

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CIANOBACTERIAS CON
INTERÉS PARA LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA**

TRABAJO FIN DE GRADO

Julio 2022

Autora: DIANA BAEZA FERRER

Tutor: JUAN MIGUEL VALVERDE VERACRUZ

Cotutora: MARÍA TERESA PRETEL



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CIANOBACTERIAS CON INTERÉS PARA LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

RESUMEN

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos con una gran variabilidad morfológica. Es posible obtener compuestos bioactivos de las cianobacterias. El objetivo de este trabajo es optimizar los procesos de extracción en cianobacterias comerciales *Chlorella* y *Spirulina*, para después caracterizar cuatro cianobacterias gipsícolas. Se determinaron polifenoles, actividad antioxidante y pigmentos que sintetizan diversas especies de cianobacterias, y que podrían tener aplicación para la industria agroalimentaria. De las cuatro cianobacterias estudiadas destaca *Tolypothrix byssoidea* como la mejor candidata a su desarrollo biotecnológico para industria alimentaria por su elevado contenido en compuestos bioactivos.

Palabras clave: Ficobiliproteínas, Polifenoles, Actividad Antioxidante, Pigmentos

EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN CYANOBACTERIA WITH INTEREST FOR THE AGRI-FOOD INDUSTRY

ABSTRACT

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotic organisms with a large morphological accumulation. It is possible to obtain bioactive compounds from cyanobacteria. The objective of this work is to optimize the extraction processes in commercial cyanobacteria *Chlorella* and *Spirulina*, to later characterize four gypsicolous cyanobacteria. Polyphenols, antioxidant activity and pigments synthesized by various species of cyanobacteria, and which could be applied to the agri-food industry, were determined. Of the four cyanobacteria studied, *Tolypothrix byssoidea* stands out as the best candidate for biotechnological development for the food industry due to its high content of bioactive compounds.

Keywords: Phycobiliproteins, Polyphenols, Antioxidant Activity, Pigments

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN. | 5 |
| 1.1. Características generales de las algas. | 5 |
| 1.2. Clasificación algas utilizadas en alimentación. | 6 |
| 1.2.1. Chlorophytas. | 6 |
| 1.2.2. Cyanophytas. | 6 |
| 1.2.3. Phaeophytas. | 7 |
| 1.2.4. Rhodophytas. | 7 |
| 1.3. Los compuestos bioactivos de las cianobacterias. | 7 |
| 1.4. Las cianobacterias de las biocostras yesíferas. Una fuente potencial de compuestos bioactivos. | 12 |
| 2. OBJETIVOS. | 16 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS. | 17 |
| 3.1. Material vegetal. Obtención de biomasa. | 17 |
| 3.2. Cuantificación e identificación de polifenoles. | 20 |
| 3.3. Cuantificación de la Actividad Antioxidante Hidrosoluble (AAH), liposoluble (AAL) y actividad antioxidante total (AAT) | 22 |
| 3.4. Cuantificación de las ficobiliproteínas. | 25 |
| 3.5. Cuantificación de las clorofilas, carotenoides y scytonemina | 26 |
| 3.6. Análisis estadístico | 27 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | 28 |
| 4.1. Optimización de los métodos en algas comerciales <i>Chlorella</i> y <i>Spirulina</i> . | 28 |
| 4.1.1 Cuantificación de polifenoles | 28 |
| 4.1.2 Cuantificación de la capacidad antioxidante hidrosoluble (AAH) y liposoluble (AAL). | 31 |
| 4.1.3 Cuantificación de ficobiliproteínas (c-ficocianina, a-aloficocianina y r-ficoeritrina). | 32 |
| 4.1.4 Cuantificación de Scytonemina, clorofilas, y carotenoides en <i>Chlorella</i> y <i>Spirulina</i> . | 32 |
| 4.2. Compuestos bioactivos en cianobacterias yesíferas. | 33 |
| 4.2.1. Polifenoles. | 33 |
| 4.2.2 Actividad Antioxidante Hidrosoluble y (AAH) y liposoluble (AAL). | 34 |
| 4.2.3. Ficobiliproteínas. | 36 |
| 4.2.4. Pigmentos. (Scytonemina, clorofila a, carotenoides) | 37 |
| 5. CONCLUSIONES. | 40 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 41 |

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Características generales de las algas.

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos con variabilidad morfológica que pueden adaptarse a diferentes ambientes, consiguiendo obtener un amplio rango de metabolitos secundarios que facilitan la aclimatación en diferentes hábitats. Las cianobacterias son conocidas también como algas verde-azuladas, cianofitas y cianofíceas, reciben este nombre en referencia a un pigmento que contienen denominado ficocianina de color azul (Quitral y col., 2012).

Una característica de dichas algas es que aparecieron hace 3500 millones de años y fueron las primeras en producir la fotosíntesis oxigénica siendo responsables de la atmósfera oxidante de hoy en día y por ende fue uno de los puntos clave para la creación y evolución de vida más compleja. Científicos de la NASA defienden que el cultivo de cianobacterias son la principal fuente para la fotosíntesis oxigénica en Marte debido al alto contenido en dióxido de carbono que presentan (Socorro y col., 2013).

Otras características que podemos encontrar en ellas son la introducción de nitrógeno atmosférico al agua gracias a la capacidad de fijar nitrógeno que tienen mediante la enzima nitrogenasa, y la captación de anhídrido carbónico. Se reproducen en casi todo tipo de hábitats por lo tanto podemos encontrarla en diferentes zonas como en fitoplancton suelos húmedos, monumentos, cuevas, fitobentos, corteza de árboles, desiertos, yeso y en condiciones extremas como aguas hipersalinas, agua bajo cero o a altas temperaturas (Socorro y col., 2013).

Son organismos microscópicos que tienen una estructura similar a los que poseen las bacterias y algas, están rodeados en una cápsula, es decir, una membrana externa mucilaginosa. A continuación, se encuentra una capa de peptidoglicano y en el interior contiene una membrana plasmática con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que dan a la cianobacteria la capacidad de adaptarse a diferentes temperaturas ambientales ya que dichos ácidos grasos pueden modificar su grado de saturación. En el interior se encuentran las membranas tilacoides donde se encuentran los pigmentos como clorofila a, ficobiliproteínas y carotenoides (Castillo-Monroy y col., 2011).

1.2. Clasificación algas utilizadas en alimentación.

1.2.1. *Chlorophytas*.

Las *Chlorophytas* o algas verdes son las más abundantes en cuanto a especies con 7000 especies aproximadamente. Tiene gran variedad de formas: unicelulares, cocales libres, coloniales, talos filamentosos simples o ramificados. Algunas especies presentan flagelo en su estructura (Quitral y col., 2012).

Contienen clorofila a, clorofila b y xantofilas. Generalmente, son de agua dulce, pero se han encontrado especies marinas. Realiza tanto reproducción asexual como sexual, en cuanto a la sexual se produce mediante isogamia, ansiogamia, oogamia y somatogamia y la reproducción asexual se lleva a cabo por bipartición, fragmentación o esporación (Quitral y col., 2012).

La *Chlorella* se encuentra dentro del grupo de las algas verdes, es unicelular e inmóvil y posee alta capacidad fotosintética. Como la mayoría de las cianobacterias se puede adaptar a diferentes ambientes y hábitats como agua dulce y marina, suelo con líquenes y protozoos. Tiene estructura esférica y elipsoidal. La especie más abundante es la *Chlorella vulgaris*, tiene varias utilidades como materia prima para biocombustibles (biodiesel), acuicultura y en alimentación demostrando beneficios para la salud ambiental (Safi y col., 2014).

1.2.2. *Cyanophytas*.

Las cianobacterias son organismos unicelulares y pluricelulares procariotas. Son organismos fotosintéticos con diferentes pigmentos como; clorofila a, ficobiliproteínas, ficocianina, ficoeritrina y algunas xantofilas. Las *Cyanophytas* contienen heterocitos que son encargados de la fijación del nitrógeno, y acinetos que acumulan sustancias de reservas. Presentan varias estructuras desde unicelulares, coloniales a filamentosas y carecen de movilidad por la ausencia de flagelos o cilios (Nuñez y col., 2020).

Las algas verdes azuladas se reproducen de forma asexual por bipartición o por fragmentación y se adaptan a diferentes ambientes tanto marinos como terrestres y extremas condiciones de salinidad y temperaturas (Nuñez y col., 2020).

La *Spirulina* o *Arthosphaera* se encuentra dentro del grupos de las cianobacterias y es una de las más comunes dentro de la industria alimentaria. Es una cianobacteria

filamentosa, en forma de espiral y se pueden presentar hasta 15 variedades distintas pero la más común es la *Spirulina palentis*. Es empleada como alimento debido a sus propiedades como la más rica fuente de proteína dentro del origen microbiano (Ali y col., 2012).

Se originó en África y América Latina, pero se ha extendido a diferentes zonas gracias a su alta capacidad de adaptación a diferentes hábitats (Ali y col., 2012).

1.2.3. Phaeophytas.

Las *Phaeophytas* se conocen comúnmente como algas pardas y contienen fucoxantina, clorofila a, clorofila c, betacarotenos y xantofilas. Son algas pluricelulares, filamentosas que presentan en su estructura dos flagelos y sus paredes contienen celulosa y ácido algínico. (Cepeda, 2012)

Presentan una reproducción asexual por fragmentación, propágulos o a través de la producción de zoosporas y una reproducción sexual por alternancia de generaciones distintas, isogamia, ansiogamia y oogamia (Cepeda, 2012).

1.2.4. Rhodophytas.

Las *Rhodophytas* o algas rojas reciben este nombre debido a que contienen una sustancia denominada fitoeritina que le da ese color rojo característico. También, presenta ficocianina, clorofila y xantofilas. Generalmente, crecen en zonas tropicales y subtropicales (Yoon y col., 2017).

En cuanto a su estructura, carecen de flagelos y pueden tener diferentes formas desde filamentos unicelulares, simples o ramificados hasta estructuras que forman pseudotejidos (Yoon y col., 2017).

Presentan reproducción compleja tanto asexual como sexual, la reproducción asexual se lleva a cabo por fragmentación del talo o por la formación de aplanosporas y la reproducción sexual es oogamia, recibiendo las estructuras sexuales nombres específicos. Algunas de las *Rhodophytas* utilizadas en la industria alimentaria son Agar-Agar, Dulse y Nori (Espinoza-Avalos, 2005).

1.3. Los compuestos bioactivos de las cianobacterias.

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos con una gran

variabilidad morfológica que se desarrollan en hábitats muy diversos. Para sobrevivir en ambientes tan variados, y en ocasiones adversos, presentan un amplio rango de metabolitos secundarios cada uno con funciones especializadas para competir con éxito en los diferentes hábitats del planeta. Estos metabolitos secundarios son de gran importancia desde el punto de vista biotecnológico e industrial. Algunos exhiben efectos tóxicos en organismos vivos y podrían ser utilizados como algicidas, herbicidas e insecticidas por sus efectos aleloquímicos (García-Espín y col., 2017). Recientemente, las cianobacterias se han convertido en una fuente innovadora de compuestos activos farmacológicamente como antibióticos, inmunosupresores, antivirales, antiinflamatorios, anticancerígenos, etc. (Knubel y col., 2012; Rastogui y Sinha 2009). Una diferente, pero no menos interesante, propiedad de las cianobacterias es la capacidad de mitigar la toxicidad de la radiación ultravioleta a través de la síntesis de compuestos protectores como aminoácidos tipo micosporina (MAAs) y escitonemina con potencial aplicación en la industria cosmética, especialmente escitonemina que también posee propiedades antiinflamatorias (Asencio y Hoffmann, 2013).

Algunas especies de cianobacterias se utilizan en la nutrición humana y animal (Raposo y col., 2013). Muchos de sus efectos beneficiosos se han atribuido a los polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados, terpenos, clorofilas y pigmentos accesorios de sus aparatos fotosintéticos (Aberoumand, 2011; Cano y col., 2012). En general, estos compuestos son antioxidantes. La ficocianina y la ficoeritrina son dos de las ficobiliproteínas más conocidas, que pueden ser utilizadas en ensayos de inmunofluorescencia (Perez-García y col., 2011). La ficocianina, pigmento ficobilínico azul, debido a su estabilidad también es utilizada en formulaciones cosméticas y colorantes alimenticios. La abundante fuente de antioxidantes que poseen las cianobacterias, las hace candidatas para su uso en los procesos biológicos, especialmente en el envejecimiento, así como en los cambios degenerativos de los diferentes órganos (Datla, 2011). En general, los metabolitos secundarios de las cianobacterias son un importante objetivo en investigación biotecnológica y biomédica debido a sus aplicaciones potenciales en agricultura y en la industria farmacéutica y alimentaria.

A pesar de que las cianobacterias que se desarrollan en lugares inhóspitos, se les considera fuente potencial de compuestos bioactivos desconocidos que tendrían usos biotecnológicos diferentes y se ha estudiado el potencial biotecnológico de organismos que se desarrollan en ambientes salinos acuáticos (Waditee-Sirisattha y col., 2016), las cianobacterias formadoras de costras yesíferas siguen estando muy poco estudiadas desde el punto de vista biotecnológico. Tan solo Kedar y col., (2002) identificaron un tipo de micosporina en costras yesíferas de una balsa salina en Israel.

El interés por los alimentos funcionales es cada vez mayor ya que éstos, además de

satisfacer las necesidades energéticas y nutricionales básicas, son capaces de aportar beneficios adicionales a nuestra salud. Actualmente, existe una tendencia entre los consumidores dirigida hacia la ingesta de productos procedentes de fuentes naturales en contraposición a los obtenidos de forma sintética. En los últimos años, los compuestos bioactivos y los efectos que estos ejercen sobre la salud humana se han convertido en un aspecto fundamental. Como consecuencia de esta creciente nueva conciencia, son numerosos los trabajos de investigación que han surgido sobre las propiedades funcionales de extractos de algas, plantas e ingredientes naturales (Gonzalez-Molina y col., 2012; Pulz y Gross, 2004; Serrano y col., 2009; Sing y col., 2016; Svircev, 2005).

Esta nueva conciencia ha llevado además a la industria agroalimentaria a centrar su atención en el desarrollo de alimentos funcionales o nutraceuticos con numerosas propiedades beneficiosas para la salud (Lavecchia y col., 2013). Lo habitual hace algunos años atrás era que los compuestos con actividad nutraceutica añadidos a los alimentos fueran producidos quimicamente, pero las nuevas demandas por una vida sostenible han llevado gradualmente a que la industria alimentaria se mueva hacia los compuestos naturales. Así, hoy en día podemos encontrar en el mercado una gran variedad de productos funcionales como pasta, pan, salsas para ensaladas, helados, postres, yogures y otros productos lácteos, chocolatinas, chicles y refrescos consistentes en matrices alimentarias, a las que se les han incorporado extractos de especies botánicas con propiedades funcionales y nutraceuticas conocidas (Conroy y col., 2011; Gironés-Vilaplana y col., 2012; Gonzalez-Molina y col., 2008; 2009; Hung y col., 2009; Pulz y Gross, 2004; Sing y col., 2016, Svircev, 2005).

En este sentido existen algunos géneros de cianobacterias como *Spirulina*, *Aphanizomenon* y *Nostoc* se cultivan de forma facil y económica, están siendo utilizadas para el consumo humano ya que suponen una fuente de compuestos bioactivos y pigmentos naturales beneficiosos para la salud, como aminoácidos, minerales, vitaminas, ácidos grasos, β -carotenos y clorofila (Gutiérrez-Praena y col., 2013). Por ejemplo, *Spirulina* se produce bajo condiciones de cultivo controlado en China (Jiang y col., 2008) ya que su contenido de proteínas (50-70% peso seco (p.s.) incluye todos los aminoácidos esenciales, en particular leucina, valina e isoleucina y presenta una alta digestibilidad (Hoseini y col., 2013), es una fuente de ácidos grasos insaturados, vitaminas del grupo B y varios minerales, especialmente hierro (Belay y Houston, 2002). *Spirulina* está siendo utilizada en bebidas como la cerveza comercializada con el nombre de *Spirulina beer* y *Antiage beer* (Svircev, 2005).

