



POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICROALGAS EXTREMÓFILAS EN EL MARCO DE LA ECONOMÍA CIRCULAR

**BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF EXTREMOPHILE MICROALGAE IN THE
FRAMEWORK OF THE CIRCULAR ECONOMY**

AMADOR LUNA, Víctor Manuel

Trabajo entregado para la obtención del grado de **MÁSTER EN
TECNOLOGÍA AMBIENTAL**

Modalidad: "Investigación"

Julio / 2021

Directores:

Dr. Francisco Navarro Roldán

Dr. Carlos Vílchez Lobato

“Las microalgas son el futuro y la economía circular en su mayor esplendor, porque aprovechamos todo, la propia microalga, además de depurar el agua, es un producto que puede usarse para alimentación animal, bioplásticos o biocombustible [...] porque el uso industrial de este recurso es ya una realidad”

(Jesús María Martín, Fundación Cartif, y Fidel Delgado, socio y fundador de Neoalgae, Proyecto CYCLALG de bioeconomía circular, 2018)

El Dr. **Francisco Navarro Roldán** con DNI: 30524975L, Profesor Titular de Universidad del departamento de Ciencias Integradas y el Dr. **Carlos Vílchez Lobato** con DNI: 29789868S, Catedrático de Universidad del departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez Martín”.

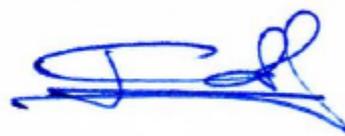
INFORMAN:

Que el trabajo titulado “**Potencial biotecnológico de microalgas extremófilas en el marco de la Economía Circular (Biotechnological potential of extremophile Microalgae in the Framework of the Circular Economy).**” presentado por **D. Víctor Manuel Amador Luna**, con D.N.I.: **49114907-V**, ha sido realizado bajo nuestra dirección, y AUTORIZAMOS su presentación y defensa como **Trabajo Fin de Máster** (Modalidad: Investigación), para el Máster Universitario en Tecnología Ambiental de la Universidad de Huelva.

En Huelva a 18 de septiembre de 2021

NAVARRO
ROLDAN
FRANCISCO
JUAN -
30524975L

Firmado digitalmente por
NAVARRO ROLDAN FRANCISCO
JUAN - 30524975L
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,
serialNumber=IDCES-30524975L,
givenName=FRANCISCO JUAN,
sn=NAVARRO ROLDAN,
cn=NAVARRO ROLDAN
FRANCISCO JUAN - 30524975L
Fecha: 2021.09.18 20:59:50 +02'00'



Fdo: F. Navarro Roldán

Fdo: C. Vílchez Lobato

RESUMEN

En el siguiente informe se evaluará la capacidad antioxidante de la microalga *Coccomyxa onubensis* (*C. onubensis*), un microorganismo extremófilo aislado de los drenajes ácidos de la zona minera del río Tinto (Huelva, España) y su posible uso en el mercado de la industria agroalimentaria en un estudio realizado en el seno del grupo de investigación SEJ-523 con la colaboración del grupo de investigación BIO-214. Esta microalga ha demostrado presentar una biomasa rica en proteínas, lípidos, hidratos de carbono, antioxidantes y vitaminas que le podrían conferir un gran interés nutricional.

Los estudios previos realizados con esta microalga demostraron que podía ser empleada como suplemento alimentario, al presentar propiedades nutricionales adecuadas, mostrando efectos beneficiosos al presentar un poder antioxidante igual y mayor que ciertos alimentos ricos en antioxidantes.

El potencial antioxidante de la microalga se comprobó mediante la comparativa con microalgas comerciales de amplio uso farmacéutico.

En este estudio se apreció que *C. onubensis* mostraba un enriquecimiento en pigmentos como la luteína, la zeaxantina, la neoxantina y el licopeno, superando los niveles del resto de algas del estudio, siendo el contenido en carotenoides totales (medido como equivalentes en β -caroteno) solo un 17.97% inferior que *N. gaditana*, quien presentaba la mayor concentración del extracto comercial, así como en clorofila-a siendo *C. onubensis* la de mayor concentración en este pigmento, no obstante, presentó una baja concentración de feofitina-a, lo que hace que el poder antioxidante derivado de los pigmentos clorofílicos sea inferior que para el caso de *P. tricornutum*.

En cuanto a su composición fenólica y actividad antioxidante total, *C. onubensis* mostró los valores más elevados de todas las muestras analizadas siendo mayores incluso que muchos alimentos antioxidantes, lo que le confiere un alto potencial antioxidante y puede ser útil en su empleo como alimento funcional, suplemento alimenticio y nutracéutico, presentando acción antitumoral, antimutagénica y protectora del daño macular, y antihiper glucemiante, antihiperlipidemiante y protectora del riesgo cardiovascular como se demostró en estudios previos.

Palabras clave: *Coccomyxa onubensis*, microalgas extremófilas, nutracéuticos, antioxidantes.

ABSTRACT

This report evaluates the antioxidant capacity of the microalgae *Coccomyxa onubensis* (*C. onubensis*), an extremophilic microorganism isolated from the acid drains of the mining area of Tinto River (Huelva, Spain) and its possible use in the food industry, by a study carried out within the SEJ-523 research group with the collaboration of the BIO-214 research group. This microalga has been shown to present a biomass rich in proteins, lipids, carbohydrates, antioxidants and vitamins that could give it great nutritional interest.

Previous studies carried out with this microalga showed that it could be used as a dietary supplement, by presenting adequate nutritional properties, showing beneficial effects by presenting an antioxidant power equal to and greater than certain foods rich in antioxidants.

The study of the antioxidant potential of the microalgae was verified by comparing it with commercial microalgae that are widely used in the pharmaceutical industry.

In this study, it was observed that *C. onubensis* showed an enrichment in pigments such as lutein, zeaxanthin, neoxanthin and lycopene, exceeding the levels of the rest of the study microalgae, the total carotenoid content (measured as equivalents in β -carotene) being only 17.97% lower than *N. gaditana*, who had the highest concentration of the commercial extract, as well as in chlorophyll-a, *C. onubensis* being the one with the highest concentration in this pigment. However, this microalga had a low concentration of pheophytin-a, which makes the antioxidant power derived from chlorophyll pigments be lower than in the case of *P. tricornutum*.

Regarding its phenolic composition and total antioxidant activity, *C. onubensis* showed the highest values of all the samples analyzed, being higher even than those values of many antioxidant foods. This feature confers *C. onubensis* a high antioxidant potential and may be useful in its use as a functional food, nutritional supplement and nutraceutical products, presenting antitumor, antimutagenic and protective action potential against macular damage, and antihyperglycemic, antihyperlipidemic and protective action against cardiovascular risk effects as demonstrated in previous studies.

