometido a 1,2-dimetilhidrazina y en ratones tratados con azoximetano (Kim et al., 2012). En consecuencia, los estudios in vitro e in vivo que usan fucoxantina y sus metabolitos demuestran que estos compuestos poseen efectos antiproliferativos significativos centrados en las células cancerosas. Esto hace que la fucoxantina sea un compuesto prometedor para controlar y tratar el cáncer.

2.1.4. Actividad antiinflamatoria

En un estudio llevado a cabo por Heo et al. (2010), se analizó el potencial antiinflamatorio que mostraba la fucoxantina aislada de un alga parda, *Myagropsis myagroides*, a través de la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO), uno de los factores determinantes de la inflamación. La respuesta inflamatoria, reacción de autodefensa contra varios estímulos patógenos, se caracteriza por atraer grandes cantidades de leucocitos al área inflamada, en la que estas células inflamatorias son activadas por mediadores de inflamación y generan radicales de aniones superóxido y óxido nítrico, convirtiéndose en un proceso nocivo autodestructivo. Es por ello por lo que los agentes antiinflamatorios deben reducir la respuesta inflamatoria al suprimir las producciones de citocinas y mediadores inflamatorios, incluidos el óxido nítrico y la prostaglandina E2 sintetizados por la enzima óxido nítrico sintasa y la ciclooxigenasa (Peng et al., 2011). Heo et al. (2010) demostraron los efectos inhibitorios de la fucoxantina sobre las citocinas inflamatorias y los mediadores en macrófagos RAW 264,7 estimulados por lipopolisacáridos. Estos autores mostraron que la fucoxantina inhibió las expresiones de óxido nítrico sintasa y ciclooxigenasa 2, y redujo los niveles de óxido nítrico, prostaglandina E2, factor de necrosis tumoral α , interleucina-1 β e interleucina-6 a través de la inhibición del factor nuclear κ B activación y la fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógeno.

En un estudio reciente, Wang y colaboradores (2018) demostraron que tanto la fucoxantina como su metabolito primario, fucoxantanol, eran capaces de inhibir la producción de NO, disminuyendo la inflamación producida por obesidad. También concluyeron que hubo una inhibición significativa de las expresiones del ARNm de MCP-1, IL-6, inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), COX-2 e iNOS en 3 células de adipocitos T3-L1 y co-cultivos de macrófagos Raw 264,7 por parte de ambos compuestos, por lo que se amplían las posibilidades de conseguir resultados muy favorables e interesantes si se continúa indagando acerca de estos beneficiosos compuestos. Por lo tanto, estos resultados son promisorios sugiriendo que la fucoxantina podría presentar implicancias terapéuticas, ya que podría contribuir en resolver las problemáticas relacionadas a enfermedades inflamatorias.

2.1.5. Efecto neuroprotector

Se prevé que, de aquí a 20 años, las enfermedades neurodegenerativas se colocarán como la segunda causa de muerte en el mundo, superando, incluso, a las provocadas por el cáncer. Esta es una de las razones por las que muchos científicos e investigadores le han dado suma importancia a desarrollar estrategias y terapias neuroprotectoras para combatir esta problemática. La neuroprotección puede definirse como los mecanismos y procedimientos utilizados con el fin de proteger las células neuronales del sistema nervioso central contra posibles daños, apoptosis, pérdidas de función o degeneración acelerada. Las sustancias capaces de ejercer dichos efectos beneficiosos son los agentes neuroprotectores, ya sean de origen natural o sintético. Sin embargo, y como también ocurre en otros campos, los compuestos sintéticos administrados con tal función

suelen estar asociados a efectos secundarios como somnolencia, cansancio, sequedad bucal, desequilibrio, ansiedad o nerviosismo, entre otros.

Es por ello por lo que la tendencia actual en el ámbito científico se basa en la búsqueda y el estudio de compuestos naturales con capacidades neuroprotectoras. En este contexto, las algas son una fuente emergente de compuestos naturales con capacidades bioactivas capaces de generar neuroprotección (Pangestuti et al., 2011). Okuzumi y colaboradores (1990) demostraron que la fucoxantina extraída y aislada de *Hizikia fusiformis*, un alga parda ampliamente consumida en Korea, Japón y China, es capaz de producir una inhibición en la expresión de N-myc, una proteína proto-oncogen, así como la proliferación de las células GOTO, una línea celular responsable del neuroblastoma humano. Una cantidad de fucoxantina equivalente a 10-1 g/mL es suficiente para inhibir la tasa de crecimiento de tal línea celular (GOTO) en un 38%, disminuyendo la velocidad de progresión de dicha enfermedad neurodegenerativa. Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos de acción de esta sustancia con exactitud, por lo que es necesario profundizar en esta área.

Por otro lado, la fucoxantina obtenida de *Wakame* (*U. pinnatifida*) también logró una disminución del daño celular de las neuronas corticales cuando se producen condiciones de hipoxia y reperusión de oxígeno. Ya que durante estos procesos suele producirse una cantidad excesiva ROS, el mecanismo de acción de la fucoxantina se asociaría con una actividad captadora de radicales, produciendo un efecto antioxidante. Esto es especialmente interesante de cara a la protección de las neuritas, ya que son componentes muy importantes de las neuronas, necesarios para el desarrollo neuronal durante el estado embrionario y también en el cerebro humano adulto (Khodosevich et al., 2010).

Hu et al. (2018) estudiaron la activación de Nrf2 y sus genes diana. Sus resultados muestran que la fucoxantina podría proteger el cerebro contra la lesión I/R. Estos autores mostraron que el estrés oxidativo se alivia significativamente con el tratamiento con fucoxantina, y la eliminación de Nrf2 bloqueó los efectos beneficiosos de la fucoxantina en las neuronas tratadas con OGD/R, lo cual indica que la fucoxantina podría inducir la activación de Nrf2/HO-1 y, por lo tanto, conducir a la atenuación del estrés oxidativo de la lesión cerebral I/R. Este estudio, además, indicó que el tratamiento con fucoxantina redujo de manera efectiva (oclusión de la arteria cerebral media) la lesión I/R cerebral inducida por MCAO y la apoptosis de las neuronas tratadas con OGD/R, y estos efectos fueron mediados en parte por la activación de Nrf2/HO-1.

En conclusión, la fucoxantina podría usarse como un suplemento con gran potencial para combatir la lesión cerebral I/R en el futuro. Zhang et al. (2017) también estudiaron los efectos neuroprotectores de la fucoxantina con un enfoque diferente. Estos autores examinaron la neuroprotección de la fucoxantina y el posible papel de las vías autofagia Nrf2-ARE y Nrf2- en los efectos neuroprotectores de la fucoxantina, en modelos in vivo e in vitro de lesión cerebral traumática (TBI). Los resultados de esta investigación sugieren que la fucoxantina proporcionó neuroprotección después de una lesión cerebral traumática, específicamente, mejoró el rendimiento neuroconductual, alivió el edema cerebral y disminuyó el volumen de la lesión.

Además, el tratamiento con fucoxantina disminuyó la apoptosis inducida por TBI y el estrés oxidativo a través de la activación de las vías Nrf2-ARE y Nrf2-autofagia.

2.2. Compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el sargazo

Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno y iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero. Los compuestos fenólicos presentan un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza donde se incluyen las algas pardas. La evaluación nutricional ha demostrado que el sargazo contiene una diversidad de compuestos bioactivos que incluyen compuestos fenólicos que se clasifican en muchas subclases en función de su estructura, como los flavonoides y los florotaninos (Cotas et al., 2020).

Los flavonoides, uno de los dos grandes grupos de compuestos fenólicos junto con los ácidos fenólicos, son un grupo extenso de compuestos derivados del benzo- γ -pirano. Dependiendo del grado de oxidación y de sustitución del anillo pirano central pueden subdividirse en flavonas, flavonoles, isoflavonas y antocianinas. Está comprobado que los flavonoides son importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas al protegerlas contra agentes agresores externos, como la radiación UV, microorganismos, animales herbívoros y del medio ambiente. Pueden actuar como señalizadores químicos, indicando a los insectos que planta es apropiada para su alimentación, oviposición o simplemente guiándolos y facilitando así la polinización. Otra de las propiedades de los flavonoides es su capacidad para contribuir a las propiedades de los alimentos, como el sabor o la dulzura (Cartaya, O et al., 2001).

Los niveles de estos compuestos en el sargazo pueden ser muy bajos y se desconocen los valores exactos. Los fenoles y flavonoides son comúnmente conocidos como compuestos bioactivos, pero su contribución farmacológica puede ser muy limitada debido a sus bajas concentraciones en el sargazo (Li, L et al., 2012).

2.3. Métodos de extracción

A comienzos del siglo XX, se inició la extracción de fucoxantina mediante varios procesos a base de solventes. La literatura científica muestra varias técnicas convencionales de extracción empleadas para la obtención de este carotenoide a partir de algas pardas. Actualmente, los métodos más comunes son los siguientes.

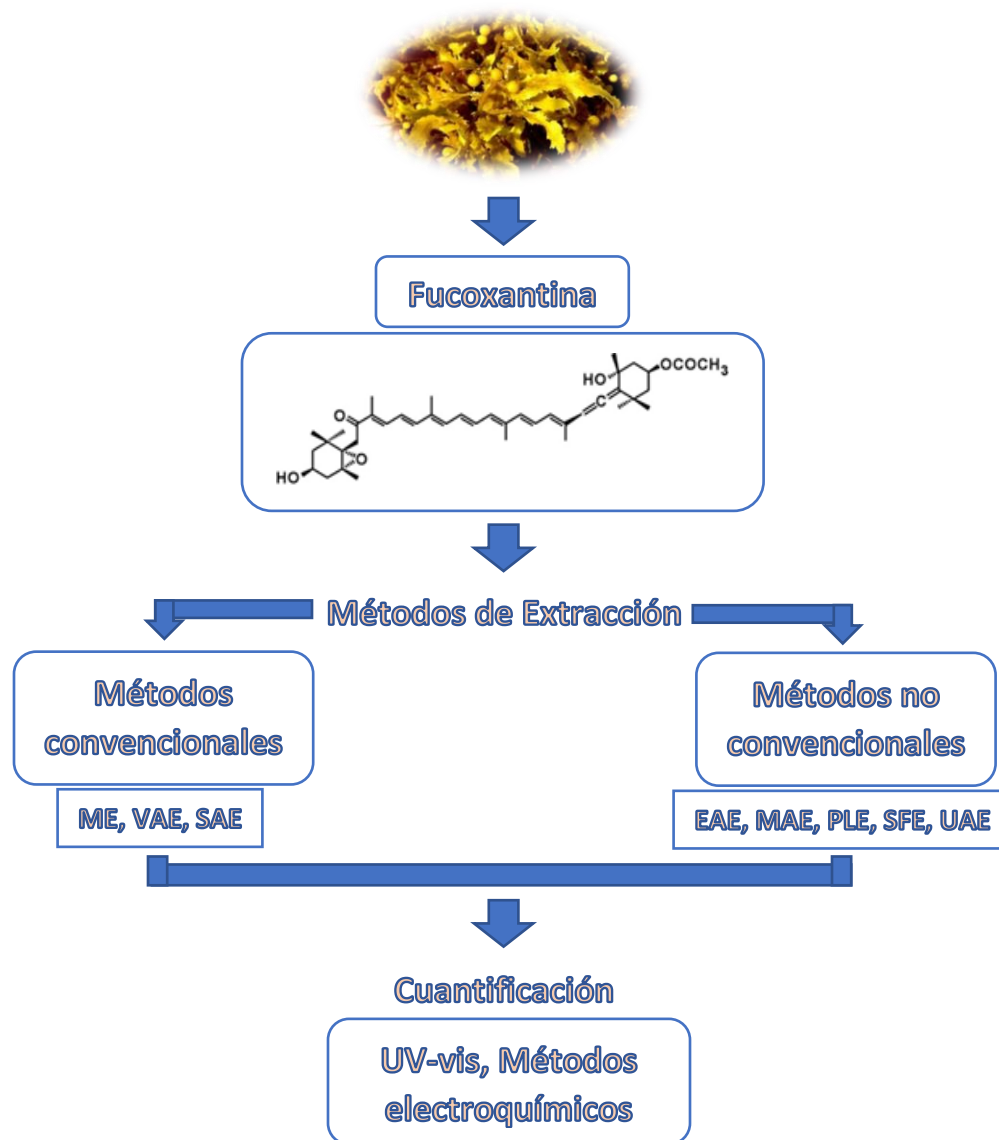


Figura 2-2. Descripción general de los métodos de extracción y cuantificación de la fucoxantina (Lourenço et al., 2020).

2.4. Métodos de extracción convencionales

2.4.1. Extracción por maceración (ME)

La mayoría de los métodos desarrollados que se encuentran en la literatura para obtener fucoxantina se basan en los protocolos de extracción por maceración (ME), que históricamente han servido para procesos de extracción comunes. La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, dónde se evalúan diferentes variables, como la relación biomasa-disolvente, porcentaje de disolvente, tiempo y temperatura de incubación (Pinela et al., 2019). La materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido y el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción (Fernaroli's et al., 1975). Existen dos métodos de maceración de acuerdo con la temperatura, caliente y frío.

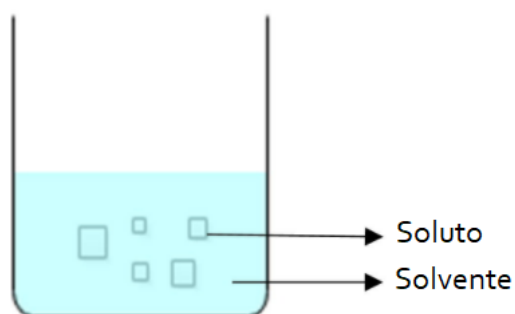


Figura 2-3. Modelo sistemático de extracción por maceración (Abd Aziz et al., 2021)

La maceración en frío consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de solvente para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Esto se lleva a cabo por un lapso largo, dependiendo de la materia prima que se vaya a macerar (Fernaroli's et al., 1975). Las ventajas de la maceración en frío consisten en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y en la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera (dependiendo del solvente), prácticamente en su totalidad sin alterarla por efectos de temperatura. Sin embargo, se necesitan períodos de tiempo mucho más extensos para lograr una extracción adecuada.

La maceración con calor consiste en el contacto entre las fases, el producto a macerar y el solvente; con la diferencia de la variación en la temperatura, en este caso pueden variar las condiciones de la maceración. El tiempo que se desea macerar varía mucho de la maceración en frío ya que al utilizar calor se acelera el proceso (Fernaroli's et al., 1975). La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto, ya que regularmente destruye algunas propiedades, es decir, muchas veces se trata de compuestos termolábiles que se ven afectados por

la temperatura, además de que requiere equipos más sofisticados que permitan el control de temperatura, sin mencionar el consumo energético que dicho proceso implica. No obstante, los períodos de tiempo de extracción se reducen favorablemente.

Se ha observado que la relación biomasa-disolvente utilizado varía mucho con amplios rangos que van desde 1:10 hasta 1:500 (Heffernan et al., 2016). La temperatura y el tiempo de extracción también son muy variables. Las temperaturas controladas probadas para la ME van desde 4°C hasta 65°C, mientras que los tiempos evaluados han variado desde 15 minutos hasta 96 horas. Además, al extraer fucoxantina, la elección del solvente es muy importante ya que determina la eficiencia del proceso de extracción. Los disolventes más utilizados son metanol (MeOH), acetona (AcO) y etanol (EtOH). Se han realizado otros estudios utilizando opciones como agua, hexano (Hx), cloroformo (Ch), diclorometano (DCM), heptano (Hp) o éter dietílico (DE). Según algunas investigaciones, el disolvente preferido fue el EtOH (Irvani et al., 2018). La optimización del proceso determinó que el rendimiento era máximo a una temperatura de 30°C durante 36.5 min, pH 5.7, utilizando 62.2% de AcO, obteniendo 6.5 µg/g de fucoxantina (Shannon et al., 2017).

2.4.2. Extracción asistida por vórtice (VAE)

Un factor esencial en la eficiencia de extracción es la dispersión uniforme y completa de las partículas en la solución. Al aumentar el número de partículas y disminuir su tamaño en la solución, la superficie de contacto entre el soluto y el solvente aumenta disminuyendo así el tiempo de extracción. Recientemente, un estudio realizado con varias macroalgas marrones utilizó y validó un sistema VAE, basado en la extracción tradicional sólido-líquido, cuya eficiencia se mejora mediante la agitación. Los resultados mostraron que el rendimiento óptimo se logró utilizando 25 µg de la muestra con 300 µL de EtOH, manteniendo un pH de 5.8 y agitada durante 15 min (Nunes et al., 2019).

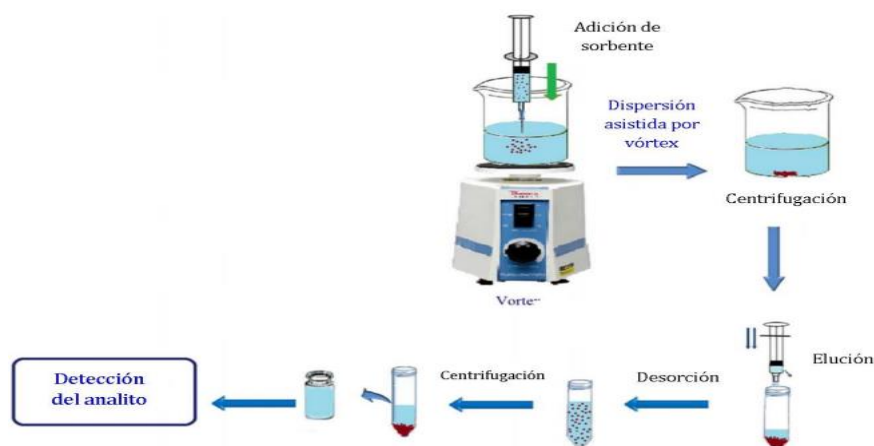


Figura 2-4. Representación esquemática de la extracción asistida por vórtice (Jiménez Fino et al., 2020)

La aplicación de esta energía externa acelera la extracción no solo por la dispersión del soluto, sino que también favorece la difusión de los analitos. Sin embargo, es importante mencionar que la aplicación de una fuente de energía que no se controla, induce a un aumento en la temperatura del sistema lo cual puede afectar negativamente a la termodinámica de la extracción e incluso llegar a degradar los analitos.

2.4.3. Extracción asistida por soxhlet (SAE)

En esta técnica se coloca una pequeña cantidad de muestra seca en el portamuestras del Soxhlet, mientras que el matraz donde se encuentra el disolvente se calienta para extraer los compuestos de interés. Los vapores del disolvente ascienden por la columna y se condensan en el refrigerante cayendo gota a gota sobre el cartucho hasta llenarse y alcanzar un nivel de desbordamiento que posteriormente es aspirado por el sifón y descargado nuevamente en el matraz de destilación. Esta disolución lleva los compuestos extraídos en el disolvente. Esta operación se repite hasta que se completa la extracción (Shahid et al., 2016).

Este sistema es generalmente utilizado para análisis sanitarios, alimentarios y medioambientales. La temperatura es un factor clave a la hora de la extracción, por lo que su aumento está relacionado con una mejor extracción, ya que puede romper las interacciones entre moléculas y facilitar la extracción. La SAE con aplicación de calor ofrece una alternativa ante la ME con menor consumo de solvente ya que permite la recirculación. Un estudio reciente mostró las mejores condiciones para la SAE, teniendo un tiempo de 12 hrs a 78°C con EtOH, pH 6.5 dando como resultado un rendimiento de 50 µg/g (Raguraman et al., 2018). La técnica de Soxhlet es una metodología simple que puede tener mejores rendimientos de extracción en comparación a otras técnicas; sin embargo, tiene algunas desventajas como el tiempo prolongado para la extracción y el desperdicio de grandes cantidades de disolvente que es difícil de eliminar y puede causar problemas ambientales adicionales (Yusuf et al., 2016).

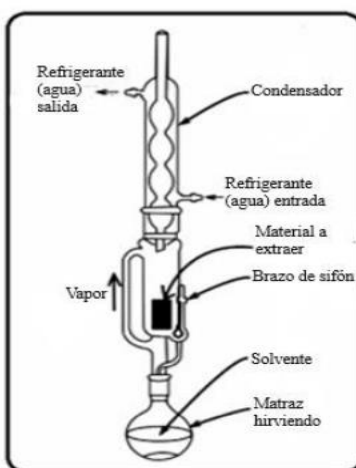


Figura 2-5. Modelo sistemático de extracción de Soxhlet (Shahid et al., 2016)

2.5. Métodos no convencionales

Los avances en tecnología son bastante útiles para la extracción de compuestos de interés. Actualmente, los métodos no convencionales reportados son los siguientes.

2.5.1. Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

El ultrasonido está basado en la propagación de ondas mecánicas conformada por un conjunto de ciclos, definidos como la combinación de altas y bajas presiones, denominadas compresiones y rarefacciones, respectivamente (Musielak et al., 2016). Las principales características de las ondas de ultrasonidos son:

- Longitud de onda: distancia que recorre una perturbación periódica que se propaga por un medio en un ciclo.
- Amplitud: presión máxima de una onda.
- Frecuencia (Hz): número de ciclos por unidad de tiempo.
- Velocidad (m/s): producto de la frecuencia por la longitud de onda.
- Potencia (W): cociente entre la energía transportada y el tiempo considerado.
- Intensidad (W/cm²): cociente de una unidad de potencia a través de una unidad de área.

Al espectro de ondas implicadas en el ultrasonido se les denomina ondas ultrasónicas, cuyas frecuencias se encuentran por encima del intervalo audible (>20 kHz) y por debajo de las frecuencias de microondas (hasta 10 MHz) (Kadam et al. 2015). La cavitación acústica, es decir, el crecimiento y colapso de pequeñas burbujas, es considerada el fenómeno principal asociado a la extracción de compuestos. Es una consecuencia de los cambios de presión y temperatura en el medio. La expansión y el colapso de las burbujas genera compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente (Figura 2-6) (Shirsath et al. 2012).

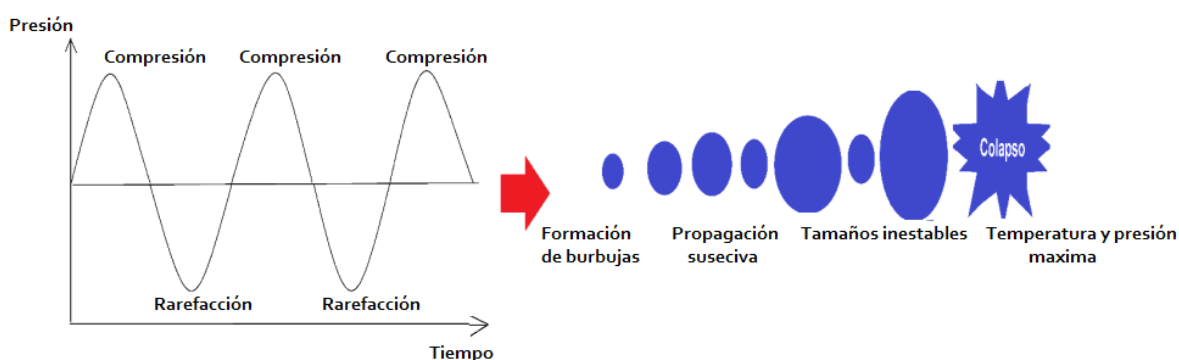


Figura 2-6. Principio de cavitación acústica (Medina et al. 2017)

En general, se han identificado varios mecanismos involucrados en la UAE. Entre ellos destaca la fragmentación, atribuida a las colisiones entre partículas y las ondas ultrasónicas, causando la reducción en el tamaño de partícula, lo que facilita la transferencia de masa. Otro mecanismo involucrado es la erosión, que ayuda a mejorar la accesibilidad del disolvente mediante la implosión de las burbujas sobre la superficie de la matriz vegetal.

Por su parte, los efectos de sonocapilaridad y de sonoporación son capaces de mejorar la penetración de líquido a través de los canales producidos por la implosión de las burbujas, ocasionando alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares. Finalmente, el esfuerzo de cizallamiento produce el colapso de las burbujas en el fluido debido al fenómeno de oscilación (Figura 2-7) (Chemat et al. 2017).