Por otro lado, la Industria de la alimentación y bebidas en España es el motor de la economía española, supone el 20.5% del total de las ventas netas en el país. Se sitúa en el

cuarto puesto de la facturación en Europa, tras Alemania, Francia e Italia y el octavo del mundo. Concretamente el subsector de fabricación de bebidas, agua embotellada y bebidas carbonatadas son los más importantes en España (21.6 % de las ventas netas). Su importancia en la economía española supone un reto de enorme interés que se engloba dentro de los objetivos planteados en este proyecto ya que la mayoría de los compuestos bioactivos presentes en las cianobacterias gipsícolas no han sido probados hasta ahora como ingredientes o aditivos alimentarios. Los zumos de frutas son, habitualmente, utilizados como matrices alimentarias para la fabricación de alimentos funcionales. De hecho, estudios recientes han demostrado que las propiedades beneficiosas de los zumos de frutas se pueden incrementar con la adición de determinadas fuentes de antioxidantes (Gonzalez-Molina y col., 2009; Sánchez-Bel y col., 2015). Una de las principales limitaciones para la obtención de determinados zumos como el zumo de kiwi es precisamente la dificultad para mantener su color verde original, el cual, consecuencia de la oxidación, adquiere rápidamente tonalidades marrones (Cassano y Drioli, 2007). La adición de colorantes naturales procedentes de cianobacterias con alta capacidad antioxidante podría ayudar a estabilizar e incluso mejorar las apreciadas propiedades organolépticas de los zumos.

Otro de los retos que se plantea la industria agroalimentaria es la producción de hortalizas mínimamente procesadas mediante sistemas que reduzcan la huella del carbono y los residuos. El cambio en los hábitos socioeconómicos de la población ha favorecido la aparición en los mercados de productos hortofrutícolas mínimamente procesados o ready to eat. Bajo este término se agrupan las frutas y hortalizas frescas, lavadas y cortadas, preparadas para el consumo directo (Pretel y col., 1998). Generalmente estos productos están acondicionados en bolsas de películas plásticas, y conservados a temperaturas inferiores a 10°C, con una vida útil que oscila entre 7 y 10 días. El proceso de elaboración de productos de cuarta gama lleva consigo un incremento en el riesgo de alteraciones fisiológicas, bioquímicas y microbiológicas, ya que la rotura de las células que ocasiona el cortado, origina la descompartimentación celular y en consecuencia, se producen modificaciones sobre las principales cualidades organolépticas de frutas y hortalizas, como color, aroma y firmeza, incremento en el riesgo a alteraciones fisiológicas e incremento del desarrollo microbiano (Wulfkuehler y col., 2013; Abadias y col., 2008). Esta alta susceptibilidad a la contaminación microbiana hace que la preparación de hortalizas ecológicas sea una tarea difícil para la industria agroalimentaria, ya que la fertilización orgánica que se utiliza en los cultivos ecológicos incrementa la carga microbiana inicial de los productos, siendo muy complicada su eliminación para la elaboración de un producto final de calidad. Sin embargo, sigue aumentando la demanda de productos *ready to eat*

sanos, seguros y respetuosos con el medio ambiente.

La creciente preocupación por las consecuencias adversas del cambio climático ha impulsado a las empresas a buscar sistemas de producción que reduzcan las emisiones de gases y los residuos. Los consumidores están comenzando a exigir productos con bajas emisiones de carbono, por lo que necesitan información en las etiquetas para poder elegir productos cuya fabricación muestre un compromiso más firme frente a este problema. En este contexto, la huella de carbono se transforma en un indicador reconocido internacionalmente como un elemento más en los procesos de toma de decisiones de las empresas. Las empresas alimentarias que inicien el cálculo de su huella de carbono en sus productos se comprometen a desarrollar programas de reducción de sus emisiones. Además, al ser una certificación de producto, puede ser utilizada en la etiqueta y sirve por lo tanto de comunicación directa entre el productor y el consumidor. La certificación en huella de carbono es uno de los requisitos para la inclusión de la organización en el Sistema de compromisos Voluntarios de la Estrategia Española 2007-2012-2020, y para la inscripción en el “Registro de huella de carbono, compensación y proyectos de absorción de dióxido de carbono”, creado por el Real Decreto 163/2014, de 14 de marzo. Según este decreto, la biomasa no se considera como fuente emisora de GEI (Gases de Efecto Invernadero), por lo que los biofertilizantes elaborados a base de extractos de cianobacterias gipsícolas podrían ser una alternativa para la producción de hortalizas mínimamente procesadas o *ready to eat* mediante un sistema que reduzca la huella del carbono y los residuos generados.

Frente al cultivo tradicional, durante los últimos años, la producción hortícola de productos mínimamente procesados o *ready to eat* mediante técnicas de cultivo sin suelo, ha ido ganado interés (Klados y Tzortzakis, 2014) ya que supone un ahorro de agua, fertilizantes, tiempo, mano de obra, espacio, mayores tasas de supervivencia de plántulas jóvenes y mayor rendimiento en comparación con los sistemas de producción convencionales (Kotsiras y col., 2016). El innovador sistema de producción en bandejas flotantes, sobre las que crecen las plantas en una solución nutritiva, es sencillo y rápido para producir hortalizas foliáceas logrando minimizar la carga microbiana, lo que las hace idóneas como materias primas para el procesado mínimo en fresco (Petropoulos y col., 2016; Zanin y col., 2011). Sin embargo, este novedoso sistema utiliza sales minerales que pueden causar problemas ambientales por la filtración de residuos que finalmente llegan a ríos y mares (Massa y col., 2010).

Esta problemática, junto a la creciente demanda de productos sanos, de calidad y que a la vez respeten el medio ambiente, hace que sea interesante la búsqueda de nuevas alternativas de fertilización orgánica. En este sentido, hay estudios que muestran el

potencial de algunas cianobacterias como biofertilizantes naturales en agricultura ya que mejoran la fertilidad del suelo y estimulan el crecimiento de las plantas (El-Bahbohy y col., 2014). Muchas de estas cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y tienen actividad hormonal, lo que hace de estos microorganismos unos candidatos idóneos para ser utilizados como una alternativa frente a los fertilizantes químicos ya que son más respetuosos con el medio ambiente (Hussain y Hasnain, 2011; Osman y col. 2010). Algunos autores encontraron buenos resultados con combinaciones de fertilizantes químicos y biofertilizantes para el cultivo de guisantes reduciendo en un 50% los fertilizantes químicos (Osman y col., 2010). De forma similar, Pereira y col. (2009) estudiaron la viabilidad de las cianobacterias como fertilizante para los cultivos de arroz. Sin embargo, no hay hasta ahora estudios enfocados al cultivo hidropónico de productos vegetales mínimamente procesados, con fertilización a base de extractos de algas fijadoras de nitrógeno. Los productos obtenidos generarían menos residuos que el cultivo hidropónico tradicional y su huella de carbono podría ser muy baja.

Continuando con las aplicaciones potenciales que las cianobacterias podrían tener para en la industria agroalimentaria, sus propiedades bioactivas hacen de estos microorganismos unos candidatos ideales para su uso como productores de nuevos compuestos que mejoren la calidad de las frutas y hortalizas en postrecolección. Muchas frutas son altamente perecederas y con una reducida vida útil tras la recolección (Valero y Serrano, 2010, Serrano y col., 2009; Serradilla y col., 2010). La pérdida de los atributos de calidad y sobre-maduración viene acompañada en la mayoría de los casos con problemas severos de podredumbres, lo que hace inviable su comercialización y consumo. Algunas de las principales cepas de hongos responsables de podredumbres en frutos son *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Penicillium expansum* (Förster, y col., 2007). Además, las pérdidas de frutos a nivel postcosecha en países en vías de desarrollo puede variar entre el 20 y 50 % (FAO, 2011). Ante esta problemática, en los últimos años se han realizado tratamientos post-recolección para conservar la calidad e incrementar su vida comercial, constituyendo un tema de estudio de gran importancia entre los investigadores que trabajan en fisiología y post-recolección. La necesidad de frenar la contaminación, la generación de residuos y la emisión de GEI ha inducido al desarrollo y estudio de nuevos tratamientos con productos naturales para mantener la calidad de frutas y hortalizas durante un periodo de conservación adecuado para permitir su comercialización y distribución en mercados lejanos y que los frutos lleguen al consumidor con características óptimas de calidad (Martínez-Esplá y col., 2014; 2017).

1.4. Las cianobacterias de las biocostras yesíferas. Una fuente potencial de compuestos bioactivos.

Los aljezares o estepas yesosas son hábitats donde la presencia de afloramientos de yesos condiciona el desarrollo de una vegetación caracterizada por especies adaptadas a la elevada concentración de sales en el suelo y a la extrema aridez. Son comunidades vegetales de gran interés ecológico constituidas principalmente por especies endémicas muy importantes para la conservación.

En los suelos ricos en yesos, y en los suelos salinos en general, las plantas tienen mayores dificultades para la absorción de agua debido a un aumento en la presión osmótica por la presencia de sales, lo que genera un claro problema de estrés hídrico. Algunas plantas responden particularmente bien a estos casos y presentan una buena tolerancia al exceso de sales. Esta tolerancia o adaptación depende principalmente de acumular los excedentes de sal en lugares adecuados, más en las vacuolas que en el citoplasma, y de eliminarlos a través de glándulas o mediante el desprendimiento de hojas o tallos demasiado cargados de sales (Hasegawa y col., 2000). La acumulación de sales en las células implica que muchas plantas características de estos suelos, además de presentar las típicas adaptaciones a las condiciones de aridez, tengan hojas o tallos carnosos o suculentos. Sin embargo, algunos autores consideran que en suelos ricos en yesos crece una vegetación que parece no compartir una estrategia adaptativa común, como sí ocurre con los halófitos (Merlo y col., 2001). Por este motivo, estos investigadores no consideran especies especialistas, sino refugiadas. Desde este punto de vista, los gipsófitos compondrían una flora muy antigua adaptada a climas secos que han subsistido en hábitats desfavorables donde la competencia es menor.

Los yesos son un tipo de hábitat extendido por todo el Globo ocupando aproximadamente 100 millones de hectáreas, sobre todo en climas áridos y semiáridos destacando Somalia, Australia, Oriente Próximo, EEUU y región circunmediterránea. España presenta la mayor extensión de afloramientos de yesos de Europa, representando un 7,2% de su superficie total y una extensión que se estima en 35.487 km². El 60% de los suelos yesíferos españoles se extienden fundamentalmente por la mitad oriental de la Península Ibérica (Mota y col., 2011). La superficie de estos afloramientos es muy variable, junto a grandes extensiones de yeso más o menos continuas, existen pequeños afloramientos que salpican todo el territorio nacional. Abarca desde los valles del Duero y del Ebro, en el norte; el Valle del Tajo y zonas cercanas de la Mancha y la Comunidad de Madrid, en el centro; hasta el valle del Guadalquivir con algunas localizaciones al pie de las sierras Subbéticas y otros territorios aledaños, en el sur de Andalucía que se extienden

hacia zonas litorales y prelitorales de la Comunidad Valenciana y la Región de Murcia.

La existencia de estos ambientes en zonas marginales y con escaso valor productivo ha hecho que su estudio haya sido tradicionalmente obviado. Sin embargo, el descubrimiento de yeso en Marte, según los datos de la MRO (Mars Reconnaissance Orbiter), ha constituido una esperanza ya que estos sistemas se presentan como un laboratorio ideal para el estudio de la ecología microbiana e interacciones microorganismos-roca en estos ambientes (Dong y col., 2007). Muy recientemente se ha creado GYALNET, una red de investigadores a nivel mundial que estudian cualquier tipo de organismos que se desarrollan en ambientes yesíferos con la intención de promocionar y valorar este tipo de ambientes.

Junto con las condiciones de aridez, los suelos gipsófilos muestran una serie de características físicas y químicas que los convierten en particularmente restrictivos para la vida de las plantas. Sorprendentemente, a pesar de su naturaleza limitante alberga una flora altamente diversificada y especializada que constituye una prioridad de conservación global. A pesar de su importancia, y a diferencia de otros sustratos especiales como suelos salinos o serpentinos, los suelos yesíferos han recibido poca atención en el pasado y los mecanismos utilizados por organismos para vivir en ellos permanecen todavía desconocidos. En los suelos yesíferos se distinguen dos partes: la más aparente formada por una vegetación compuesta por un matorral abierto en el que se desarrollan plantas exclusivamente gipsícolas y la parte predominante constituida por costras bióticas formadas por comunidades de briófitos, líquenes y cianobacterias.

Las particulares características del suelo condicionan fuertemente la vegetación y favorecen la presencia de numerosas especies endémicas, lo que les confiere un carácter original. La vegetación gipsícola del sureste ibérico es bastante diversa y se distribuye sobre un conjunto de afloramientos de yesos de superficie variable. Desde el punto de vista fitosociológico se reconocen varias Asociaciones recogidas en el listado de la Directiva Hábitat como prioritarias, 1520 * Vegetación gipsícola ibérica (*Gypsophiletalia*) (Alcaraz y col. 2008).

Por otro lado, las biocostras recubren parte de la superficie de estos suelos y del yeso-roca aflorante participando de forma activa en la alteración de la roca y consecuente formación del suelo. Como en pocos ecosistemas de la tierra, en las yeseras las costras biológicas tienen un enorme protagonismo y marcan, en gran medida, el funcionamiento de los mismos: da estabilidad al sistema protegiendo estos suelos frente a los procesos erosivos, controla buena parte de la productividad primaria y favorecen la retención e infiltración del agua de lluvia en los suelos. Cianobacterias, algas, líquenes y musgos

conforman tapices que pueden llegar a ser casi continuos sobre el suelo. Si se sumara toda esta diversidad criptogámica a la que presenta la flora vascular obtendríamos valores extraordinarios. Aunque la flora criptogámica no cuenta con endemismos de área muy restringida, algunas especies representan disyunciones notables que relacionan la red de zonas áridas del mundo (Asencio y Aboal., 2003). Expresan estrategias de supervivencia extraordinarias con una capacidad de resistencia sin igual. Esta flora también incluye elementos notables cuya conservación es inexcusable. No hay duda de que para gestionar y conservar los aljezares hay que profundizar en el conocimiento taxonómico, filogenético y ecológico de estos organismos. Destacan las comunidades de líquenes y musgos ampliamente estudiadas y reconocidas (Egea y Alonso., 1996, Guerra y col., 1995) mientras que muy poco se sabe de las comunidades de cianobacterias (Domínguez y Asencio., 2011) aunque están ampliamente distribuidas en los ambientes yesíferos.

Datos relativamente recientes señalan que la superficie ocupada por hábitats yesíferos está experimentando un profundo declive (Escudero, 2009). Esto se debe a la roturación de terrenos marginales de baja productividad, a la forestación de tierras agrícolas marginales, y a las canteras de yesos, problema especialmente acuciante en el sureste peninsular. Los efectos sinérgicos del cambio climático y de los cambios de uso constituirán una de las principales alteraciones con efectos sobre la biodiversidad en los próximos decenios (Fernández-González y col., 2005). Sin embargo, la biodiversidad conforma un componente clave en las estrategias de mitigación y adaptación al cambio climático, ya que, para un ecosistema dado, las comunidades funcionalmente más diversas probablemente puedan adaptarse mejor al cambio y la variabilidad climática, que las comunidades empobrecidas (Convention on Biological Diversity, 2003). Estos cambios constituyen una incertidumbre, son difíciles de estimar y necesitan estudio y monitorización para aproximarse a los hechos futuros lo máximo posible con la finalidad de evitar la pérdida de diversidad, ya que en los ambientes semiáridos encontramos una biodiversidad emblemática y peculiar a nivel europeo. Puesto que se asume de forma cada vez más generalizada que el cambio climático influye también en las interacciones bióticas, es esencial tenerlas en cuenta en la predicción de la distribución y abundancia de las especies (Van der Putten y col., 2010).