Keywords: *Coccomyxa onubensis*, *extremophilic microalgae*, nutraceuticals, antioxidants.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Identificación de <i>C. onubensis</i>	4
1.2. Estado del arte y antecedentes del estudio.	7
1.3. Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) y antioxidantes.	10
1.4. Objetivos del estudio.	11
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
2.1 Aislamiento y obtención de biomasa de las algas de interés.	13
2.2. Extracción de los compuestos activos de interés.	13
2.2.1. Extracción de los pigmentos fotosintéticos y los carotenoides para análisis cromatográfico.	13
2.2.2. Extracción de compuestos antioxidantes para determinaciones espectrofotométricas.	13
2.3. Análisis de los compuestos de interés alimentario.....	14
2.3.1. Determinación espectrofotométrica de las clorofilas y los carotenoides totales.....	14
2.3.2. Determinación cromatográfica del contenido de pigmentos en extracto metanólico.	14
2.3.3. Determinación espectrofotométrica de los compuestos antioxidantes de interés.	15
2.4. Reactivos.	16
2.5. Análisis estadísticos.	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
3.1. Caracterización de los pigmentos fotosintéticos de las microalgas.	19
3.1.1. Caracterización de los pigmentos del grupo de las clorofilas.....	20
3.1.2. Análisis de los pigmentos del grupo de los carotenoides en las microalgas estudiadas.	27
3.1.3. Determinación de la actividad precursora de la vitamina A de las microalgas.....	51
3.2. Cuantificación de los polifenoles presentes en las microalgas del estudio.....	56
3.2.1. Determinación de polifenoles flavonoides.	60
3.2.2. Determinación de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables).	63
3.3. Determinación de la capacidad antioxidante total equivalente (TEAC) de los extractos microalgales del estudio.	67
3.4. Breve resumen de los resultados obtenidos.....	71
4. CONCLUSIONES.....	75
5. RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS.....	77
4.1. Libros, revistas y artículos científicos.	77
4.2. Referencias de figuras.	88
4.2.1. Libros, revistas y artículos científicos.	88
4.2.2. Páginas web.	89
4.3. Otras referencias.	89
4.3.1. Congresos.....	89
4.3.2. Páginas web.	89
4.3.3. Otros textos.....	90
5. ANEXOS.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1.a. Localización geográfica del punto de extracción de la microalga.	5
Fig. 1.1.b. Localización geológica del punto de extracción de la microalga.	5
Fig. 1.2.a. Localización geográfica del río Tinto.	5
Fig. 1.2.b. Localización geológica del río Tinto.	5
Fig. 1.3.a. Densidad celular y tasas de crecimiento de la microalga “ <i>Coccomyxa onubensis</i> ” incubadas en medios con distintas concentraciones de hierro (Fe^{2+}).	7
Fig. 1.3.b. Cromatografía correspondiente a extractos metanólicos obtenidos en cultivos de “ <i>Coccomyxa onubensis</i> ” incubada en condiciones estándar.	7
Fig. 1.4.a. Vista de la microalga “ <i>Coccomyxa onubensis</i> sp.”.	8
Fig. 1.4.b. Morfología de la microalga “ <i>Coccomyxa onubensis</i> sp.”.	8
Fig. 3.1. Relación del contenido en pigmentos del grupo de las clorofilas presentes en la microalga <i>C. onubensis</i> en condiciones de crecimiento estándar junto con los valores obtenidos para cada una de las algas comerciales de estudio.	22
Fig. 3.2. Niveles totales obtenidos de los pigmentos clorofílicos para cada uno en las diferentes algas estudiadas.	24
Fig. 3.3. Contenido en clorofila-a + feofitina-a presentes en las microalgas de estudio.	26
Fig. 3.4. Cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>C. onubensis</i> en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm.	29
Fig. 3.5. Cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>I. galbana</i> en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm.	30
Fig. 1.6. Cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>T. suecica</i> en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm.	31
Fig. 1.7. Cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>P. tricornutum</i> en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm.	32
Fig. 1.8. Cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>N. gaditana</i> en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm.	33
Fig. 3.9. Relación del contenido en pigmentos del grupo de las carotenoides presentes en la microalga <i>C. onubensis</i> en condiciones de crecimiento estándar junto con el perfil de carotenoides de cada una de las algas comerciales estudiadas.	35
Fig. 3.10. Contenido en carotenoides totales analizados presentes en las microalgas del estudio.	37
Fig. 3.11. Contenido en fucoxantina presente en las microalgas del estudio.	39
Fig. 3.12. Contenido en neoxantina presente en las microalgas del estudio.	41
Fig. 3.13. Contenido en violaxantina presente en las microalgas del estudio.	43

Fig. 3.14. Contenido en astaxantina presente en las microalgas del estudio.	44
Fig. 3.152. Contenido en luteína y zeaxantina presente en las microalgas del estudio.	46
Fig. 3.16. Contenido en licopeno presente en las microalgas del estudio.....	48
Fig. 3.17. Contenido en β -caroteno presente en las microalgas del estudio.....	50
Fig. 3.18. Contenido en equivalentes de β -caroteno presente en las microalgas del estudio.	53
Fig. 3.19. Contenido en equivalentes de vitamina A presente en las microalgas del estudio.....	55
Fig. 3.20. Recta de calibrado para la medida de polifenoles totales obtenido como densidad óptica de la absorbancia de un patrón de ácido gálico (mg-eq de ácido gálico L ⁻¹).	57
Fig. 3.21. Concentración de polifenoles totales presentes en las microalgas en función al peso fresco de cada alga.	58
Fig. 3.22. Curva de calibrado para la medida de polifenoles flavonoides obtenido como densidad óptica de la absorbancia de un patrón de catequina (mg-eq de catequina L ⁻¹).	61
Fig. 3.23. Concentración de polifenoles flavonoides presentes en las microalgas en función al peso fresco cada alga.	62
Fig. 3.24. Recta de calibrado para la medida de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables) obtenido como densidad óptica de la absorbancia de un patrón de metil-galato (mg-eq de metil-galato mL ⁻¹).	65
Fig. 3.25. Concentración de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables) presentes en las muestras microalgales en función al peso fresco del alga empleada.	66
Fig. 3.26. Curva de calibrado para la medida de la actividad antioxidante total (t=30 minutos) obtenido como densidad óptica de la absorbancia de un patrón de Trólox (mM-eq de Trólox).	68
Fig. 3.27. Capacidad antioxidante equivalente total para 30 min (TEAC 30 min) de las distintas microalgas del estudio en función al peso fresco de microalga empleada.....	70
Fig. 5.1. Espectro de absorción característico de los pigmentos caracterizados en el mix comercial de DHL Water and Environment (Dinamarca).	91
Fig. 5.2. Espectros de los pigmentos individualizados (1).	91
Fig. 5.3. Espectros de los pigmentos individualizados (2).	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Gradiente de separación por fase reversa para la determinación cromatográfica del contenido de carotenoides y clorofilas en extracto metanólico.....	15
Tabla 3.1. Contenido en pigmentos del grupo de las clorofilas presentes en la microalga <i>C. onubensis</i> en condiciones de crecimiento estándar junto con los valores obtenidos para cada una de las algas comerciales de estudio ordenados de mayor a menor contenido en pigmentos totales.	20
Tabla 3.2. Contenido en clorofila-a y feofitina-a presentes en las microalgas de estudio.	25
Tabla 3.3. Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>C. onubensis</i> en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm.....	29
Tabla 3.4. Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>I. galbana</i> en condiciones normales bajo una longitud de onda de 450 nm	30
Tabla 3.5. Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>T. suecica</i> en condiciones normales bajo una longitud de onda de 450 nm.....	31
Tabla 3.6. Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>P. tricornutum</i> condiciones normales bajo una longitud de onda de 450 nm.....	32
Tabla 3.7. Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de <i>N. gaditana</i> condiciones normales bajo una longitud de onda de 450 nm.....	33
Tabla 3.8. Contenido en carotenoides totales presentes en las microalgas del estudio.	36
Tabla 3.9. Contenido en fucoxantina presentes en las microalgas del estudio.	38
Tabla 3.10. Contenido en neoxantina presentes en las microalgas del estudio.	40
Tabla 3.11. Contenido en violaxantina presentes en las microalgas del estudio.....	42
Tabla 3.12. Contenido en astaxantina presentes en las microalgas del estudio.	44
Tabla 3.13. Contenido en luteína y zeaxantina presentes en las microalgas del estudio.	46
Tabla 3.14. Contenido en licopeno presentes en las microalgas del estudio.....	48
Tabla 3.15. Contenido en β -caroteno presentes en las microalgas del estudio.	50
Tabla 3.16. Contenido en carotenoides totales medido como $\mu\text{g-eq}$ de β -caroteno 100 g^{-1} de peso fresco en cada una de las microalgas del estudio.....	52
Tabla 3.17. Contenido en carotenoides en diferentes alimentos consumidos en España.....	54
Tabla 3.18. Contenido en equivalentes de vitamina A presente en las microalgas del estudio.....	55
Tabla 3.19. Concentración de polifenoles totales presentes en las muestras microalgales para 100 g de peso fresco.	57