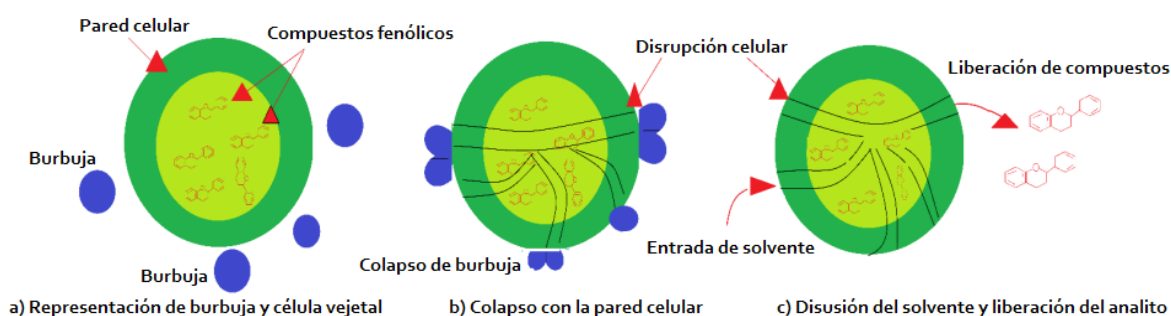


Figura 2-7. Representación gráfica del fenómeno de cavitación, colapso y liberación del material vegetal. (Medina et al., 2017)

La irradiación ultrasónica puede ser aplicada de dos maneras: por contacto directo con la muestra, o, indirectamente, a través de las paredes del recipiente que contiene la muestra, como en los sistemas de baño ultrasónico. La principal desventaja del baño de ultrasonido es que generalmente funciona a una sola frecuencia (20 o 40 kHz). Sin embargo, existen sistemas de extracción más eficientes, como los sistemas de extracción por ultrasonido acoplado a una sonda (Figura 2-8), en donde el contacto directo con la muestra, le permite desarrollar una potencia de hasta 100 veces más que la proporcionada por el baño de ultrasonido (Pico et al., 2013).

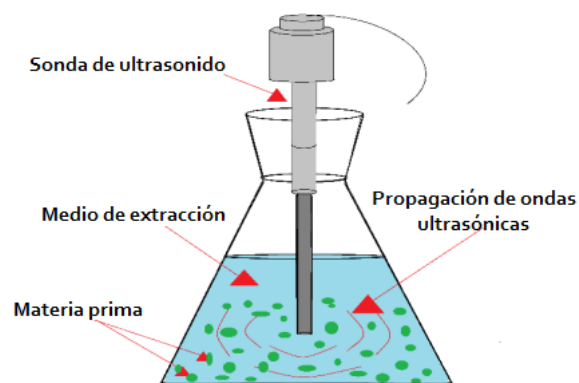


Figura 2-8. Representación de un equipo de ultrasonido acoplado a una sonda (Medina et al., 2017)

Ciertos beneficios en términos de penetración del disolvente surgen del uso en UAE como es la intensificación de transferencia de masa. La extracción también puede mejorarse debido al colapso de las burbujas formadoras de cavitación, cerca de las paredes celulares (Teli et al., 2012). La tasa de extracción y el rendimiento pueden mejorarse mediante la combinación óptima de las variables del ultrasonido, como la intensidad y el tiempo de aplicación (Rodríguez et al., 2012). Además, disolventes diferentes para la extracción podrían dar rendimientos mayores de fucoxantina en los extractos. Esta técnica se ha empleado para extraer fucoxantina de algas pardas. Los valores óptimos de la concentración del disolvente, la temperatura, el pH y el tiempo de aplicación fueron EtOH al 80%, 50°C, pH 5.5 y 30 minutos, respectivamente. Estas condiciones permitieron obtener 300 µg/g en peso seco de fucoxantina, que es superior al contenido de fucoxantina obtenido con la extracción convencional (Raguraman et al., 2018).

La UAE representa una tecnología factible para el escalamiento industrial. La ventaja de escalar este método de extracción radica en la reducción del tiempo de procesamiento y altos rendimientos obtenidos, además de su sostenibilidad para el medio ambiente. Pingret y colaboradores (2012), llevaron a cabo la extracción de compuestos fenólicos de la pulpa de manzana por UAE, utilizando como parámetro de escala, la relación disolvente-soluto (1- 500) en un tanque piloto de extracción de 30 L acoplado a una salida de ultrasonido cuádruple de 25 kHz y 200 W. Los resultados mostraron un rendimiento de extracción 15% más alto que el obtenido por extracción convencional. Varios estudios demuestran la eficacia del proceso de UAE comparado con otros métodos convencionales o novedosos, no sólo en el laboratorio, sino también a escala de planta piloto (Pingret et al. 2012). Se ha reportado que UAE representa una ventaja frente a los métodos convencionales de extracción, al aumentar la recuperación de polifenoles (Vázquez et al. 2014; Rodríguez-Pérez et al. 2015; Cai et al. 2016), además de permitir la reducción en el tiempo del proceso. Lo anterior se atribuye al hecho de que el uso de ultrasonido favorece la ruptura de la pared celular, con el consiguiente aumento de la penetración del disolvente (Pingret et al. 2012).

2.5.2. Ondas de choque

Durante los últimos 30 años, las aplicaciones biomédicas de las ondas de choque se han desarrollado enormemente y se han establecido en la medicina para tratamientos seguros y eficaces de varias enfermedades. Actualmente las ondas de choque sorprenden por su capacidad para transfectar células humanas, así como para transformar genéticamente hongos filamentosos y bacterias. Las implicaciones clínicas y biotecnológicas de estos hallazgos son enormes. Ejemplo de ello es la litotricia extracorpórea por ondas de choque (SWL) la cual revolucionó la urología y pasará a la historia de la medicina como uno de los avances tecnológicos más destacados (Loske, A. M. 2017).

Tras demostrar la viabilidad de la pulverización de cálculos urinarios mediante ondas de choque sin necesidad de cirugía, el siguiente paso obvio fue explorar su uso para el tratamiento de cálculos en otras partes del cuerpo. Al tratar de aumentar la eficiencia del equipo y reducir el daño a los tejidos afectados, aparecieron muchas otras aplicaciones, nunca pensadas. Varios grupos de investigación se centraron en la interacción entre las ondas de choque y los tejidos vivos, y empezaron a publicar los resultados de estudios multidisciplinarios. En muchos países, el uso de las ondas de choque para tratar dolencias relacionadas con la ortopedia pronto superó el número de pacientes tratados con SWL. Hoy en día, las aplicaciones biomédicas de las ondas de choque incluyen una variedad tan grande que sería un proyecto enorme describir a fondo el desarrollo histórico de cada una de ellas (Loske, A. M. 2017).

Las ondas de choque son perturbaciones abruptas y no lineales que consisten en un pulso de presión positiva de uno a tres microsegundos, seguido de una presión negativa con una duración de varios microsegundos. Se caracterizan típicamente por su pico de presión positiva (p_+), su amplitud de presión negativa (p_-) y la anchura total a la mitad del máximo del pico de presión positiva (t_{FWHMp_+}). El subíndice "FWHM" significa "full width at half maximum". Este valor se define como el tiempo que transcurre desde el instante en que la presión supera por primera vez el 50% de p_+ hasta el instante en que la presión vuelve a descender hasta este valor. El tiempo de ascenso del pulso positivo, definido como el tiempo necesario para que la presión suba del 10% al 90% de su valor máximo, p_+ , varía entre 1 y 500 ns (Figura 2-9). Los valores de p_+ , p_- , t_{FWHMp_+} y t_r dependen de varios factores, como el principio de generación de la onda de choque, el mecanismo de enfoque y la energía (Loske, A. M. 2017).

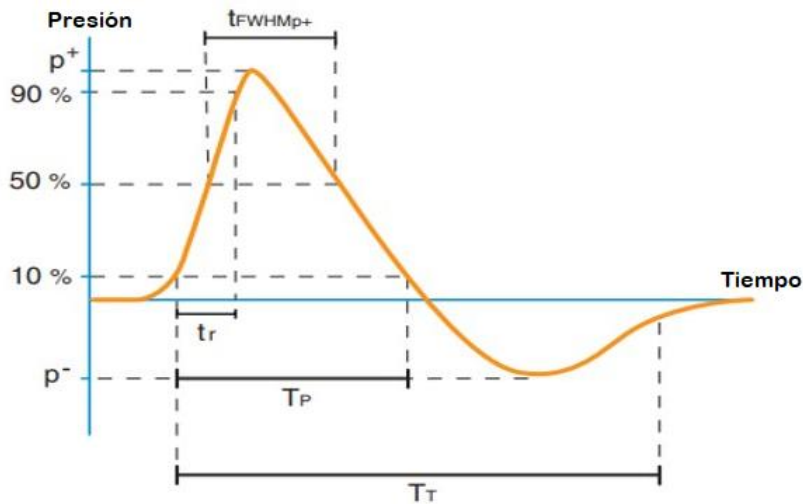


Figura 2-9. Esquema de la formación de una onda de choque que muestra el pico de presión positiva (p^+), el pico de presión negativa (p^-), el tiempo de subida (t_r) y la duración del pulso de compresión (t_{FWHMp+}) (Loske, A. M. 2017)

La cavitación acústica, es decir, el crecimiento y el colapso de las microburbujas contenidas en los fluidos, y la tensión de cizallamiento generada debido al gradiente de presión espacial provoca que las microburbujas preexistentes en el fluido experimentan un colapso forzado producido por la onda de choque entrante. A medida que la onda de choque pasa, cada burbuja aumenta su volumen cientos de veces hasta que se produce un segundo colapso extremadamente violento cientos de microsegundos después. Debido a las diferencias de presión, el colapso de la burbuja es asimétrico. Cuando una microburbuja colapsa cerca de una superficie sólida, la burbuja involuciona desde el extremo distal y un microjet se mueve hacia el objeto. La colisión entre el microjet y la pared opuesta de la burbuja que se mueve hacia dentro genera una onda de choque secundaria de alta presión (hasta 300 MPa). La cavitación acústica es tan violenta que puede producir radicales libres de oxígeno y una tensión de cizallamiento adicional.

2.5.3. Ondas de choque en aplicaciones biomédicas

Las ondas de choque desempeñan un papel importante en varios campos, como la acústica, la química física, la aerodinámica y la dinámica de gases, las ciencias de los materiales, las ciencias espaciales, las geociencias, las ciencias de la vida y la medicina. Aunque la presión, es decir, la fuerza aplicada perpendicularmente a una superficie por unidad de área se reporta con valores positivos, dependiendo del nivel de referencia, a veces también se expresa con valores negativos. En los informes que tratan de las aplicaciones biomédicas de las ondas de choque, la presión suele considerarse negativa si su valor es inferior a la presión anterior a la llegada de la onda de choque, es decir, se considera negativa la depresión de presión que aparece después del impulso de presión

positivo principal. Si la presión negativa máxima supera las fuerzas de cohesión del fluido o la adhesión a las motas en el fluido, aparecen burbujas. Este fenómeno se denomina cavitación acústica. En las aplicaciones biomédicas, la cavitación suele formarse a partir de pequeños núcleos de cavitación o microburbujas. Las ondas de choque, usadas para aplicaciones clínicas son pulsos generados en el agua que alcanzan presiones de hasta 1500 veces la presión atmosférica en un lapso muy pequeño. Para producir ondas de choque, generalmente se utilizan sistemas electrohidráulicos, piezoeléctricos o electromagnéticos (Dreyer et al., 2000).

Los equipos electrohidráulicos funcionan mediante una descarga eléctrica producida entre dos electrodos colocados en un primer foco de un reflector metálico con forma de elipsoide de revolución. Cada descarga genera una burbuja de plasma que se expande súbitamente, produciendo una onda de choque que se concentra en el segundo foco del reflector. Los generadores electromagnéticos se basan en la magnetización y repulsión de una membrana metálica; ambas funciones causadas por el campo magnético producido por una bobina cilíndrica. Al hacer pasar un pulso de corriente eléctrica por la bobina, ésta se convierte en un electroimán que magnetiza y rechaza la membrana en su entorno. Así se produce un pulso de presión que se propaga hasta ser concentrado por un reflector o una lente, transformándose en una onda de choque cerca del foco (Dreyer et al., 2000).

2.5.4. Generadores piezoeléctricos

En 1880, los hermanos Pierre y Jacques Curie demostraron que la aplicación de una tensión mecánica a ciertos materiales produce electricidad, fenómeno conocido como efecto piezoeléctrico. Las piezocerámicas más comunes son el titanato de bario y el titanato de zirconato de plomo. Una ventaja importante de estos materiales es su larga vida útil. Los elementos cerámicos piezoeléctricos policristalinos cambian repentinamente su tamaño unos pocos micrómetros cuando se les aplica un impulso eléctrico. Cuando estos elementos están en contacto con un fluido, su rápida expansión produce un pulso de presión, seguido de una fase de tensión. Dependiendo del diseño de la fuente de ondas de choque, se disponen entre decenas y miles de estos elementos en una superficie. El perfil de la onda de presión generada depende de varios factores, como el material aislante en la parte delantera del transductor, el material de soporte en su parte trasera, la forma de los elementos piezoeléctricos y el impulso de excitación eléctrica (Dreyer et al., 2000).

El mismo tipo de onda también puede generarse con cientos de cristales piezoeléctricos montados sobre la superficie de un cascarón esférico de aluminio, los cuales deben ser aislados del agua por un polímero. Al recibir un pulso de alto voltaje, estos cristales aumentan súbitamente su longitud, produciendo pulsos de presión en el agua; así, la contribución de cada cristal se propaga hacia el centro del cascarón esférico, superponiéndose con la de los demás, generando una onda de choque (Figura 2-10).

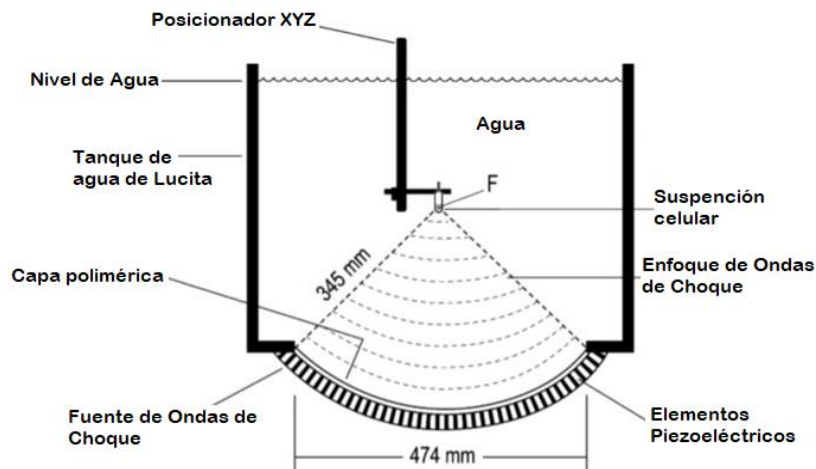


Figura 2-10. Esquema de un generador experimental de ondas de choque piezoeléctrico (Loske, A. M. 2017)

Cada elemento piezocerámico se expande unos pocos micrómetros, generando un pulso de presión que se propaga hacia el centro del arreglo (F). La superposición de todos los impulsos de presión y los efectos no lineales producen una onda de choque en las proximidades de F . Si se utiliza una disposición esférica, el sistema se autoenfoca y no requiere reflectores. Para controlar la velocidad de descarga de las ondas de choque se utiliza un conmutador de chispa o un tiristor de alto voltaje accionado por un generador de pulsos. Al igual que los sistemas electrohidráulicos, el circuito eléctrico de las fuentes de ondas de choque piezoeléctricas consta principalmente de una unidad de carga de condensadores y un sistema de control de la descarga. Las fuentes piezoeléctricas dependen de la propagación acústica no lineal para generar ondas de choque en las proximidades del punto focal. Las principales ventajas de las fuentes de ondas de choque piezoeléctricas son su larga vida útil (más de un millón de ondas de choque) y la menor necesidad de analgesia debido a la excelente capacidad de enfoque del transductor. Una ventaja adicional de las fuentes de ondas de choque piezoeléctricas es la posibilidad de modificar la onda de presión alterando la excitación de los elementos piezocerámicos. A diferencia de las mediciones con fuentes de ondas de choque electrohidráulicas, no es necesario promediar los registros de presión (Dreyer et al., 2000).

2.5.5. Ondas de choque tándem

Se ha demostrado que el colapso de las burbujas y la emisión de microjet pueden aumentar significativamente si una segunda onda de choque llega poco antes de que las burbujas generadas por la onda de choque anterior comiencen a colapsar (Bailey et al., 1997). El retardo óptimo entre las dos ondas de choque (llamadas ondas de choque en tándem) depende de varios factores, como las propiedades del fluido y el perfil de presión. Los análisis numéricos han revelado que la segunda onda de choque puede tener una amplitud menor que la primera (generadora de burbujas) y seguir

siendo eficaz (Bailey et al., 1997; Canseco et al., 2011). En general, las ondas de choque en tándem se definen como dos ondas de choque consecutivas, generadas dentro de un lapso de aproximadamente 10-900 microsegundos. Se han utilizado términos como ondas de choque en tándem y de doble pulso de forma intercalada; sin embargo, las ondas de choque de doble pulso pueden generarse con lapsos demasiado largos para ser considerados como pulsos en tándem. Las ondas de choque en tándem pueden ser útiles no solo para mejorar la SWL, sino también para potenciar el efecto bactericida de las ondas de choque (Álvarez et al., 2008), y para aumentar la eficacia de la transformación genética la transfección celular y el tratamiento del cáncer. Una de las ventajas de usar ondas de choque tándem es el hecho de que con este perfil de presión es posible aumentar la energía de colapso de las burbujas para un rango de retardos mucho mayor (Loske, A. M. 2017).

Se han desarrollado sistemas más eficientes y descubierto aplicaciones novedosas de ondas de choque, entre las cuales destacan la introducción de material genético en hongos microscópicos (transformación genética) y la incorporación de material genético al interior de células humanas (transfección) (Álvarez et al., 2008). De manera análoga a lo que sucede con los microorganismos mencionados, las ondas de choque son capaces de abrir poros en membranas celulares. La importancia de la transformación genética de hongos y bacterias usando ondas de choque radica en la posibilidad de producir antibióticos, insulina, vacunas y ácido cítrico. El material genético insertado puede provenir de bacterias, plantas o incluso mamíferos (Lukes et al., 2014).

2.6. Solventes no convencionales

2.6.1. Solventes eutécticos profundos (DES)

Los solventes eutécticos profundos (DES, por sus siglas en inglés) fueron introducidos por Abbott y colaboradores en 2004 como alternativa a los líquidos iónicos. Estos autores demostraron que combinaciones de urea con sales de amonio cuaternarias sustituidas, tales como cloruro de colina, producían mezclas eutécticas líquidas a temperatura ambiente con propiedades interesantes como solventes. Un sistema eutéctico, del griego "ευ" (eu = fácil) y "τήξις" (teksis = fusión), hace referencia a la mezcla de compuestos cuyo punto de fusión y solidificación es menor que el de los compuestos por separado. Las principales ventajas frente a los líquidos iónicos se deben principalmente a su fácil preparación, bajo costo y biodegradabilidad. Asimismo, comparten las características atractivas de los líquidos iónicos ya que poseen baja volatilidad y es posible ajustar sus propiedades fisicoquímicas siendo también llamados "solventes de diseño". Las aplicaciones de los DES se han centrado principalmente en reacciones orgánicas, electroquímica, reacciones enzimáticas y más recientemente para procesos de extracción de metabolitos a partir de diferentes matrices (Dai et al., 2013).

2.6.2. Solventes eutécticos profundos naturales (NADES)

En 2011 los investigadores Choi y colaboradores propusieron el término "Solventes Eutécticos Profundos Naturales" (NADES, por sus siglas en inglés), con el fin de diferenciar de los DES a aquellas

mezclas eutécticas constituidas únicamente por compuestos presentes en el metabolismo celular de todos los organismos vivos. Entre los principales componentes de estos solventes verdes se encuentran azúcares, alcoholes, aminoácidos, ácidos orgánicos y derivados de colina. En este sentido, los NADES se alinean con los principios de la Química Verde, por su naturaleza, bajo costo, fácil preparación y biodegradabilidad. Cabe destacar que los componentes de los NADES se encuentran en elevadas concentraciones en la dieta humana (Dai et al., 2013).

Se sabe que la fucoxantina, que es un carotenoide, es altamente hidrofóbica, esto debido a su carácter no polar o poco polar, entonces, para realizar una extracción satisfactoria deberá hacerse uso de un solvente que sea capaz de disolver este tipo de compuestos. Los NADES se conforman gracias a interacciones intermoleculares del tipo enlaces de hidrógeno, pues se componen de un dador y un aceptor, esta característica les permite también formar estas interacciones con el soluto en cuestión, permitiendo que existan un gran número de interacciones y por lo tanto se lleve a cabo la disolución (Paiva et al., 2014). La fucoxantina en su estructura posee varios átomos de oxígeno. Es un excelente aceptor de enlaces de hidrógeno, encontrando sitios de interacción entre los NADES y las fucoxantinas que servirán para la disolución de éstas. En este sentido, se ha reportado que las mezclas como la de cloruro de colina y ácido láctico son muy eficientes para moléculas con carácter poco polar, como es el caso de las fucoxantinas (Wei et al., 2015). Estos disolventes suelen caracterizarse por una alta viscosidad, la cual puede verse considerablemente reducida con la adición de una cantidad conocida de agua (Dai et al., 2013; Paiva et al., 2014). Generalmente se recomienda un máximo del 25%, para no afectar las propiedades de los NADES (Wei et al., 2015; Dai et al., 2016; Alcalde et al., 2019).

2.7. Cuantificación de las fucoxantinas

La fucoxantina ofrece distintas alternativas para su cuantificación ya que puede realizarse mediante técnicas analíticas (basadas en su detección de masa molecular), métodos espectrofotométricos (basados en su característica de color), o una combinación de ambos sistemas. Los instrumentos más comúnmente utilizados para su identificación y cuantificación son:

- Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) usando la relación masa-carga (m/z).
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detectores de matriz de diodos ultravioleta (UV), que detecta el pico de absorbancia máximo a 446 nm.
- Resonancia magnética nuclear (RMN), que determina su estructura.
- Lectores espectrofotométricos que proporcionan datos basados en absorbancia.

(Xia, S. et al., 2013)

2.7.1. Prueba por espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis)

La mayoría de los protocolos desarrollados para la cuantificación de fucoxantina ya sea usando un equipo HPLC o UPLC, suelen establecer absorbancias en torno a 450 nm. Sin embargo, la presencia de dobles enlaces conjugados en la estructura de la fucoxantina (Figura 1-1) la vuelve inestable en algunas condiciones. La fucoxantina puede isomerizarse en cis-fucoxantina, cuya oxidación puede producir compuestos de carbonilo de cadena corta. Para detectar y proporcionar una cuantificación precisa de la fucoxantina se usa la técnica espectrofotométrica Ultravioleta Visible (UV-Vis), ya que la fucoxantina absorbe principalmente en el rango de 450 a 540 nm en la parte azul-verde a amarillo-verde del espectro visible, alcanzando un máximo de alrededor de 510-525 nm, según diversas estimaciones. Es útil realizar lecturas de espectros amplios (de 300 a 800 nm) o establecer las longitudes de onda específicas asociadas con estos subproductos (300, 350 y 400 nm) (Zhu et al., 2016). Los métodos espectrofotométricos son más económicos, ya que reducen los tiempos experimentales y no utilizan un volumen grande de solventes orgánicos, por lo que también pueden ser consideradas como técnicas más ecológicas, siendo una opción más rápida y sencilla (Rajauria et al., 2013).