Las yeseras constituyen un sistema muy sensible frente a variaciones climáticas como las derivadas del cambio climático (Miranda y col., 2004), en donde las cianobacterias adquieren gran relevancia ya que poseen adaptaciones para tolerar ambientes extremos con elevada radiación ultravioleta, elevadas temperaturas y altos niveles de salinidad. En un escenario de cambio climático, las cianobacterias jugarán un papel relevante en la resiliencia a las perturbaciones con la síntesis de una gran diversidad de metabolitos

secundarios con estructuras poco frecuentes y potente bioactividad de gran importancia desde el punto de vista biotecnológico e industrial. El término extremófilo es ampliamente utilizado para definir a aquellos organismos que viven óptimamente en ambientes extremos. La mayoría son microorganismos ya que su mayor versatilidad metabólica, la mayor sencillez estructural y el bajo tiempo de generación son las causas de una mayor capacidad de variación genética y de una mayor adaptación al medio extremo. Por ejemplo, *Chroococcidiopsis sp*, es una cianobacteria que habita a temperaturas de -50 °C en la Antártida (Magana-Arachchi y Wanigatunge, 2013). Los organismos extremófilos presentan un enorme potencial para los procesos industriales y biotecnológicos. Muchos de estos organismos desarrollan algunas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, las cianobacterias se consideran una fuente prolífica de metabolitos secundarios con un amplio espectro de de compuestos bioactivos y alto potencial para su uso en la industria agroalimentaria. Sin embargo, éstos recursos aún no han sido convenientemente explotados (Aberoumand, 2011; Ghosh y col., 2016; Haque y col., 2017). Además, todavía existen nuevos taxones procedentes de distintos hábitats, entre los que se encuentran los ecosistemas gipsícolas, que no se han estudiado y necesitan ser examinados para detectar sus metabolitos bioactivos.

Por todo lo expuesto anteriormente, en este proyecto se pretende caracterizar algunos metabolitos secundarios de cuatro especies de cianobacterias de yesos pocos estudiadas hasta el momento. Al mismo tiempo, se pretende enfatizar en el interés para la conservación de los hábitats yesíferos como fuente de diversidad de cianobacterias con potencial actividad bioactiva y potencial interés económico.

2. OBJETIVOS.

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es caracterizar cuatro especies de cianobacterias gipsícolas desde el punto de vista de sus compuestos bioactivos. Para obtener este objetivo general se plantean los siguientes objetivos parciales:

1º Optimizar métodos de extracción y cuantificación de compuestos bioactivos (polifenoles, actividad antioxidante hidrosoluble y liposoluble, ficobiliproteínas, clorofilas y carotenoides) en microalgas comerciales: *Chlorella* y *Spirulina*.

2º Aplicar las técnicas anteriormente optimizadas en muestras de cuatro especies de cianobacterias gipsícolas: *Tolypothrix byssoidea*, *Gloeotheca confluens*, *Gloeocapsa novacekii* y *Scytonema ocellatum*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Material vegetal. Obtención de biomasa.

Las biomásas comerciales *Chlorella* y *Spirulina* se adquirieron en una herboristería y tienda de dietética en Orihuela, (Alicante). Como se puede apreciar en las figuras 1 y 2 se trata de formatos comerciales destinados al consumidor, 80 g *Chlorella* y 200 g *Spirulina*.



Figura 1. Chlorella obtenida en tienda de herboristería



Figura 2. Spirulina obtenida en tienda de herboristería

La obtención de las muestras de cianobacterias gipsícolas: *Tolypothrix byssoidea*, *Gloeotheca confluens*, *Gloeocapsa novacekii* y *Scytonema ocellatum*, se realizó mediante la extracción en ambientes yeseros de zonas litorales y prelitorales de la Comunidad Valenciana y la Región de Murcia. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de la UMH donde el grupo de investigación "Biodiversidad, Taxonomía, Filogenia, Ecofisiología y Biotecnología de algas" reprodujo, desarrolló y purificó las muestras. La obtención de la biomasa para el siguiente estudio se ha realizado con las siguientes condiciones de cultivo:

- Medio BG11
- Temperatura 20 °C
- Radiación activa fotosintética 600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$
- Fotoperiodo 18:6 h

Además, en cultivos líquidos:

- Tiempo de cultivo para recoger biomasa 28 días
- Aireación continua

En las siguientes figuras 3, 4, 5 y 5 se puede observar las placas Petri de crecimiento de las cianobacterias así como su vista a microscopio.

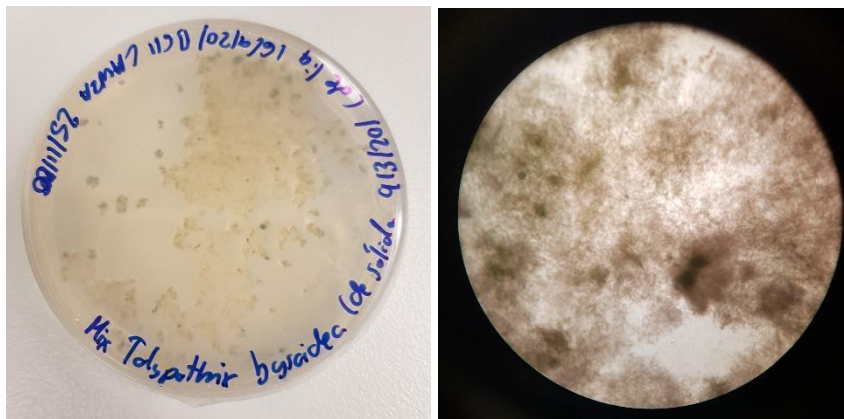


Figura 3. *Tolypothrix byssoidea*

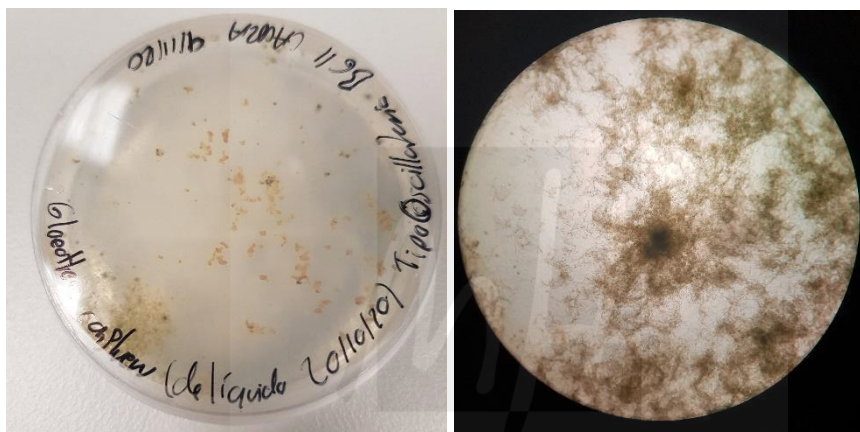


Figura 4. *Gloeotheca confluens*

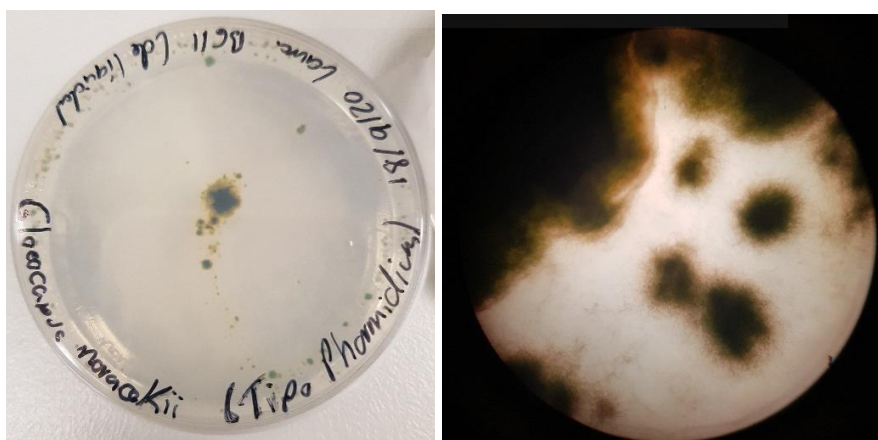


Figura 5. *Gloeocapsa novacekii*

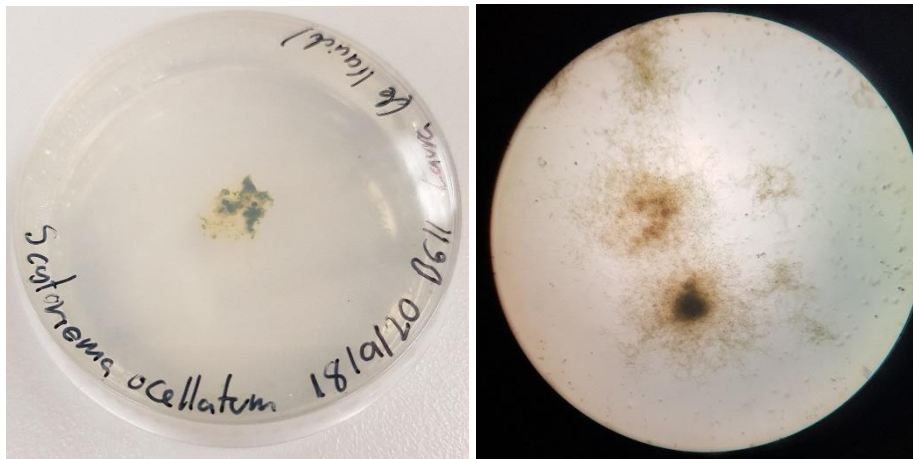


Figura 6. *Scytonema ocellatum*

Una vez cultivadas las cianobacterias, se realizó una liofilización de las muestras y posteriormente se guardaron en tubos Falcon identificados, sellados con Parafilm y mantenidos en congelación a -20 °C para su óptima conservación (figura 7).



Figura 7. Muestras de cianobacterias liofilizadas

3.2. Cuantificación e identificación de polifenoles.

Para la identificación de polifenoles, primero se realizó la puesta a punto con las muestras de *Chlorella* y *Spirulina* donde se concluyó que la mejor extracción de polifenoles se obtenía con 10 mg de muestra en 1 mL de agua destilada, 22 h a 4°C de incubación y posteriormente 1 h de ultrasonidos.

En la determinación de fenoles se basa en la medida de la absorbancia para comparar los resultados con una recta de calibrado en este caso de ácido gálico que en ella

se abarcan las absorbancias correspondientes a distintas concentraciones de un patrón de contenido en fenoles conocido.

Materiales

- Micropipeta (100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)
- Eppendorf
- Potter-Elvehjem
- Cubetas de plástico de 3 mL para espectrofotometría visible
- Tubo de ensayo
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica
- Reactivo de Folin
- Agua destilada
- Agitador (Vortex)

Preparación de disoluciones patrón ácido gálico:

- ❖ Primero, preparar los tubos de ensayo numerados.
- ❖ Añadir a cada tubo el volumen de agua destilada
- ❖ Añadir a cada tubo el volumen de ácido gálico correspondiente
- ❖ Agitar en el vortex durante 2 min y mantener en oscuridad y refrigeración.

Miguel Hernández

Tabla 1. Preparación de la curva patrón de ácido gálico 1mM

| | RECTA PATRÓN POLIFENOLES TOTALES (ácido gálico 1mM) | | | | | | |
|------------------------------------|--|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| μL cubeta | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 |
| μg a. gálico | 4,705 | 9,41 | 18,81 | 28,22 | 37,63 | 47,03 | 56,44 |

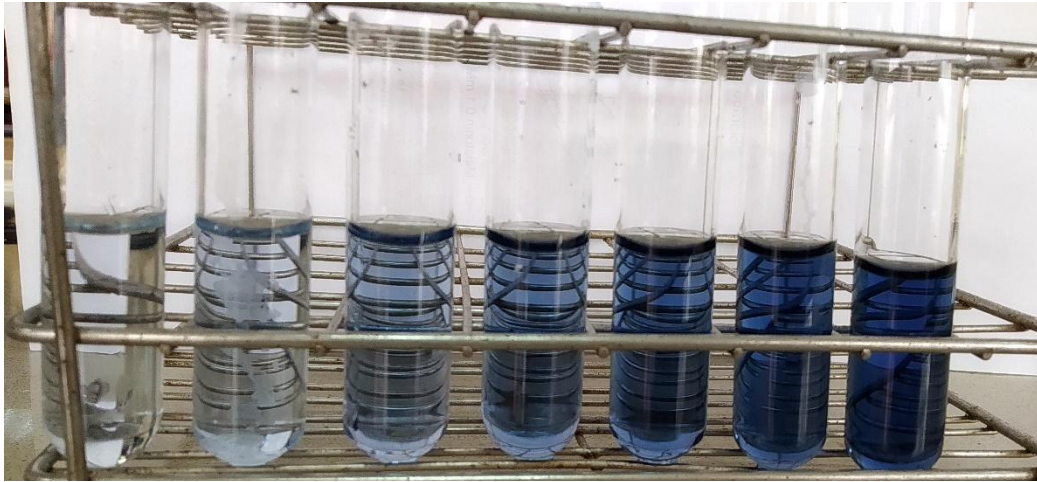


Figura 8. Muestras de ácido gálico con reactivo Folin para preparar recta patrón
La ecuación de la recta patrón de ácido gálico fue $y = 0.0198x$ $r^2 = 0.9986$

Preparación del extracto de cianobacterias comerciales para determinar polifenoles

Tras pesar 10 mg de cada una de las muestras e introducir en el eppendorf por triplicado, se añadieron 0,5 ml de agua y con ayuda de un micro pistilo se homogeneizó la muestra, después, se adicionó otros 0,5 ml de agua restantes y se limpió el pistilo. Se agitó en vortex durante 5 min y se dejó reposar en oscuridad 22 h a 4°C. Después se pasaron a baño de ultrasonidos durante 1 h a 4°C. Seguidamente se centrifugó a 10000 rev min⁻¹ y 4°C.

Finalmente, se procede a pasar 100 µl de extracto a tubos de ensayo y se adiciona 2,5 ml de Folin 1:10 diluido del original y 400 µl de agua destilada. En el caso del blanco se introduce 2,5 ml de reactivo de Folin y 500 µl de agua. Se agita y se deja reposar 5 min. Después se añade carbonato de sodio, se agita y se deja reposar 10 minutos.



Figura 9. Extracciones de muestras *Chlorella* y *Spirulina* para la cuantificación de polifenoles

A partir de los valores obtenidos de absorbancia y los valores conocidos de peso de muestra y volumen de extracto, teniendo en cuenta la recta patrón de ácido gálico se puede calcular la cantidad de polifenoles en las muestras de cianobacterias comerciales.

3.3. Cuantificación de la Actividad Antioxidante Hidrosoluble (AAH), liposoluble (AAL) y actividad antioxidante total (AAT)

Es muy usual el uso de compuestos como el ABTS (2,2'-azinobis [ácido 3-etilbenzothiazoline-6-sulfónico]) para determinar la actividad antioxidante. Este compuesto cromogénico redox, tiene una alta solubilidad en agua y es muy estable desde un punto de vista químico. Es un sustrato de la peroxidasa, el cual cuando es oxidado en presencia de H_2O_2 genera un radical el cual tiene un espectro de absorción característico detectado a 414nm. Sin embargo, existe una máxima absorción secundaria en las longitudes de onda de 645, 734 y 815 nm.

La acción de los antioxidantes sobre estos radicales ABTS radica en la eliminación de estos radicales ABTS y no por la inhibición de su formación, por tanto, podemos postular que a mayor capacidad de eliminación de estos radicales, mayor será el potencial antioxidante del extracto empleado.