Tabla 3.20. Comparación de valores de polifenoles totales para diferentes frutas y hortalizas en comparación con microalgas del estudio.....	59
Tabla 3.21. Concentración de polifenoles flavonoides presentes en las muestras microalgales para 100 g de peso fresco.....	61
Tabla 3.22. Comparación de valores de polifenoles flavonoides para diferentes alimentos ricos en este compuesto en comparación con las microalgas analizadas.	63
Tabla 3.23. Concentración de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables) presentes en las muestras microalgales para 100 g de peso fresco.....	65
Tabla 3.24. Comparación de valores de taninos hidrolizables para diferentes alimentos ricos en este compuesto en comparación con las muestra analizadas	67
Tabla 3.25. Capacidad antioxidante equivalente total de cada una de las microalgas del estudio en función al peso fresco de alga empleada para 30 minutos (TEAC tras 30 min).	69
Tabla 3.26. Comparación de valores TEAC tras 30 min para alimentos antioxidantes en comparación con las microalgas analizadas.....	70
Tabla 3.27 Recopilación de los resultados analíticos obtenidos en el estudio del potencial nutracéutico de la microalga <i>C. onubensis</i>	72

1. INTRODUCCIÓN.

La Unión Europea en su estrategia de Bioeconomía actualizada el 29 de noviembre de 2019 bajo el título “*Una bioeconomía sostenible para Europa: reforzar la conexión entre la economía, la sociedad y el medio ambiente*” trata de promover la investigación en torno a los nuevos recursos biológicos que ayuden a la Sociedad a diversificar las cadenas de valor existente y alcanzar la Economía Circular [Parlamento Europeo, 2020]. Esto hace que sea necesario la innovación y desarrollo de nuevas técnicas basadas en ciclos biológicos, así como la puesta en valor de nuevos recursos y productos revalorizables.

El caso de las microalgas es un ejemplo claro de la implementación de nuevas técnicas para alcanzar este nuevo sistema económico, debido, en primer caso a sus propiedades intrínsecas como son su elevado rendimiento productivo y su biomasa rica en proteínas, lípidos y carbohidratos de alto interés en diversos sectores económicos [Steffen et al., 2015].

Las microalgas, o algas microscópicas, son un grupo diverso de algas (Algae L. 1751) de tamaño microscópico. Esta clasificación no muestra un grupo taxonómico, sino que se tratan de organismos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica y de obtener el carbono orgánico a través de la luz solar diferente a la realizada por las embriofitas o plantas terrestres. Esta clasificación tan extensa ha provocado que en ella se encuentren organismos de diferentes grupos taxonómicos caracterizados por su nivel de organización protofítico o talofítico y la presencia de clorofila (al menos del tipo a) y otros pigmentos en mayor o menor grado de autotrofia respecto al carbono, tratándose de un grupo funcional ecológico [Toimil, 2021].

Este grupo funcional se compone de entre 22500 y 33000 especies agrupadas en 12 a 15 clase con diferentes líneas filogenéticas y son las responsables de la producción de aproximadamente 2/3 de la materia orgánica de la Biosfera [Romero-Zarco, 2018; Adl et al., 2005]. A su vez, estas son la causa del 50% de las emisiones de oxígeno fotosintético global y son capaces de capturar alrededor del 40% del dióxido de carbono emitido por los humanos, fomentando el control del efecto invernadero y la lluvia ácida [Field et al., 1998; Wang et al., 2008; Kumar et al., 2010; Zeng et al., 2011] desempeñando un importante papel como organismos autótrofos y un enorme impacto en la cadena trófica, al ser la base de la captación lumínica en ecosistemas acuáticos y de la producción primaria de materia orgánica.

Este tipo de organismos, además, están siendo ampliamente estudiados desde el punto de vista tecnológico debido a sus múltiples funciones y a su gran potencial biotecnológico desde el punto de vista de la Economía Circular, al tratarse de organismos vivos capaces de diversificar las cadenas de valor existentes y de desarrollar nuevas tecnologías que permiten reducir la generación de residuos de tipo orgánico, así como la captación de las

emisiones de CO₂, favoreciendo el cierre del ciclo de la producción, además de dar respuesta a uno de los principales problemas derivados de la acción humana a nivel global

La Economía Circular es uno de los conceptos que más fuertemente están afianzándose en el panorama mundial actual surgiendo gran cantidad de estudios al respecto para la actualización de las factorías con el fin de afectar en la menor medida posible la economía de los Recursos Naturales, así como el propio Medio Ambiente [Pearce y Turner, 1989]. Este modelo, sugerido en el siglo pasado, se contrapone con el sistema clásico conocido como “lineal”, en el cual se le da un final de vida útil a los productos convirtiéndolos en desechos cuando es empleado por el consumidor final; esto hace que, a largo plazo, este sistema sea insostenible al consumir todos los recursos del planeta y crear sustancias inservibles desechadas [Steffen et al., 2015].

De esta forma y con el fin de premiar la sostenibilidad, la Economía Circular se apoya en el principio de “cerrar el ciclo de vida”, así los productos que anteriormente debían de ser desechados, pasan a ser un nuevo recurso, reduciéndose el consumo de materias primer y evitando el desperdicio de energía, agua y materias primas [Rodríguez, 2019]. Dentro de los principios marcados para la introducción de la Economía Circular en el comercio y la industria se diferencian los ciclos biológicos y los técnicos siempre que el ciclo de desarrollo continuo sea positivo y preserve y aumente todo el capital natural [Perman et al., 1996], siendo uno de los principales focos de atención como ciclo biológico el potencial uso de las microalgas.

Potenciar el empleo e implementación de las llamadas biorrefinerías de microalgas es uno de los principales objetivos de la investigación en biotecnología de microalgas, con el fin de fomentar el cierre del ciclo del carbono mediante esta fijación de CO₂ derivada de la propia producción de la biorrefinería [Dufour, 2017].

No obstante, la obtención de biocombustibles no es la única opción para fomentar el empleo de las microalgas. Desde hace años, en China, se ha incentivado la creación de factorías naturales para el cultivo microalgal con propiedades alimentarias y farmacológicas o nutracéuticas. Estas factorías presentan una alta eficiencia y bajo consumo de recursos, al tener una alta productividad y solo requerir de agitación, luz y control de las condiciones óptimas de cultivo [Abalde et al., 1995].

El empleo de las microalgas en la industria alimentaria y cosmética, en la actualidad, no está ampliamente potenciado en la Sociedad Europea, pudiendo ser un objetivo a alcanzar con el fin de potenciar el empleo de los ciclos biológicos en las industrias, tanto para la obtención de productos de interés como para la reducción de la emisiones netas de CO₂ a la atmósfera.

Así, unificando los dos intereses de la sociedad europea, surge la biotecnología de microalgas. Tal y como se recoge en el Programa POCTEFA (2018), “las microalgas representan actualmente un nuevo recurso renovable para la obtención de bio-productos

destinados a los sectores energéticos, químicos y agropecuarios”. Tanto es así que en las últimas décadas ha aumentado considerablemente la demanda de biomasa marina de esta índole para su empleo directo en alimentación (alimentos funcionales o nutraceuticos), para la obtención de productos industriales o terapéutico o, en especial, para la obtención de biodiésel [del Río et al., 2017].

La biotecnología de microalgas ha sido una de las disciplinas que más ha influenciado a este aumento de productos sostenibles derivados de los ciclos biológicos de microalgas. Esto es debido a que esta disciplina se encarga de emplear técnicas biotecnológicas para inducir a las microalgas a la generación de estos productos de interés e, incluso, ha sido la inductora de la introducción de estas en técnicas de fitorremediación, dado su alta tasa de proliferación y su capacidad de biotransformación de contaminantes presentes en medios líquidos y gaseosos en pos de la generación de biomasa [Hernández Pérez y Labbé, 2014].