2.7.2. Cuantificación de las fucoxantinas por voltamperometría diferencial de pulsos (DPV)

El termino voltamperometría describe a una clase de técnicas electro analíticas, y que es utilizada para la medición de corriente-potencial obtenida en un determinado electrodo. La voltamperometría se basa en la medida de la corriente electrónica que surge en una celda de tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y el contraelectrodo. Esta relación podría explicarse cuando el potencial (E) se aplica al electrodo de trabajo y la corriente resultante fluye a través de la celda electroquímica, la cual es registrada. El potencial aplicado al electrodo de trabajo sirve como fuerza para la reacción de transferencia electrónica; controla el parámetro que hace que las especies químicas presentes en la solución sean electrolizadas (reducidas u oxidadas) en la superficie del electrodo (Sýs et al., 2017).

Por lo tanto, un enfoque voltamperométrico en la cuantificación de la fucoxantina se propone como una alternativa interesante debido a que el muestreo es más fácil, el análisis requiere menos tiempo y los costos operativos son bajos. Como antioxidante la fucoxantina se considera un compuesto electroactivo que pueden oxidarse anódicamente en los electrodos que incorporaban carbón vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl (saturado con KCl) como electrodo de referencia y platino como contraelectrodo en disolventes orgánicos puros o en sus mezclas acuosas. Es posible realizar la determinación voltamperométrica de fucoxantinas en solución acuosa después de su extracción en la superficie del electrodo de trabajo (Sýs et al., 2017). En comparación con los métodos de cuantificación mencionados anteriormente, aún no se han estudiado los métodos electroquímicos en la cuantificación de la fucoxantina.

2.8. Estabilidad de las fucoxantinas

Una vez extraída la fucoxantina, es fundamental almacenarla en condiciones estables, prestando especial atención a su exposición a la luz, pH o temperaturas extremas. Los métodos más estudiados para confirmar la estabilidad química de la molécula son la nanoencapsulación (Prieto et al., 2012).

2.8.1. Nanoencapsulación

Nano, deriva de la palabra griega “*nano*” (nano=extremadamente pequeño). En general, las nanopartículas se definen como partículas coloidales sólidas, de acuerdo con el proceso de formación empleado pueden obtenerse nanoesferas y las nanocápsulas, esto en función de su morfología. (Mora et al., 2010; Rao et al., 2011). Las nanoesferas tienen estructuras homogéneas, matriciales en la que los medicamentos se dispersan de manera uniformemente. Las nanocápsulas, son las que muestran una estructura núcleo-cápsula. La formulación de nanopartículas implica ciertos desafíos porque es importante tener una distribución de tamaño homogéneo, la morfología, el objetivo terapéutico de la administración del fármaco, la biocompatibilidad del polímero y la compatibilidad de las propiedades fisicoquímicas del agente bioactivo (Li et al., 2010). Las nanopartículas son sistemas poliméricos submicrónicos (< 1µm) (Sáez et al., 2004).

Las nanoesferas son partículas sólidas. Las moléculas pueden ser adsorbidas en la superficie de la esfera o pueden estar encapsuladas dentro de la partícula. En general, son esféricas, pero el término "nanoesfera" no hace referencia necesariamente a una morfología totalmente esférica. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares, actuando como una especie de depósito, en el que las sustancias atrapadas se limitan a una cavidad que consta de un núcleo líquido (aceite o agua) rodeado por una cáscara de material sólido (Rao et al., 2011). Entre los principales métodos de preparación podemos citar: nanoprecipitación, emulsión de difusión, doble emulsión, emulsión-coacervación, revestimiento de polímero y la capa por capa. Las nanopartículas poliméricas se han estudiado ampliamente como vehículos de fármacos en el campo farmacéutico y diferentes equipos de investigación han publicado análisis sobre los mecanismos de formación de nanopartículas, la clasificación de los sistemas nanoparticulados y las técnicas para la preparación de nanocápsulas (Mora et al., 2010).

2.8.2. Nanoencapsulado de las fucoxantinas

La encapsulación es un proceso que proporciona una barrera física para evitar la alteración del ingrediente central. Esta técnica estabiliza y protege las moléculas que se degradan fácilmente, por lo que la encapsulación permite el fortalecimiento de diferentes matrices con compuestos que de otra manera habrían perdido sus bioactividades. Se ha evaluado la estabilidad y biodisponibilidad de la fucoxantina cuando se encapsula utilizando diferentes enfoques y materiales. La variabilidad de los materiales de las paredes que se han utilizado para desarrollar cápsulas es enorme. Como materiales de encapsulación se emplean comúnmente diferentes proteínas (suero, zeína, caseína y gelatina), oligosacáridos (maltodextrinas, ciclodextrina), polisacáridos (quitosano, alginatos) o glicolípidos, aplicados tanto individualmente como combinados (Sun et al., 2018).

2.8.3. Nanopartículas de PLGA-PVA

Las nanopartículas son vehículos que se han venido empleando para el transporte y la liberación controlada de fármacos (Kumari et al. 2013). Entre los diferentes polímeros que se pueden emplear en su fabricación está el copolímero de ácido láctico-co-glicólico (PLGA) (Figura2-11).

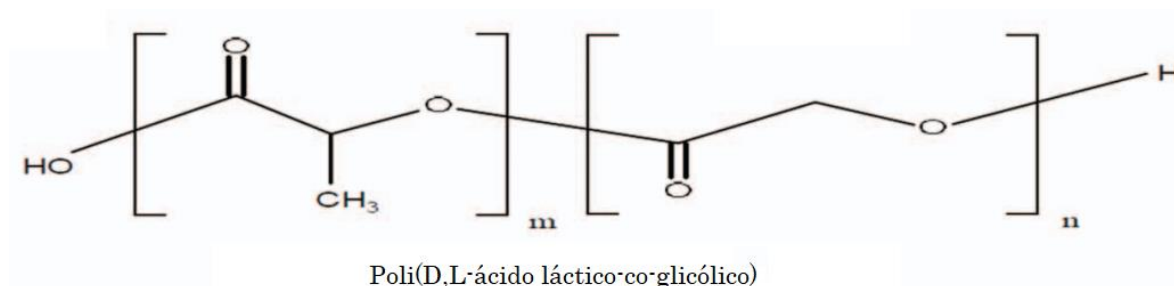


Figura 2-11. Estructura molecular del poli(D,L-ácido láctico-co-glicólico) (Ansary et al., 2014)

Este es un material biodegradable, que se puede sintetizar variando la relación entre sus monómeros y produciéndose con diferentes masas molares. Su biodegradación y carácter hidrófobo puede cambiar de acuerdo con la relación entre sus monómeros. Las nanopartículas de (PLGA) son polímeros de alto peso molecular con buena biocompatibilidad y biodegradabilidad. Estos han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. para la administración de fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades. El PLGA se ha utilizado como polímero biocompatible, biodegradable y de administración segura.

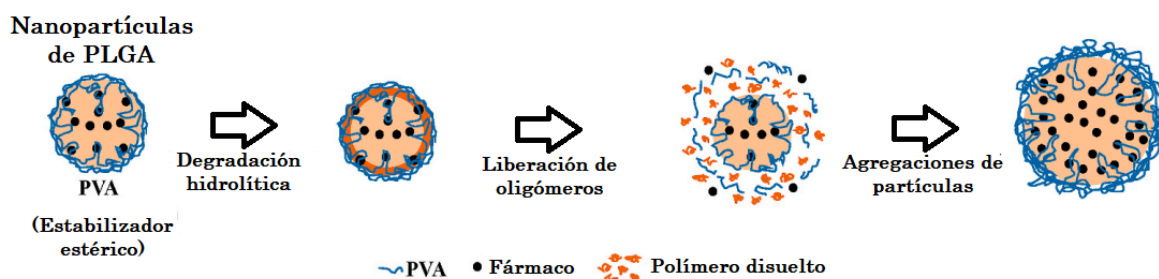


Figura 2-12. Representación esquemática de estabilizadores estéricos en la formación de nanopartículas de PLGA y estiramiento de las cadenas de PVA (Ansary et al., 2014)

Normalmente las nanopartículas de PLGA cargadas con fármacos hidrofóbicos se han obtenido mediante el método de emulsión simple (Sharma et al., 2016). Este método se caracteriza por utilizar un polímero biodegradable, un fármaco hidrófobo, un disolvente orgánico volátil, agua y un surfactante. En particular, varios surfactantes no iónicos como el poli (alcohol vinílico) (PVA) (Heo et al., 2010) se ha utilizado como estabilizador estérico y electrostático. Es importante destacar que el PVA se ha administrado por vía oral e intravenosa en nanosuspensiones farmacéuticas (Wu et al., 2011). Además, el PVA se ha utilizado durante la preparación de nanoesferas de PLGA cargadas de fármacos y dirigidas a la vía oral (Wang et al., 2014).

Se ha demostrado que el paso de la fucoxantina a través del tracto gastrointestinal desencadena su transformación en fucoxantínol. La fucoxantina contenida en las nanopartículas también se transforma en fucoxantínol, mostrando los mejores resultados a 100 y 130 nm de diámetro de partícula. Ambos componentes de las nanocápsulas interactuaron con la fucoxantina por contactos hidrófobos, lo que logra estabilizar la molécula y sus bioactividades (Li et al., 2018).

Por tanto, la encapsulación permite el aislamiento de los ingredientes objetivo, proporcionando estabilidad química, que en última instancia preservará sus bioactividades, y también permite la determinación de una dosis exacta. La incorporación de concentraciones exactas en una matriz puede representar un formato de administración cómodo para los consumidores, lo que permitirá maximizar los beneficios para la salud asociados con la fucoxantina, que en su mayoría dependen de la dosis. Por tanto, la encapsulación de fucoxantina es un método preciso para especificar su cantidad final, lo que facilita la posible adherencia de los tratamientos basados en fucoxantina (Tafuku et al., 2012).

2.8.4. Homogeneización ultrasónica

La homogeneización ultrasónica es un proceso mecánico para reducir las partículas en un líquido de modo que se vuelvan regularmente pequeñas y se distribuyan uniformemente. Cuando se utilizan homogeneizadores ultrasónicos para aplicaciones como mezclar, dispersar y emulsionar, el objetivo es reducir pequeñas partículas o gotitas en un líquido para mejorar la uniformidad y estabilidad de la mezcla. Estas partículas (fase de dispersión) pueden ser tanto sólidas como líquidas. Una reducción en el diámetro medio de las partículas aumenta el número de partículas individuales. Esto conduce a una reducción de la distancia media de las partículas y aumenta el área de la superficie de las partículas. Si existe una diferencia en la gravedad específica entre las partículas y el líquido, la homogeneidad de la mezcla puede influir en la estabilidad de la dispersión. Si el tamaño de partícula es similar para la mayoría de las partículas, la tendencia a aglomerarse durante su sedimentación o su ascenso a la superficie se reduce, ya que las partículas similares tienen una velocidad similar de flotación o sedimentación (Mora et al., 2010).

En comparación con los métodos de homogeneización convencionales, los métodos de homogeneización ultrasónicos destacan por que producen pequeñas partículas, pueden manejar concentraciones de sólidos elevadas y logran preparar suspensiones estables, dispersiones y emulsiones. Los homogeneizadores ultrasónicos son fácilmente controlables con precisión, ya que

los parámetros importantes del proceso (amplitud, potencia, tiempo, temperatura y presión) pueden ser influenciados y ajustados. Los homogeneizadores ultrasónicos son eficaces, energéticamente eficientes, fáciles de usar y seguros (Sun et al., 2018).

2.8.5. Potencial Z

Es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial requerido para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla (Yoval et al.). La medición del potencial zeta es una técnica que proporciona información sobre la distribución de carga superficial en la interfase sólido/agua (Mantilla et al., 2008).

Cuando una superficie sólida está en contacto con una solución acuosa, la formación de una carga interfacial causa el rearrreglo de los iones libres locales en la solución para producir una región muy delgada de densidad de carga neta diferente de cero que está cercana a la interfase. El arreglo de cargas en la interfase sólido-líquido y el balance de los iones de carga contraria a la superficie sólida es lo que se refiere a la doble capa eléctrica. Según el modelo de la doble capa eléctrica, se pueden asumir la existencia de dos capas en la vecindad de la interfase sólido/solución; una capa en la cual se presenta un decaimiento lineal del potencial eléctrico y que permanece fija aun cuando las partículas se muevan, y una capa difusa con decaimiento exponencial. Esto implica la existencia de un plano de referencia entre la capa fija y la capa difusa y justo el potencial se denomina potencial Z, o potencial electrodinámico (Mantilla et al., 2008). Esta concentración define el punto de carga cero o punto isoeléctrico y en él no hay doble capa eléctrica (Moreno et al., 1987). El potencial superficial puede ser utilizado para la evaluación y conocimiento de los procesos de separación por flotación espumante (Mantilla et al., 2008). Además, en el área de investigación de materiales, sobre todo en el estudio de nanoestructuras, resulta útil determinar el valor del potencial Z para conocer la estabilidad del sistema (Yoval et al.).

2.8.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) por sus siglas en inglés (scanning electron microscopy), es una técnica que permite caracterizar una gran variedad de materiales, como nanoestructurados, aleaciones metálicas, polímeros, minerales, fibras, películas delgadas, biomateriales y en algunos casos muestras con alto contenido en humedad (Abdullaha et al., 2014). Los materiales restrictivos para realizar análisis son aquellos con propiedades magnéticas, a menos, que se fijen apropiadamente en alguna matriz de contención (Zorko et al., 2014).

Es una herramienta que permite la observación y caracterización de todo tipo de materiales sólidos con un excelente detalle. La SEM se ha utilizado en estudios con enfoques muy variados en la biología, la salud, el medio ambiente, entre otras. En biología, la SEM se ha enfocado en estudios morfoanatómicos y de caracterización en las áreas de botánica, fitopatología, ecofisiología, palinología, fitorremediación, zoología, entomología, suelos, paleontología, entre otras. La microscopía electrónica se fundamenta en la emisión de un barrido de haz de electrones sobre la muestra, los cuales interactúan con la misma produciendo diferentes tipos de señales que son

recogidas por detectores (Suga et al., 2014). Finalmente, la información obtenida en los detectores es transformada para dar lugar a una imagen de alta definición, con una resolución de 0,4 a 20 nanómetros. Como conclusión, obtenemos una imagen de alta resolución de la topografía de la superficie de nuestra muestra (Abdullah et al., 2014). Los equipos de SEM cuentan con un filamento que genera un haz de electrones que impactan con la muestra. Estos electrones interactúan con la muestra que se está estudiando y devuelven distintas señales que son interpretadas por distintos detectores. Con esta información se obtiene información superficial de:

- Forma y topografía
- Textura
- Composición

(Suga et al., 2014).

Las imágenes de un microscopio electrónico se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la materia. Al incidir el haz de electrones sobre la muestra, interactúa con ella y se producen diversos efectos que serán captados y visualizados en función del equipo utilizado. Cuando el haz incide sobre la muestra, se producen muchas interacciones entre los electrones de este haz y los átomos de la muestra. Por otra parte, la energía que pierden los electrones al incidir sobre la muestra puede hacer que otros electrones salgan despedidos (electrones secundarios), y producir rayos X, electrones Auger, etc. El más común de estos es el que detecta electrones secundarios, y es con el que se hacen la mayoría de las imágenes de microscopios de barrido (Echlin, P., 2011)

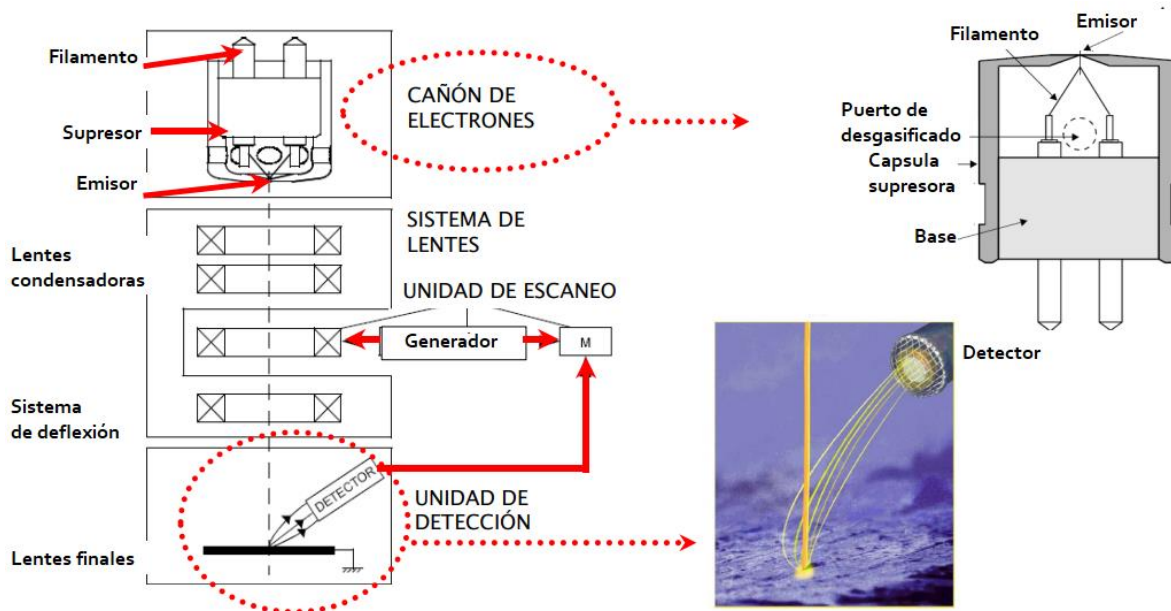


Figura 2-13. Diagrama representativo de un microscopio FE-SEM (Echlin, P., 2011)

2.8.7. Liberación del activo

La liberación controlada está definida como el método mediante el cual uno o más agentes activos estarán disponibles en un sitio y/o tiempo determinado a una velocidad específica. Las sustancias poliméricas son la base de la formación de sistemas que controlan la liberación (Ramos et al., 2000). Una de las limitaciones que presenta la forma de liberación controlada se encuentra en su permanencia en el lugar de absorción o de acción durante un tiempo suficiente, es decir, poder localizarlas en un lugar concreto del organismo (Rodríguez et al., 2000).

Cuando se maneja un sistema de liberación controlada, el agente bioactivo es incorporado a un soporte que generalmente es un material polimérico o una combinación de varios (Ramos et al., 2000). En el caso de nanopartículas poliméricas, en las que el fármaco se encuentra uniformemente distribuido, su liberación se produce por difusión a través de la matriz degradable o de la degradación de la matriz. Si la difusión del fármaco es más rápida que la degradación de la matriz, entonces el mecanismo de liberación es en gran parte controlado por un proceso de difusión. La liberación rápida se atribuye principalmente al débil enlazamiento o a la adsorción de los fármacos a la superficie, relativamente grande, de las nanopartículas (Oropesa et al., 2012).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

En este capítulo se presenta la descripción de la fase experimental para la extracción y protección de fucoxantinas presentes en algas *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*.

3.1. Materiales y reactivos

3.1.1. Material biológico

En todos los experimentos reportados se utilizaron muestras de *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*, recolectadas en el periodo de julio a agosto del 2021 en Puerto Morelos, Quinta Roo, México.

3.1.2. Reactivos

Reactivo de fenol de Folin & Ciocalteu (2M), cloruro de colina (ACS, ≥98%), betaína (ACS, ≥98%), ácido láctico (reactivo ACS, ≥98%), ácido cítrico (anhidro ACS, ≥99.5%), ácido tartárico (reactivo ACS, ≥99.5%), alcohol etílico (reactivo >96%), monohidrato de ácido gálico (reactivo ACS, >98%), carbonato de sodio (Na₂CO₃, anhidro, ≥99.5%), cloruro de aluminio (AlCl₃, anhidro, 98%), hidróxido de sodio (NaOH, ≥97%, gránulos), quercetina (≥95%), ácido ascórbico (≥99%) 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), fosfato dipotasico (K₂HPO₄, reactivo ACS, ≥98%), fosfato momopotasico (KH₂PO₄, reactivo ACS, ≥98%), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA, 50:50, mol wt 30000-60000), poli(vinil alcohol) (PVA, M_w 13000-23000, 87-89% hidrolizado), fueron suministrados por Sigma Aldrich (Toluca, México). Todos los reactivos informados eran de grado analítico y se usaron tal como se recibieron a menos que se especifique lo contrario.

3.2. Obtención de las muestras

Se trabajó con las especies de algas pardas *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans* originarias de las playas del Caribe Mexicano, las cuales se recolectaron en el mes de agosto del 2021. Las algas fueron trasladadas al Laboratorio de Biomateriales del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA), donde se sometieron a un proceso de limpieza para retirar impurezas tales como arena, fauna marina y contaminantes en general. Posteriormente se dejaron secar por 24 horas en un horno a 40°C. Completado el tiempo de secado se procedió a pulverizarlas utilizando un pulverizador de alimentos y un tamiz. Se emplearon tres periodos de 10 segundos, para evitar una elevación de temperatura y obtener una muestra homogénea. Finalmente, la muestra se almacenó en un frasco

de vidrio ámbar a una temperatura controlada de -4°C en condiciones de escasa luz para su uso posterior.

3.3. Técnicas de extracción

En la Tabla 3-1 se resumen las técnicas de extracción para la obtención de las fucoxantinas. En cada evaluación las muestras se realizaron por duplicado para garantizar la eficiencia de la técnica. La fase general de experimentación fue de 5 meses, iniciando en agosto del 2021 y culminando en diciembre del 2021.

Técnica de Extracción	Código de identificación	Periodo de Evaluación
Ondas de choque	Och	Agosto-Septiembre
Baño Ultrasónico	UAE-B	Septiembre-Octubre
Ultrasonido Asistido	UAE-S	Octubre-Noviembre

Tabla 3-1. Técnicas de extracción utilizadas

3.4. Extracción por ondas de choque (Och)

La extracción con ondas de choque se realizó con un generador experimental de ondas de choque piezolith 2501 (Richard wolf gmbH, knittlingen, Alemania). La fuente de ondas de choque consta de 3000 elementos piezoeléctricos montados en un soporte de aluminio con forma de cascarón cóncavo semiesférico (radio de 345 mm) y aislados por un polímero flexible (Figura 2-10). El circuito eléctrico consiste en una unidad de carga de condensadores y un sistema de control de carga-descarga. Se utilizó un tiristor accionado por un generador de impulsos para controlar la frecuencia de descarga. Encima de la fuente de ondas de choque se montó un tanque de agua (675 mm x 675 mm de base, 450 mm de altura) y un posicionador xyz. El nivel de agua se mantuvo a 40 mm por encima de (*F*) (Figura 2-10) y la temperatura a 30°C, respectivamente. La velocidad de descarga se fijó en 0.5 Hz.

Todas las extracciones se realizaron con agua desionizada, debido a la alta viscosidad que presentan los NADES. Se transfirieron 4 mL de la suspensión de agua desionizada con alga pulverizada a pipetas de transferencia de polietileno estériles (Thermo fisher scientific, Waltham, MA, EE. UU.) con forma similar a un puro (41 mm de longitud x 13 mm de diámetro) (Figura 3-1) que se cortaron aproximadamente dos centímetros por encima de la base y se sellaron térmicamente antes de la extracción con ondas de choque. Las pipetas se colocaron de forma que el centro de la suspensión coincidiera con *F*, utilizando dos punteros láser montados horizontalmente en el plano focal perpendicular al tanque de agua (Figura 2-10). Cada experimento se repitió dos veces para cuatro valores de voltaje de descarga (3, 4, 5 y 6 kV). La amplitud del pulso de presión positiva (*p+*) en *F* se midió con un hidrófono de aguja de difluoruro de polivinilideno (Imotec gmbH, würselen, Alemania).