Materiales

- Pipetas (100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)
- Matraz aforado 1000 mL
- Cubeta de plástico
- Espectrofotómetro
- Centrifugadora
- Gradilla
- Cronómetro
- Eppendorf
- Agitador (vortex)
- Vaso precipitado

Antes de comenzar a realizar el procedimiento se deben preparar los reactivos:

Tampón Fosfato 50 mM (Extractos):

Pesar 1,7g de KH_2PO_4 y disolverlo en 250 mL de Agua ultrapura.

Pesar 2,177g de $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ y disolverlo en 250 mL de Agua ultrapura.

Disponer en un vaso de 500 mL los 250 ml de $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ y verter poco a poco la disolución monobásica (KH_2PO_4) hasta alcanzar el pH 7,5.

Tampón Glicina 50 Mm:

Pesar 0,938 g de Glicina y disolverla en 250 mL de agua ultrapura. Ajustar el pH con HCl hasta 4,5.

H_2O_2 1 mM: Tomar 100 μ L de H_2O_2 y adicionarle 900 μ L de agua ultrapura. Tomar 28,3 μ L y adicionarle 25 mL de agua ultrapura.

ABTS 10 mM: Pesar 0,055 g y disolverlos en 10 mL de agua ultrapura.

Peroxidasa 10 μ M: Pesar 0,0044 g y disolverlos en 10 mL de agua ultrapura

Una vez preparados los reactivos, se pesan 10 mg de muestra por triplicado y se adiciona 1 mL tampón fosfato que se homogeniza con ayuda de un Potter-Elvehjem, añadiendo 0,5 ml de tampón, se mezcla y los 0,5 mL de tampón restantes se añaden a continuación haciendo mayor insistencia en las paredes del Potter-Elvehjem para limpiarlo evitando pérdidas de la muestra, después introducimos 0,5ml de etil acetato. Seguidamente introduciremos los eppendorf en la centrifuga durante 15 min a 15000 rev/min y 4 °C. En la figura 10 podemos observar el resultado de esta separación apareciendo en la parte superior el extracto liposoluble, en el centro el extracto hidrosoluble y en el fondo los residuos de la muestra o pellets.

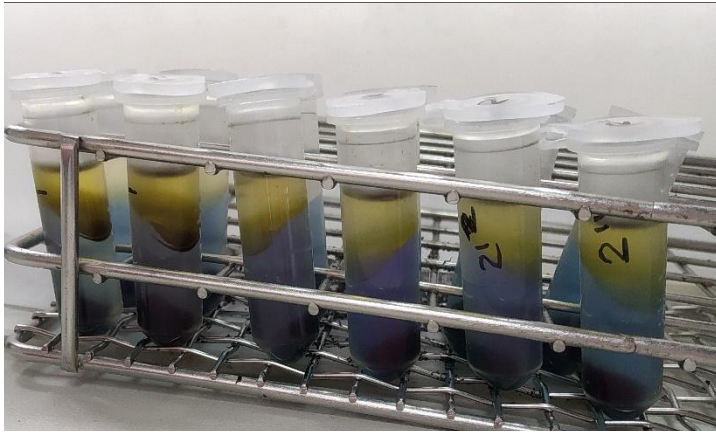


Figura 10. Muestras con separación de fases liposolubles e hidrosolubles

Durante la centrifugación procedemos a preparar el calibrado del espectrofotómetro realizando un blanco, se empieza por el blanco para la actividad antioxidante liposoluble ya que una vez se adicione el etil acetato, este compuesto se evapora conforme avanza el tiempo por lo tanto para obtener mejores resultados es necesario realizar esta medida en el menor tiempo posible, para la preparación del blanco de AAL se introduce 890 μL de etanol, 30 μL de ABTS y 30 μL de peróxido de hidrógeno, en el caso del blanco de la AAH que se realiza después de medir la AAL se adiciona 890 μL de glicina, 30 μL ABTS y 30 μL de peróxido de hidrogeno.

Una vez calibrado el espectrofotómetro se introduce en la cubeta para la AAL 825 μL de tampón glicina, 25 μL de ABTS, 25 μL de peróxido de hidrógeno, a continuación, se mide a 730 nm, sacamos la cubeta y le adicionamos 100 μL de muestra de extracto liposoluble y volvemos a medir la absorbancia cada 30 y 60 segundos. Establecemos la AAH de la muestra como la diferencia entre las dos medidas.

En el caso de la actividad antioxidante hidrosoluble, realizamos el blanco y después introducimos en la cubeta 25 μL de ATS, 25 μL de peróxido de hidrógeno, 25 μL de peroxidasa y 825 μL de etanol, en ese orden respectivamente ya que de lo contrario no se producirá la reacción, medimos la absorbancia a 730 nm, sacamos la cubeta y adicionamos 100 μL del extracto hidrosoluble y se vuelve a medir la absorbancia cada 30 y 60 segundos. Se establece la AAL de la muestra como la diferencia entre las dos medidas.

Finalmente, se realiza el mismo procedimiento para la realización de la recta patrón con Trolox, que es un compuesto ampliamente utilizado como referencia de actividades antioxidantes. Las ecuaciones de las rectas patrón Trolox con los reactivos hidrosolubles fue $y = 0.1739x$ $r^2 = 0.9918$ y para liposolubles fue $y = 0.31981x$ $r^2 = 0.9469$.

3.4. Cuantificación de las ficobiliproteínas.

Para la cuantificación de las ficobiliproteínas se utilizaron al igual que con las determinaciones anteriores, primero las microalgas comerciales y una vez optimizado el método se cuantificaron las cianobacterias cultivadas en el laboratorio.

Materiales

- Papel de aluminio (oscuridad)
- Hielo
- Centrifuga
- Eppendorf
- Tubos de ensayo
- Espectrofotómetro
- Potter-Elvehjem
- Micropipetas 100 µL, 200 µL, 1000 µL
- Tampón fosfato pH 6,5
- Balanza analítica

La cuantificación de ficobiliproteínas se realizó primero con *Chlorella* y *Spirulina* con diferentes masas de muestra de 5 mg y 10 mg por triplicado.

Primero se pesan los 5 mg y 10 mg por triplicado de cada una de las muestras y se introducen en un eppendorf. Una vez pesada la muestra se trabaja en oscuridad y se añade 2,5 mL de tampón fosfato y se tritura con ayuda de un micropistilo o potter-elvehjem para obtener una muestra más homogénea. Las muestras se centrifugan durante 15 min a 10000 g y 4 °C. Finalmente, se miden las absorbancias del sobrenadante a 652 nm, 615 nm y 562 nm. Con los resultados obtenidos y utilizando las fórmulas de *Bennet* y *Bogorad* (1973) se calcularon las concentraciones de ficobiliproteínas.

$$c - \text{ficocianina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Abs } 615 \text{ nm} - 0,474 * \text{Abs } 652 \text{ nm}}{5,34}$$

$$a - \text{aloficocianina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Abs } 552 \text{ nm} - 0,208 * \text{Abs } 615 \text{ nm}}{5,09}$$

$$r - \text{ficoeritrina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{(\text{Abs } 562 \text{ nm} - (2,41 * c - \text{fico} \frac{\text{mg}}{\text{ml}}) - 0,849 * a - \text{alo} \frac{\text{mg}}{\text{ml}})}{9,62}$$

Tras obtener los resultados en las muestras patrón se concluyó que se obtienen mejores resultados con 10 mg de muestras por lo tanto para la cuantificación de ficobiliproteínas de

las muestras de biomasa se usaron 10 mg de muestra por triplicado de los cuatro tipos de cianobacterias y siguiendo el procedimiento anterior.

En la figura 11 se aprecian las extracciones para determinar las ficobiliproteínas de las muestras de referencia *Chlorella* y *Spirulina*.



Figura 11. Extracción de ficobiliproteínas en *Chlorella* y *Spirulina*

3.5. Cuantificación de las clorofilas, carotenoides y scytonemina

Materiales

- Muestra
- Papel de aluminio
- Hielo
- Tubos de ensayo
- Eppendorf (2 mL)
- Centrifuga
- Micropipetas
- Potter-Elvehjem
- Jeringuilla
- Filtro GF/F estéril
- Espectrofotómetro
- Cubeta de vidrio
- Acetona



En la cuantificación de clorofilas, carotenoides y escitoneminas se ha pesado 1 mg de muestra tanto para *Chlorella* y *Spirulina* como para las cuatro algas, todas por triplicado.

Una vez pesadas las muestras e introducidas en los eppendorf, con ayuda de un Potter-Elvehjem se tritura y se adiciona lentamente con una micropipeta 1 mL de acetona pura consiguiendo una muestra más homogénea.

Se agita durante 4 minutos y posteriormente se guarda 24 h a 4°C tapado con papel de aluminio para conseguir oscuridad y evitar deterioros en la muestra que puedan interferir en los resultados.

Pasadas 24 h se vuelve a agitar durante 3 minutos y se centrifuga durante 30 min a 6000 rev min⁻¹.

Tras la centrifugación se recoge el sobrenadante con una jeringuilla y se pasa la muestra por un filtro 0.45 µm para eliminar impurezas que interfieran en los resultados.

Finalmente, con todas las muestras limpias de impurezas se pasa a cubetas de vidrio puesto que se está trabajando con acetona y se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a 384 nm, 490 nm y 663 nm. En la figura 12 se aprecian las extracciones de carotenoides, clorofilas y scytonemina en *Chlorella* y *Spirulina*. Con los resultados obtenidos y las siguientes fórmulas obtenemos el contenido de clorofilas, carotenoides y escitoneminas.

$$\text{Escitonemina} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = 2 * \left(\frac{1.04 * \text{Abs } 384 \text{ nm} - 0.79 * \text{Abs } 663 \text{ nm} - 0.27 * \text{Abs } 490 \text{ nm}}{\text{Abs } 384 \text{ nm}} \right) * (0.002/0.001)$$

$$\text{Clorofila a} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = 2 * \left(\frac{1.02 * \text{Abs } 663 \text{ nm} - 0.027 * \text{Abs } 384 \text{ nm} + 0.01 * \text{Abs } 663 \text{ nm}}{\text{Abs } 663 \text{ nm}} \right)$$

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = 2 * \left(\frac{1.02 * \text{Abs } 490 \text{ nm} - 0.08 * \text{Abs } 384 \text{ nm} - 0.026 * \text{Abs } 663 \text{ nm}}{\text{Abs } 490} \right)$$



Figura 12. Extracción de carotenoides, clorofilas y scytonemina en *Chlorella* y *Spirulina*

3.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se han expresado como media ± ES y se analizaron estadísticamente con el software IBM SPSS Statistics versión 20. Se realizó inicialmente un análisis multivariante con factor fijo cianobacteria y las variables dependientes fueron las determinaciones de los compuestos bioactivos. El nivel de significación se fijó en p<0,05 y se realizó la comparación de medias para los distintos subconjuntos o tratamientos

utilizando el test Tukey. Además, se llevaron a cabo los análisis de correlación de Pearson para estudiar la relación entre las distintas variables estudiadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Optimización de los métodos en algas comerciales *Chlorella* y *Spirulina*.

4.1.1 Cuantificación de polifenoles

En primer lugar, se llevó a cabo la realización de una recta de calibrado con ácido gálico. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin a pH básico apareciendo un color azul que es determinado espectrofotométricamente. Este reactivo contiene una mezcla de compuestos (volframato y molibdato sódicos en ácido fosfórico) de color amarillo que reaccionan con los fenoles reduciéndose y apareciendo un color azul, cuya intensidad es la que se mide para conocer el contenido de polifenoles, es decir, se produce una reacción redox con la que se puede conocer la actividad antioxidante.

Se utilizó ácido gálico como patrón, la ecuación de la recta fue: $y = 0.0198x$
 $r^2 = 0.9986$.

Con el fin de optimizar la cantidad de biomasa de cianobacterias para llevar a cabo una óptima extracción de polifenoles se utiliza el método propuesto por Wood y col., (2002). para frutas y hortalizas, metanol: agua (8:2), también se estudió la influencia de diferentes cantidades de biomasa sobre la capacidad de extracción. En la figura 13, se puede apreciar que *Spirulina* tiene aproximadamente el doble de fenoles que *Chlorella*. Sin embargo, en ambas especies, *Chlorella* y *Spirulina*, a medida que la cantidad de biomasa aumenta, la capacidad de extracción disminuye, por lo que se decide utilizar la menor cantidad, 20 mg. Además, se repitieron estas extracciones con otras proporciones de metanol y agua, observando que las mayores absorbancias y por tanto las mejores extracciones se producían con agua destilada.

Posteriormente, se evaluó la influencia de los procesos de extracción, tiempo de incubación a 4°C y aplicación de ultrasonidos. Los resultados se pueden apreciar en la figura 14, donde se observa que el ultrasonido mejora la capacidad de extracción.

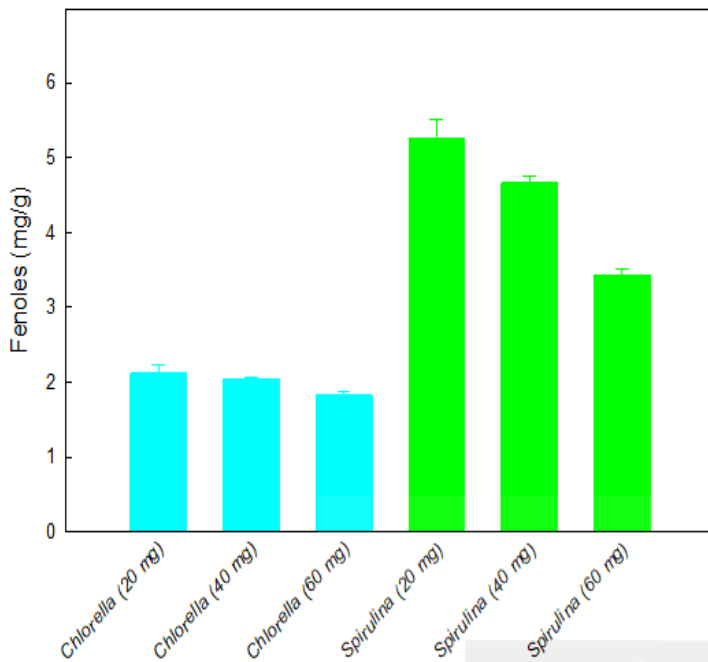


Figura 13. Optimización de la concentración del extracto. Polifenoles totales (mg gálico eq g^{-1} ps) con diferentes concentraciones (20, 40 y 60 mg/g ps).

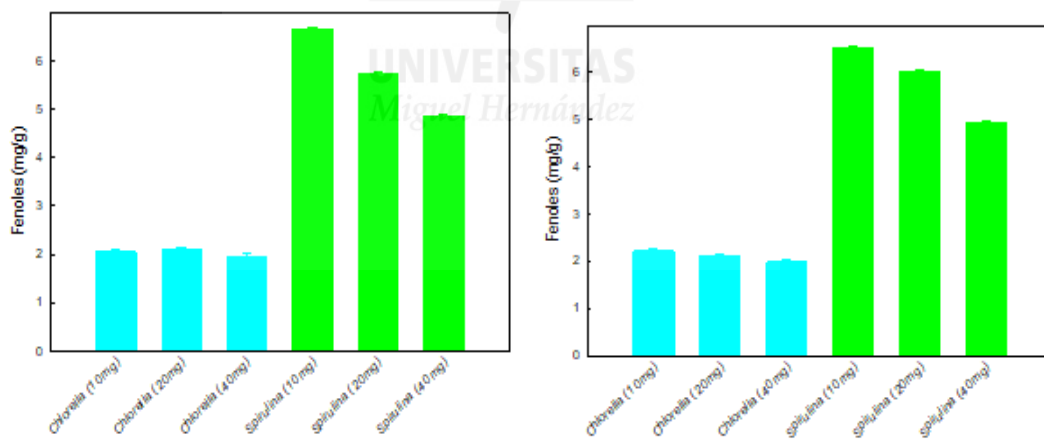


Figura 14. Optimización del método de extracción. Polifenoles totales (mg gálico eq. g^{-1} ps) con diferentes métodos de extracción y diferentes concentraciones (10, 20 y 40 mg/g ps). Incubación 22 horas a 4°C (izquierda) y combinación de ultrasonidos e incubación 22 horas a 4°C (derecha).