Las microalgas tienen una gran utilidad dentro de la industria alimentaria ya que es un sistema totalmente eficiente al alcanzar grandes cantidades de biomasa en poco tiempo gracias a su tasa de crecimiento superior a la de otras especies vegetales terrestres. Estos grandes rendimientos, unido a que la modificación de su composición bioquímica empleando técnicas biotecnológicas presenta una gran facilidad, hacen de las microalgas el principal foco de atención para la obtención de nutraceuticos sostenibles gracias a que, además, presentan altas concentraciones de compuestos de interés comercial como las proteínas, los lípidos, el almidón, el glicerol, los pigmentos naturales y otros biopolímeros que podrían servir para equilibrar la dieta de los consumidores [Brennan y Owende, 2010].

La biotecnología de microalgas es una disciplina bastante novedosa, siendo la *Chlorella vulgaris* (una Chlorophyceae de agua dulce con una alta presencia en el medio natural) el primer objeto de cultivo y análisis [Romero López y Echevarría Lazo, 1999]. Esta especie de microalga junto con *Spirulina* (o *Arthrospira*) *maxima*, *Haematococcus pluvialis*, *Diatronema vlkianum* e *Isochrysis galbana* han sido los máximos exponentes del empleo de esta disciplina para la obtención de nutraceuticos en forma de píldora y pastilla con concentrados de su biomasa [Batista et al., 2013]. Como se ha demostrado, en muy pocos casos la biomasa de las microalgas se emplea para alimentación humana (tan solo el 30% de la producción se destina a alimentación animal y es en su mayoría destinada a la acuicultura) y se restringe al uso de *S. maxima*, *C. vulgaris*, *Dunaliella*, *Nostoc* y *Aphanizomenom*, destacando la *Chlorella* y la *Spirulina* debido a su fácil digestión por el reducido contenido en glucosa [Batista et al., 2013].

En los últimos años ha cobrado especial relevancia una microalga aislada por el equipo del Dr. Vílchez en la zona norte del río Tinto (Huelva) debido a su gran interés dentro de la industria alimenticia. Esta alga, nombrada como *Coccomyxa onubensis* [Garbayo et al. ex J. L. Fuentes et al., 2016] ha sido cultivada y estudiada como potencial productor de biodiésel [Ruíz-Domínguez et al., 2015], pero, en los últimos años, y tras su caracterización bioquímica [Garbayo et al., 2012] y el conocimiento de su actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos [Navarro et al., 2015], ha pasado a ser objeto de estudio como

nutracéutico para el control y tratamiento de los efectos derivados del síndrome metabólico [Navarro et al., 2020].

En el pasado año, se publicaron los últimos resultados del estudio con esta microalga [Navarro et al., 2020], en el cual se observó que esta alga presentaba un suave efecto hematopoyético con respuesta hipocolesterolemizante e hipolipemizante, a su vez, se observaron resultados prometedores relacionados con la disminución de los niveles de glucemia en los roedores de estudio, reduciéndose los efectos derivados del Síndrome Metabólico a nivel sanguíneo e, incluso, se apreciaron mejoras en la calidad de las membranas plasmáticas del sistema nervioso. Junto con estos resultados, se confirmó que la ingesta de esta microalga no inducía ningún daño orgánico a nivel sérico [Amador, 2020; Toimil, 2021], por lo que se concluyó que no existía riesgo derivado de la ingesta de esta microalga en ensayos de avanzados de experimentación animal.

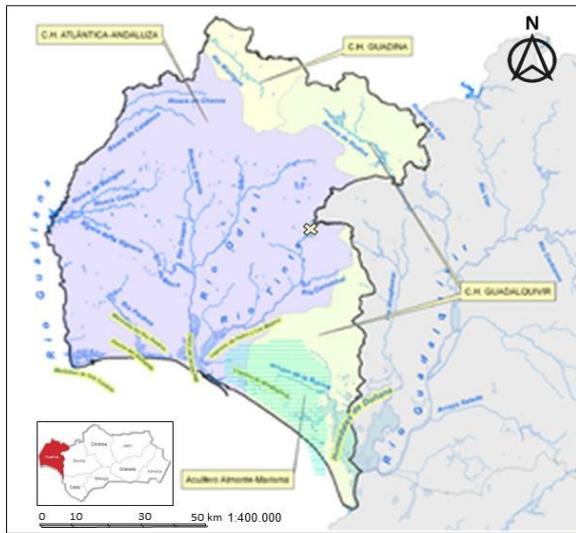
1.1. Identificación de *C. onubensis*.

La microalga *C. onubensis* SAG 2510 [Fuentes et al., 2016] fue aislada de las aguas ácidas presentes en el curso alto del río Tinto en la localización georreferenciada para las coordenadas de latitud 37.585115° y longitud -6.550754° (Fig. 1.1.a y 1.1.b) a su paso por la Cuenca minera de Huelva [Navarro et al., 2017].

El río tinto (Fig. 1.2.a) nace en la Peña del Hierro, situado al norte de Nerva, y desemboca en el océano Atlántico en la desembocadura estuarina del Tinto-Odiel, con una longitud total de casi 100 km [Davis et al., 2000]. Este río presenta variaciones de caudal durante el año hidrológico, pasando de 1 hm³/mes (escorrentía mínima), a aproximadamente 40 hm³/mes (escorrentía máxima) durante los meses de diciembre a febrero [BOJA, 2016].

Geológicamente (Fig. 1.2.b), este río discurre movilizando e interactuando con dos de las tres unidades de la provincia de Huelva, la Zona Sud-portuguesa (en su curso alto) y la Cuenca del Guadalquivir (en su tramo final). A su paso por la Cuenca minera, recorre varias explotaciones mineras como las minas de Riotinto, localizadas en la conocida como faja pirítica Ibérica, la unidad más septentrional de la zona Sud-portuguesa, que se trata de una banda de 250 km de largo y 75 km de ancho de yacimientos de sulfuro masivo y manganeso [Mellado, 2006].

a) Localización Geográfica del río Tinto



b) Localización Geológica del río Tinto

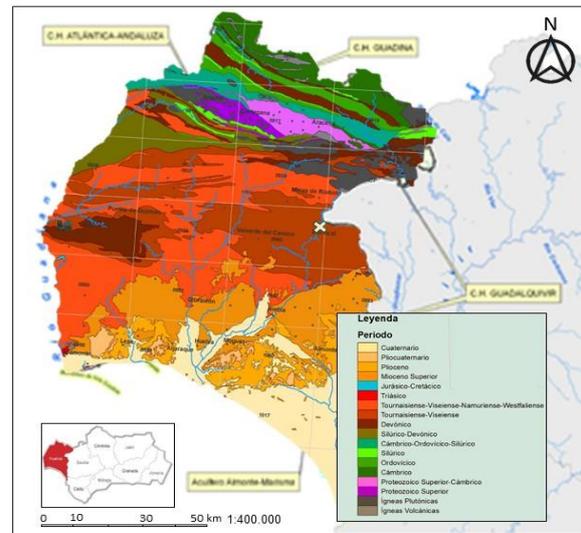
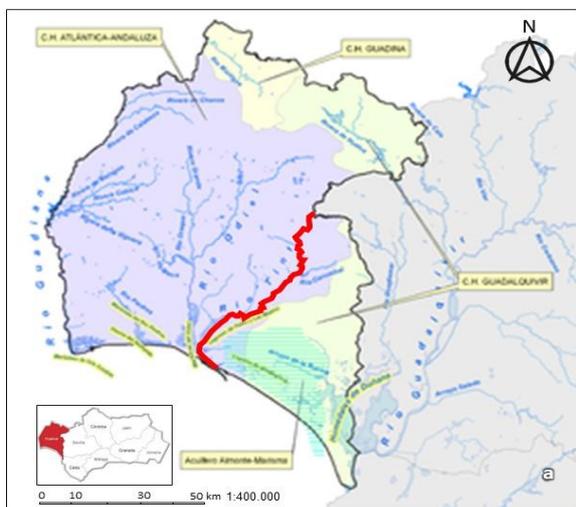


Fig. 1.1.a. Localización geográfica del punto de extracción de la microalga (Elaboración propia mediante software ArcGIS vs 10.8.1) [Fuente: Mapa de Ríos y Distritos hidrogeográficos de Andalucía 100 REDIAM, 2008].