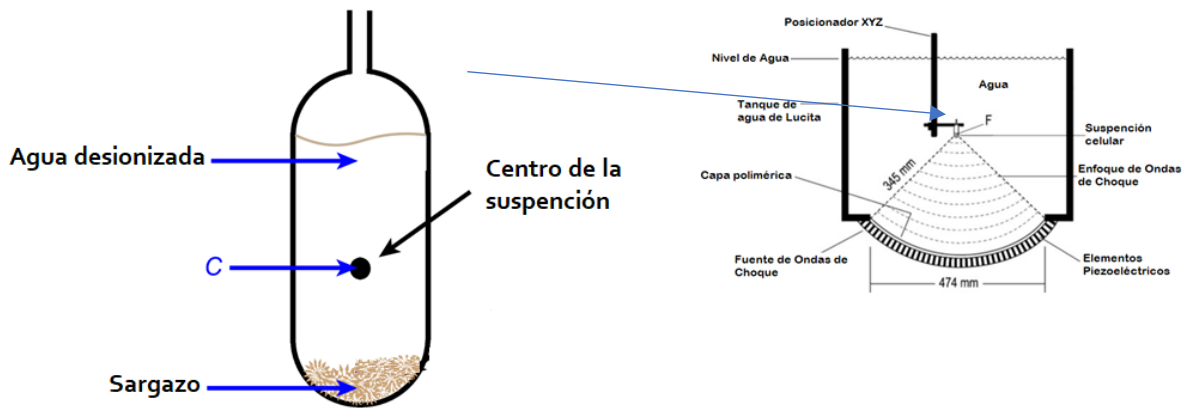


Figura 3-1. Pipeta de transferencia

La tabla 3-2 muestra en su segunda columna los valores de los voltajes utilizados, todos ellos con una incertidumbre de ± 0.125 kV. La siguiente columna muestra los valores del pico de presión obtenidos con el medidor digital del osciloscopio, donde también se indica la incertidumbre sistemática de la presión en unidades absolutas ($P+$ [MPa], dP [MPa]), habiendo usado para ello el factor de conversión del transductor (14.8605 mV/MPa). Finalmente, la última columna de la tabla contiene los tiempos FWHM de los oscilogramas analizados.

Número de ondas de choque aplicadas	Voltaje (kV)	$P+$ (Mpa)	FWHM (ns)
1000	3.0 ± 0.125	21.74 ± 0.27	404 ± 0.2
1500	4.0 ± 0.125	42.02 ± 1.06	230 ± 0.2
1500	5.0 ± 0.125	66.48 ± 1.49	192 ± 0.2
1500	6.0 ± 0.125	82.77 ± 1.21	196 ± 0.2

Tabla 3-2. Parámetros para la extracción asistida por ondas de choque

3.5. Preparación de NADES

Con el propósito de realizar una extracción satisfactoria se emplearon solventes capaces de disolver compuestos altamente hidrofóbicos, como es el caso de la fucoxantina. Basándonos en los datos reportados en la literatura (Aroso et al., 2017), se propusieron los NADES mostrados (Tabla 3-3).

Código NADES	Componentes	Relación Molar	Apariencia
ChCl-AL	Cloruro de Colina: Ácido láctico	1:2	Líquido viscoso transparente
ChCl-AC	Cloruro de Colina: Ácido cítrico: H ₂ O	2:1:1	Líquido viscoso transparente
ChCl-AT	Cloruro de Colina: Ácido tartárico: H ₂ O	2:1:1	Líquido viscoso color ámbar
B-AL	Betaína: Ácido láctico	1:1	Líquido viscoso transparente
B-AC	Betaína: Ácido cítrico: H ₂ O	1:1:1	Líquido viscoso transparente
B-AT	Betaína: Ácido tartárico: H ₂ O	1:1:1	Líquido viscoso transparente

Tabla 3-3. Disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) utilizados para las extracciones

Para la preparación de los solventes se empleó el método de calentamiento (Dai et al., 2013), usando como aceptores de enlace de hidrógeno al cloruro de colina y la betaína, los cuales tienen una estructura bastante similar y como ha sido reportado numerosas veces en la literatura (Aroso et al., 2017; Cicci et al., 2017; Troter et al., 2017 Alcalde et al., 2019), por su ion cloruro, resultan una buena alternativa para esta aplicación.

Para el caso del donador de hidrógeno, se eligieron tres ácidos carboxílicos (ácido láctico, ácido cítrico y ácido tartárico). Esto debido a los protones de hidrógeno (grupos hidroxilo) que poseen en su estructura y que fácilmente pueden enlazarse, por medio de enlaces de hidrógeno, al ion cloruro del aceptor, además, se eligen específicamente estas combinaciones debido a que en la literatura se han reportado extracciones satisfactorias de algunos compuestos fenólicos y carotenoides a partir de diversas plantas haciendo uso de estas mezclas eutécticas (Wei et al., 2015; Dai et al., 2016; Cicci et al., 2017; Płotka et al., 2017; Koutsoukos et al., 2019). En el anexo A1-1 se presenta esta metodología de manera completa.

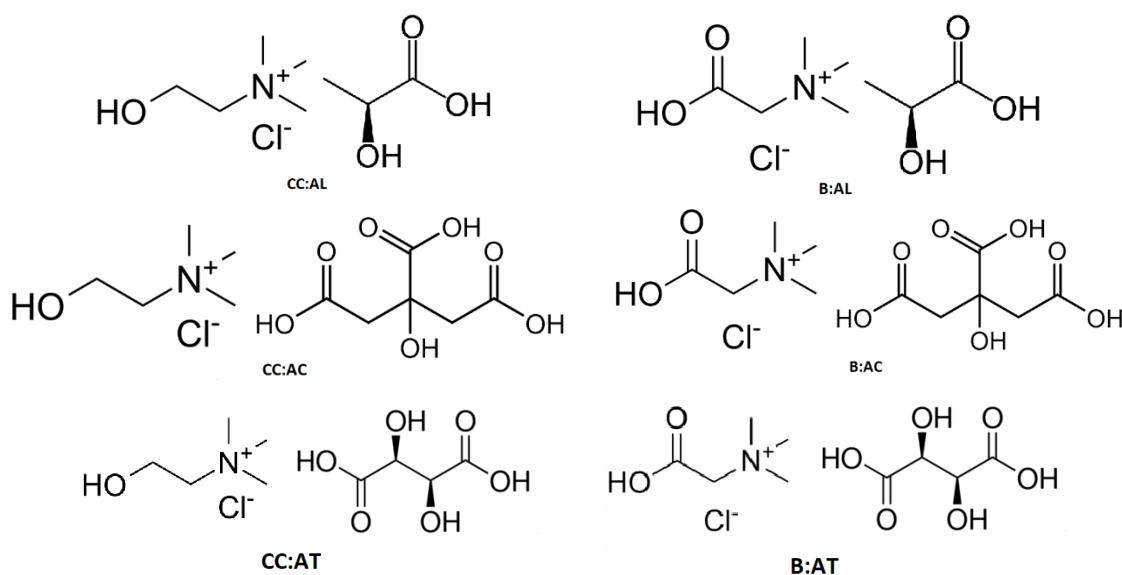


Figura 3-2. Estructura química de los distintos compuestos a utilizar para la preparación de los NADES

3.6. Extracción por baño ultrasónico (UAE-B)

Las muestras pulverizadas de alga se mezclaron en una proporción de 200 mg por cada mL de NADES, manteniendo una agitación constante por 2 horas. Posteriormente las muestras se dejaron en refrigeración por 1 hora. Una vez completado el tiempo de refrigeración, las muestras se sonicaron durante 45 minutos usando un baño ultrasónico UAE-B branson MT-3510 (Branson ultrasonics corporation, Danbury, CT, USA). Una vez terminando el proceso de sonicación las muestras fueron puestas nuevamente en refrigeración por 1 hora. Completado el segundo tiempo de refrigeración, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos a 20°C. La suspensión resultante se filtró con un papel de acetato de celulosa wattman de 8 µm. Los extractos obtenidos se diluyeron con EtOH al 96% en una relación 1:4 (v/v). Las muestras resultantes se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a -4°C para su análisis posterior, etiquetándolos con el nombre del NADES utilizado.

3.7. Extracción por ultrasonido asistido (UAE-S)

Las muestras pulverizadas de alga se mezclaron manteniendo la misma proporción que el apartado 3.6 con agitación constante por 2 horas. Posteriormente las muestras se dejaron en refrigeración por 1 hora. Completado el tiempo de refrigeración, se aplicó el proceso de sonicación por sonopunta (UAE-S) empleando un equipo Hielscher UP200Ht (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemania)

durante 2 minutos con una amplitud del 25%, dejando nuevamente las muestras 1 hora en refrigeración. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 10000 rpm durante 10 minutos a 20°C. La suspensión resultante fue filtrada con papel de acetato de celulosa Wattman de 8 µm.

Los extractos se diluyeron con EtOH al 96% manteniendo la misma relación del apartado 3.6, nuevamente las muestras se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a -4°C para su análisis posterior, etiquetándolos con el nombre del NADES utilizado.

3.8. Análisis cuantitativo de la fucoxantina por espectrometría ultravioleta UV-vis

Para la cuantificación de la fucoxantina se empleó la técnica de espectrofotometría ultravioleta UV-vis. Se utilizó un equipo UV-Vis Shimadzu UV 1600 (Shimadzu, Kyoto, Japón), midiendo la señal de los extractos en un rango de 300 a 800 nm. Para la cantidad de fucoxantina obtenida se cuantificó utilizando la ecuación (1).

$$\text{fucoxantina}(mg\ g^{-1}) = A_{470} - 1.239(A_{631} + A_{581} - 0.3 * A_{664}) - 0.0275 * A_{664}/141 \quad (1)$$

(Raguraman et al., 2018).

donde, A = Absorbancia a las longitudes de onda (470, 631, 581 y 664 nm)

3.9. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de las fucoxantinas se evaluó de acuerdo con el método químico para la neutralización del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) el cual es un radical estable que presenta una intensa coloración violeta y absorbe a una longitud de onda de 517 nm, descrito por Von Gadow y colaboradores (1997). El fundamento del método consiste en que este radical tiene un electrón desapareado haciendo que la muestra presente una coloración azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción de una sustancia antioxidante. La diferencia de absorbancias permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (Castañeda et al., 2008).

Se realizó una curva de calibración de ácido ascórbico en un rango de concentración de 20 µM/L hasta 200 µM/L usando agua destilada como solvente, para obtener la ecuación de correlación con la cual se determinó su correspondiente equivalencia en ácido ascórbico, según el porcentaje de actividad antioxidante obtenido. En el anexo A1-2 se presentan las metodologías de manera completa.

El ensayo de eliminación de radicales libres DPPH se realizó mezclando 75 µL de muestra con 1450 µL de solución DPPH 50 µM en un frasco de vidrio ámbar. Las soluciones reactivas se dejaron en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente por 30 minutos. A continuación, se midió la absorbancia a 517 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV 1600 (Shimadzu, Kyoto, Japón). La actividad de eliminación de radicales se expresó utilizando ácido ascórbico como estándar en equivalentes por gramo de alga seca de extracto (µM AA/g alga).

3.10. Determinación de fenoles totales (TPC)

El contenido fenólico total (TPC) se determinó mediante un análisis espectrofotométrico controlando la absorbancia a 765 nm según la norma ISO 14502-1-2005E y utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Kerio, et al., 2013). La curva de calibración se preparó mediante el proceso descrito en el anexo del A1-3.

Para el análisis, se requirió una dilución 1:100 del extracto. A continuación, se mezcló 1 mL de la solución diluida con 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% (v/v) y 4 mL de solución de Na₂CO₃ al 7,5% (m/v) durante 1 hora antes del análisis espectrométrico. Los resultados se expresaron utilizando el ácido gálico como estándar en microgramos equivalentes por gramo de alga saca (µg GA/gr alga).

3.11. Determinación de flavonoides totales (TFC)

El contenido total de flavonoides (TFC) se determinó utilizando una reacción de complejación con cloruro de aluminio en presencia de NaNO₃ como medio alcalino, lo que produjo una solución de color rojo anaranjado que podía estudiarse espectroscópicamente a 510 nm.

La curva de calibración se realizó con una solución de quercetina a una concentración de 10 mg/mL para la determinación de flavonoides totales en las muestras. El procedimiento se describe en el anexo del A1-4.

Se utilizaron 125 µL de la disolución de quercetina, posteriormente se añadieron 75 µL de NaNO₃ al 5% (m/v), dejando en reposo la mezcla por 6 minutos. Adicionalmente se añadieron 150 µL AlCl₃ al 5% (m/v) y se mantuvo la mezcla en reposo 5 minutos más. La muestra se neutralizó con 750 µL una solución de NaOH 1 M dejando la mezcla resultante en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los resultados del análisis se expresaron en microgramos equivalente por gramo de alga seca (µg QE/gr alga).

3.12. Contenido antioxidante electroquímico

Se seleccionó la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), un método rápido, novedoso y fiable para determinar las fucoxantinas predominantes en una muestra sobre un electrodo de carbono vítreo, para caracterizar el poder antioxidante mediante una oxidación electroquímica realizada a pH 7. La DPV se llevó a cabo empleando un sistema convencional de celdas de tres electrodos que incorporaban carbón vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl (saturado con KCl) como electrodo de referencia y platino como contraelectrodo. Se preparó una solución buffer de fosfato de potasio (solución madre de K₂HPO₄/KH₂PO₄ 0.1 M). Para la técnica se utilizaron 4 mL de la solución buffer, se añadió 1 mL de los extractos, etiquetando los frascos con el código del método de extracción empleado. Las mediciones se realizaron usando un Bio-Logic VP-50 potentiostat (Bio-Logic Science Instruments, Seyssinet-Pariset, France) y EC-Lab como software de adquisición con una velocidad de barrido de 5 mV/s y una amplitud de pulso de 70 mV.

3.13. Síntesis de nanopartículas poliméricas sólidas de PLGA-PVA

La síntesis de nanopartículas se realizó empleando el método de emulsión y evaporación. La fase orgánica estaba compuesta por 4 mL de acetato de etilo grado analítico como solvente, 50 mg de PLGA y 5 mg de extracto. El surfactante consistió en 600 mg de PVA (masa molar 13-23 kDa) mezclado con 20 mL de agua destilada. La fase orgánica y el surfactante se dejaron en dilución por 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante, posteriormente fue añadida lentamente la fase orgánica al surfactante por medio de una pipeta de goteo de 2 mL. La mezcla resultante se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por 30 minutos. La emulsión se formó aplicando ultrasonido asistido por sonopunta (UAE-S) empleando un equipo Hielscher UP200Ht (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemania) durante lapsos de 30 segundos de sonicación con 2 minutos de reposo a una amplitud del 80% hasta completar 4 minutos. Posteriormente se evaporó el solvente en un rotavapor por 30 minutos a 40°C para evitar degradación del polímero. La muestra se lavó con agua destilada y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue retirado, se le aplicó un segundo lavado y sometió a centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, la muestra se guardó en un frasco de vidrio manteniéndola en refrigeración.

3.14. Determinación del tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula fue determinada por dispersión de luz dinámica (DLS) empleando un equipo Malvern Zetasizer ZS a 25°C y una dilución de nanopartículas de 1:10. Los datos fueron analizados empleando análisis de varianza en una vía y la comparación entre medias fue evaluada por medio de la prueba de diferencia media significativa (DLS) con un nivel de significancia de 0.05.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cantidad de fucoxantinas extraídas

4.1.1. Cantidad de fucoxantinas extraídas por las técnicas de UAE-B y UAE-S

Para evaluar la concentración de fucoxantinas extraídas mediante las técnicas de baño ultrasónico (UAE-B) y ultrasonido asistido (UAE-S) se cuantificaron seis familias de NADES (Tabla 3-3). En la Figura 4-1 se muestra la concentración de fucoxantinas obtenidas, expresadas en $\mu\text{g/g}$ de alga seca. Para su cuantificación se empleó la técnica de espectroscopia UV-vis y la ecuación (1).

Mediante el uso de la técnica de UAE-S se lograron los mayores rendimientos. La máxima concentración de fucoxantinas se obtuvo mediante el uso del NADES de betaína-ácido cítrico con un mol de agua (B-AC), (a partir de este punto del texto nos referiremos a los NADES empleando el código distintivo de la Tabla 3-3) con una concentración de $14.40 \mu\text{g/g}$. Los NADES compuestos por la etapa betaína-ácido carboxílico presentaron un mejor desempeño en la obtención de las fucoxantinas (nos referiremos a la fucoxantina extraída con el código distintivo FX) en comparación con los NADES compuestos de cloruro de colina-ácido carboxílico. Esto se debe a que los compuestos ricos en grupos hidroxilo como las fucoxantinas son buenos donantes de hidrógeno y forman preferentemente enlaces con aceptores de hidrógeno como la betaína. Esta afirmación se logra observar comparando las dos técnicas de extracción (Figura 4-1).

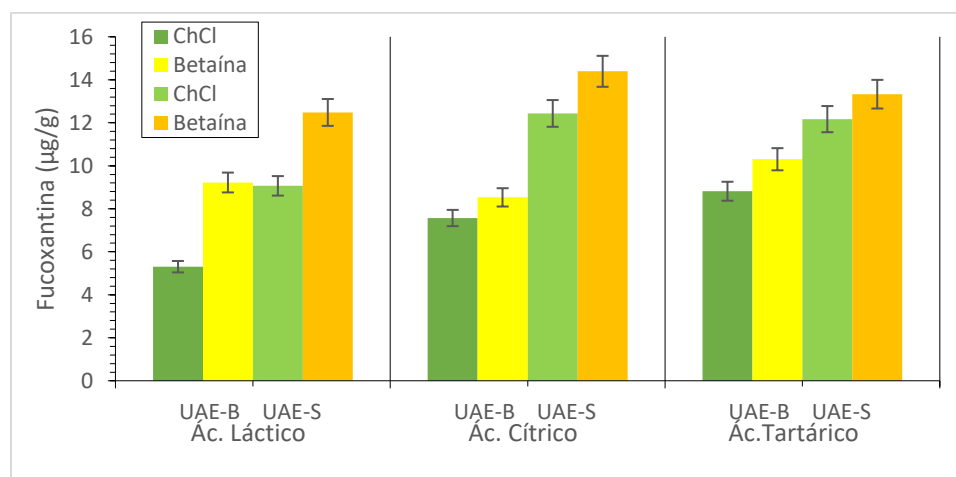


Figura 4-1. Cantidad de fucoxantina extraída por las técnicas de UAE-B y UAE-S con NADES

Para el caso del uso de ácido láctico se observó que el mejor rendimiento fue usando betaína (B-AL) con un valor de 13.42 $\mu\text{g/g}$. De igual manera se aprecia una mayor concentración para el ácido tartárico con betaína adicionando un mol de agua (B-AT), obteniendo 13.23 $\mu\text{g/g}$ de FX. Nuestros resultados muestran un 56% de mayor rendimiento en comparación con los 6.5 $\mu\text{g/g}$ reportados por Shannon y colaboradores (2017). De acuerdo con los resultados anteriores, los rendimientos de extracción aumentaron significativamente con el contenido de agua añadido (máximo un 15% de agua), debido a la disminución de la viscosidad de los NADES y por ende mayor formación de enlaces puente de hidrogeno con las FX, potenciando así la transferencia de masa entre el soluto y el solvente en cuestión. A pesar de que el cloruro de colina presenta esta misma propiedad, se obtuvo una menor recuperación, es posible que sea menos selectivo obteniendo no solo fucoxantinas, si no también otros carotenoides como el β -caroteno y luteína.

4.1.2. Fucoxantinas extraídas por ondas de choque

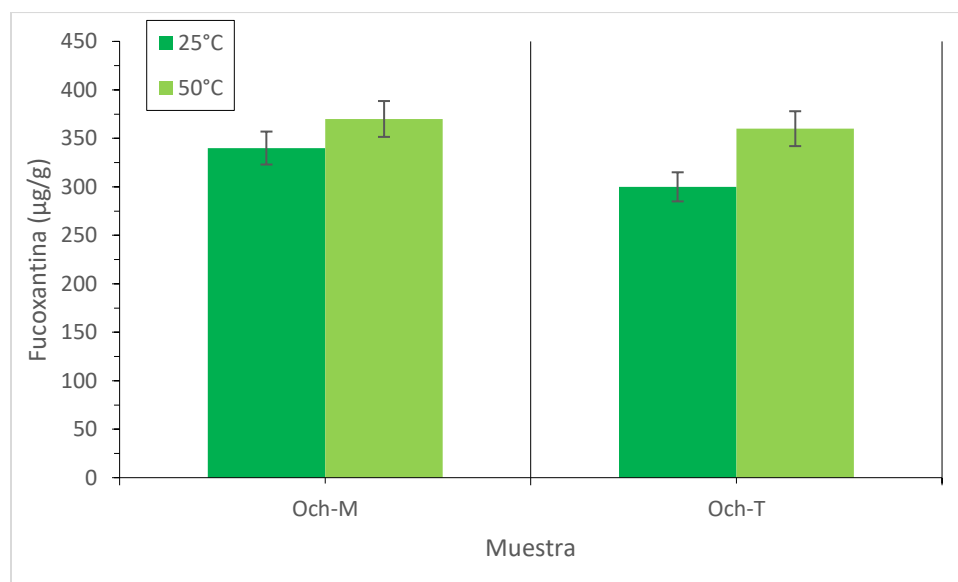


Figura 4-2. Cantidad de fucoxantina extraída por ondas de choque

En la Figura 4-2 se muestra que los rendimientos de FX obtenidos usando como método de extracción ondas de choque (Och-M y Och-T), son mejores cuando la temperatura de extracción es de 50°C, consiguiendo 350 μg de FX por gramo de sargazo seco (Och-M), siendo un 14.3% mayor a los 300 $\mu\text{g/g}$ obtenidos con la extracción convencional de Raguraman y colaboradores (2018) y un 13.7% mayor a la extracción por Och-T, dicha diferencia puede atribuirse a que algunas burbujas ya había colapsado al inducir la segunda onda de choque. Los mejores rendimientos se lograron al exponer las muestras a 1500 ondas de choque. Este resultado puede indicar que a medida que se incrementa el número de ondas de choque se extraen una mayor cantidad de compuestos debido al efecto de la cavitación acústica y la tensión de cizallamiento generados por el gradiente espacial

de cada onda de choque, siendo los responsables de la extracción de fucoxantinas; sin embargo, existe un límite por encima del cual los compuestos se pueden degradar principalmente por el aumento de la tensión mecánica que rompe los enlaces químicos.

La cavitación acústica depende de varios factores, como la presencia de microburbujas en el fluido, el tiempo de subida y las amplitudes máximas positivas y negativas del impulso de presión, además el ancho del pulso de presión (FWHM) también influye en la transferencia de energía. La presencia de otros carotenoides como el β -caroteno y luteína (impurezas en la suspensión) en el interior del vial de prueba pueden actuar como lugares de nucleación de nuevas burbujas, es decir, pueden aparecer burbujas en las interfaces fluido-partícula debido a la fuerza de tracción de cada onda de choque. Además, si hay una interfaz fluido-aire dentro del vial de prueba, cada onda de choque sufre una reflexión como onda de rarefacción debido a la gran diferencia entre las impedancias acústicas de los medios, lo que provoca una cavitación y una deformación adicionales. Potenciar la cavitación mediante el uso de ondas de choque en tándem en lugar de ondas de choque de un solo pulso ayudo a confirmar nuestra hipótesis de que la cavitación es uno de los principales mecanismos responsables de la extracción anteriormente mencionada. El rendimiento por Och fue un 95.7% mayor a la técnica de UAE-S con NADES. Estos resultados indican la eficiencia de extracción con ondas de choque en términos de rendimiento y menor tiempo de operación.

4.2. Determinación de la capacidad antioxidante. Método DPPH

La capacidad antioxidante total es un parámetro único que cuantifica la capacidad de una muestra biológica compleja para eliminar los radicales libres.