Existe un ligero aumento en la capacidad de extracción de los polifenoles por el efecto de los ultrasonidos, tal como se puede apreciar en la figura 14. También se observó que con cantidades de 10 mg de muestra se obtuvieron mejores extracciones, por lo que se decidió que esta sería la cantidad a utilizar.

Por tanto, para la cuantificación de polifenoles los mejores resultados se obtienen con 10 mg, 22 h a 4°C y 1 h ultrasonidos. Este será el método que se utilizará para la cuantificación de polifenoles en cianobacterias de yesos.

Diversos autores (Singleton y col, 1999). utilizan para la extracción ultrasonidos e incrementan el tiempo de extracción en frío para mejorar la capacidad de extracción en algunas especies de algas. Por tanto, para continuar optimizando el método de extracción para la cuantificación de polifenoles a partir de biomasa algales, se ensayaron diferentes cantidades de biomasa (20, 40 y 60 mg) con extracción durante 60 minutos en ultrasonidos y en frío. Nuevamente se observa (figura 17) que la capacidad de extracción disminuye a medida que la cantidad de biomasa aumenta, especialmente cuando el contenido de polifenoles es mayor, como es el caso de *Spirulina*. Por tanto, se seleccionó como mejor opción utilizar 10 mg de biomasa.

Además, algunos autores observaron una mejora en la capacidad de extracción si, además de utilizar frío y ultrasonidos, se deja durante 24 horas en agitación en frío (Gil y col., 2002). De acuerdo con estos autores y, con el fin de asegurar que el método de extracción de polifenoles es el óptimo se llevó a cabo un ensayo combinando concentraciones más bajas, ultrasonidos, tiempo y baja temperatura. Se observó que no existe un gran aumento en la capacidad de extracción tras la incubación de 22 h a 4°C y seguidamente aplicar los ultrasonidos durante 1h 4°. Sin embargo, al comprobar que había un ligero aumento, y puesto que la bibliografía lo recomienda, se decide incluir este proceso en la optimización de la extracción de los compuestos bioactivos de las cianobacterias.

Como en los ensayos anteriores (figura 13 y 14), teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos con *Chlorella* y *Spirulina*, para llevar a cabo la cuantificación de polifenoles en cianobacterias de biocostras yesíferas se utilizarán 10 mg de biomasa, y la extracción se realizará durante 22 horas de incubación a 4°C más 1 hora en ultrasonidos a 4°C.

4.1.2 Cuantificación de la capacidad antioxidante hidrosoluble (AAH) y liposoluble (AAL).

El objetivo de este estudio fue optimizar los métodos con estas algas comerciales, ya que el proceso de obtención de biomasa de algas de yesos es un proceso largo y costoso y con el fin de utilizar la menos cantidad de biomasa posible.

En la figura 15 se observa que la *Spirulina* contiene mayor contenido en AAH y con ello mayor AAT esto indica que tiene mayor capacidad antioxidante que la *Chlorella*.

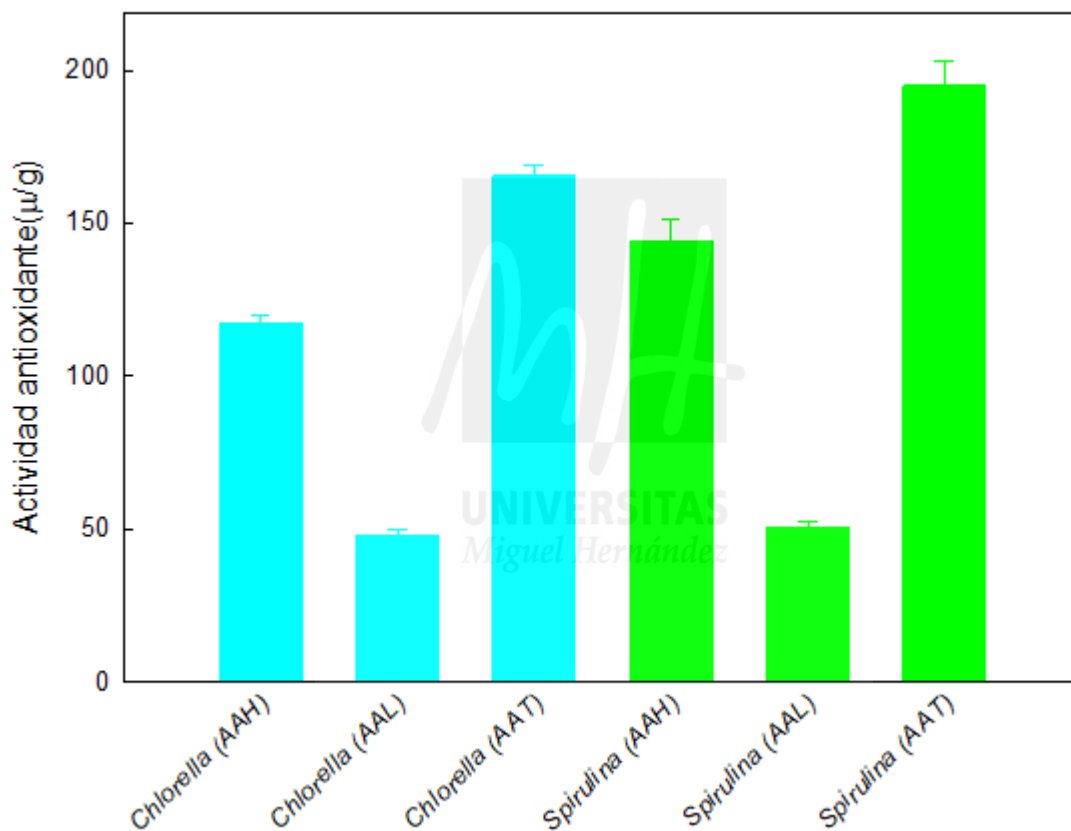


Figura 15. Actividad antioxidante hidrosoluble (AAH), liposoluble (AAL) y total (AAT) de *Chlorella* y *Spirulina*. Los datos son la media \pm EE de tres determinaciones.

4.1.3 Cuantificación de ficobiliproteínas (c-ficocianina, a-aloficocianina y r-ficoeritrina).

Las ficobiliproteínas son holoproteínas hidrosolubles que se encuentran presentes en cianobacterias y en los cloroplastos de algunas algas como *rhodophytas*, *cryptomonas*, su función es absorber energía solar que a continuación se transfiere a la clorofila durante el proceso de fotosíntesis (García y col., 2006).

En la tabla 2 se muestran los resultados sobre ficobiliproteínas (c-ficocianina, a-aloficocianina y r-ficoeritrina), como se puede apreciar en caso de la r-ficoeritrina no la contiene ninguna de las algas utilizadas para optimizar el método (*Chlorella* y *Spirulina*), en cuanto a la c-ficocianina se encuentran en gran proporción en *Spirulina* y ausente en *Chlorella*, finalmente, a-aloficocianina se encuentra en ambas algas pero en mayor concentración en *Spirulina* en comparación con *Chlorella* por lo tanto se puede concluir que *Spirulina* tiene mayor contenido en ficobiliproteínas.

Tabla 2. Ficobiliproteínas (c-ficocianina, a-aloficocianina y r-ficoeritrina) en *Chlorella* y *Spirulina*.

| Especie | Ficobiliproteínas (mg g ⁻¹ p s) | | |
|------------------|--|------------------|----------------|
| | c-ficocianina | a-aloficocianina | r-ficoeritrina |
| <i>Chlorella</i> | - | 1,13±0,20 | - |
| <i>Spirulina</i> | 38,73±7,71 | 18,85±3,60 | - |

4.1.4 Cuantificación de Scytonemina, clorofilas, y carotenoides en *Chlorella* y *Spirulina*.

En las microalgas los carotenoides pueden encontrarse en las membranas tilacoidales de los cloroplastos o en el interior de cuerpos lipídicos, fuera de los mismos (Siefermann-Harms, 1987; Yong y Lee, 1991; Bidigare y col., 1993). También, desarrollan una función de fotoprotección, previniendo la fotooxidación, ya que atenúan o desenergetizan especies reactivas de oxígeno, así como la clorofila en estado excitado (Siefermann-Harms, 1987; Young y Lee, 1991; Bidigare y col., 1993).

Por ello, también es de gran interés conocer su contenido en las cianobacterias tanto en las comerciales como en las algas yesíferas del estudio.

En la figura 16, se observa que en ambas algas comerciales la clorofila a es la que se encuentra en mayor concentración, aunque ligeramente superior en *Spirulina*, en el caso de los carotenoides se puede apreciar que hay mayor diferencia entre ambas cianobacterias

conteniendo mayor número la *Spirulina* y en tercer lugar se encuentran las *Scytonemina* con un contenido similar en ambas.

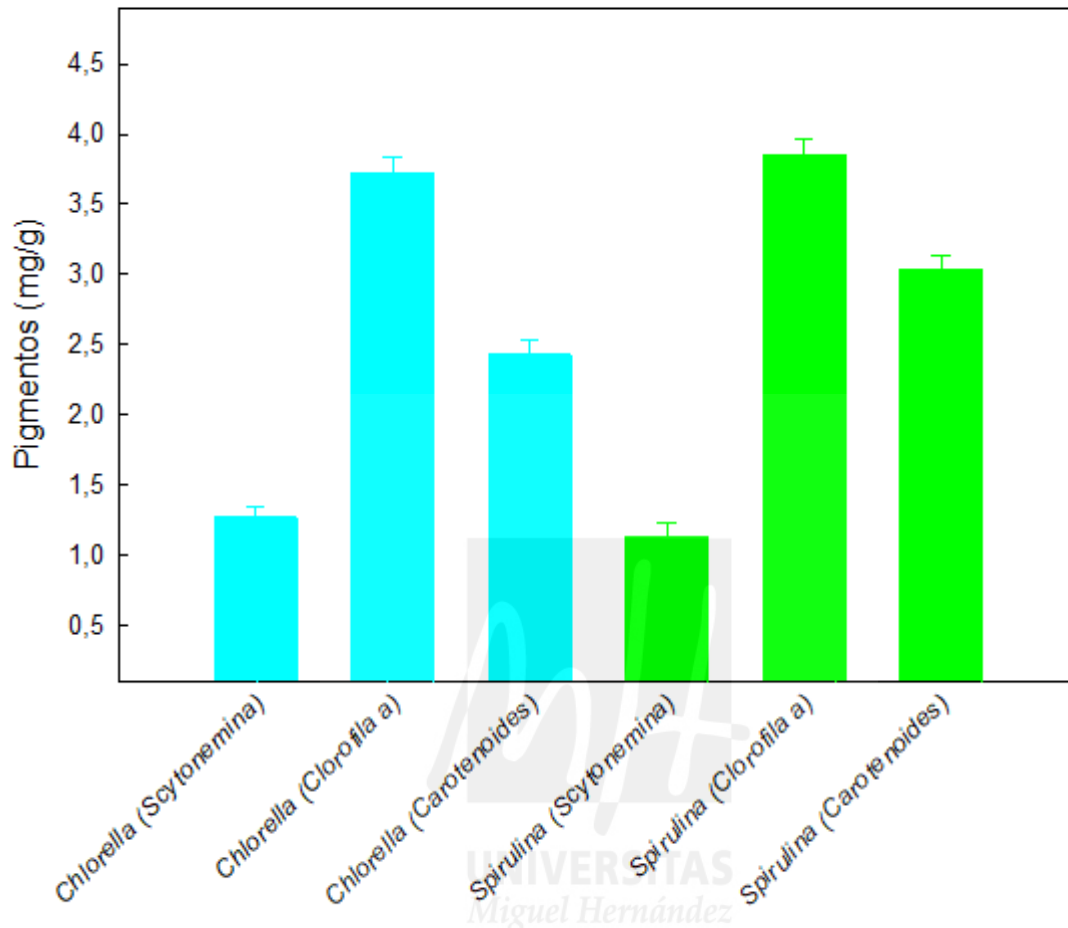


Figura 16. Scytonemina, clorofila a y carotenoides en *Chlorococcum* y *Spirulina* (mg g^{-1} ps). Los datos son la media \pm EE de tres determinaciones.

4.2. Compuestos bioactivos en cianobacterias yesíferas.

4.2.1. Polifenoles.

En la figura 17 encontramos las biocostras yesíferas y como se aprecia la *Tolypothrix byssoidea* destaca con diferencia frente al resto de cianobacterias con más del doble en contenido de polifenoles, lo que indica que tiene mayor capacidad antioxidante que el resto, a continuación, encontramos, *Gloeocapsa novacekii* y *Scytonema ocellatum* con una cantidad similar de polifenoles y ligeramente por debajo aparece *Gloeotheca confluens*.

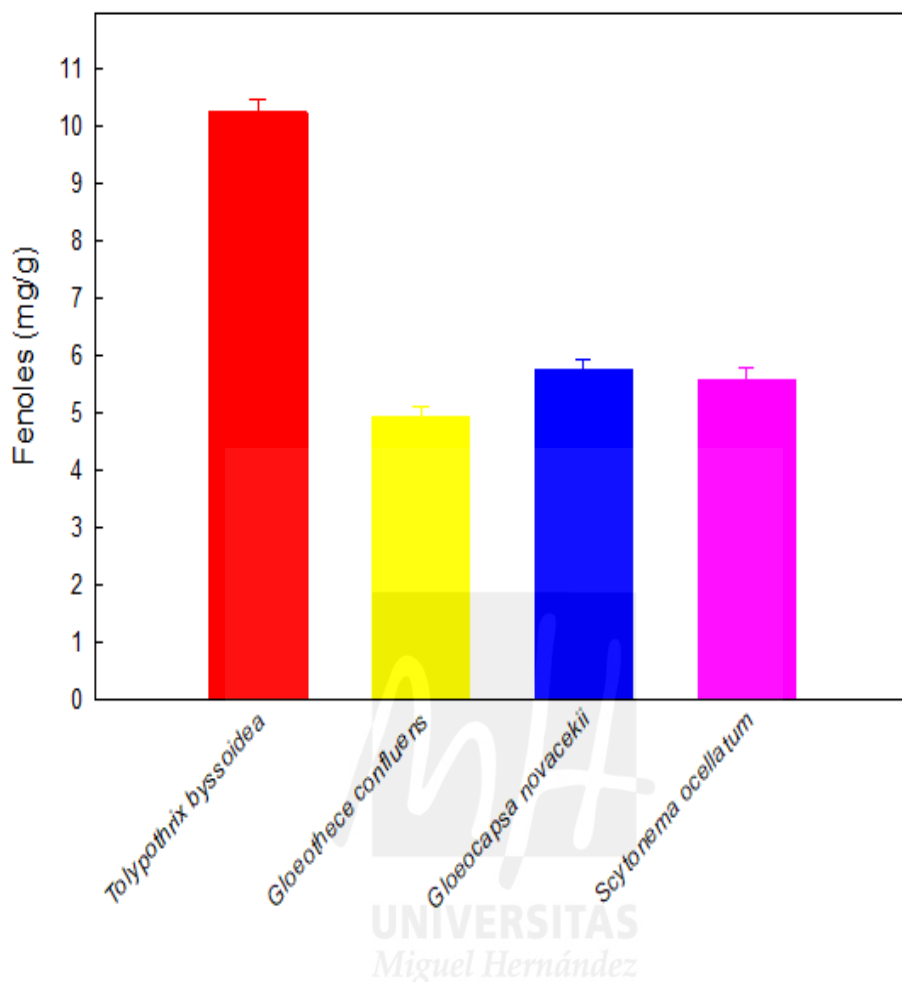


Figura 17. Fenoles totales (mg gálico eq g⁻¹ ps) en cianobacterias de biocostras yesíferas. Los datos son la media ± EE de tres determinaciones.