Fig. 1.1.b. Localización geológica del punto de extracción de la microalga (Elaboración propia mediante software ArcGIS vs 10.8.1) [Fuente: DERA 100 IECA, 2015].

Localización Geográfica del río Tinto



Localización Geológica del río Tinto

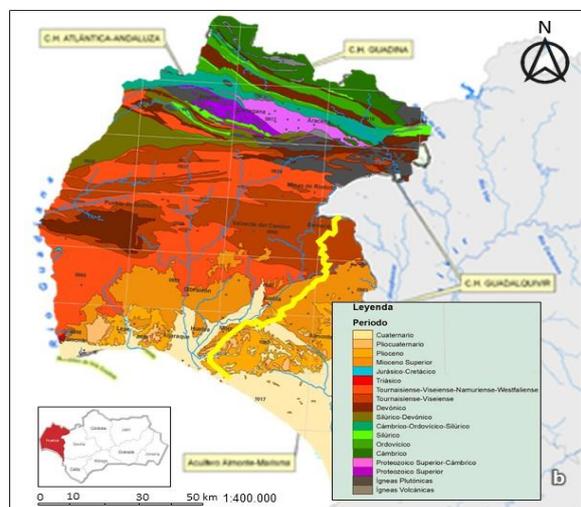


Fig. 1.2.b. Localización geográfica del río Tinto (Elaboración propia mediante software ArcGIS vs 10.8.1) [Fuente: Mapa de Ríos y Distritos hidrogeográficos de Andalucía 100 REDIAM, 2008].

Fig. 1.2.b. Localización geológica del río Tinto (Elaboración propia mediante software ArcGIS vs 10.8.1) [Fuente: DERA 100 IECA, 2015].

Estos materiales se formaron durante la etapa del Devónico al Carbonífero en un ambiente reductor; es por ello, que, tras su exposición supergénica, tienden a oxidarse en un proceso conocido como Drenaje Ácido (AMD, o Acid Mine Drainage, si se trata de origen antrópico,

o ARD, o Acid Rock Drainage, cuando es por causas naturales). En este proceso los minerales de los sulfuros metálicos, en especial la pirita (FeS_2), se oxidan en un medio acuoso (acelerado por la acción microbiana de bacterias como la *Acidithiobacillus ferrooxidans*), liberando al medio protones o hidrogeniones que reducen el pH, aumentando la movilización en el agua de los metales que pasan al medio acuoso al disolverse en aguas superficiales y subterráneas afectadas por el drenaje Ácido [Galván, 2011], los cuales conllevan la aparición de hábitats ácidos y ecosistemas y ambientes extremos debido a la exposición de estos materiales, proceso natural que ha ocurrido en la Tierra desde hace millones de años [Phoenix et al., 2006], intensificada por la acción humana asociada a la minería de la Cuenca minera desde hace más de 3000 años, aumentando el volumen de roca expuesta en forma de minas (a cielo abierto o de galería) y escombreras [Sarmiento et al., 2008].

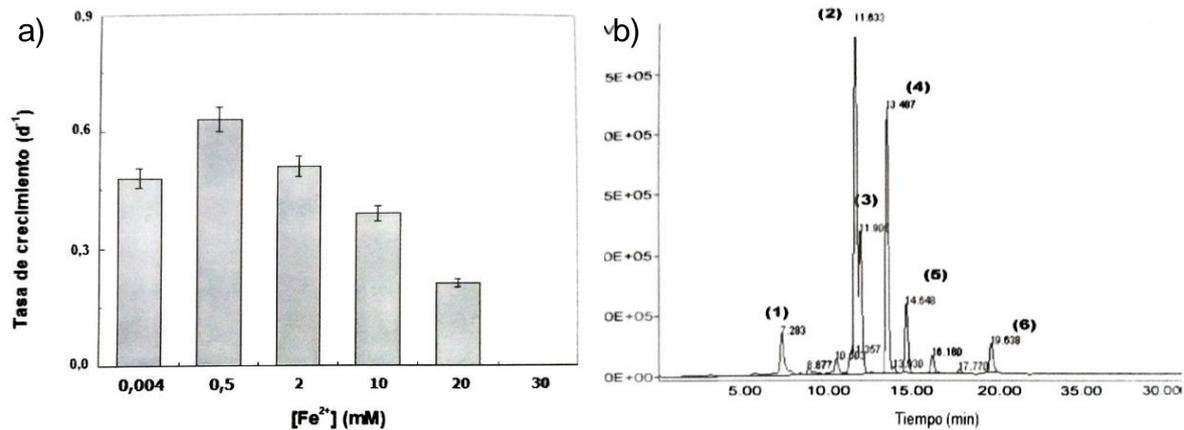
Las condiciones de acidez presentes en las aguas del río Tinto generan graves consecuencias como es la escasez de nutrientes inorgánicos (tales como los nitratos o el amonio que son requeridos por los organismos fotosintéticos; productores primarios del ecosistema), limitaciones de carbono en disolución (derivado de la conversión del bicarbonato a ácido carbónico con liberación del CO_2 a la atmósfera dada su baja solubilidad en las aguas con extrema acidez) y la presencia de altas acumulaciones de especies reactivas del oxígeno como son los peróxidos que inducen la ruptura de la membrana plasmática de las células por peroxidación lipídica [Forján et al., 2015].

La microalga *C. onubensis* es un espécimen de alto interés, en primer lugar, debido a su resistencia a estas condiciones extremas y, además, por su elevada tasa de crecimiento y productividad en concentraciones altas de hierro en solución [Forján et al., 2015]. Con el fin de comprender las condiciones de crecimiento óptimo de esta microalga para su cultivo y producción, se llevaron a cabo análisis que mostraron que su proliferación dependía de la presencia de este elemento en solución (Fig. 1.3.a) aumentando su proliferación en función del incremento de Fe^{2+} hasta alcanzar el óptimo a 0,5 mM e inhibiéndose su crecimiento para valores superiores a 20 mM [Garbayo et al., 2012].

Esto se debe a las adaptaciones que, al igual que otras microalgas extremófilas, muestra *C. onubensis* con el fin de defenderse ante las condiciones especiales del medio. Entre estas adaptaciones destaca la presencia de gránulos de almidón con el fin de hacer frente a la escasez de carbono en el medio, la presencia de gránulos electrodensos en el citoplasma, los cuales corresponderían con inclusiones metálicas, como respuesta a la presencia de metales pesados en disolución que, unidas al aumento del tamaño de las vacuolas, generan resistencia ante la actividad de estos como respuesta de bioacumulación [Forján et al., 2015].

Junto con esto, *C. onubensis* ha mostrado adaptaciones para evitar la peroxidación lipídica derivada del estrés oxidativo mediante la hiperacumulación de ácidos grasos insaturados y terpenoides (carotenoides). Este mecanismo antioxidante le permite hacer frente a las especies reactivas del oxígeno y es una respuesta ante la oxidación ampliamente empleada en microorganismos extremófilos, cuyo fin esencial es evitar los efectos nocivos de la presencia de radicales libres producto de dicho estrés oxidativo [Granado-Lorencio et al., 2009]. Entre los carotenoides que presenta (Fig. 1.3.b) destacan por su abundancia la luteína, la zeaxantina, la violaxantina y el β -caroteno [Garbayo et al., 2012].