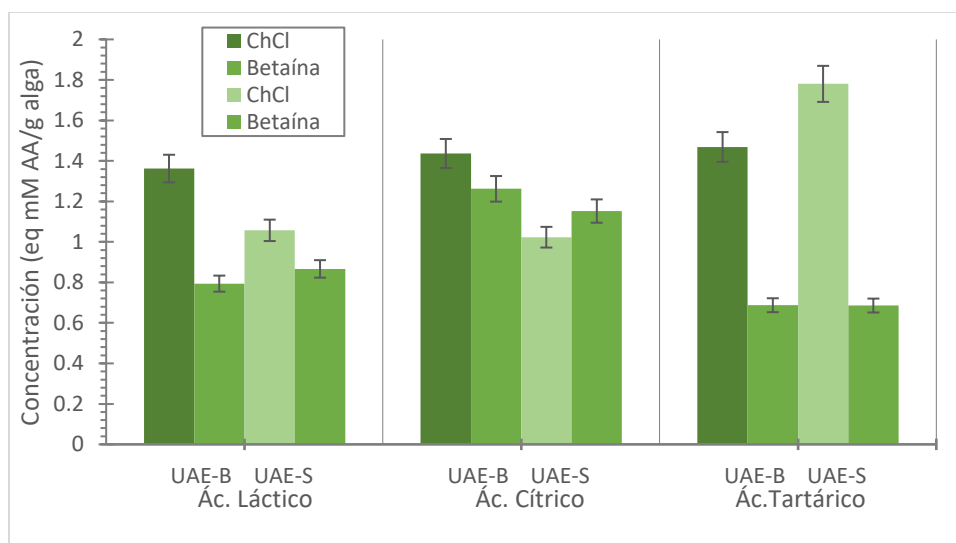


Figura 4-3. Capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con NADES

En la Figura 4-3 se muestran los resultados obtenidos de las mediciones de capacidad antioxidante de las diferentes muestras expresadas en eq mM AA/gr alga. Se observa que las FX muestran una capacidad antioxidante dependiente del NADES. La extracción realizada con NADES muestra que la capacidad antioxidante más alta se obtiene utilizando los compuestos de cloruro de colina-ácido carboxílico, la diferencia puede estar relacionada con el poder extractante de los NADES y su relación con los compuestos presentes en la muestra responsables de la inhibición del radical, así como el método y las condiciones de extracción que desempeñan un papel fundamental en la capacidad antioxidante de los extractos.

La fucoxantina desempeña un papel fundamental como captador de radicales libres a través de la transferencia del electrón excitado a sus enlaces conjugados para producir un radical libre más estable. Además, actúa como un amortiguador de oxígeno singlete y antioxidante eficaz que otros carotenoides como el β -caroteno y la luteína.

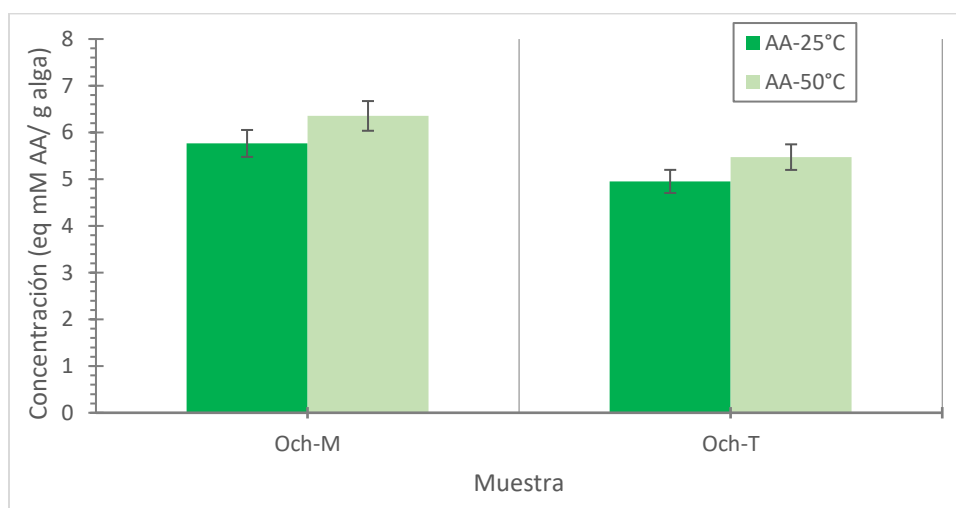


Figura 4-4. Capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con ondas de choque

Se mostró que los extractos de Och-M y Och-T presentan una mayor capacidad antioxidante al tener valores superiores en un 70% aproximadamente a los obtenidos por UAE-B y UAE-S. Se realizó una caracterización electroquímica porque se ha reportado que la fluorescencia de los extractos de fucoxantina podría dar resultados engañosos (Harasym, J. et al., 2014). Con respecto a la cantidad relativa de contenido de fucoxantina, nuestros resultados son consistentes con los métodos de extracción presentados, porque a mayor cantidad de fucoxantinas, se espera una mayor capacidad antioxidante.

4.3. Determinación de fenoles y flavonoides totales (TPC y TFC)

4.3.1. Determinación de compuestos fenólicos totales (TPC)

La concentración de compuestos fenólicos en las muestras en las que se usaron NADES como medios de extracción fueron expresadas en eq μg de ácido gálico por gramo de alga seca. Los mayores rendimientos se lograron con los NADES a base de betaina-ácido carboxílico en comparación con aquellos que tienen cloruro de colina en su composición. Esto debido a aniones como el Cl^- en el cloruro de colina pueden estar rodeados por los carboxilos del ácido que impiden la interacción de los fenoles, por el contrario, la betaina limita más este efecto debido a sus aniones de menor tamaño, por lo tanto, interactúan más fuertemente con los compuestos disueltos, aumentando su solubilidad y rendimiento como puede observarse en los casos donde se empleó la técnica de UAE-B (Figura 4-5). Demostrando que el disolvente utilizado en el proceso de extracción juega un rol importante en la concentración de los extractos, considerando la polaridad tanto del disolvente como la de los compuestos fenólicos (Ricco et al., 2010).

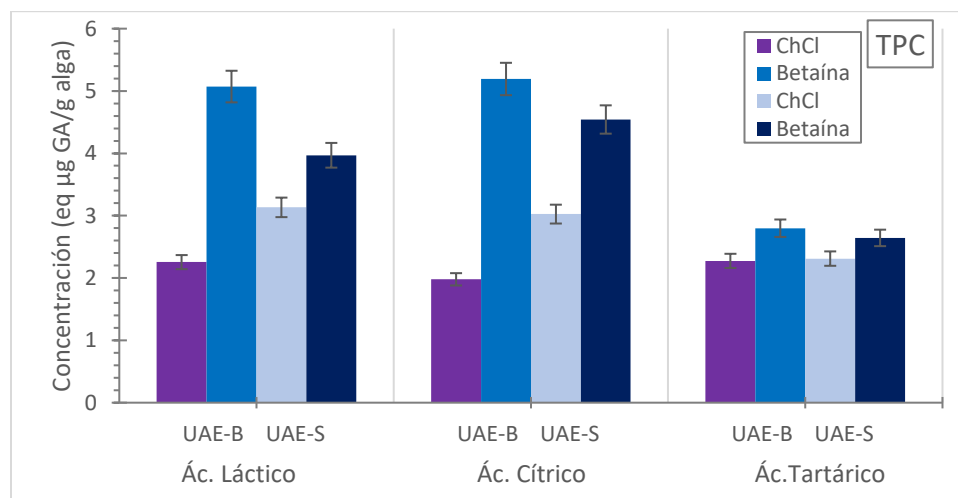


Figura 4-5. Concentración de compuestos fenólicos totales obtenidos con NADES

4.3.2. Determinación de compuestos flavonoides totales (TFC)

Nuevamente los valores se expresaron en eq µg de quercetina por gramo de alga seca.

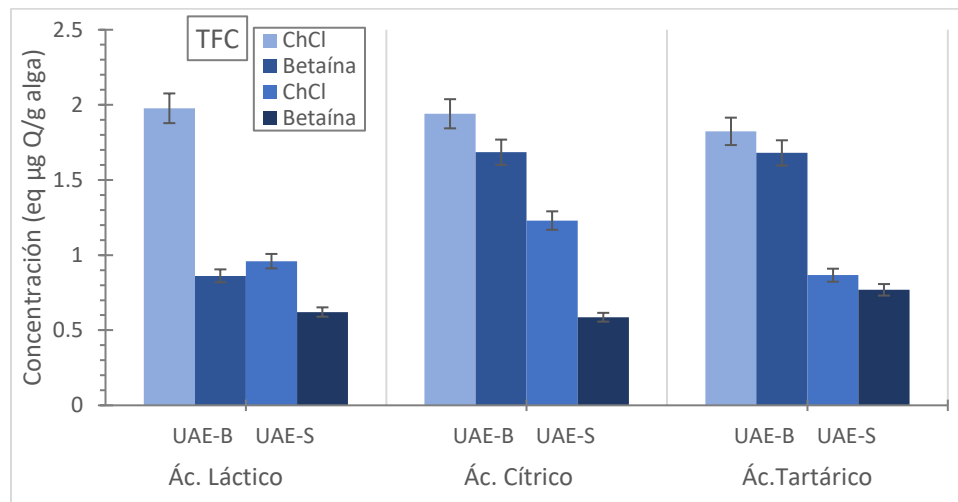


Figura 4-6. Concentración de compuestos flavonoides totales obtenidos con NADES

Se observa un mayor rendimiento con los NADES a base de cloruro de colina-ácido carboxílico por UAE-B en un 52% en comparación a los NADES a base de betaína-ácido carboxílico, demostrando que la betaína presenta mayor selectividad para la extracción de fucoxantinas. Conforme a lo esperado se demuestra una mayor cantidad del TPC que el TFC, ya que los flavonoides se consideran compuestos fenólicos. La diferencia significativa entre todos los extractos, en la determinación de fenoles y flavonoides totales, se podría deber a la capacidad de los disolventes para extraer los compuestos desde el material vegetal, a la temperatura o al tiempo de extracción (Sreejith et al., 2012). Por consiguiente, al utilizar un disolvente de alta polaridad puede ocurrir que se rompa la membrana celular y mejore la extracción. Los valores obtenidos de TPC y TFC demuestran lo establecido por Li y colaboradores (2012) sobre las concentraciones de estos compuestos bioactivos siendo muy bajas en el sargazo y desconociendo los valores exactos.

4.3.3. Determinación de fenoles y flavonoides totales (TPC y TFC) por las técnicas de ondas de choque

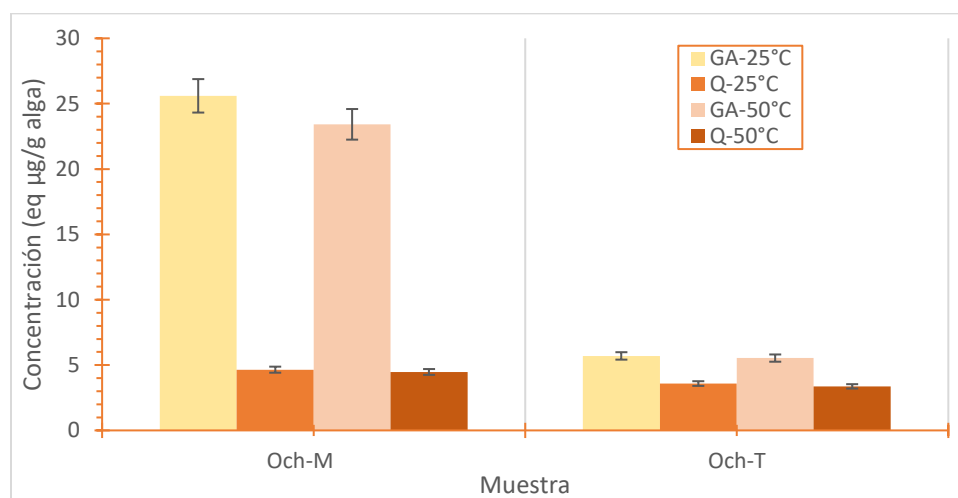


Figura 4-7. Concentración de compuestos fenólicos y flavonoides totales obtenidos con ondas de choque

Se aprecia claramente una mayor contribución del TPC por parte de las Och-M superior en un 172% al rendimiento obtenido por UAE-B con NADES y un 76.7% superior a las Och-T, demostrando que los mecanismos de extracción no son los mismos. Esto sugiere que la exposición a ondas de choque es una técnica prometedora para la extracción de compuestos fenólicos ya que el tiempo de extracción requerido es significativamente menor (aproximadamente 5 minutos en comparación con los 45 minutos de UAE-B). Para otros contenidos fenólicos requieren tiempos más prolongados. Por otra parte, las altas concentraciones de fenoles y flavonoides pueden deberse a que el crecimiento de las algas pardas *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans* ocurre en áreas altamente expuestas a la radiación UV, lo que puede inducir o incrementar la biosíntesis de fenoles (Martínez et al., 2003).

Además, el aumento de los compuestos fenólicos se ha asociado con el aumento en la capacidad de fenilalanina amonio liasa, una enzima clave en el metabolismo de compuestos fenólicos tales como: ácidos fenólicos, feniletanoides o flavonoides, los cuales son considerados los principales constituyentes de la capacidad antioxidante en vegetales (López et al., 2012). En cuanto a la cantidad relativa de contenido fenólico, parece que nuestros resultados son coherentes con el contenido de flavonoides y fenoles de los métodos de extracción presentados ya que a mayor TFC y TPC, se espera una mayor capacidad antioxidante.

4.4. Medición electroquímica de las fucoxantinas

Para comprobar los resultados obtenidos por espectroscopia UV-Vis, se desarrolló un método electroquímico para la cuantificación de las FX. Las Figuras 4-9 a 4-10 muestran la respuesta electroquímica de la técnica DPV de las muestras con NADES a pH 7, donde se observan seis señales de oxidación correspondientes a los extractos compuestos de cloruro de colina-ácido carboxílico y seis señales de oxidación para los extractos compuestos de betaína-ácido carboxílico, todas las señales se midieron bajo la misma curva de calibración para determinar la concentración de FX (Figura 4-8). En ambos casos se midió el área bajo la curva desde -0.4 hasta 0.4 Volts y las corrientes de los diferentes picos observados.

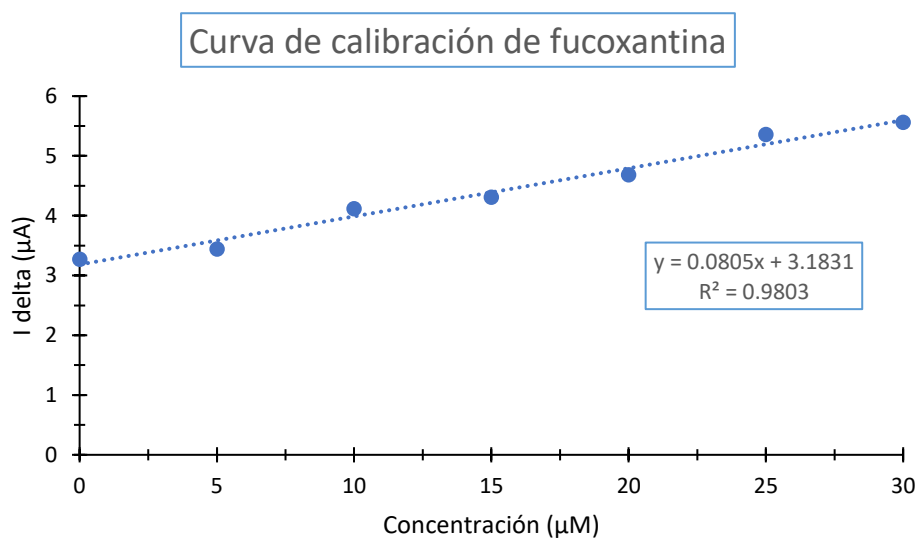


Figura 4-8. Curva de calibración empleada en la cuantificación electroquímica

Las pruebas demostraron que los extractos obtenidos con NADES presentaron una mayor concentración de fucoxantinas mediante el uso de la técnica de UAE-S. El mayor rendimiento fue para la muestra obtenida con B-AC, mostrando un máximo de oxidación en 3.6 µA equivalente a 19.130 µg/g (Figura 4-10). Se pueden observar una linealidad de concentración de FX asociada a los picos de oxidación. Los resultados mostraron que la fucoxantina se oxida a un potencial de -0.1 Volts.

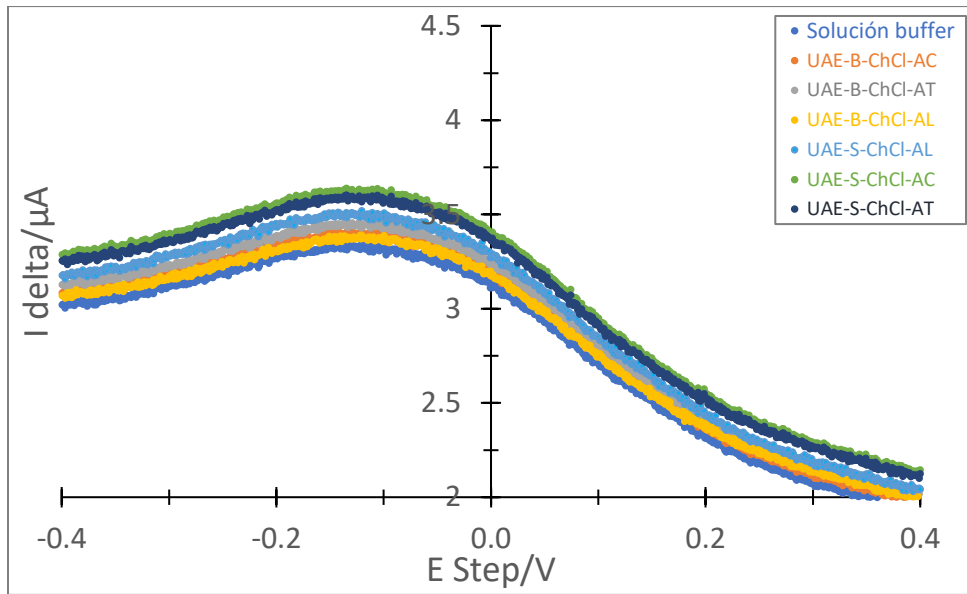


Figura 4-9. DPV de ChCl-ácido carboxílico

En la Figura 4-9 se aprecia un punto máximo de 3.47 μA para la muestra con ChCl-AC equivalente a una concentración de 13.317 μg por gramo de alga seca. Para la muestra con ChCl-AL se obtuvo un punto máximo a 3.39 μA equivalente a una concentración de FX igual a 10.567 $\mu\text{g/g}$. El mayor rendimiento para la muestra de ChCl-AT, con un pico de 3.44 μA , equivalente a 12.617 $\mu\text{g/g}$. Los rendimientos fueron un 52% (ChCl-AC), 38.48% (ChCl-AL) y 48.5% (ChCl-AT), respectivamente mayor al reportado por los autores Shannon y colaboradores (2017).

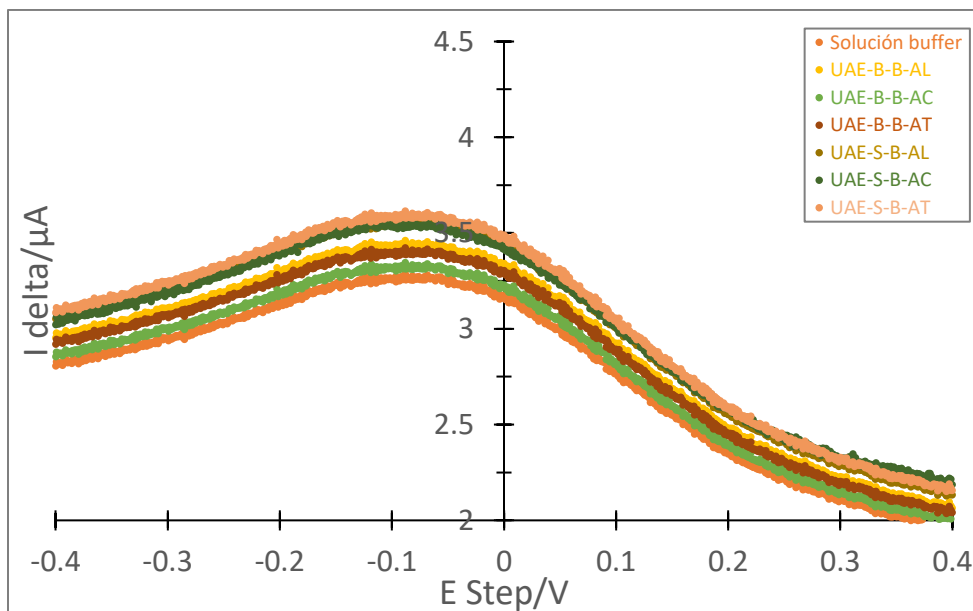


Figura 4-10. DPV de betaína-ácido carboxílico

La muestra con B-AL obtuvo un punto máximo a 3.43 μA equivalente a una concentración de FX igual a 12.59 $\mu\text{g/g}$. El mayor rendimiento se observa en 3.5 μA para el extracto con B-AT, equivalente a 14.658 $\mu\text{g/g}$. Los rendimientos fueron un 66% (B-AC), 48% (B-AL) y 55.65% (B-AT), respectivamente mayor al reportado por los autores Shannon y colaboradores (2017). En ambos casos, la corriente de los picos de oxidación aumenta proporcionalmente a la concentración de fucoxantinas. De igual manera para los extractos obtenidos con Och-M y Och-T se aprecia la misma tendencia para las señales de oxidación a pH 7 (Figura 4-11). Esto demuestra que la técnica de DPV puede utilizarse para detectar y cuantificar las fucoxantinas.

La extracción con Och-T a 25°C muestra el mayor rendimiento de FX a 5.5 μA equivalente una concentración de aproximadamente 387.472 $\mu\text{g/g}$ siendo un 22.57% mayor a lo reportado por Raguraman y colaboradores (2018). Esto debido a que la cavitación es uno de los principales mecanismos responsables de la extracción de fucoxantinas, lo cual se demuestra con una mayor señal de oxidación.

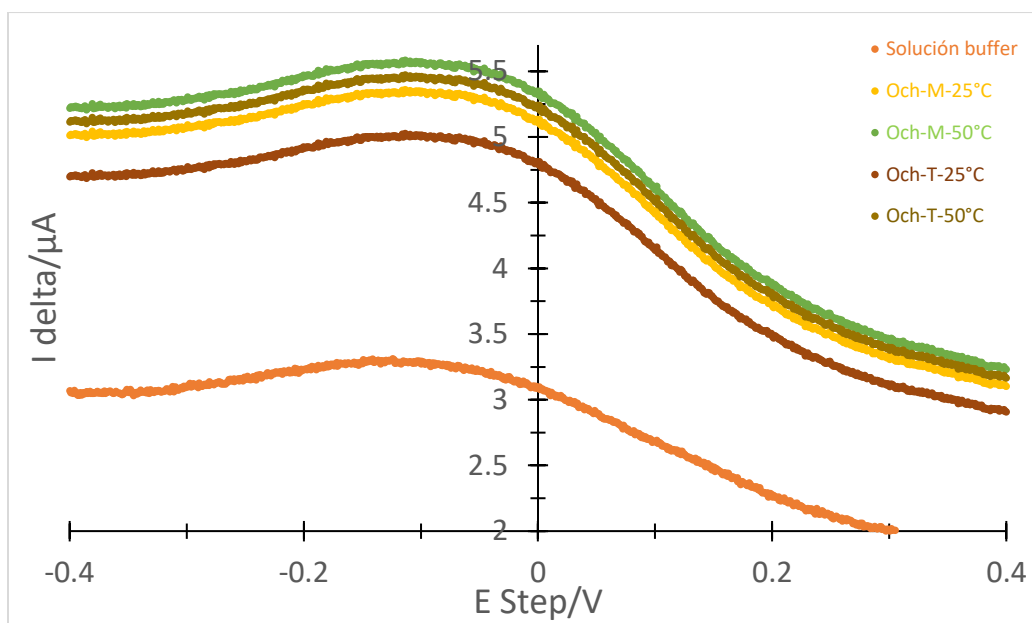


Figura 4-11. DPV de los extractos obtenidos con ondas de choque

Las respuestas cualitativas de todos los métodos de extracción evaluados coinciden, ya que en todos los casos detectamos la misma señal a un potencial de oxidación muy similar. En cuanto al estudio cuantitativo, se observa que la extracción de todas las técnicas se produjo en el siguiente orden Och-M > Och-T > UAE-S > UAE-B, lo cual concuerda con la tendencia obtenida por espectroscopia (Tabla 4-1 y 4-2).