4.2.2 Actividad Antioxidante Hidrosoluble y (AAH) y liposoluble (AAL).

Una vez optimizado el proceso con las dos algas comerciales, se analizaron las cianobacterias gipsícolas. Los resultados obtenidos para las biomásas de estudio se encuentran en la figura 18 y 19, se aprecia una mayor capacidad antioxidante en *Tolypothrix byssoidea* tanto de AAH como AAL en comparación con el resto de algas, seguida por *Gloeothece confluens* y similar y en menor proporción de actividad antioxidante se encuentra *Gloeocapsa novacekii* y *Scytonema ocellatum*. Por lo tanto, como en el caso del contenido de polifenoles, *Tolypothrix byssoidea* sigue destacando sobre las demás presentando mayor actividad antioxidante.

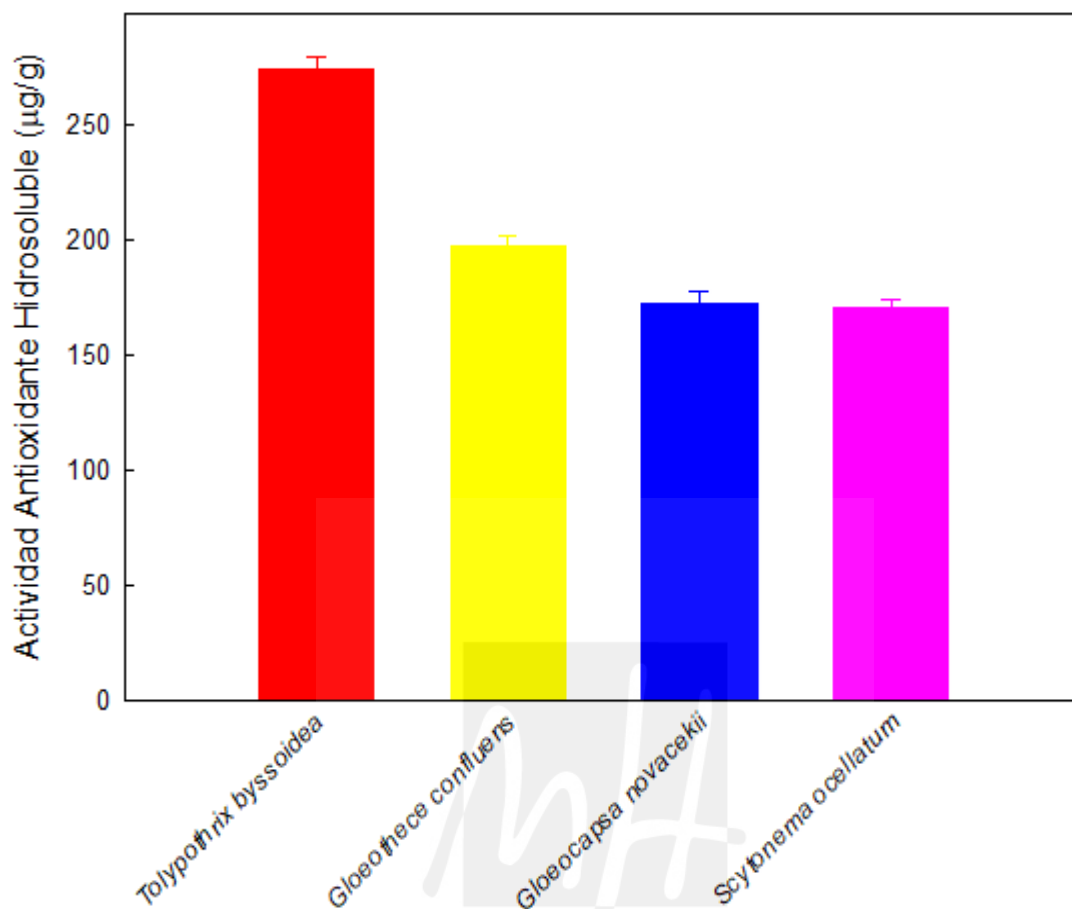


Figura 18. Actividad antioxidante hidrosoluble (AAH) en cianobacterias de biocostras yesíferas. Los datos son la media \pm EE de tres determinaciones.

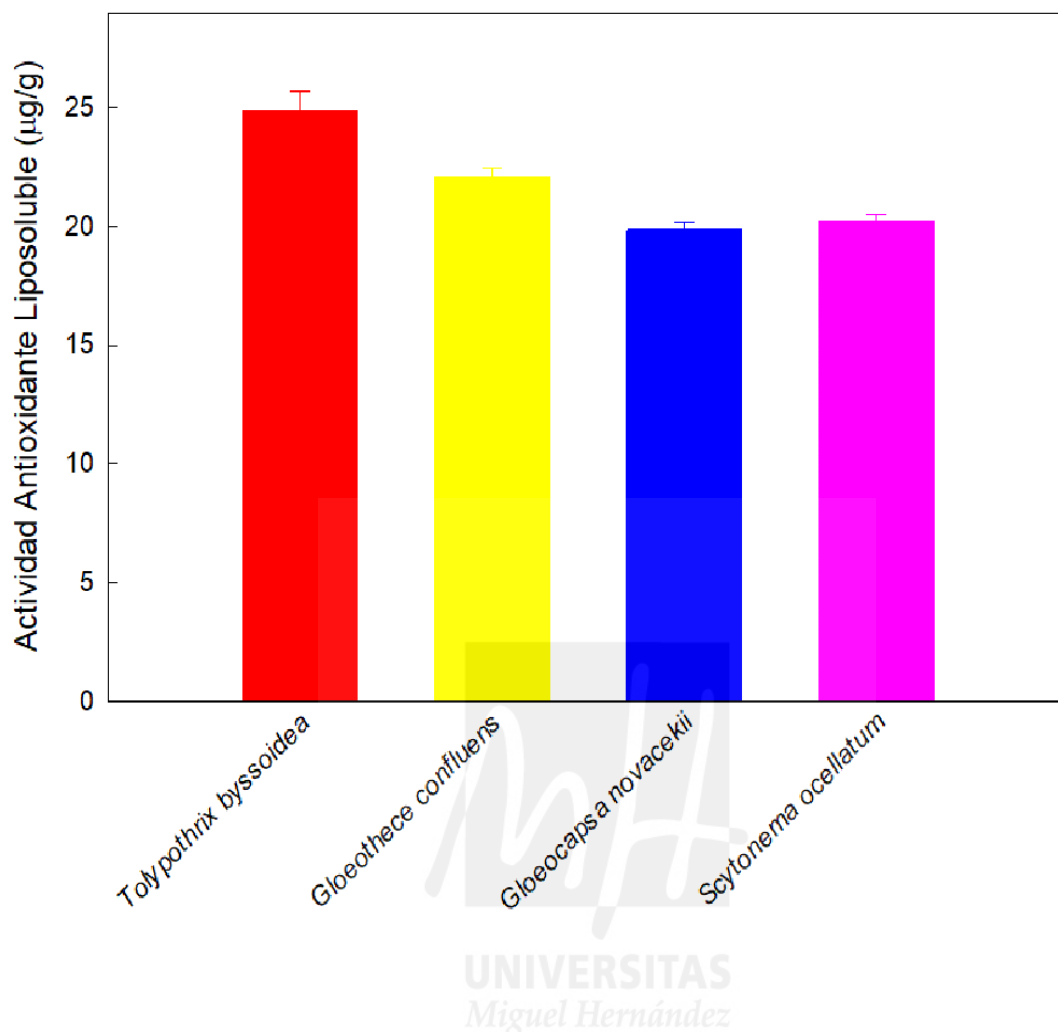


Figura 19. Actividad antioxidante liposoluble (AAL) en cianobacterias de biocostras yesíferas. Los datos son la media \pm EE de tres determinaciones.

4.2.3. Ficobiliproteínas.

Las algas comerciales carecían de ficobiliproteínas a excepción de α -aloficocianina. Por el contrario, todas las algas yesíferas estudiadas contienen este producto en concentración similar (Tabla 3), aunque en el caso de c -ficocianina y α -aloficocianina *Tolypothrix byssoidea* tiene valores superiores, a diferencia de la r -ficoeritrina donde se encuentran resultados ligeramente más altos en *Gloeocapsa novacekii*.

Tabla 3. Ficobiliproteínas (c-ficocianina, a-aloficocianina y r-ficoeritrina) en cianobacterias de biocostras yesíferas.

| Especie | Ficobiliproteínas (mg g ⁻¹ p s) | | |
|------------------------------|--|------------------|----------------|
| | c-ficocianina | a-aloficocianina | r-ficoeritrina |
| <i>Tolypothrix byssoidea</i> | 14,07±2,62 | 12,54±1,77 | 0,56±0,04 |
| <i>Gloeothece confluens</i> | 12,66±1,16 | 7,73±0,61 | 0,35±0,07 |
| <i>Gloeocapsa novacekii</i> | 17,28±3,11 | 11,87±1,84 | 1,45±0,34 |
| <i>Scytonema ocellatum</i> | 13,72±0,28 | 10,35±0,74 | 0,77±0,28 |

4.2.4. Pigmentos. (*Scytonemina*, *clorofila a*, *carotenoides*)

En la figura 20, se observa que hay mayor contenido de scytonemina en *Scytonema ocellatum* con un resultado significativo con más del doble en comparación con las demás cianobacterias estudiadas, le sigue *Tolypothrix byssoidea*, pero con un valor ya inferior y similar al de *Gloeothece confluens* y *Gloeocapsa novacekii*, aunque ambas siguen bajando la incidencia de contenido en scytonemina encontrándose en último lugar de *Gloeothece confluens*.

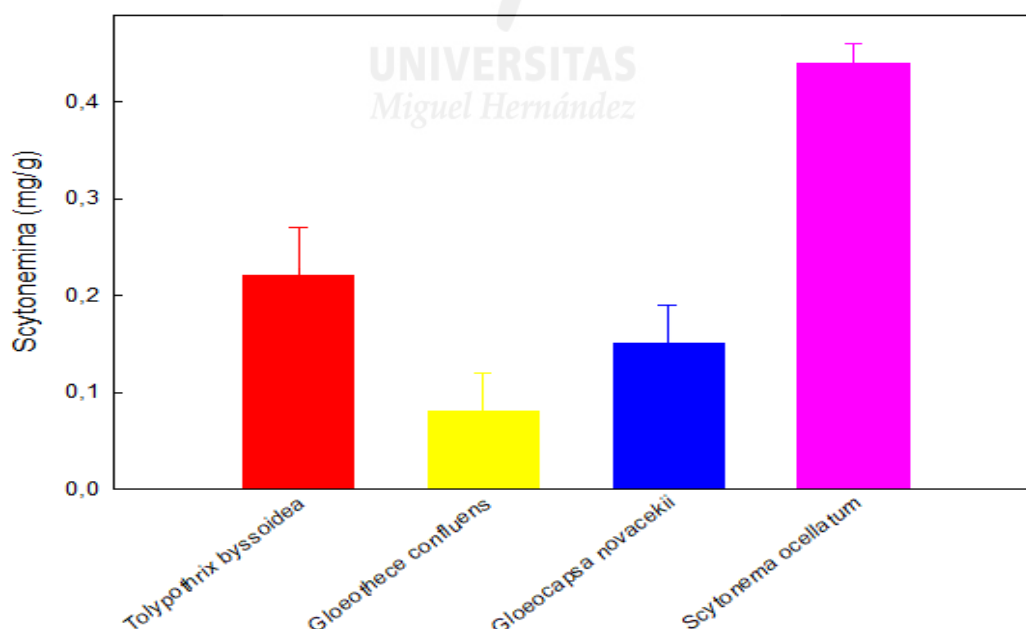


Figura 20. Scytonemina en cianobacterias de biocostras yesíferas (mg g⁻¹ ps). Los datos son la media ± EE de tres determinaciones.

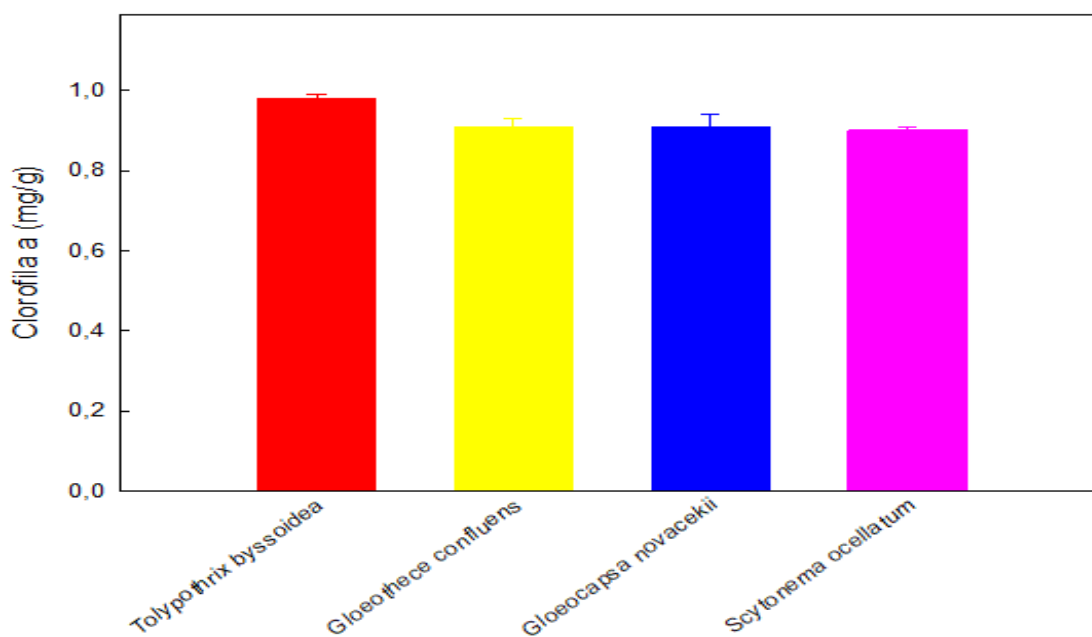


Figura 21. Clorofila a en cianobacterias de biocostras yesíferas (mg g^{-1} ps). Los datos son la media \pm EE de tres determinaciones.

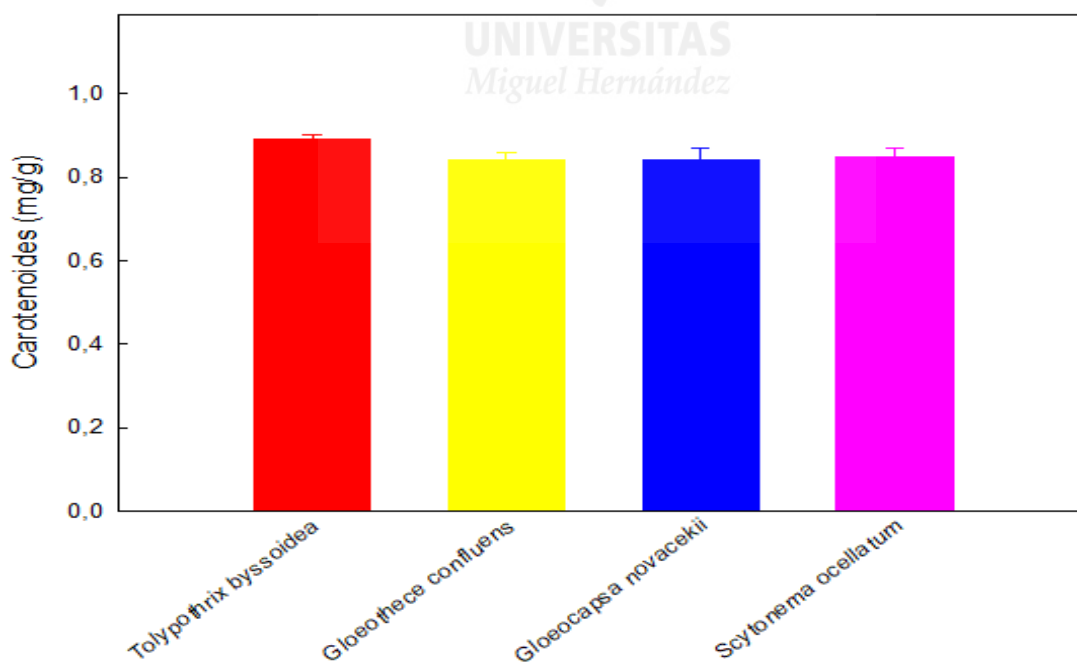


Figura 22. Carotenoides en cianobacterias de biocostras yesíferas (mg g^{-1} ps). Los datos son la media \pm EE de tres determinaciones.