Fig. 1.3.a. Densidad celular y tasas de crecimiento de la microalga “*Coccomyxa onubensis*” incubadas en



medios con distintas concentraciones de hierro (Fe^{2+}). [Fuente: Forján et al., 2015].

Fig. 1.3.b. Cromatografía correspondiente a extractos metanólicos obtenidos en cultivos de “*Coccomyxa onubensis*” incubada en condiciones estándar. (1) violaxantina, (2) luteína, (3) zeaxantina, (4) clorofila-b, (5) clorofila-a, (6) β -caroteno. [Fuente: Forján et al., 2015].

1.2. Estado del arte y antecedentes del estudio.

En los últimos años, la línea de investigación de nuevos alimentos y nutracéuticos ha mostrado un especial interés en el estudio de los beneficios alimenticios de las microalgas, es por esta razón que la influencia de la ingesta de estas microalgas en animales es aún objeto de estudio. A pesar de ello, se ha comprobado la influencia de algunas algas en el crecimiento de animales además de la biodisponibilidad de algunos de los componentes de estas para su empleo como aditivo potencial dentro de la industria alimentaria [Gudiel-Urbano y Goñi, 2001-a].

El uso de las algas en la alimentación es algo que se ha extendido tradicionalmente mucho en países asiáticos, no obstante, en los países europeos aún se está iniciando su comercio y reconocimiento; a pesar de ello, en los últimos años, la aceptación de estos productos marinos está mostrando un aumento considerable. Esto es debido a que se trata de un alimento equilibrado con bajas calorías y gran cantidad de nutrientes esenciales, bajo contenido lipídico y alta presencia de ácidos grasos insaturados (que presentan grandes beneficios para la prevención de enfermedades crónicas cardiovasculares); las algas, además presentan bajo contenido de carbohidratos hidrolizables, aumentando el contenido

de fibra en la dieta que, además, favorece la disminución de los niveles de colesterol en sangre y mejora el tránsito intestinal; junto con esto, las microalgas presentan un gran conjunto de vitaminas, aminoácidos esenciales y micronutrientes, lo que las convierte en un potencial suplemento alimentario [Quitral et al., 2012].

Algunos estudios incluso han podido demostrar que la ingesta de algas, además, presenta beneficios indirectos al modificar la composición y actividad de la microflora intestinal de la rata [Gudiel-Urbano y Goñi, 2001-b]. Todo esto hace que estudiar el efecto de nuevas especies de microalgas, como es el caso de *C. onubensis* (Fig 1.4.a y 1.4.b), como alimento funcional, suplemento alimentario o nutraceutico sea necesario.



Fig. 1.4.a. Vista de la microalga "*Coccomyxa onubensis* sp." Bajo contraste de fases (100x) [Fuente: Romero, 2015].

Fig. 1.4.b. Morfología de la microalga "*Coccomyxa onubensis* sp." [Fuente: Fuentes et al., 2016].

Como otros alimentos potenciales, el primer paso a realizar fueron los estudios de bioseguridad, con el fin de demostrar que este "futuro alimento" era inocuo. Este proceso, previo al estudio de los beneficios del alimento, se conoce como fase preclínica y se realiza, generalmente, sobre animales de experimentación, especialmente roedores, debido a que su bioquímica y metabolismo es fácilmente semejable con los de los humanos, presentan tasas de crecimiento aptas para la reducción de los tiempos de experimentación y es posible eliminar las afecciones externas que puedan generar errores en el procedimiento; junto con esto, los roedores muestran un especial interés debido a su posibilidad de cría consanguínea, la creación de híbridos viables y fértiles y la capacidad de transmisión de alteraciones del genoma "a pedido" [Benavides y Guénet, 2003]. Para emplear estos vectores, suelen crearse piensos modificados, mezclando dietas convencionales en función del roedor empleado y suplementando con compuestos de interés para el estudio realizado [Van Haver, 2007].

En los estudios de bioseguridad que se llevaron a cabo por nuestro el equipo de investigación SEJ-523, se concluyó en que *C. onubensis* podía servir como suplemento para elaborar estos piensos siendo tolerado por los vectores de experimentación (*Rattus norvegicus* var. Lon Evans), sin provocar alteraciones de parámetros bioquímicos de daño hepático, pancreático o renal incluso a dosis muy elevadas (no fisiológicas), mostrando un

leve efecto hematopoyético y un fuerte efecto hipocolesterolemiaante con poder hepatoprotector. Junto con esto, no se obtuvieron datos que pudieran llevar a pensar que se mostrasen daños ni respuesta negativa a nivel histopatológico [Romero, 2015; Navarro et al., 2016]. Las conclusiones obtenidas para los estudios de bioseguridad realizados, mostraron la necesidad de continuar el estudio de la *C. onubensis* como suplemento alimentario, dado que se trató de un producto seguro con “las propiedades nutricionales adecuadas de los alimentos funcionales” [Romero, 2015].

Tras esto, se procedió a los estudios avanzados mediante el empleo de los supuestos bajo los cuales se basaron los estudios de bioseguridad resaltados como “óptimos” (suplementación en la dieta con 62,5 mg de microalga en polvo por cada gramo de dieta convencional o lo que es lo mismo 6,25% del peso). Estos estudios se realizaron empleando el modelo animal considerado más ventajoso, *Rattus norvegicus* var. Long Evans (Orden Rodentia, Suborden Myomorpha, Familia Muridae), esto fue debido a que presenta una gran similitud anatómica y fisiológica con los ratones y su mayor tamaño (mayores órganos y volumen de sangre) facilitaría su tratamiento posterior. Estos individuos, además, presentan poca visión, no regurgitan ni vomitan, lo que hace que sean más seguros a la hora de garantizar la ingesta del alimento [Romero, 2015] y tienen un metabolismo constante [Salvador, 2012].

Esta variedad de rata muestra una alta docilidad, lo que favorece su manipulación y reduce los riesgos y su tamaño máximo es reducido, ahorrando en producción de alimento. Finalmente, presentan una gran ventaja al reducirse la variabilidad genética gracias a la capacidad de cría de cepas consanguíneas. No obstante, las características del ensayo indujeron a la necesidad de emplear individuos machos, ya que se requería de una composición hormonal estable durante la vida adulta para evitar errores de interpretación de los parámetros esenciales para el estudio en ensayos nutricionales [Navarro et al., 1999].

Tras un período de alimentación de alimentación semicontinua en condiciones ad libitum realizado en los roedores, se observó que la microalga presentaba la capacidad de contrarrestar el aumento sérico de glucosa producida por una ingesta de dieta hipercalórica, así como inducción a la disminución de los niveles de colesterol total y, concretamente, colesterol-LDL a unos niveles comparables y semejantes con el fármaco empleado de forma general para el tratamiento y control de los efectos del síndrome metabólico en sangre en humanos y animales (atorvastatina 10 mg/kg de peso y día). Junto con esto, se apreciaron beneficios a nivel del sistema nervioso al protegerse frente a la disminución del contenido en EPA (ácido eicosapentanoico) del tronco encefálico y el cerebelo y el nivel de DHA (ácido docosahexanoico) de la médula espinal de forma semejante que el fármaco, disminuyendo, además el contenido de ácido palmítico y araquidónico del mesencéfalo y la médula espinal, por lo que mostró una clara mejora de la calidad de las membranas celulares del sistema nervioso sin mostrar ningún daño en los órganos de los individuos a nivel histológico ni mediante marcadores de daño bioquímico

[Amador, 2020; Navarro et al., 2020; Tomil García, 2021]. De esta forma se concluyó mediante estudios en animales que la microalga contrarrestaba los efectos ligados al síndrome metabólico derivados de la hipercolesterolemia e hiperlipidemia, hiperglucemia y, además, podría servir como prevención ante la disfunción cognitiva asociada a la dieta. Con el fin de concluir con esta fase de estudio en vectores animales, se hace necesario continuar los estudios orgánicos asociados a los marcadores de actividad enzimática asociada a la acción del estrés oxidativo inducido por las dietas hipercalóricas.