Código NADES	Método de extracción	Cuantificación por UV-Vis	Cuantificación por DPV
ChCl-AL	UAE-B	5.30 µg/g	6.05 µg/g
	UAE-S	9.10 µg/g	10.50 µg/g
ChCl-AC	UAE-B	7.60 µg/g	8.40 µg/g
	UAE-S	12.40 µg/g	13.30 µg/g
ChCl-AT	UAE-B	8.80 µg/g	9.20 µg/g
	UAE-S	12.20 µg/g	12.60 µg/g
B-AL	UAE-B	9.20 µg/g	10.95 µg/g
	UAE-S	12.50 µg/g	12.60 µg/g
B-AC	UAE-B	8.50 µg/g	9.10 µg/g
	UAE-S	14.40 µg/g	19.10 µg/g
B-AT	UAE-B	10.30 µg/g	11.70 µg/g
	UAE-S	13.30 µg/g	14.65 µg/g

Tabla 4-1. Comparación de las cuantificaciones electroquímicas con espectroscópicas de los extractos obtenidos con NADES

En las Tablas 4-1 y 4-2 se aprecia una mayor concentración de los extractos cuantificados por DPV, lo que demuestra una mayor sensibilidad por parte de la técnica electroquímica.

Código ondas de choque	Temperatura de extracción	Cuantificación por UV-Vis	Cuantificación por DPV
Och-M	25 °C	339.45 µg/g	347.80 µg/g
	50 °C	370.50 µg/g	387.50 µg/g
Och-T	25 °C	300.50 µg/g	304.30 µg/g
	50 °C	358.40 µg/g	367.80 µg/g

Tabla 4-2. Comparación de las cuantificaciones electroquímicas con espectroscópicas de los extractos obtenidos con ondas de choque

La comparación de los resultados electroquímicos con los datos obtenidos por métodos espectrofotométricos muestra que las técnicas electroquímicas son más sensibles, lo que indica que el análisis electroquímico es una opción valiosa, fácil y fiable en la detección y cuantificación de fitoquímicos en comparación a la espectroscopia convencional.

4.5. Caracterización por DLS de las nanoesferas poliméricas de PLGA-PVA-FX

Se sintetizaron nanopartículas de PLGA-PVA-FX variando la relación masa-volumen del surfactante (%m/v) con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad de la fucoxantina. Se midieron parámetros tales como el tamaño de partícula por dispersión de luz dinámica (DLS) como se aprecia en las Tablas 4-3, 4-4 y 4-5.

Nombre	Temperatura (°C)	Transmitancia	índice de polidispersidad	Diámetro hidrodinámico
PLGA-PVA-FX (Nps1)	20	76.7%	15.6%	174.27 nm
% m/v	1%		Desviación estándar	29.22 nm

Tabla 4-3. *Tamaño de las nanopartículas de PLGA-PVA-FX con 1% de surfactante*

Las nanopartículas (Nps) de PLGA-PVA preparadas con la técnica de emulsión-evaporación a 1% en relación masa-volumen de surfactante mostraron un tamaño significativamente mayor en comparación con las Nps preparadas a 5% y 5% con 40 mL de agua. La muestra Nps1 mostró ser monodispersa (Figura 4-12).

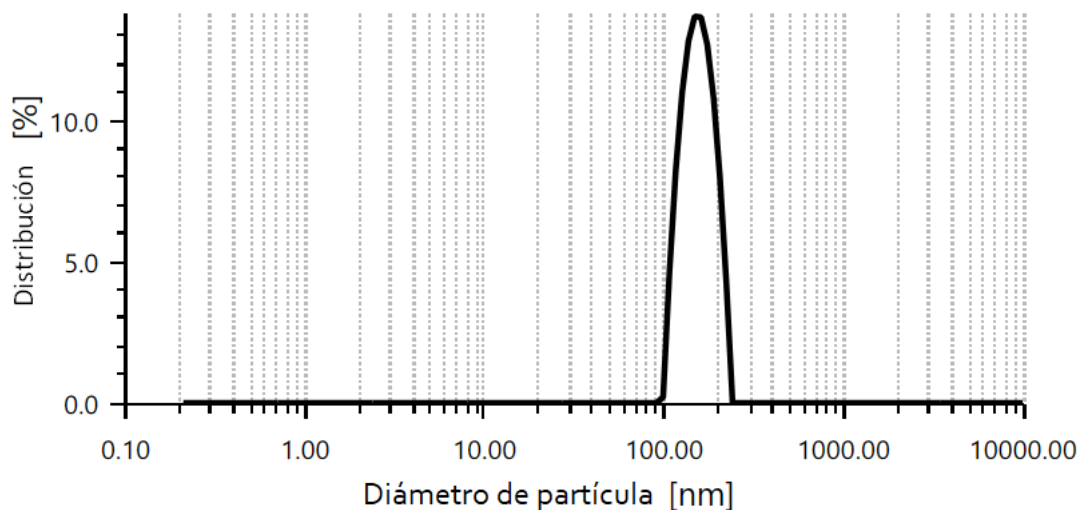


Figura 4-12. Distribución y tamaño de partícula de la muestra Nps1

La formación de Nps con tamaño mayor a 170 nm podría deberse a una concentración de surfactante (PVA) menor, debido a que en las tres muestras se mantuvieron a la misma concentración de PLGA (50 mg), así como a las mismas condiciones de tiempo de agitación. El tamaño de las Nps desempeña un papel crucial en la absorción celular. La formación de Nps de PLGA-PVA con tamaño inferior a 200 nm facilita la absorción celular a través de la endocitosis (Sharma et al., 2015).

Nombre	Temperatura (°C)	Transmitancia	índice de polidispersidad	Diámetro hidrodinámico
PLGA-PVA-FX (Nps2)	20	65.4%	23.0%	160.5 nm
% m/v	5%		Desviación estándar	57.48 nm

Tabla 4-4. Tamaño de las nanopartículas de PLGA-PVA-FX con 5% de surfactante

Las Nps a 5% mostraron que a una concentración mayor de PVA (600 mg) es mejor para la producción de Nps con un tamaño relativamente menor de aproximadamente 160.5 nm (Tabla 4-4). La muestra Nps2 mostró ser monodispersa con una concentración mayor de surfactante, pero el

índice de polidispersidad (PDI) de la muestra Nps2 también se incrementó. Patel y colaboradores (2016) informaron que se obtuvo una disminución del PDI con el aumento de la solución acuosa.

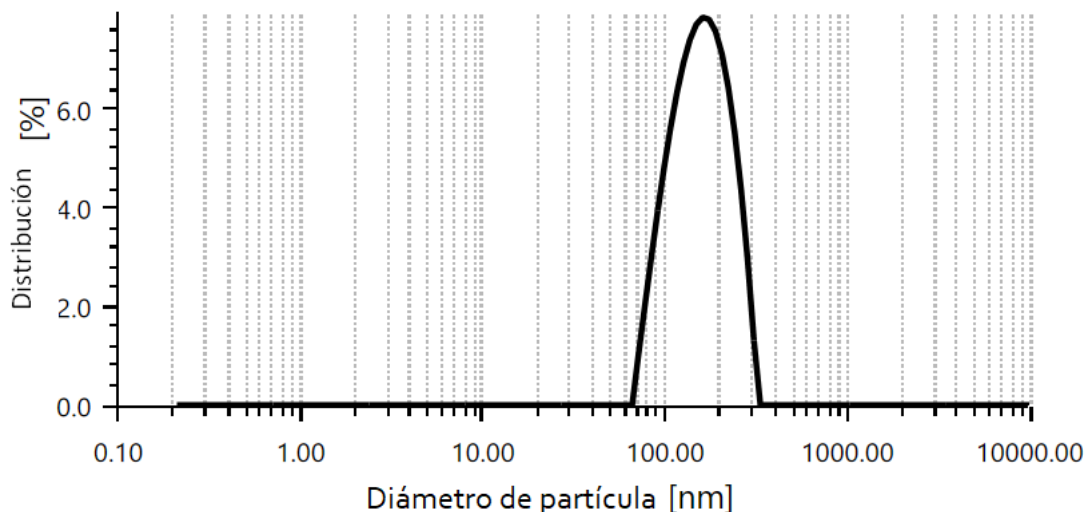


Figura 4-13. Distribución y tamaño de partícula de la muestra Nps2

Se comprobó que el tiempo de agitación no tuvo influencia significativa en el tamaño y el PDI de las Nps, por lo que se dejó las mismas 2 horas para la muestra Nps3. El porcentaje de la amplitud en el proceso de sonicación mostro que el tamaño de partícula es afectado, así como el PDI. Los resultados reportados por Lancheros y colaboradores (2014) a amplitudes entre 20 y 60% no muestran diferencia significativa, pero si a 80% que es el valor de amplitud con el cual se llevó a cabo la experimentación.

Nombre	Temperatura (°C)	Transmitancia	índice de polidispersidad	Diámetro hidrodinámico
PLGA-PVA-FX (Nps3)	20	74.8%	8.4%	114.92 nm
% m/v	5%	40 mL de agua	Desviación estándar	23.08 nm

Tabla 4-5. Tamaño de las nanopartículas de PLGA-PVA-FX con 5% de surfactante y 40 mL de agua

Al aumentar tanto la concentración de PVA como el volumen a las mismas condiciones de agitación y sonicación que la muestra Nps2, el tamaño de partícula de la muestra Nps3 disminuyó hasta 114.92 nm aproximadamente, así como el PDI que también fue dependiente de la concentración del PVA y no fue influenciado por la concentración del PLGA. El uso de una mayor proporción de fase acuosa durante la preparación de las Nps poliméricas da lugar a una mayor dilución de la solución de polímero orgánico.

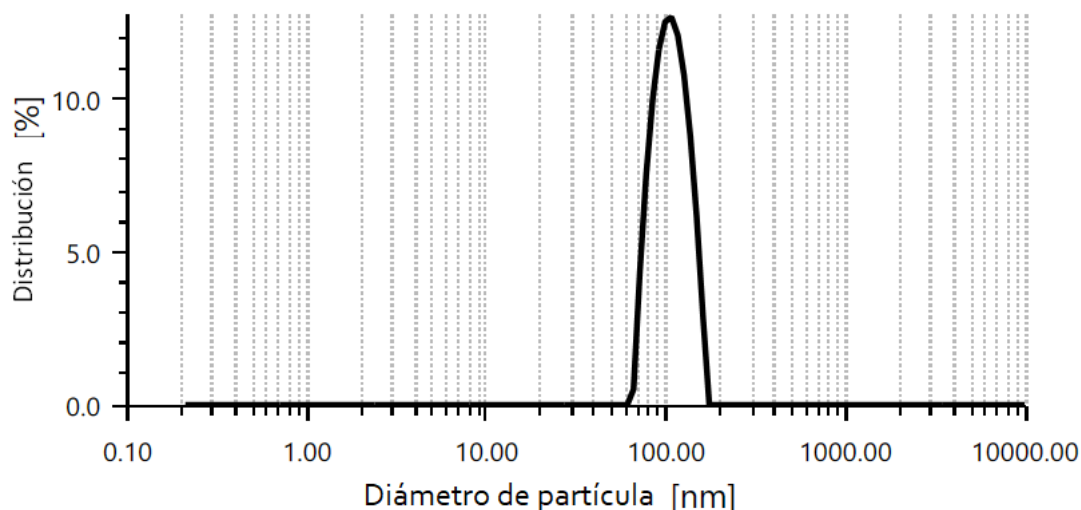


Figura 4-14. Distribución y tamaño de partícula de la muestra Nps3

La muestra Nps3 también mostró ser monodispersa al igual que las dos muestras anteriores, por lo que los factores que influyen en el tamaño fueron la concentración de PVA, el volumen de agua, la amplitud de sonicación, el número de rpm durante la centrifugación y la interacción del sistema PLGA-PVA-FX. Las Nps presentan una forma esférica y de tamaño uniforme. Las Nps cargadas negativamente pueden evitar las interacciones inespecíficas de la membrana celular debido a las fuerzas electrostáticas, lo cual es bueno para la administración de fármacos. Estos resultados indicaron el éxito de la síntesis del copolímero PLGA-PVA, en este estudio la superficie de PLGA se cubrió con PVA y el tamaño de las partículas PLGA-PVA-FX se redujo al nivel nanométrico. Obteniendo formas esféricas y un tamaño uniforme con un diámetro promedio de unos 115 nm, lo que sugiere que estas partículas podrían emplearse en administración de fármacos.

4.6. Caracterización por microscopia electrónica de barrido de las nanoesferas poliméricas de PLGA-PVA-FX

La morfología de las nanopartículas se observó con un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo Hitachi S-4300 (Nova NanoSEM 450, FEI, OR, U.S.A.).

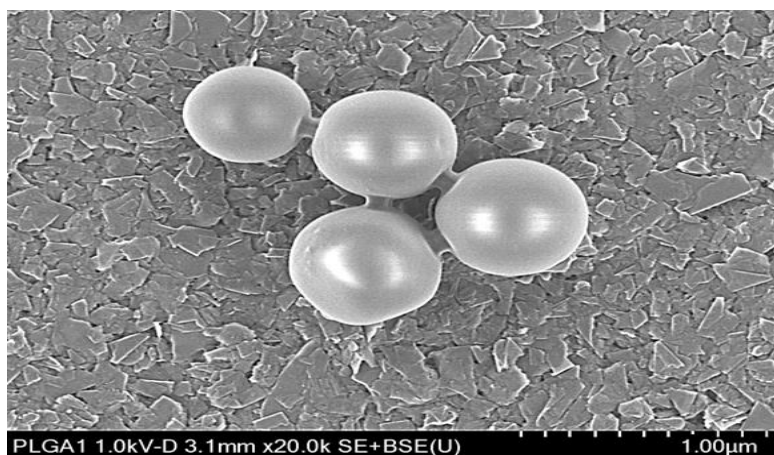


Figura 4-15. Muestra Nps1: Nanopartículas de PLGA-PVA-FX con 1% de surfactante (PVA)

El análisis morfológico de la muestra Nps1 confirmó la forma esférica de las nanopartículas con un tamaño promedio de 200 nm, producidas por el método de emulsión-evaporación (Figura 4-15). Se aprecia que con una concentración menor de PVA la muestra Nps1 tendió a aglomerarse. El voltaje se redujo a 1 kV para apreciar la fusión de las partículas. Al igual que los resultados obtenidos por la técnica de DLS descrito anteriormente, las observaciones de SEM confirman que el tamaño de partícula disminuyó con el aumento del contenido de surfactante PVA de 5.88% para la muestra Nps2 y 32.94% para la muestra Nps3 (Figuras 4-16 y 4-17).

Cuando la concentración de PVA fue menor, el contenido de PLGA condujo al aumento de la viscosidad de la fase orgánica, promoviendo así la formación de gotas de mayor tamaño. El tiempo de sonicación, así como el cuidado de no elevar más de 40°C la temperatura de las muestras de Nps condujo a un tamaño menor y una distribución más estrecha. Las mediciones en SEM confirmaron el control del tamaño de las partículas.

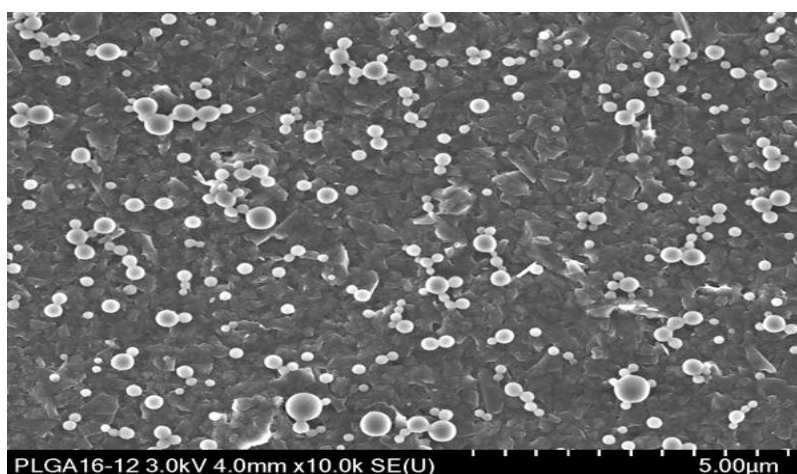


Figura 4-16. Muestra Nps2: Nanopartículas PLGA-PVA-FX con 5% de surfactante (PVA)

Además, el aumento de la viscosidad podría dificultar la rápida dispersión de la solución de PLGA en la fase acuosa, dando lugar a nanopartículas de mayor tamaño tras la evaporación del disolvente orgánico (Song et al., 2008).

La Figura 4-17 también muestra que la morfología cambió y por el contrario a las otras dos muestras las partículas más grandes rara vez se aglomeraron durante la observación por SEM. Esto podría deberse a que las partículas más pequeñas tenían una cubierta de PLGA relativamente más fina, por lo que podrían ser fácilmente fundidas por la corriente de electrones durante la obtención de imágenes por SEM.

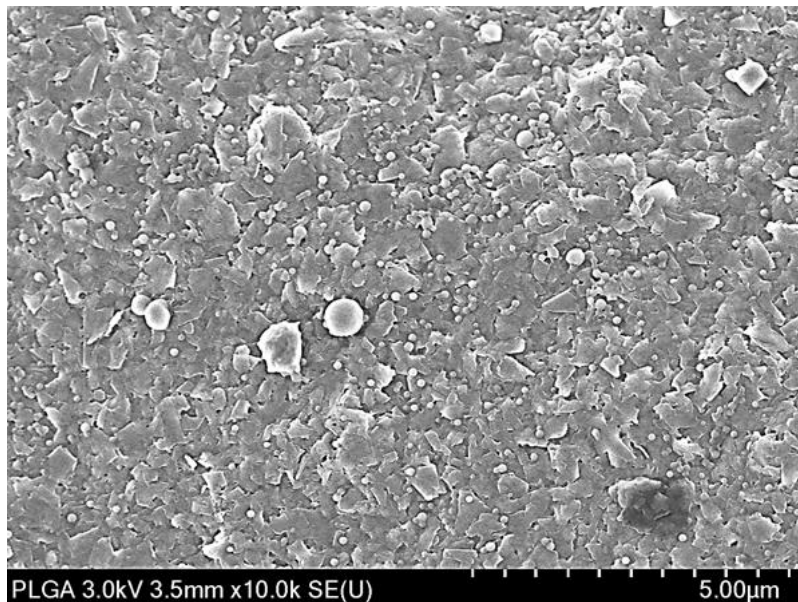


Figura 4-17. Muestra Nps3: Nanopartículas PLGA-PVA-FX con 5% de surfactante (PVA) 40 mL agua

Además, la relación masa-volumen en la síntesis de las Nps desempeñó un papel clave para controlar la distribución del tamaño de las emulsiones. Se observa que el aumento de volumen de solución acuosa condujo a una disminución del tamaño de las partículas y una distribución más amplia (Figura 4-17).

Una posible razón podría ser que el aumento de volumen total incrementó el esfuerzo de cizallamiento de la energía suministrada en el proceso de sonicación, disminuyendo así el tamaño de las partículas. Por otra parte, al mantener el volumen en 20 mL condujo a un mayor tamaño de partícula. Debido a que el tamaño de partícula y la morfología de las Nps son parámetros críticos que afectan en la liberación de fármaco.

4.7. Caracterización electroquímica de las nanoesferas poliméricas de PLGA-PVA-FX

La encapsulación de las muestras de FX en nanopartículas de PLGA-PVA podría mejorar en gran medida la estabilidad de la fucoxantina y evitar la degradación de ésta en el sistema de fluidos corporales, tal como se demuestra empleando nuevamente la técnica electroquímica de voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) donde aparentemente el sistema PLGA-PVA-FX comparado con el extracto Och-M-50°C no muestra la señal oxidativa medida de la fucoxantina (Figura 4-18).

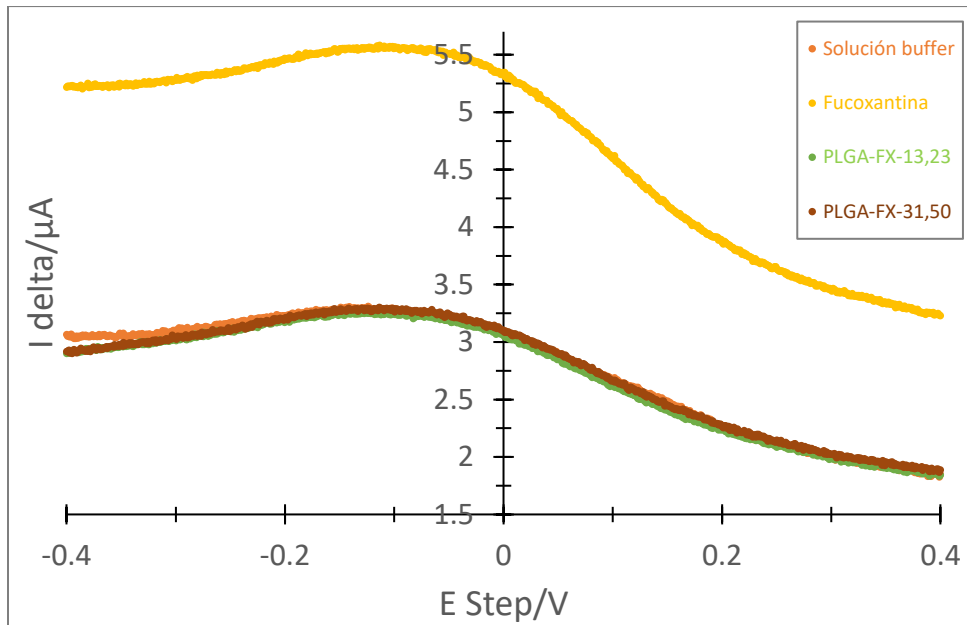


Figura 4-18. Eficiencia de la encapsulación de fucoxantinas con nanopartículas poliméricas de PLGA-PVA

La posible razón podría atribuirse al surfactante dentro de las nanopartículas dado que el PVA es un emulsionante no degradable, conduciendo a una mayor estabilidad de las Nps. También podría deberse a la mayor eficiencia de encapsulación del extracto de FX dentro de las muestras con menor tamaño de partícula.

El aumento de PVA condujo a Nps más pequeñas, así como una mayor eficiencia de encapsulación. Se especula que las nanopartículas PLGA-PVA podrían inducir la liberación sostenida de fucoxantina, lo que podría disminuir en gran medida la degradación o el metabolismo, y así mejorar la concentración y/o la biodisponibilidad de la fucoxantina in vitro. Esta hipótesis merece un estudio más profundo y una experimentación in vivo para su validación. Todos estos resultados sugieren que las nanopartículas de PLGA-PVA podrían mejorar la biodisponibilidad y la eficacia de la fucoxantina y merecen un mayor estudio y avance en el desarrollo de fármacos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusiones

De acuerdo con el objetivo general, caracterizar física y químicamente fucoxantinas de algas pardas provenientes de las costas del Caribe Mexicano, así como los objetivos específicos de esta investigación se puede concluir lo siguiente:

- Se logró demostrar que las ondas de choque monopulso y tándem presentan ventajas significativas sobre los métodos convencionales en la extracción de fucoxantina de *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*, un carotenoide con capacidad anticancerígena, neuroprotectora, fotoprotectora, antiobesidad, antiinflamatoria y antioxidante. Dicha extracción logró rendimientos de 350 µg por gramo de sargazo seco, siendo un 14.3% mayor a los 300 µg/g obtenidos con la extracción convencional de Raguraman y colaboradores (2018). La extracción por ondas de choque es un método atractivo para obtener fucoxantinas sin necesidad de solventes orgánicos en tiempos de 5 minutos.
- Se informó en este trabajo que el ácido láctico, ácido cítrico y ácido tartárico combinados con cloruro de colina y betaína son adecuados para la extracción de compuestos fenólicos totales y lipofílicos de *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*. En particular, los NADES, además de su reducido impacto ambiental, permiten una alta estabilidad de los metabolitos activos y preservan la actividad antioxidante de los extractos. Así, los resultados descritos en esta tesis ponen de manifiesto el potencial de los NADES para la recuperación de compuestos fenólicos y lipofílicos de *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*.
- La UEA-B y UEA-S dieron lugar a buenos rendimientos de fucoxantina (20 µg por gramo de sargazo seco), resultando ser métodos eficientes por la tasa de extracción en un corto periodo de tiempo. La metodología resultó ser rápida y fiable y podría utilizarse para extraer compuestos de otras especies.
- La fucoxantina extraída mostró una excelente propiedad antioxidante mediante la inhibición de los radicales libres DPPH. El alto rendimiento de la fucoxantina podría utilizarse como ingrediente en alimentos funcionales para la prevención del estrés oxidativo.
- Se logró cuantificar las fucoxantinas extraídas mediante espectroscopia ultravioleta visible (UV-vis) y voltamperometría diferencial de pulsos (DVP). Esta última se propuso como técnica en la cuantificación de la fucoxantina, mostrando ser una alternativa interesante debido a que el muestreo es más fácil, el análisis requiere menos tiempo y los costos

operativos son bajos, siendo posible la determinación de fucoxantinas en solución acuosa después de su extracción.