En la figura 21, se observa que el contenido en clorofila a es similar en todas las cianobacterias de biocostras yesíferas, destacando por encima *Tolypothrix byssoidea*. En la figura 22, igual que en el contenido de clorofila a, todas las cianobacterias se encuentran con un valor similar de carotenoides destacando ligeramente por encima *Tolypothrix byssoidea*.

La tabla 4 muestra los resultados obtenidos tras el ANOVA de cada uno de los compuestos bioactivos y las actividades antioxidantes para cada una de las muestras de cianobacterias. Letras diferentes en los valores significa que existen diferencias significativas $p < 0,05$ entre ellos. La Figura 23 muestra la correlación existente entre las actividades antioxidantes hidrosolubles y liposolubles y el contenido de fenoles. Se puede apreciar como la correlación es alta ($r^2=0.723$) entre la actividad antioxidante hidrosoluble y el contenido de fenoles, mientras que no existe correlación respecto a la liposoluble. Al observar los resultados de correlación entre el resto de parámetros analizados, cabe destacar una alta correlación entre la Actividad Antioxidante Liposoluble y algunos compuestos como la Scytonemina ($r^2=0,90$), la Clorofila a ($r^2=0.98$) y los Carotenoides ($r^2=0,97$).

Tabla 4. Diferencias significativas de las muestras analizadas

| | FENOLES | AAH | AAL | SCYTONEMINA | CLOROFILA A | CAROTENOIDES | C FICOCIANINA | A ALOFICOCIANINA | R FICOERITRINA |
|-------------|---------|---------|---------|-------------|-------------|--------------|---------------|------------------|----------------|
| CHLORELLA | 2,07a | 117,29a | 48,09c | 1,27c | 3,72b | 2,43b | -2,44a | 1,13a | 0,62a |
| GLOETHECE | 4,71b | 197,42d | 22,06ab | 0,08a | 0,91a | 0,84a | 12,66b | 7,73b | 0,35b |
| SCYTONEMA | 5,52bc | 170,96c | 20,21a | 0,44b | 0,90a | 0,85a | 13,72b | 10,35b | 0,77b |
| GLOECAPSA | 5,72bc | 172,79c | 19,85a | 0,15a | 0,91a | 0,84a | 14,45b | 10,14b | 1,15b |
| ESPIRULINA | 5,79c | 144,20b | 50,65c | 1,13c | 3,85b | 3,04b | 38,73c | 18,85c | 2,95a |
| TOLYPOTHRIX | 9,87d | 274,22d | 24,87b | 0,22a | 0,98a | 0,89a | 14,07b | 12,54b | 0,56b |

REGRESIÓN FENOLES vs AAT HIDRO Y LIPO

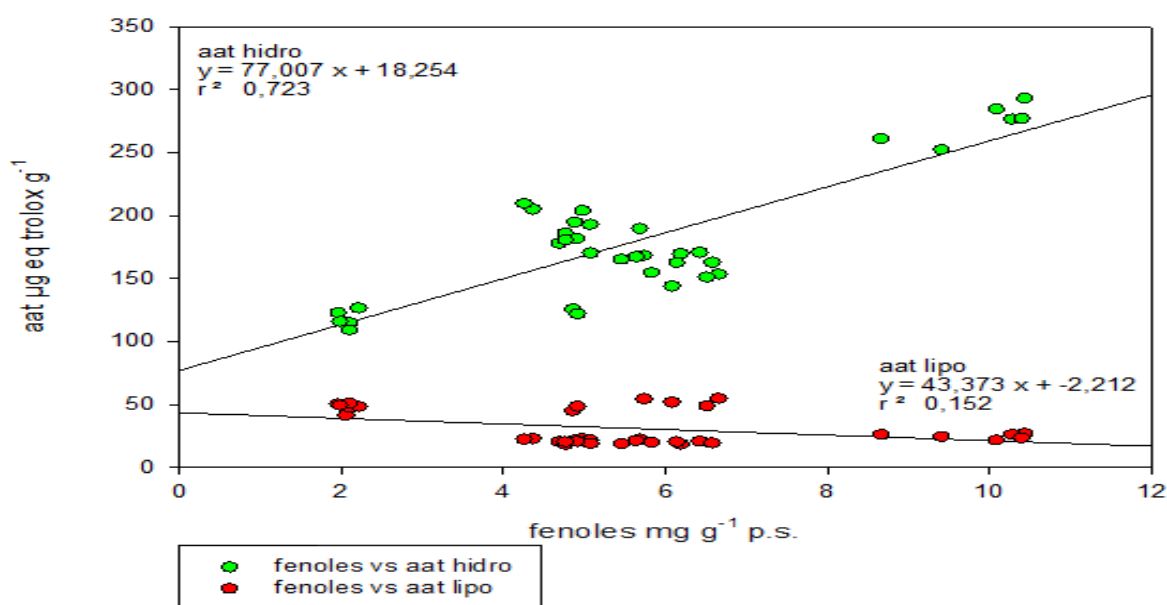


Figura 23. Correlación existente entre las actividades antioxidantes hidrosolubles y liposolubles y el contenido de fenoles.

5. CONCLUSIONES.

1^a La optimización de la extracción de compuestos bioactivos en cianobacterias se consiguió con la homogeneización de 10 mg de material liofilizado en 1 mL de agua destilada, seguido de una incubación de 22 h en oscuridad a 4 °C, después 1 hora de baño en ultrasonidos y finalmente una centrifugación a 10000 rev min⁻¹ 10 min y 4° C.

2^a Los resultados de compuestos bioactivos en las cianobacterias comerciales muestran que *Spirulina* contiene un mayor contenido en compuestos bioactivos (Fenoles, Ficobiliproteínas, Pigmentos y Actividad Antioxidante tanto Hidrosoluble como Liposoluble) que *Chlorella*.

3^a Los resultados de compuestos bioactivos en las cianobacterias gipsícolas estudiadas muestran que *Tolypothrix byssoidea* contiene alrededor de doble contenido en Fenoles que el resto de cianobacterias. También ofrece entorno al 40 % más de Actividad Antioxidante Hidrosoluble. La Actividad Antioxidante Liposoluble es 10 veces inferior que la Hidrosoluble en todas las cianobacterias.

4^a El contenido en ficobiliproteínas en las cianobacterias gipsícolas analizadas es bastante similar en todas ellas, estando las concentraciones de c-ficocianina y a-aloficocianina en valores alrededor de 10-17 mg g⁻¹ ps. Sin embargo, el contenido de r-ficoeritrina es mucho menor (<1 mg g⁻¹ ps).

5ª El contenido del pigmento scytonemina destaca en la *Scytonema ocellatum* con un contenido doble al resto de cianobacterias ($\approx \text{mg g}^{-1} \text{ ps}$). Los contenidos de clorofila a y carotenoides son muy similares en todas las cianobacterias analizadas y no alcanzan la cantidad de $1 \text{ mg g}^{-1} \text{ ps}$ en ningún caso

6ª En términos generales, de las cuatro especies de cianobacterias gipsícolas estudiadas, *Tolypothrix brysoidea* es la que mayor contenido de compuestos bioactivos posee. En comparación a las cianobacterias que se comercializan actualmente para alimentación se puede afirmar que *Tolypothrix* contiene casi el doble de fenoles y actividad antioxidante hidrosoluble que *Spirulina* y el triple que *Chlorella*. Siendo estos los compuestos bioactivos mayoritarios. Respecto a ficobiliproteínas y pigmentos, las comerciales contienen mayores cantidades relativas que las gipsícolas, sin embargo, el aporte en Actividad Antioxidante de estos compuestos y la concentración es muy baja en todos los casos.

7ª La elevada correlación entre contenido de fenoles y actividad antioxidante hidrosoluble induce a considerar que estos compuestos aportan la mayor parte de esta actividad. Por el contrario, las ficobiliproteínas y los pigmentos (scytonemina, clorofila a y carotenoides) aportan la mayor parte de la actividad antioxidante liposoluble al encontrarse también altamente correlacionados.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abadías, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Calidad microbiológica de frutas y hortalizas frescas y mínimamente procesadas, y germinados de establecimientos minoristas. *Revista internacional de microbiología alimentaria*, 123 (1-2), 121-129.
- Aberoumand, A. (2011). Un artículo de revisión sobre las propiedades y fuentes de los pigmentos comestibles como biocolorantes naturales en los productos alimenticios y la industria alimentaria. *World J Dairy Food Sci* , 6 (1), 71-78.
- Ali, SK y Saleh, AM (2012). *Espirulina: una descripción general*. *Revista Internacional de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas* , 4 (3), 9-15.
- Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food chemistry*, 73(2), 239-244.
- Asencio, A. D., & Hoffmann, L. (2013). Chemosystematic evaluation of the genus *Scytonema* (Cyanobacteria) based on occurrence of phycobiliproteins, scytonemin, carotenoids and mycosporine-like amino acid compounds. *European Journal of Phycology*,

48(4), 331-344.

- Asencio, AD y Aboal, M. (2003). La presencia de *Arthronema africanum* (Cyanophyceae/Cyanobacteria, Oscillatoriales) en el desierto de Almería, SE de España, con implicaciones en su distribución biogeográfica. ARCHIV FUR HYDROBIOLOGIE-SUPPLEMENT-, 146 , 7-14.
- Asencio, AD y Hoffmann, L. (2013). Evaluación quimiosistemática del género *Scytonema* (Cyanobacteria) basada en la presencia de ficobiliproteínas, scytonemin, carotenoides y compuestos de aminoácidos similares a microsporinas. Revista Europea de Ficología , 48 (4), 331-344.
- Asencio, AD y Hoffmann, L. (2013). Evaluación quimiosistemática del género *Scytonema* (Cyanobacteria) basada en la presencia de ficobiliproteínas, scytonemin, carotenoides y compuestos de aminoácidos similares a microsporinas. Revista Europea de Ficología , 48 (4), 331-344.
- Belay, A. (2002). La potencial aplicación de la *Spirulina* (*Arthrospira*) como suplemento nutricional y terapéutico en el manejo de la salud. J Am Nutraceutical Assoc , 5 , 27-48.
- Belay, A. (2002). La potencial aplicación de la *Spirulina* (*Arthrospira*) como suplemento nutricional y terapéutico en el manejo de la salud. J Am Nutraceutical Assoc , 5 , 27-48.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. The Journal of cell biology, 58(2), 419-435.
- Camargo-Santos, D. (2013). Acción alelopática de saxitoxinas y microcistinas en cianobacterias y microalgas verdes en condiciones controladas.
- Cassano, A. y Drioli, E. (2007). Concentración de jugo de kiwi clarificado por destilación osmótica. Revista de Ingeniería de Alimentos , 79 (4), 1397-1404.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., & Aguilar, C. N. (2010). In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. Industrial Crops and Products, 32(3), 324-328.
- CASTILLO-MONROY, A. P., & MAESTRE, F. T. (2011). La costra biológica del suelo: Avances recientes en el conocimiento de su estructura y función ecológica. Revista chilena de historia natural, 84(1), 1-21.
- Cepeda, A. G. (2012). Estudio de metabolitos secundarios de rhodophytas y

phaeophytas. Universidad de La Laguna (Canary Islands, Spain).

- Chakdar, H. y Pabbi, S. (2016). Ficobilinas cianobacterianas: producción, purificación y regulación. En *Frontier descubrimientos e innovaciones en microbiología interdisciplinaria* (págs. 45-69). Springer, Nueva Delhi.
- Christie, W. W., & Han, X. (2003). Preparation of derivatives of fatty acids. *Lipid analysis*, 3, 217.
- Conroy, KP, Davidson, IM y Warnock, M. (2011). Obesidad patógena y nutraceuticos. *Actas de la Sociedad de Nutrición* , 70 (4), 426-438.
- Datla, P. (2011). The wonder molecule called phycocyanin. Chennai-India: Parry Nutraceuticals Retrieved February 18, 2012.
- Datla, P. (2011). The wonder molecule called phycocyanin. Chennai-India: Parry Nutraceuticals Retrieved February 18, 2012.
- Díaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Guillén, F., Castillo, S., Martínez-Romero, D., Valero, D., & Serrano, M. (2008). Changes in physicochemical and nutritive parameters and bioactive compounds during development and on-tree ripening of eight plum cultivars: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(14), 2499-2507.
- Domínguez, S. G., & Asencio, A. D. (2011). Distribution of chasmoendolithic cyanobacteria in gypsiferous soils from semi-arid environments (SE Spain) by chemical and physical parameters. *Nova Hedwigia*, 92(1/2), 1-27.
- Domínguez, SG y Asencio, AD (2011). Distribución de cianobacterias casmoendolíticas en suelos yesíferos de ambientes semiáridos (SE de España) por parámetros químicos y físicos. *Nova Hedwigia* , 92 (1/2), 1-27.
- Dong, H., Rech, JA, Jiang, H., Sun, H. y Buck, BJ (2007). Cianobacterias endolíticas en yeso del suelo: presencia en los desiertos de Atacama (Chile), Mojave (Estados Unidos) y la cuenca de Al-Jafr (Jordania). *Revista de Investigación Geofísica: Biogeociencias* , 112 (G2).
- Egea, I., Sánchez-Bel, P., Romojaro, F., & Pretel, M. T. (2010). Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. *Plant foods for human nutrition*, 65(2), 121-129.
- Egea, J. M., & Alonso, F. L. (1996). Patrones de distribución en la flora líquénica xerófila del sureste de España. 35-47..
- El-Bahbohy, RM, Khalil, MK y Mahmoud, AA (2014). Impacto de las fitohormonas en la posible fijación de nitrógeno *Cyanobacterium anabaena* sp. aislar. *Revista Global de*

Ciencias de la Agricultura y la Seguridad Alimentaria , 1 (2), 38-51.

- Escudero, A. (2009). Vegetación gypsicola mediterranea (Gypsophiletalia). Bases ecológicas preliminares para la conservación de los tipos de habitat de interes comunitario en España, Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino Madrid.
- Espinoza-Avalos, J. (2005). Fenología de macroalgas marinas. *Hidrobiológica*, 15(1), 109-122.
- Faassen, E. J., & Lürling, M. (2013). Occurrence of the microcystins MC-LW and MC-LF in Dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity. *Marine drugs*, 11(7), 2643-2654.
- FAO.(2011). FAO (Second Global Plant of Action for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture Adopted by the FAO Rome, Italy.
- Fernández-González, F., Loidi, J., Moreno, J. C., Del Arco, M., & Fernández-Cancio, A. (2005). Impactos sobre la biodiversidad vegetal. Evaluación preliminar de los impactos en España por efecto del cambio climático, 183-247
- Folch, J., Lees, M., Sloan-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1):497-509.
- Förster, H., Driever, GF, Thompson, DC y Adaskaveg, JE (2007). Manejo de pudrición poscosecha para cultivos de frutas de hueso en California utilizando los fungicidas de "riesgo reducido" fludioxonil y fenhexamid. *Enfermedad de las plantas* , 91 (2), 209-215.
- García-Espín, L., Cantoral, E. A., Asencio, A. D., & Aboal, M. (2017). Microcystins and cyanophyte extracts inhibit or promote the photosynthesis of fluvial algae. *Ecological and management implications. Ecotoxicology*, 26(5), 658-666.
- García-Espín, L., Cantoral, EA, Asencio, AD, & Aboal, M. (2017). Los extractos de microcistinas y cianofitas inhiben o favorecen la fotosíntesis de las algas fluviales. *Implicaciones ecológicas y de gestión. Ecotoxicología* , 26 (5), 658-666.
- Garcia-Pichel, F., & Castenholz, R. W. (1991). Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment 1. *Journal of Phycology*, 27(3), 395-409.
- Ghosh, A., Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, ON, Saini, S., ... & Gayen, K. (2016). Progreso hacia el aislamiento de cepas y cepas de microalgas modificadas genéticamente para la producción de biocombustibles y otros productos químicos de valor agregado: una revisión. *Gestión y conversión de energía* , 113 , 104-118.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2002). Antioxidant

capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(17), 4976-4982.

- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., García-Viguera, C., & Moreno, DA (2012). Una novedosa bebida rica en fenoles antioxidantes: baya de maqui (*Aristotelia chilensis*) y jugo de limón. *Lwt* , 47 (2), 279-286.
- González-Molina, E., Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., Moreno, DA, & García-Viguera, C. (2012). Nuevas bebidas de zumo de limón con concentrados de saúco y uva como fuente de compuestos bioactivos. *Revista de ciencia de los alimentos* , 77 (6), C727-C733.
- González-Molina, E., Moreno, DA y García-Viguera, C. (2008). Jugo de limón enriquecido con aronia: una nueva bebida altamente antioxidante. *Revista de química agrícola y alimentaria* , 56 (23), 11327-11333.
- González-Molina, E., Moreno, DA, & García-Viguera, C. (2009). Una nueva bebida rica en bioactivos saludables que combina jugos de limón y granada. *Química alimentaria* , 115 (4), 1364-1372.
- Gonzalez-Silvera, D., Pérez, S., Korbee, N., Figueroa, F. L., Asencio, A. D., Aboal, M., & López-Jiménez, J. Á. (2017). Effects of global change factors on fatty acids and mycosporine-like amino acid production in *Chroothece richteriana* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 53(5), 999-1009.
- GUERRA, J., Ros, RM, CANO, MJ, & CASARES, M. (1995). Afloramientos yesíferos en el SE de España, refugios de briófitas raras, vulnerables y en peligro de extinción. *Criptogamia, Bryol. Lichénol* , 16 (2), 125-135.
- Gutiérrez-Praena, D., Jos, Á., Pichardo, S., Moreno, IM, & Cameán, AM (2013). Presencia y bioacumulación de microcistinas y cilindrospermopsina en alimentos y la efectividad de algunas técnicas de cocción para disminuir sus concentraciones: una revisión. *Toxicología alimentaria y química* , 53 , 139-152.
- Haque, F., Banayan, S., Yee, J. y Chiang, YW (2017). Extracción y aplicaciones de cianotoxinas y otros metabolitos secundarios de cianobacterias. *Chemosphere* , 183 , 164-175.
- Hart, D. J., & Scott, K. J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54(1), 101-111.

- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 51: 463–499.
- Hoseini, SM, Khosravi-Darani, K. y Mozafari, MR (2013). Aplicaciones nutricionales y médicas de la microalga espirulina. *Mini revisiones en química médica* , 13 (8), 1231-1237.
- Houston, M. (2002). La aplicación potencial de la espirulina (*Arthrospira*) como suplemento nutricional y terapéutico en la gestión de la salud. Europa, E. C., Valdivia, V. B., Sánchez, R. R., Manzo, P. T., Colín, M. F., García, A. H., & Butrón, R. O. (2012). Uso terapéutico de algunos microorganismos, microalgas, algas y hongos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(4), 22-30.
- Houston, M. (2002). La aplicación potencial de la espirulina (*Arthrospira*) como suplemento nutricional y terapéutico en la gestión de la salud. Europa, E. C., Valdivia, V. B., Sánchez, R. R., Manzo, P. T., Colín, M. F., García, A. H., & Butrón, R. O. (2012). Uso terapéutico de algunos microorganismos, microalgas, algas y hongos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(4), 22-30.
- Hung, LD, Hori, K., Nang, HQ, Kha, T. y Hoa, LT (2009). Cambios estacionales en la tasa de crecimiento, el rendimiento de carragenina y el contenido de lectina en el alga roja *Kappaphycus alvarezii* cultivada en Camranh Bay, Vietnam. *Revista de Ficología Aplicada* , 21 (3), 265-272.
- Hussain, A. y Hasnain, S. (2011). Fitoestimulación y biofertilización en trigo por cianobacterias. *Revista de Microbiología Industrial y Biotecnología* , 38 (1), 85-92.
- Jiang, Y., Xie, P., Chen, J. y Liang, G. (2008). Detección de microcistinas hepatotóxicas en 36 tipos de productos alimenticios de cianobacteria *Spirulina* en China. *Aditivos alimentarios y contaminantes* , 25 (7), 885-894.
- Kedar, L., Kashman, Y. y Oren, A. (2002). La micosporina-2-glicina es el principal aminoácido similar a la micosporina en una cianobacteria unicelular (*Euhalothece* sp.) aislada de una costra de yeso en un estanque salino hipersalino. *FEMS Microbiology Letters* , 208 (2), 233-237.
- Kitson, R. E., & Mellon, M. G. (1944). Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 16(6), 379-383.
- Klados, E. y Tzortzakis, N. (2014). Efectos del sustrato y la salinidad en *Cichorium spinosum* cultivado hidropónicamente. *Revista de ciencia del suelo y nutrición vegetal* , 14 (1), 211-222.

- KNÜBEL, G., LARSEN, LK, MOORE, RE, LEVINE, IA y PATTERSON, GM (1990). Indolocarbazoles citotóxicos y antivirales de un alga azul-verde perteneciente a Nostocaceae. *The Journal of antibiotics* , 43 (10), 1236-1239.
- Kotsiras, A., Vlachodimitropoulou, A., Gerakaris, A., Bakas, N. y Darras, AI (2016). Prácticas innovadoras de cosecha de tipos de lechuga verde Butterhead, Lollo rosso y Batavia (*Lactuca sativa* L.) cultivadas en un sistema hidropónico flotante para mantener la calidad y mejorar la capacidad de almacenamiento. *Scientia horticulturae* , 201 , 1-9.
- Lavecchia, T., Rea, G., Antonacci, A. y Giardi, MT (2013). Efectos saludables y adversos de los metabolitos funcionales derivados de plantas: la necesidad de revelar su contenido y bioactividad en una matriz alimentaria compleja. *Revisiones críticas en ciencia de los alimentos y nutrición* , 53 (2), 198-213.
- Magana-Arachchi, DN y Wanigatunge, RP (2013). Primer informe del género *Chroococcidiopsis* (cianobacteria) de Sri Lanka: una amenaza potencial para la salud humana. *Diario de la fundación científica nacional de Sri Lanka* , 41 (1).
- Martínez-Esplá, A., García-Pastor, ME, Zapata, PJ, Guillén, F., Serrano, M., Valero, D., & Gironés-Vilaplana, A. (2017). La aplicación de ácido oxálico antes de la cosecha mejora la calidad y el contenido fitoquímico de la alcachofa (*Cynara scolymus* L.) en la cosecha y durante el almacenamiento. *Química de los alimentos* , 230 , 343-349.
- Martínez-Esplá, A., Zapata, PJ, Valero, D., García-Viguera, C., Castillo, S., & Serrano, M. (2014). La aplicación de ácido oxálico antes de la cosecha aumentó el tamaño de la fruta, los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante en cultivares de cereza dulce (*Prunus avium* L.). *Revista de química agrícola y alimentaria* , 62 (15), 3432-3437.
- Massa, D., Incrocci, L., Maggini, R., Carmassi, G., Campiotti, CA y Pardossi, A. (2010). Estrategias para disminuir el drenaje de agua y la emisión de nitratos de cultivos sin suelo de tomate en invernadero. *Manejo Agrícola del Agua* , 97 (7), 971-980.
- Merlo, M. E., Rodríguez-Tamayo, M. L., Jiménez, M. L., & Mota, J. F. (2001). Recapitulación sobre el comportamiento biogeográfico de algunos gipsófitos y halófitos ibéricos. *Monografías de Flora y Vegetación Bética*, 12, 77-95.
- Miranda, J. D., Padilla, F. M., & Pugnaire, F. I. (2004). Sucesión y restauración en ambientes semiáridos. *Ecosistemas*, 13(1).
- Mota, J.F., Sánchez-Gómez, P., Guirado, J.S. (2011). Diversidad vegetal de las yeseras ibéricas. El reto de los archipiélagos edáficos para la biología de la conservación. *ADIF- Mediterráneo Asesores Consultores*. Almería. 636 pp

- Nakamura, H., Kobayashi, J. I., & Hirata, Y. (1982). Separation of mycosporine-like amino acids in marine organisms using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 250, 113-118.
- Núñez, A., & Dos Santos, M. (2020). CYANOPHYTAS.
- Osman, MEH, El-Sheekh, MM, El-Naggar, AH y Gheda, SF (2010). Efecto de dos especies de cianobacterias como biofertilizantes en algunas actividades metabólicas, crecimiento y rendimiento de plantas de guisantes. *Biología y fertilidad de los suelos* , 46 (8), 861-875.
- Pereira, I., Ortega, R., Barrientos, L., Moya, M., Reyes, G., & Kramm, V. (2009). Desarrollo de un biofertilizante a base de cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno para cultivos de arroz en Chile. *Revista de psicología aplicada* , 21 (1), 135-144.
- Pérez-García, O., Escalante, FM, De-Bashan, LE, & Bashan, Y. (2011). Cultivos heterótrofos de microalgas: metabolismo y productos potenciales. *Investigación del agua* , 45 (1), 11-36.
- PETROPOULOS, SA, Chatzieustratiou, E., Constantopoulou, E. y KAPOTIS, G. (2016). Rendimiento y calidad de lechuga y rúcula cultivadas en sistema de cultivo flotante. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* , 44 (2), 603-612.
- Pineda-Mendoza, R., Martínez-Jerónimo, F., Garduño-Solórzano, G., & Olvera-Ramírez, R. (2011). Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de México. *Polibotánica*, (31), 31-50.
- Pretel, M. T., Botella, M. A., Zapata Asunción Amorós, P. J., & Serrano, M. (2004). Antioxidative activity and general fruit characteristics in different traditional orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] varieties. *European Food Research and Technology*, 219(5), 474-478.
- Pretel, MT, Fernández, PS, Romojaro, F., & Martinez, A. (1998). El efecto del envasado en atmósfera modificada en naranjas 'listas para comer'. *LWT-Ciencia y tecnología de los alimentos* , 31 (4), 322-328.
- Pulz, O. y Gross, W. (2004). Productos valiosos de la biotecnología de microalgas. *Microbiología aplicada y biotecnología* , 65 (6), 635-648.
- Quitral, V., Morales, C., Sepúlveda, M., & Schwartz, M. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Revista chilena de nutrición*, 39(4), 196-202.
- Raposo, MF, de Morais, RMSC, & de Morais, AMMB (2013). Aplicaciones a la salud

de compuestos bioactivos de microalgas marinas. *Ciencias de la vida* , 93 (15), 479-486.

- Rastogi, RP y Sinha, RP (2009). Importancia biotecnológica e industrial de los metabolitos secundarios de cianobacterias. *Avances en biotecnología* , 27 (4), 521-539.
- Romojaro, A., Botella, M. Á., Obón, C., & Pretel, M. T. (2013). Nutritional and antioxidant properties of wild edible plants and their use as potential ingredients in the modern diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(8), 944-952.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, PY y Vaca-García, C. (2014). Morfología, composición, producción, procesamiento y aplicaciones de *Chlorella vulgaris*: Una revisión. *Revisiones de energía renovable y sostenible* , 35 , 265-278.
- Sanchez-Bel, P., Egea, I., Serrano, M., Romojaro, A., & Pretel, M. T. (2012). Obtaining and storage of ready-to-use segments from traditional orange obtained by enzymatic peeling. *Food science and technology international*, 18(1), 63-72.
- Sanchez-Bel, P., Romojaro, A., Egea, I., & Pretel, M. T. (2015). Wild edible plants as potential antioxidant or nutritional supplements for beverages minimally processed. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 830-837.
- Sánchez-Bel, P., Romojaro, A., Egea, I., & Pretel, MT (2015). Plantas silvestres comestibles como posibles suplementos antioxidantes o nutricionales para bebidas mínimamente procesadas. *LWT-Ciencia y tecnología de los alimentos* , 62 (1), 830-837.
- Serradilla, MJ, Martín, A., Hernández, A., López-Corrales, M., Lozano, M., & Córdoba, MDG (2010). Efecto de la etapa de maduración comercial y almacenamiento poscosecha sobre los cambios microbianos y de aroma de las cerezas dulces 'Ambrunés'. *Revista de química agrícola y alimentaria* , 58 (16), 9157-9163.
- Serrano, M., Diaz-Mula, H. M., Zapata, P. J., Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., ... & Valero, D. (2009). Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(8), 3240-3246.
- Serrano, M., Diaz-Mula, HM, Zapata, PJ, Castillo, S., Guillén, F., Martínez-Romero, D., ... & Valero, D. (2009). La etapa de madurez en la cosecha determina la calidad de la fruta y el potencial antioxidante después del almacenamiento de los cultivares de cereza dulce. *Revista de química agrícola y alimentaria* , 57 (8), 3240-3246.
- Singh, JS, Kumar, A., Rai, AN y Singh, DP (2016). Cianobacterias: un recurso biológico precioso en la agricultura, los ecosistemas y la sostenibilidad ambiental. *Fronteras en microbiología* , 7 , 529.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Socorro, A., & Cristobal, R. (2013). Fotosíntesis Artificial. Comparación con el mecanismo natural. *Revista cubana de física*, 30(1), 1-9.
- Sommer, S. G., Kjellerup, V., & Kristjansen, O. (1992). Determination of total ammonium nitrogen in pig and cattle slurry: sample preparation and analysis. *Acta Agriculturae Scandinavica B-Plant Soil Sciences*, 42(3), 146-151.
- Svirčev, Z. (2005). Mikroalge i cijanobakterije: u biotehnologiji. Prirodno matematički fakultet.
- Valero, D., & Serrano, M. (2010). Postharvest biology and technology for preserving fruit quality. CRC press.
- Van der Putten, W. H., Macel, M., & Visser, M. E. (2010). Predicting species distribution and abundance responses to climate change: why it is essential to include biotic interactions across trophic levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1549), 2025-2034.
- Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., & Takabe, T. (2016). Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiol*, 2(1), 42-54.
- Wulfkuehler, S., Kurfiss, L., Kammerer, D. R., Weiss, A., Schmidt, H., & Carle, R. (2013). Impact of different washing procedures on quality of fresh-cut iceberg lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) and endive (*Cichorium endivia* L.). *European Food Research and Technology*, 236(2), 229-241.
- Yoon, HS, Nelson, W., Lindstrom, SC, Boo, SM, Pueschel, C., Qiu, H. y Bhattacharya, D. (2017). Rhodophyta. En *Handbook of the Protists: Second Edition* (págs. 89-133). Publicaciones internacionales de Springer.
- Zanin, G., Ponchia, G., & Sambo, P. (2008, April). Yield and quality of vegetables grown in a floating system for ready-to-eat produce. In *International Symposium on Strategies Towards Sustainability of Protected Cultivation in Mild Winter Climate* 807 (pp. 433-438).
- Zapata, P. J., Serrano, M., García-Legaz, M. F., Pretel, M. T., & Botella, M. A. (2017). Short term effect of salt shock on ethylene and polyamines depends on plant salt sensitivity. *Frontiers in Plant Science*, 8, 855.



UNIVERSITAS
Miguel Hernández