Por otro lado, mediante estudios de la biomasa fresca de la microalga, se obtuvieron resultados que mostraron que su capacidad antioxidante (medida en equivalentes de Trólox) era de 3,65 μ moles de Trólox por cada 100 gramos del peso fresco. Esta alta actividad antioxidante venía unida a un valor de polifenoles totales de 167,2 mg de ácido gálico por cada 100 g de peso, un contenido en flavonoides de 21,32 mg equivalentes de catequina por cada 100 g de peso fresco, un contenido en taninos hidrolizables de 450 mg de metil-galato por cada 100 gramos de peso seco y contenidos de 0,1462 mg de β -caroteno por cada 100 gramos de peso fresco [del Valle, 2016; Toimil, 2021]. Por lo que se confirmaba que esta microalga presentaba un alto contenido en antioxidantes naturales absorbibles por los organismos que adaptase su dieta con este suplemento dietético.

De esta forma, la microalga presenta un gran potencial como suplemento alimenticio antioxidante [Garbayo et al., 2012], por lo que su empleo para el control y estabilización del estrés oxidativo dentro de los tejidos animales sería fundamental para atacar las tres principales consecuencias del Síndrome Metabólico. Es por este motivo, que se procederá a la comparativa de estas propiedades antioxidantes del alga de estudio con respecto a otras algas comerciales con propiedades antioxidantes aportadas por el Laboratorio de Investigación y Control Agroalimentario de la Universidad de Huelva del Centro de Investigación y Desarrollo de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (CIDERTA).

1.3. Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) y antioxidantes.

El estrés oxidativo celular es una de las consecuencias derivadas de una dieta hipercalórica y el síndrome metabólico en los animales [Bernabé et al., 2010]. La principal causa del estrés oxidativo es la presencia en las células de los llamados “radicales libres”, los cuales son especies químicas (átomos, moléculas o partes de las moléculas) que no pueden existir de forma independiente en el medio debido a su inestabilidad orbital. Estos radicales suelen presentar uno o varios electrones desapareados que suelen ser cedidos a otras estructuras (agente reductor) o aceptan electrones de estas estructuras (agente oxidante) [Halliwell, 1993].

Los principales agentes causantes del estrés oxidativo en la naturaleza son las Especies Reactivas del Oxígeno (EROs), las cuales, a su vez, pueden ser radicales libres o no. Entre los más importantes destacan los radicales superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), hidroperóxido ($H_2O^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}), alcoxi (RO^{\cdot}) y peroxi (ROO^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO^{\cdot}) y dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}). En muchos casos, estas moléculas pueden ser

asimiladas del medio o de origen endógeno (surgen tras reacciones secundarias no deseadas entre moléculas del sistema biológico). Estos EROs presenta una reactividad variable, dependiente del tipo de molécula (naturaleza química esencialmente), así, son más reactivos los radicales libres de reducido volumen, aunque presenten una carga eléctrica equivalente [Valko et al., 2007].

Dentro de las células se producen diversas reacciones que pueden provocar la generación de estos EROs y radicales libres de origen endógeno. Entre las diferentes fuentes principales, se destaca la acción de las mitocondrias celulares derivado del metabolismo del oxígeno por la vía univalente. De los cuatro complejos asociados al transporte electrónico en la cadena respiratoria, se ha comprobado que son los complejos I y III aquellos que producen estos radicales libres endógenos causantes del estrés oxidativo [Boveris et al., 1976; Turrens y Boveris, 1980]. Además, el radical hidroxilo afecta a la función de barrera permeable selectiva de las membranas biológicas [Goodam, 1998] al verse sus ácidos grasos poliinsaturados afectados por la peroxidación lipídica inducida por este. Estas reacciones afectan al ácido graso formando un radical carbonado que inicia una cadena de reacciones oxidativas. La única forma de evitar la pérdida de fluidez de las membranas y posterior lisis celular es presentar un nivel de antioxidantes tal que puedan hacer frente a estas sustancias conformando complejos estables que inhiban la acción catabólica de los radicales libres [Halliwell, 1990].

Los antioxidantes son un grupo de elementos con una importante función homeostática entre la que destaca la capacidad de controlar las concentraciones de los radicales libres por debajo de umbrales citotóxicos [Willcox et al., 2004]. Estas especies antioxidantes pueden ser de naturaleza enzimática y no enzimática y son capaces de prevenir la oxidación de otras moléculas al interaccionar y estabilizar las estructuras afectadas o transformar a configuraciones reducidas las especies oxidantes [Halliwell, 1995]. Entre los principales antioxidantes no enzimáticos presentes en las microalgas se pueden diferenciar los polifenoles y los pigmentos carotenoides, especialmente.

Estos compuestos antioxidantes presentes en microalgas han sido objeto de estudio en especial por la industria cosmética y alimentaria, al reducir el envejecimiento celular y los posibles daños derivados, destacando los extractos activos de cuatro microalgas: *Isochrhysis galbana*, *Nannochloopsis gaditana*, *Phaeodactylum tricorutum* y *Tetraselmis suecica*, (presentes en un extracto bioactivo comercial junto con *Dunaliella salina* conocido con el nombre de Dermalgae®) las cuales serán estudiadas junto a la microalga de estudio *C. onubensis* con el fin de caracterizar la potencial acción nutracéutica de nuestra alga en comparación con otras ya comercializadas.

1.4. Objetivos del estudio.

Objetivo principal: El siguiente trabajo de investigación de fin de máster se enfoca en el estudio de la utilidad de la microalga *Coccomyxa onubensis* como suplemento alimentario antioxidante mediante la comparativa de diversos parámetros con respecto a cuatro de las

cinco algas presentes en el compuesto bioactivo Dermalgae®. En particular, este trabajo se centra en el análisis de diferentes compuestos bioquímicos presentes en las microalgas que presentan respuesta antioxidante al ser ingeridos por organismos vivos.

Para alcanzar este objetivo principal, establecemos los siguientes objetivos específicos:

- Obtención y preparación de biomasa de *Coccomyxa onubensis* para su posterior empleo.
- Obtención de los extractos bioactivos metanólicos de todas las microalgas del estudio para el análisis cromatográfico y espectrofotométrico, así como el extracto en acetona para la determinación de los pigmentos totales.
- Caracterización de los picos cromatográficos obtenidos mediante el espectro de absorción propio de los pigmentos fotosintéticos.
- Caracterización cromatográfica y espectrofotométrica de los pigmentos totales e individuales de cada alga del estudio y comparativa de las concentraciones obtenidas mediante el empleo de patrones en cromatografía y fórmulas empíricas para la espectrofotometría.
- Determinación espectrofotométrica de los compuestos fenólicos totales y parciales de cada alga del estudio y comparación de los valores obtenidos entre sí y con respecto a alimentos de alto contenido en los mismos.
- Determinación espectrofotométrica de la actividad antioxidante total de cada alga del estudio y comparación de los valores obtenidos entre sí y con respecto a alimentos de alto valor antioxidante.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 Aislamiento y obtención de biomasa de las algas de interés.

La biomasa de la microalga de estudio *C. onubensis* fue facilitada por el grupo de investigación BIO-214 cuando el cultivo se encontraba en etapa de crecimiento exponencial. Fueron recogidas mediante centrifugación y posteriormente liofilizadas para finalmente ser almacenadas hasta su empleo posterior a -80°C .