- Las nanopartículas de PLGA-PVA-FX fueron capaces de proteger los extractos obteniendo un tamaño de partículas de PLGA-PVA-FX menores a 115 nm. Las mediciones de SEM confirmaron los resultados por DLS y mostraron que la variación de concentración de surfactante y cantidad de solución acuosa afectó significativamente el tamaño de partícula y su distribución.
- La encapsulación de los extractos FX en nanoesferas de PLGA-PVA mejoró en gran medida la estabilidad de la fucoxantina y evitó su degradación, tal como se demostró en la caracterización electroquímica (DPV) donde aparentemente el sistema PLGA-PVA-FX comparado con el extracto de fucoxantina no mostró la señal oxidativa característica.

5.2. Perspectivas

De acuerdo con los resultados de esta investigación, se recomienda continuar con los siguientes puntos:

- Continuar con el proceso de extracción con NADES, evaluando una mayor área superficial de contacto entre la muestra en polvo de alga y el NADES en cuestión y la cantidad de agua agregada al NADES, cuidando de no disminuir mucho su viscosidad.
- Realizar una purificación de los extractos mediante cromatografía líquida (HPLC) acoplada con un espectrómetro de masas o mediante cromatografía en columna de sílice y análisis fisicoquímico mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).
- Medir el potencial zeta de las nanopartículas de PLGA-PVA-FX, para establecer la estabilidad de la suspensión y analizar las propiedades térmicas del material.
- Estudiar la biodisponibilidad y estabilidad de las nanopartículas de PLGA-PVA-FX y administración oral, así como la cinética de liberación y difusión de la fucoxantina en pruebas in vitro. También evaluar los efectos de la captación celular de las nanopartículas, la inhibición del estrés oxidativo y la inflamación.
- Evaluar la viabilidad de escalar el método de extracción por ondas de choque a nivel piloto y estudiar la relación costo-beneficio entre la cantidad de alga necesaria para llevar a cabo el proceso y el rendimiento obtenido.

ANEXOS

Anexo 1. Metodologías específicas y curvas de calibración

A1-1. Preparación de los NADES

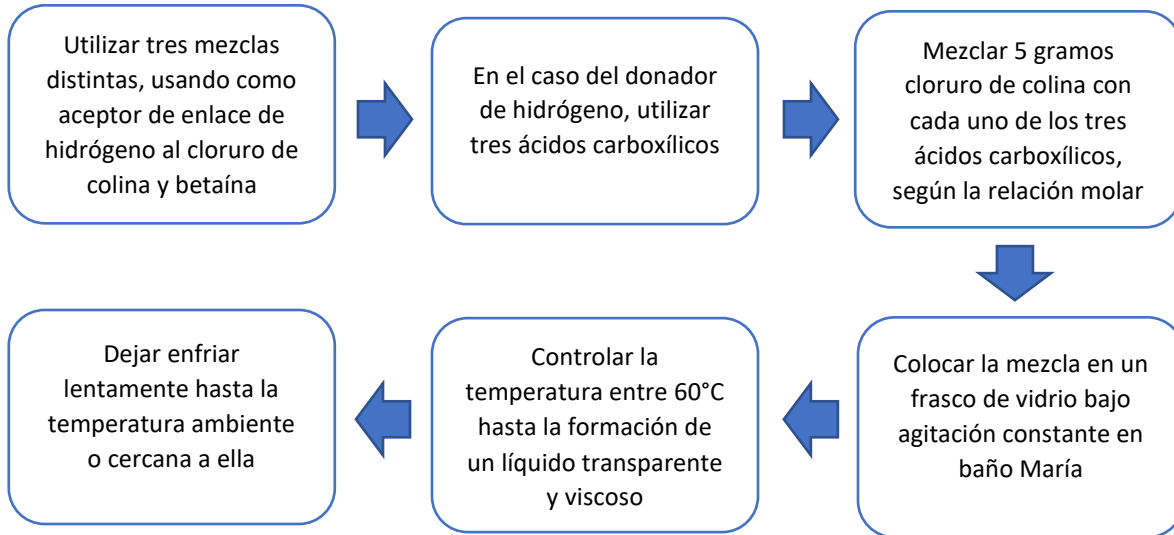


Figura A1-1. Diagrama de bloques para la preparación de los NADES

A1-2. Curva de calibración de ácido ascórbico para el método DPPH

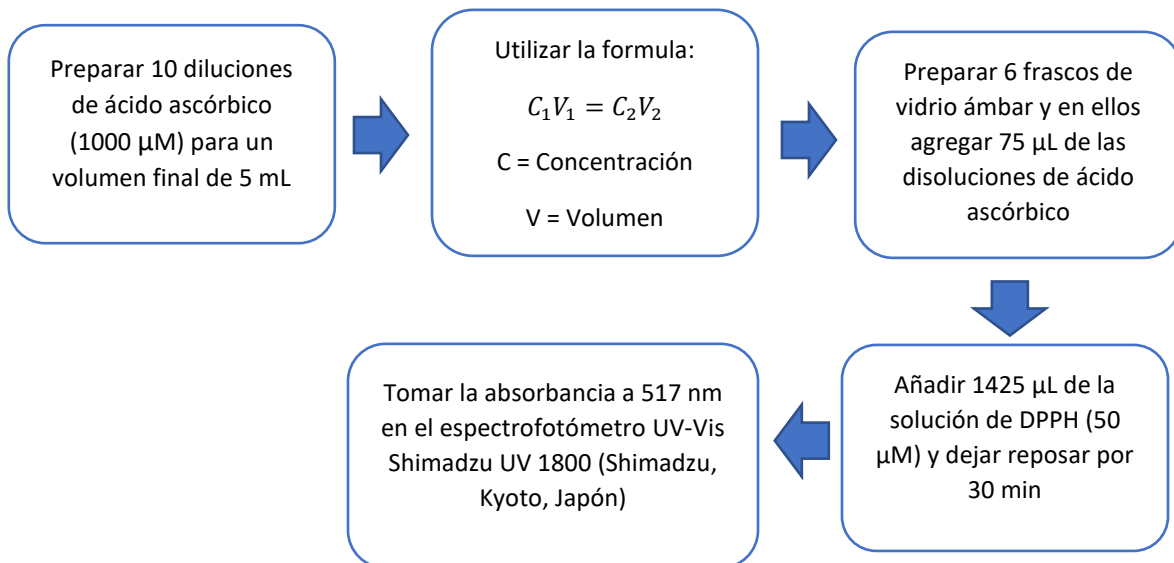


Figura A1-2. Diagrama de bloques para la preparación de la curva de calibración de ácido ascórbico para el método DPPH

Muestra	Concentración ($\mu\text{M/L}$)	Absorbancia
1	20	0.1345
2	40	0.131
3	60	0.1282
4	80	0.1141
5	100	0.1116
6	120	0.1124
7	140	0.112
8	160	0.1163
9	180	0.0874
10	200	0.0832

Tabla A1-1. Datos de la curva de calibración de ácido ascórbico con DPPH

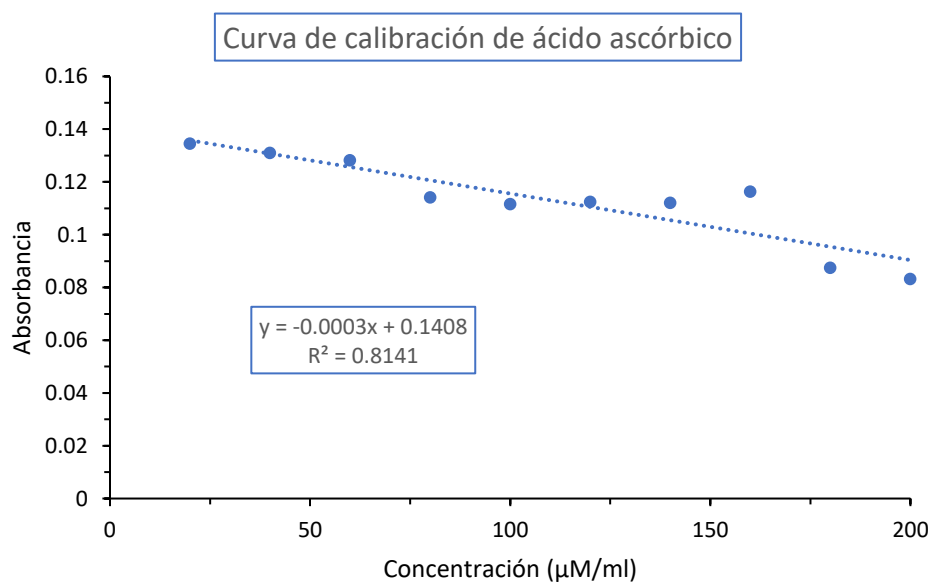


Figura A1-3. Curva de calibración de ácido ascórbico para la prueba de (DPPH)

A1-3. Curva de calibración de ácido gálico para la prueba de (TPC)

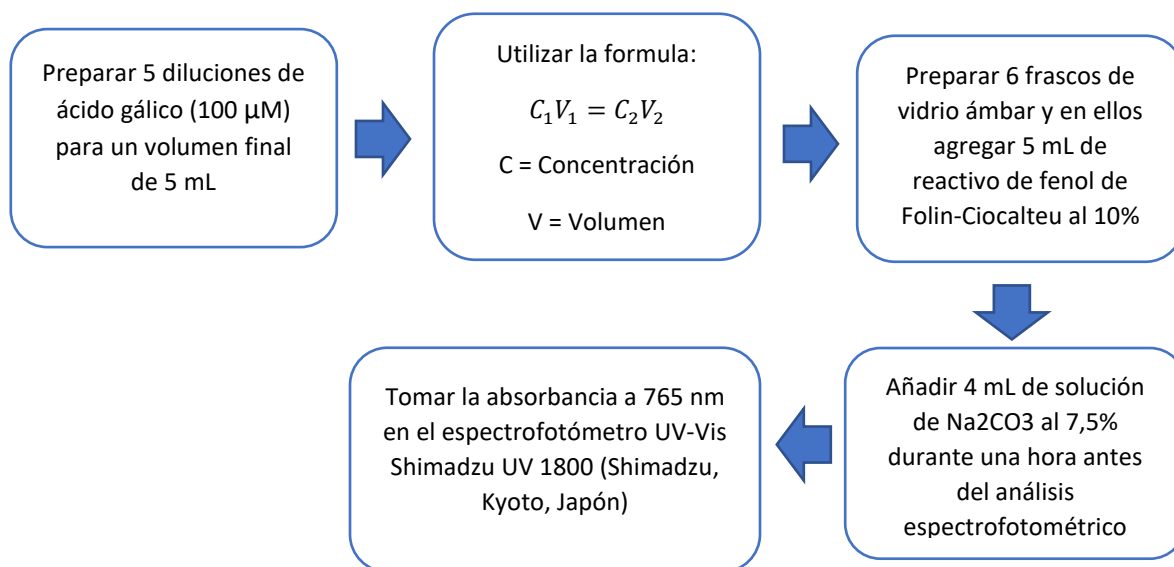


Figura A1-4. Diagrama de bloques para la preparación de la curva de calibración de ácido gálico para la prueba de (TPC)

Muestra	Concentración (µg/mL)	Absorbancia
1	10	0.028
2	20	0.2194
3	40	0.3428
4	60	0.6316
5	80	0.7722
6	100	1.1443

Tabla A1-2. Datos de la curva de calibración de ácido gálico para la prueba de (TPC)

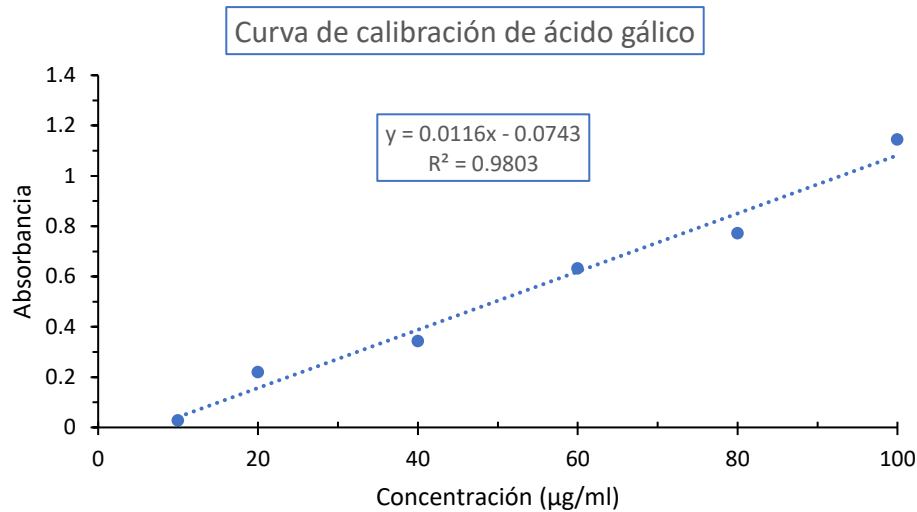


Figura A1-5. Curva de calibración de ácido gálico para la prueba de (TPC)

A1-4. Curva de calibración de quercetina para la prueba de (TFC)

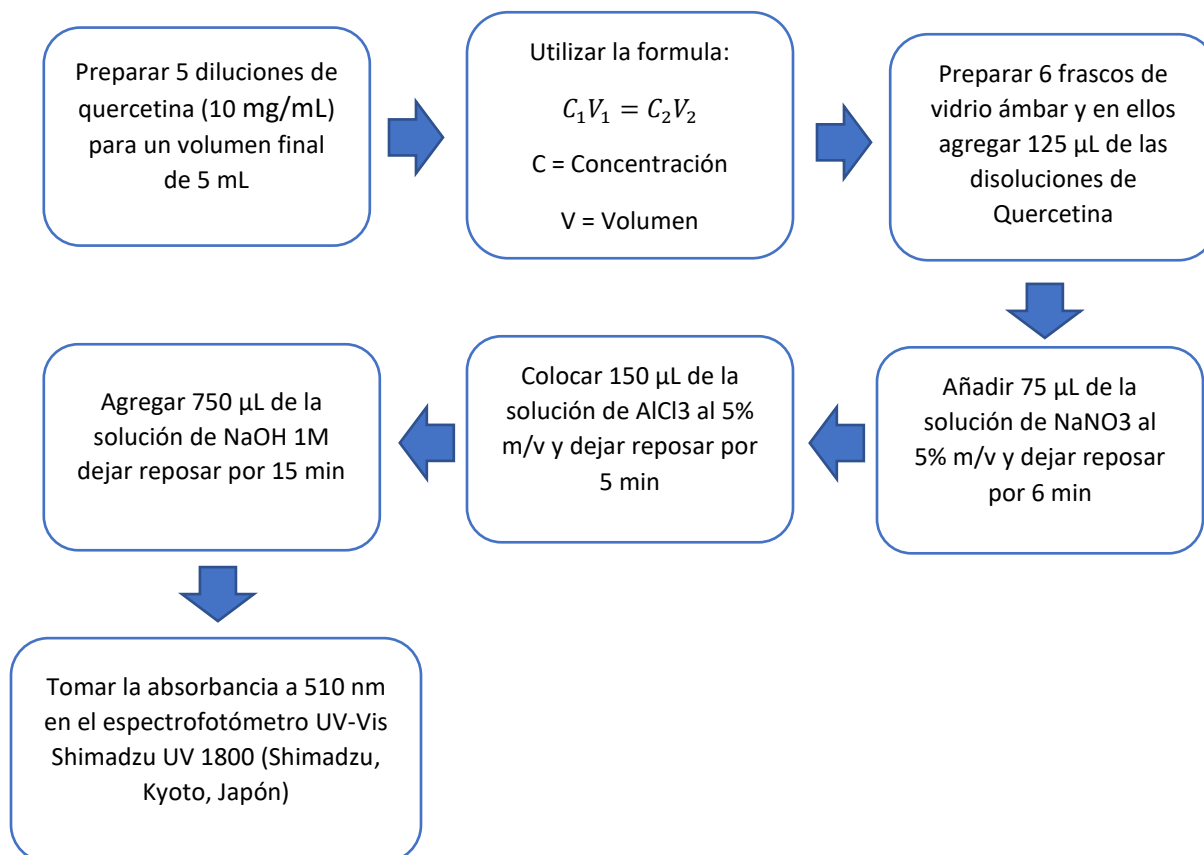


Figura A1-6. Diagrama de bloques para la preparación de la curva de calibración de quercetina para la prueba de (TFC)

Muestra	Concentración (mg/mL)	Absorbancia
1	1	0.028
2	2	0.2194
3	4	0.3428
4	6	0.6316
5	8	0.7722
6	10	1.1443

Tabla A1-3. Datos de la curva de calibración de quercetina para la prueba de (TFC)

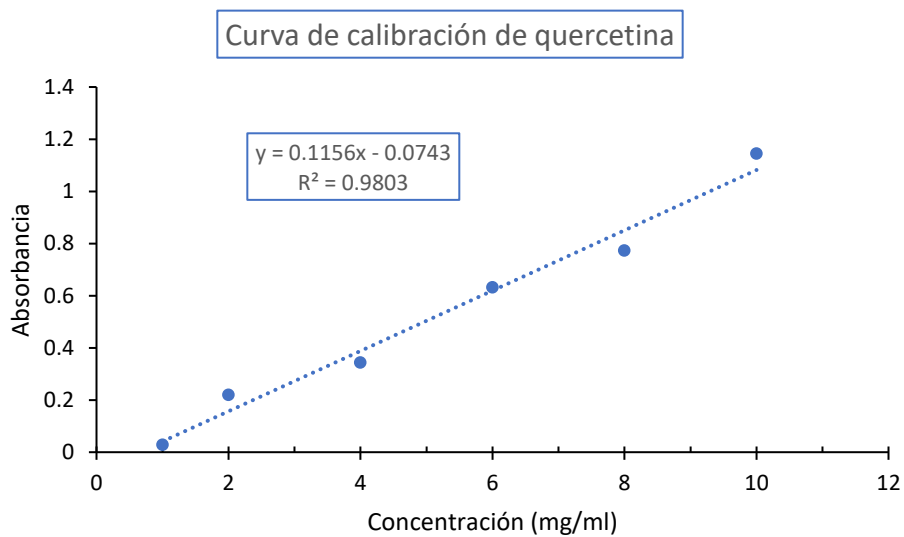


Figura A1-7. Curva de calibración de quercetina para la prueba de (TFC)

Bibliografía

- Abd Aziz, N. A., Hasham, R., Sarmidi, M. R., Suhaimi, S. H., & Idris, M. K. H. (2021). A review on extraction techniques and therapeutic value of polar bioactives from Asian medicinal herbs: Case study on *Orthosiphon aristatus*, *Eurycoma longifolia* and *Andrographis paniculata*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(2), 143-165.
- Abdullah, S. Z., Bérubé, P. R., & Horne, D. J. (2014). SEM imaging of membranes: Importance of sample preparation and imaging parameters. *Journal of membrane science*, 463, 113-125.
- Abu-Ghannam, N., & Shannon, E. (2017). Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as functional food. *Microbial functional foods and nutraceuticals*, 39-64.
- Ahmad, M., Madni, A., Usman, M., Munir, A., Akhtar, N., & Khan, H. S. (2011). Pharmaceutical micro encapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems. *World Acad. Sci. Eng. Technol*, 75, 384-387.
- Airanthi, M. W. A., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2011). Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *Journal of Food Science*, 76(1), C104-C111.
- Airanthi, M. W. A., Sasaki, N., Iwasaki, S., Baba, N., Abe, M., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2011). Effect of brown seaweed lipids on fatty acid composition and lipid hydroperoxide levels of mouse liver. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 4156-4163.
- Alcalde, R., Gutiérrez, A., Atilhan, M., & Aparicio, S. (2019). An experimental and theoretical investigation of the physicochemical properties on choline chloride–Lactic acid based natural deep eutectic solvent (NADES). *Journal of Molecular Liquids*, 290, 110916.
- Ansary, R. H., Awang, M. B., & Rahman, M. M. (2014). Biodegradable poly (D, L-lactic-co-glycolic acid)-based micro/nanoparticles for sustained release of protein drugs-A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(7), 1179-1190.
- Aroso, I. M., Paiva, A., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2017). Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine–Physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 241, 654-661.
- Asai, A., Sugawara, T., Ono, H., & Nagao, A. (2004). Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(2), 205-211.
- Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of biomaterials science, polymer edition*, 17(3), 247-289.
- Athanasiou, K. A., Niederauer, G. G., & Agrawal, C. M. (1996). Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 17(2), 93-102.
- Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D. Y. M. M., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food research international*, 48(2), 410-427.
- Azuola, R., & Vargas-Aguilar, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Revista Tecnología en marcha*, 20(4).

-
- Bahare, R. S., Ganguly, S., Choowongkomon, K., & Seetaha, S. (2015). Synthesis, HIV-1 RT inhibitory, antibacterial, antifungal and binding mode studies of some novel N-substituted 5-benzylidene-2, 4-thiazolidinediones. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 1-15.
- Barakat, N. S., & Ahmad, A. A. (2008). Diclofenac sodium loaded-cellulose acetate butyrate: Effect of processing variables on microparticles properties, drug release kinetics and ulcerogenic activity. *Journal of microencapsulation*, 25(1), 31-45.
- Bedoux, G., Caamal-Fuentes, E., Boulho, R., Marty, C., Bourgougnon, N., Freile-Pelegrín, Y., & Robledo, D. (2017). Antiviral and cytotoxic activities of polysaccharides extracted from four tropical seaweed species. *Natural Product Communications*, 12(6), 1934578X1701200602.
- Beppu, F., Hosokawa, M., Niwano, Y., & Miyashita, K. (2012). Effects of dietary fucoxanthin on cholesterol metabolism in diabetic/obese KK-A y mice. *Lipids in health and disease*, 11(1), 1-8.
- Berkland, C., Kim, K. K., & Pack, D. W. (2003). PLG microsphere size controls drug release rate through several competing factors. *Pharmaceutical research*, 20(7), 1055-1062.
- Billakanti, J. M., Catchpole, O. J., Fenton, T. A., Mitchell, K. A., & MacKenzie, A. D. (2013). Enzyme-assisted extraction of fucoxanthin and lipids containing polyunsaturated fatty acids from *Undaria pinnatifida* using dimethyl ether and ethanol. *Process biochemistry*, 48(12), 1999-2008.
- Blasco, A. J., González, M. C., & Escarpa, A. (2004). Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 511(1), 71-81.
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Bubalo, M. C., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., ... & Jokić, S. (2017). Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 195-203.
- Branstetter, B. K., St. Leger, J., Acton, D., Stewart, J., Houser, D., Finneran, J. J., & Jenkins, K. (2017). Killer whale (*Orcinus orca*) behavioral audiograms. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 141(4), 2387-2398.
- Bretanha, L. C., Teixeira, V. E., Ritter, M., Siqueira, G. M., Cunico, W., Pereira, C. M., & Freitag, R. A. (2011). Ultrasound-promoted synthesis of 3-trichloromethyl-5-alkyl (aryl)-1, 2, 4-oxadiazoles. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(3), 704-707.
- Bubalo, M. C., Vidović, S., Redovniković, I. R., & Jokić, S. (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and Bioproducts Processing*, 109, 52-73.
- Capelo-Martínez, J. L. (Ed.). (2009). *Ultrasound in chemistry: analytical applications*. John Wiley & Sons.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22(2), 5-14.
- Chavan, V. P., Patwardhan, A. V., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of epoxidation of soybean oil using sonochemical reactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 54, 22-28.

-
- Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W., ... & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. *Plant physiology*, *156*(4), 1701-1705.
- Chuyen, H. V., & Eun, J. B. (2017). Marine carotenoids: Bioactivities and potential benefits to human health. *Critical reviews in food science and nutrition*, *57*(12), 2600-2610.
- Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zhao, S., Ma, X., Wan, Q., ... & Li, P. (2016). Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chemistry*, *197*, 266-272.
- Cicci, A., Sed, G., & Bravi, M. (2017). Potential of choline chloride-based natural deep eutectic solvents (NaDES) in the extraction of microalgal metabolites. *Chemical Engineering Transactions*, *57*, 61-66.
- Cotas, J., Leandro, A., Monteiro, P., Pacheco, D., Figueirinha, A., Gonçalves, A. M., ... & Pereira, L. (2020). Seaweed phenolics: From extraction to applications. *Marine Drugs*, *18*(8), 384.
- D'Orazio, N., Gemello, E., Gammone, M. A., De Girolamo, M., Ficoneri, C., & Riccioni, G. (2012). Fucoxantin: A treasure from the sea. *Marine drugs*, *10*(3), 604-616.
- Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A*, *1434*, 50-56.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica chimica acta*, *766*, 61-68.
- Dawczynski, C., Schubert, R., & Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food chemistry*, *103*(3), 891-899.
- Deb, P. K., Kokaz, S. F., Abed, S. N., Paradkar, A., & Tekade, R. K. (2019). Pharmaceutical and biomedical applications of polymers. In *Basic fundamentals of drug delivery* (pp. 203-267). Academic Press.
- Dreyer, T., Krauss, W., Bauer, E., & Riedlinger, R. E. (2000, October). Investigations of compact self focusing transducers using stacked piezoelectric elements for strong sound pulses in therapy. In *2000 IEEE Ultrasonics Symposium. Proceedings. An International Symposium (Cat. No. 00CH37121)* (Vol. 2, pp. 1239-1242). IEEE.
- El-Ansary, A., & Al-Ayadhi, L. (2014). GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. *Journal of neuroinflammation*, *11*(1), 1-9.
- Echlin, P. (2011). *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer Science & Business Media.
- Evan, A. P., Willis, L. R., McAteer, J. A., Bailey, M. R., Connors, B. A., Shao, Y., ... & Crum, L. A. (2002). Kidney damage and renal functional changes are minimized by waveform control that suppresses cavitation in shock wave lithotripsy. *The Journal of urology*, *168*(4 Part 1), 1556-1562.
- Fourmentin, S., Gomes, M. C., & Lichtfouse, E. (Eds.). (2021). *Deep Eutectic Solvents for Medicine, Gas Solubilization and Extraction of Natural Substances* (Vol. 56). Springer Nature.

Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xu, Y., Li, L., & Luo, Z. (2021). Sonication-synergistic natural deep eutectic solvent as a green and efficient approach for extraction of phenolic compounds from peels of *Carya cathayensis* Sarg. *Food Chemistry*, 355, 129577.

Govindarajan, A. F., Cooney, L., Whittaker, K., Bloch, D., Burdorf, R. M., Canning, S., ... & Siuda, A. N. (2019). The distribution and mitochondrial genotype of the hydroid *Aglaophenia latecarinata* is correlated with its pelagic *Sargassum* substrate type in the tropical and subtropical western Atlantic Ocean. *PeerJ*, 7, e7814.

Hans, M. L., & Lowman, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 319-327.

Harasym, J., & Oledzki, R. (2014). Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition*, 30(5), 511-517.

Hashimoto, T., Ozaki, Y., Taminato, M., Das, S. K., Mizuno, M., Yoshimura, K., ... & Kanazawa, K. (2009). The distribution and accumulation of fucoxanthin and its metabolites after oral administration in mice. *British journal of nutrition*, 102(2), 242-248.

Heffernan, N., Smyth, T. J., FitzGerald, R. J., Vila-Soler, A., Mendiola, J., Ibáñez, E., & Brunton, N. P. (2016). Comparison of extraction methods for selected carotenoids from macroalgae and the assessment of their seasonal/spatial variation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 221-228.

Heo, S. J., Ko, S. C., Kang, S. M., Kang, H. S., Kim, J. P., Kim, S. H., ... & Jeon, Y. J. (2008). Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂-induced cell damage. *European food research and technology*, 228(1), 145-151.

Herrmann, K. (1976). Flavonols and flavones in food plants: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 11(5), 433-448.

Hu, L., Chen, W., Tian, F., Yuan, C., Wang, H., & Yue, H. (2018). Neuroprotective role of fucoxanthin against cerebral ischemic/reperfusion injury through activation of Nrf2/HO-1 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1484-1489.

Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2011). Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(2), 153-162.

Iravani, N., Hajiaghaee, R., & Zarekarizi, A. (2018). A review on biosynthesis, health benefits and extraction methods of fucoxanthin, particular marine carotenoids in algae, 17(67), 6-30.

J Mason, T., Chemat, F., & Vinatoru, M. (2011). The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237-247.

Jeliński, T., Przybyłek, M., & Cysewski, P. (2019). Natural deep eutectic solvents as agents for improving solubility, stability and delivery of curcumin. *Pharmaceutical Research*, 36(8), 1-10.

Jiménez Fino, A. M. (2020). *Estudio generalizado de sistemas miniaturizados de extracción para la preconcentración y determinación de metales pesados en aguas en concentraciones a nivel de subtrazas* (Bachelor's thesis, Uniandes).

-
- Jin, E. S., Polle, J. E., Lee, H. K., Hyun, S. M., & Chang, M. (2003). Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. *Journal of microbiology and biotechnology*, 13(2), 165-174.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60-67.
- Kajikawa, T., Okumura, S., Iwashita, T., Kosumi, D., Hashimoto, H., & Katsumura, S. (2012). Stereocontrolled total synthesis of fucoxanthin and its polyene chain-modified derivative. *Organic letters*, 14(3), 808-811.
- Kawee-ai, A., Kuntiya, A., & Kim, S. M. (2013). Anticholinesterase and antioxidant activities of fucoxanthin purified from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Natural Product Communications*, 8(10), 1934578X1300801010.
- Kerio, L. C., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K., & Rotich, M. K. (2013). Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. *Food chemistry*, 136(3-4), 1405-1413.
- Khandare, V., Walia, S., Singh, M., & Kaur, C. (2011). Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioprocess Processing*, 89(4), 482-486.
- Khodosevich, K., & Monyer, H. (2010). Signaling involved in neurite outgrowth of postnatally born subventricular zone neurons in vitro. *BMC neuroscience*, 11(1), 1-11.
- Klaseboer, E., Fong, S. W., Turangan, C. K., Khoo, B. C., Szeri, A. J., Calvisi, M. L., ... & Zhong, P. (2007). Interaction of lithotripter shockwaves with single inertial cavitation bubbles. *Journal of fluid mechanics*, 593, 33-56.
- Kodama, T., & Takayama, K. (1998). Dynamic behavior of bubbles during extracorporeal shock-wave lithotripsy. *Ultrasound in medicine & biology*, 24(5), 723-738.
- Kuhnau, J. (1976). Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World review of nutrition and dietetics*.
- Kumar, S. R., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2013). Fucoxanthin: A marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Marine drugs*, 11(12), 5130-5147.
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- Lancheros, R. J., Beleño, J. Á., Guerrero, C. A., & Godoy-Silva, R. D. (2014). Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Universitas Scientiarum*, 19(2), 161-168.
- Lee, S. B., Lee, J. Y., Song, D. G., Pan, C. H., Nho, C. W., Kim, M. C., ... & Um, B. H. (2008). Cancer chemopreventive effects of Korean seaweed extracts. *Food Science and Biotechnology*, 17(3), 613-622.
- Li, H., Xu, Y., Sun, X., Wang, S., Wang, J., Zhu, J., ... & Zhao, L. (2018). Stability, bioactivity, and bioaccessibility of fucoxanthin in zein-caseinate composite nanoparticles fabricated at neutral pH by antisolvent precipitation. *Food Hydrocolloids*, 84, 379-388.

-
- Li, X., Anton, N., Arpagaus, C., Bellesteix, F., & Vandamme, T. F. (2010). Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*, 147(2), 304-310.
- Liu, C. L., Liang, A. L., & Hu, M. L. (2011). Protective effects of fucoxanthin against ferric nitrilotriacetate-induced oxidative stress in murine hepatic BNL CL. 2 cells. *Toxicology in Vitro*, 25(7), 1314-1319.
- Liu, L., Heinrich, M., Myers, S., & Dworjanyn, S. A. (2012). Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of ethnopharmacology*, 142(3), 591-619.
- Loske, A. M. (2017). Medical and biomedical applications of shock waves.
- Loske, A. M. (2017). Medical and biomedical applications of shock waves: the state of the art and the near future. In *30th International Symposium on Shock Waves 1* (pp. 29-34). Springer, Cham.
- Lourenço-Lopes, C., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., ... & Simal-Gandara, J. (2020). Scientific approaches on extraction, purification and stability for the commercialization of fucoxanthin recovered from brown algae. *Foods*, 9(8), 1113.
- Lukes, P., Fernández, F., Gutiérrez-Aceves, J., Fernández, E., Alvarez, U. M., Sunka, P., & Loske, A. M. (2016). Tandem shock waves in medicine and biology: a review of potential applications and successes. *Shock waves*, 26(1), 1-23.
- Mantilla, C., PEDRAZA, J., & LAVERDE, D. (2008). Utilización de estudios de potencial zeta en el desarrollo de un proceso alternativo de flotación de mineral feldespático. *Dyna*, 75(154), 65-71.
- Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., & Akimoto, N. (2007). Characterization of fucoxanthin and fucoxanthinol esters in the Chinese surf clam, *Macra chinensis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(4), 1563-1567.
- Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3), 47.
- Mikami, K., & Hosokawa, M. (2013). Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 13763-13781.
- Miyashita, K., Nishikawa, S., Beppu, F., Tsukui, T., Abe, M., & Hosokawa, M. (2011). The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7), 1166-1174.
- Mohamadnia, S., Tavakoli, O., Faramarzi, M. A., & Shamsollahi, Z. (2020). Production of fucoxanthin by the microalga *Tisochrysis lutea*: A review of recent developments. *Aquaculture*, 516, 734637.
- Mohammed, A., Bissoon, R., Bajnath, E., Mohammed, K., Lee, T., Bissram, M., ... & Ward, K. (2018). Multistage extraction and purification of waste *Sargassum natans* to produce sodium alginate: An optimization approach. *Carbohydrate polymers*, 198, 109-118.

-
- Molina, G. A., González-Fuentes, F., Loske, A. M., Fernández, F., & Estevez, M. (2020). Shock wave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids from *Eysenhardtia polystachya* heartwood: A novel method and its comparison with conventional methodologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 61, 104809.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 385(1-2), 113-142.
- Moreno, R., Moya, J. S., & Requena, J. (1987). Electroquímica de suspensiones cerámicas. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr*, 26(6), 355-365.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P., & Aminabhavi, T. M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 125(3), 193-209.
- Musielak, G., Mierzwa, D., & Kroehnke, J. (2016). Food drying enhancement by ultrasound—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 126-141.
- Neumann, U., Derwenskus, F., Flaiz Flister, V., Schmid-Staiger, U., Hirth, T., & Bischoff, S. C. (2019). Fucoxanthin, a carotenoid derived from *Phaeodactylum tricornutum* exerts antiproliferative and antioxidant activities in vitro. *Antioxidants*, 8(6), 183.
- Nicolae, C. V., Trică, B., Doncea, S. M., Marinaș, I. C., Oancea, F., & Constantinescu-Aruxandei, D. (2019). Evaluation and optimization of polysaccharides and ferulic acid solubility in NADES using surface response methodology. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 29(1), 96.
- Noviendri, D. (2014). Microencapsulation of Fucoxanthin by Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) Double Emulsion Solvent Evaporation Method: A Review. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 9(3), 137-150.
- Nunes, N., Leça, J. M., Pereira, A. C., Pereira, V., Ferraz, S., Barreto, M. C., ... & de Carvalho, M. P. (2019). Evaluation of fucoxanthin contents in seaweed biomass by vortex-assisted solid-liquid microextraction using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Algal Research*, 42, 101603.
- Okuzumi, J., Nishino, H., Murakoshi, M., Iwashima, A., Tanaka, Y., Yamane, T., ... & Takahashi, T. (1990). Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer letters*, 55(1), 75-81.
- Oomen, W. W., Begines, P., Mustafa, N. R., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2020). Natural deep eutectic solvent extraction of flavonoids of *scutellaria baicalensis* as a replacement for conventional organic solvents. *Molecules*, 25(3), 617.
- Oropesa-Nuñez, R., & Jáuregui-Haza, U. J. (2012). Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43(3).
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071.

-
- Pan, G., Yu, G., Zhu, C., & Qiao, J. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 486-490.
- Pekkarinen, S. S., Heinonen, I. M., & Hopia, A. I. (1999). Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), 499-506.
- Peng, J., Yuan, J. P., Wu, C. F., & Wang, J. H. (2011). Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine drugs*, 9(10), 1806-1828.
- Pico, Y. (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, 84-99.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Pereira, E., Jabeur, I., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019). Optimization of heat-and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa calyces for natural food colorants. *Food chemistry*, 275, 309-321.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Le Bourvellec, C., Renard, C. M., & Chemat, F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 73-81.
- Plotka-Wasyłka, J., Rutkowska, M., Owczarek, K., Tobiszewski, M., & Namieśnik, J. (2017). Extraction with environmentally friendly solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 91, 12-25.
- Pohanka, M. (2016). Toxicology and the biological role of methanol and ethanol: Current view. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*, 160(1).
- Prieto, M. A., Rodríguez-Amado, I., Vázquez, J. A., & Murado, M. A. (2012). β -Carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8983-8993.
- Raguraman, V., MubarakAli, D., Narendrakumar, G., Thirugnanasambandam, R., Kirubakaran, R., & Thajuddin, N. (2018). Unraveling rapid extraction of fucoxanthin from Padina tetrastratica: Purification, characterization and biomedical application. *Process Biochemistry*, 73, 211-219.
- Rajauria, G., & Abu-Ghannam, N. (2013). Isolation and partial characterization of bioactive fucoxanthin from Himanthalia elongata brown seaweed: A TLC-based approach. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2013.
- Ramirez, J. C., Flores-Villaseñor, S. E., Vargas-Reyes, E., Herrera-Ordóñez, J., Torres-Rincón, S., & Peralta-Rodríguez, R. D. (2020). Preparation of PDLLA and PLGA nanoparticles stabilized with PVA and a PVA-SDS mixture: Studies on particle size, degradation and drug release. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 101907.
- Ramos Picos, D., Gómez Carril, M., Fernández Mena, D., & Núñez de la Fuente, L. (2000). Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Revista Cubana de Farmacia*, 34(1), 70-77.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.
- Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in polymer science*, 36(7), 887-913.

-
- Ravi, H., & Baskaran, V. (2015). Biodegradable chitosan-glycolipid hybrid nanogels: A novel approach to encapsulate fucoxanthin for improved stability and bioavailability. *Food Hydrocolloids*, 43, 717-725.
- Rodrigues, L. A., Pereira, C. V., Leonardo, I. C., Fernández, N., Gaspar, F. B., Silva, J. M., ... & Matias, A. A. (2020). Terpene-based natural deep eutectic systems as efficient solvents to recover astaxanthin from brown crab shell residues. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(5), 2246-2259.
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246-254.
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., & Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 98-103.
- Sangeetha, R. K., Bhaskar, N., Divakar, S., & Baskaran, V. (2010). Bioavailability and metabolism of fucoxanthin in rats: structural characterization of metabolites by LC-MS (APCI). *Molecular and cellular biochemistry*, 333(1), 299-310.
- Sanjeewa, K. A., Kang, N., Ahn, G., Jee, Y., Kim, Y. T., & Jeon, Y. J. (2018). Bioactive potentials of sulfated polysaccharides isolated from brown seaweed *Sargassum* spp in related to human health applications: A review. *Food Hydrocolloids*, 81, 200-208.
- Santana, A. P., Andrade, D. F., Mora-Vargas, J. A., Amaral, C. D., Oliveira, A., & Gonzalez, M. H. (2019). Natural deep eutectic solvents for sample preparation prior to elemental analysis by plasma-based techniques. *Talanta*, 199, 361-369.
- Salvia-Trujillo, L., Sun, Q., Um, B. H., Park, Y., & McClements, D. J. (2015). In vitro and in vivo study of fucoxanthin bioavailability from nanoemulsion-based delivery systems: Impact of lipid carrier type. *Journal of Functional Foods*, 17, 293-304.
- Satomi, Y. (2017). Antitumor and cancer-preventative function of fucoxanthin: A marine carotenoid. *Anticancer research*, 37(4), 1557-1562.
- Shahid, M. O. H. A. M. M. A. D., Yusuf, M. O. H. D., & Mohammad, F. (2016). Plant phenolics: A Review on Modern extraction techniques. *Recent Progress in Medicinal Plants*, 41, 265-287.
- Shang, Y. F., Kim, S. M., Lee, W. J., & Um, B. H. (2011). Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(2), 237-241.
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2017). Optimisation of fucoxanthin extraction from Irish seaweeds by response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 1027-1036.
- Sharma, S., Parmar, A., Kori, S., & Sandhir, R. (2016). PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC trends in analytical chemistry*, 80, 30-40.
- Shikov, A. N., Kosman, V. M., Flissyuk, E. V., Smekhova, I. E., Elameen, A., & Pozharitskaya, O. N. (2020). Natural deep eutectic solvents for the extraction of phenyletanes and phenylpropanoids of *Rhodiola rosea* L. *Molecules*, 25(8), 1826.

-
- Sinha, S., Astani, A., Ghosh, T., Schnitzler, P., & Ray, B. (2010). Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity. *Phytochemistry*, 71(2-3), 235-242.
- Sivagnanam, S. P., Yin, S., Choi, J. H., Park, Y. B., Woo, H. C., & Chun, B. S. (2015). Biological properties of fucoxanthin in oil recovered from two brown seaweeds using supercritical CO₂ extraction. *Marine Drugs*, 13(6), 3422-3442.
- Suárez, A. M., & Martínez-Daranas, B. (2018). La problemática del Sargazo en el Caribe. *Adaptación basada en Ecosistemas: alternativa para la gestión sostenible de los recursos marinos y costeros del Caribe*, 82.
- Suga, M., Asahina, S., Sakuda, Y., Kazumori, H., Nishiyama, H., Nokuo, T., ... & Terasaki, O. (2014). Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. *Progress in Solid State Chemistry*, 42(1-2), 1-21.
- Sun, X., Xu, Y., Zhao, L., Yan, H., Wang, S., & Wang, D. (2018). The stability and bioaccessibility of fucoxanthin in spray-dried microcapsules based on various biopolymers. *Rsc Advances*, 8(61), 35139-35149.
- Susanto, E., Fahmi, A. S., Agustini, T. W., Rosyadi, S., & Wardani, A. D. (2017, February). Effects of different heat processing on fucoxanthin, antioxidant activity and colour of Indonesian brown seaweeds. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 55, No. 1, p. 012063). IOP Publishing.
- Suslick, K. S., Didenko, Y., Fang, M. M., Hyeon, T., Kolbeck, K. J., McNamara III, W. B., ... & Wong, M. (1999). Acoustic cavitation and its chemical consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 357(1751), 335-353.
- Sýs, M., Švecová, B., Švancara, I., & Metelka, R. (2017). Determination of vitamin E in margarines and edible oils using square wave anodic stripping voltammetry with a glassy carbon paste electrode. *Food chemistry*, 229, 621-627.
- Tafuku, S., Ishikawa, C., Yasumoto, T., & Mori, N. (2012). Anti-neoplastic effects of fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on Burkitt's and Hodgkin's lymphoma cells. *Oncology reports*, 28(4), 1512-1518.
- Takla, S. S., Shawky, E., Hammada, H. M., & Darwish, F. A. (2018). Green techniques in comparison to conventional ones in the extraction of Amaryllidaceae alkaloids: Best solvents selection and parameters optimization. *Journal of Chromatography A*, 1567, 99-110.
- Taofiq, O., Heleno, S. A., Calhelha, R. C., Fernandes, I. P., Alves, M. J., Barros, L., ... & Barreiro, M. F. (2018). Mushroom-based cosmeceutical ingredients: Microencapsulation and in vitro release profile. *Industrial Crops and Products*, 124, 44-52.
- Teli, M. D., & Sheikh, J. (2012). Extraction of chitosan from shrimp shells waste and application in antibacterial finishing of bamboo rayon. *International journal of biological macromolecules*, 50(5), 1195-1200.
- Troter, D. Z., Todorović, Z. B., Đokić-Stojanović, D. R., Đorđević, B. S., Todorović, V., Konstantinović, S. S., & Veljković, V. B. (2017). The physicochemical and thermodynamic properties of the choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 82(9), 1039-1052.

-
- Vasir, J. K., & Labhasetwar, V. (2007). Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, 59(8), 718-728.
- Velásquez, P., Bustos, D., Montenegro, G., & Giordano, A. (2021). Ultrasound-assisted extraction of anthocyanins using natural deep eutectic solvents and their incorporation in edible films. *Molecules*, 26(4), 984.
- Vickers, N. J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. *Current biology*, 27(14), R713-R715.
- Wang, S. K., Li, Y., White, W. L., & Lu, J. (2014). Extracts from New Zealand *Undaria pinnatifida* containing fucoxanthin as potential functional biomaterials against cancer in vitro. *Journal of Functional Biomaterials*, 5(2), 29-42.
- Willstätter, R., & Page, H. J. (1914). Untersuchungen über Chlorophyll. XXIV. Über die Pigmente der Braunalgen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 404(3), 237-271.
- Win, K. Y., & Feng, S. S. (2006). In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation. *Biomaterials*, 27(10), 2285-2291.
- Wu, L., Zhang, J., & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 63(6), 456-469.
- Wu, M. T., Chou, H. N., & Huang, C. J. (2014). Dietary fucoxanthin increases metabolic rate and upregulated mRNA expressions of the PGC-1alpha network, mitochondrial biogenesis and fusion genes in white adipose tissues of mice. *Marine drugs*, 12(2), 964-982.
- Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q., & Zhang, C. (2013). Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine drugs*, 11(7), 2667-2681.
- Xiao, X., Si, X., Yuan, Z., Xu, X., & Li, G. (2012). Isolation of fucoxanthin from edible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speed countercurrent chromatography. *Journal of separation science*, 35(17), 2313-2317.
- Yip, W. H., Joe, L. S., Mustapha, W. A. W., Maskat, M. Y., & Said, M. (2014). Characterisation and stability of pigments extracted from *Sargassum binderi* obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malaysiana*, 43(9), 1345-1354.
- Zarekarizi, A., Hoffmann, L., & Burritt, D. (2019). Approaches for the sustainable production of fucoxanthin, a xanthophyll with potential health benefits. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 281-299.
- Zhang, R., Zhang, X., Tang, Y., & Mao, J. (2020). Composition, isolation, purification and biological activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharides: A review. *Carbohydrate polymers*, 228, 115381.
- Zhao, D., Kim, S. M., Pan, C. H., & Chung, D. (2014). Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil. *Food chemistry*, 145, 505-513.
- Zhu, J., Sun, X., Chen, X., Wang, S., & Wang, D. (2016). Chemical cleavage of fucoxanthin from *Undaria pinnatifida* and formation of apo-fucoxanthinones and apo-fucoxanthinals identified using LC-DAD-APCI-MS/MS. *Food Chemistry*, 211, 365-373.

Zorko, M., Jozinović, B., Bele, M., Hodnik, N., & Gaberšček, M. (2014). SEM method for direct visual tracking of nanoscale morphological changes of platinum based electrocatalysts on fixed locations upon electrochemical or thermal treatments. *Ultramicroscopy*, 140, 44-50.