Todas las algas comerciales estudiadas fueron suministradas por los proveedores especializados y suministradas ya liofilizadas, conservándose en las mismas condiciones que la biomasa de *C. onubensis*.

2.2. Extracción de los compuestos activos de interés.

Todas las muestras de microalgas fueron tratadas para su análisis en forma de extracto metanólico o en acetona, siguiendo dos procedimientos diferenciados en función del sistema analítico a emplear debido a la especificidad de los reactivos requeridos, así como la solubilidad de los compuestos a analizar.

2.2.1. Extracción de los pigmentos fotosintéticos y los carotenoides para análisis cromatográfico.

El polvo de las microalgas fue tratado mediante una extracción metanólica con el fin de separar la fracción soluble de los compuestos sin interés.

Para ello, en primer lugar, se procedió a la rotura de las paredes celulares y el homogenizado de la muestra, para lo cual se dispuso una fracción del polvo de las algas de estudio en un volumen final de 4 mL de metanol puro (grado HPLC) a una concentración de $0,003\text{ g mL}^{-1}$ y se homogenizó empleando un homogeneizador de alta eficiencia (Ultraturrax T 25 basic, IKA-Werke GmbH & Co. Kg, 79219 Staufen, Alemania), ajustado a una velocidad de giro de 2500 rpm, manteniendo la temperatura de la muestra a 4°C (con la ayuda de un baño de hielo), seguido de una homogenización manual empleando un Potter de vidrio con vástago de teflón para completar la rotura de las paredes celulares y permitir la liberación de todos los pigmentos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 5500 g durante 5 minutos para eliminar restos insolubles, y el sobrenadante se almacenó en oscuridad a 4°C hasta el momento de las determinaciones, con el fin de evitar alteraciones indeseadas de la muestra.

2.2.2. Extracción de compuestos antioxidantes para determinaciones espectrofotométricas.

Para la extracción de los compuestos antioxidantes para las determinaciones espectrofotométricas se empleó un medio de metanol al 30% de calidad analítica, al cual

se le añadió la muestra pulverizada y seca a una concentración final de $0,04 \text{ g mL}^{-1}$ en un volumen total de 2,5 mL.

Esta muestra fue procesada en frío y oscuridad mediante la homogenización siguiendo el procedimiento descrito previamente, para finalmente centrifugarla a 12500 g durante 10 min a una temperatura de 4°C . El sobrenadante generado tras la separación de fases fue extraído y alicuotado para las diferentes determinaciones, almacenándose en oscuridad a -80°C para evitar la degradación de los compuestos antioxidantes.

Para la determinación de los pigmentos totales se realizó la misma extracción con una concentración de $0,02 \text{ g mL}^{-1}$ de cada alga en acetona fría al 90% y se mantuvo en agitación durante 24 horas a 4°C hasta su posterior análisis espectrofotométrico.

2.3. Análisis de los compuestos de interés alimentario.

Todos los análisis se realizaron manteniendo la cadena de frío y en oscuridad, con el fin de evitar la oxidación y degradación de los compuestos antioxidantes. Por ello, se emplearon recipientes de vidrio tintado o, en su defecto, forrados con aluminio, y se mantuvieron en un baño de hielo durante períodos de tiempo reducidos.

2.3.1. Determinación espectrofotométrica de las clorofilas y los carotenoides totales.

Para proceder a las determinaciones de los pigmentos fotosintéticos, así como los carotenoides totales, se empleó un volumen final de 1 mL del extracto en acetona y se procedió a su medición espectrofotométrica en un dispositivo UV-VIS (Spectronic 200E Version 4.07i, Thermo Fisher Scientific 02451, Mundelein, Illinois, USA).

Para el cálculo de las clorofilas a, b y c presentes en los extractos, se procedió a la medición de la absorbancia del sobrenadante obtenido tras la extracción a una longitud de onda de 664, 647 y 630 nm respectivamente, empleando las ecuaciones de Arnon (1949) para la clorofila-a, la clorofila-b y la clorofila-c, así como para el valor de feofitina-a (producto de degradación de la clorofila-a que se calculará como la diferencia de absorbancia antes y después de la degradación de clorofila en medio ácido a una absorbancia de 664 nm). Todos estos valores obtenidos fueron corregidos mediante la resta del valor de turbidez de la muestra (medida a 750 nm, la cual se repitió tras el proceso de acidificación de la muestra para el cálculo de la feofitina-a), siguiendo el método de Clesceri et al (1988) modificado.

2.3.2. Determinación cromatográfica del contenido de pigmentos en extracto metanólico.

La medición de los extractos se llevó a cabo mediante inyección manual (con el fin de evitar la exposición prolongada de las muestras a la temperatura ambiente) en un cromatógrafo líquido de alta precisión o HPLC (System Gold HPLC, Beckman Coulter Inc., 4300, N. Harbor Blvd., Fullerton, California, USA) y analizado mediante el software 32 KaratTM

Software versión 7 con detector diode array UV-VIS y una columna C18 de fase reversa o separación por afinidad a medios de diferente apolaridad.

Antes de proceder a la inyección de las muestras, se procedió al filtrado del extracto mediante un filtro de 0,45 μm con el fin de eliminar toda impureza y reducir el riesgo de obstrucción de la columna.

Para llevar a cabo la separación, se dispuso de dos fases móviles una con acetato de etilo puro (Fase A) y otra de acetonitrilo-agua (9:1) (Fase B) disponiendo el gradiente de análisis descrito por Young et al. (1997), con un flujo constante de 1 mL min⁻¹

Tabla 2.1. Gradiente de separación por fase reversa para la determinación cromatográfica del contenido de carotenoides y clorofilas en extracto metanólico.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	0	100
16	60	40
25	100	0
30	0	100

La identificación y cuantificación de los carotenoides específicos se basó en la comparación de los tiempos de retención de los diferentes picos con respecto al de los estándares comerciales conocidos (entre 0,007 y 0,015 mg mL⁻¹) (DHL Water and Environment, Dinamarca). Para proceder al cálculo de la concentración, se relacionó el área del pico correspondiente con el área del pico del estándar comercial considerando el factor de dilución de cada extracto.

2.3.3. Determinación espectrofotométrica de los compuestos antioxidantes de interés.

Todos los métodos espectrofotométricos se llevaron a cabo con el mismo espectrofotómetro (Scientific Espectrofotometer Evolution 201/220 UV-VIS, Thermo Fisher Scientific 02451, Mundelein, Illinois, USA) y todos los valores de absorbancia obtenidos fueron referenciados en función al peso seco de cada microalga.

2.3.3.1. Determinación de la capacidad antioxidante total de la muestra microalgal.

El cálculo de la capacidad antioxidante total inicial de cada microalga fue realizado siguiendo el método descrito por Brand Williams et al. (1995), basado en la captación de radicales libres, adaptado para nuestro material a microvolúmenes. El método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los antioxidantes de la muestra, medido a 515 nm. Es un método sencillo, fiable y ampliamente utilizado para la evaluación de la actividad antioxidante total. El radical DPPH es estable y presenta una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes.

2.3.3.2. *Determinación de los polifenoles totales en la muestra microalgal.*

Los fenoles totales fueron determinados mediante el procedimiento descrito en Georgé et al. (2005). Según éste, los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo de Folin-Ciocalteu que le confiere una coloración azul que es medida en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 725 nm, permitiendo cuantificar los polifenoles presentes en una muestra antioxidante.

2.3.3.3. *Determinación de polifenoles flavonoides en la muestra microalgal.*

El contenido de los flavonoides totales fue determinado en equivalentes de catequina siguiendo la metodología descrita por Liu et al. (2002). El valor de la absorbancia fue medido a 510 nm obteniendo la cantidad de flavonoides equivalentes para una masa de 1 mg de peso fresco de microalga.

2.3.3.4. *Determinación de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables) en la muestra microalgal.*

El contenido en taninos fue determinado en equivalentes de metil-galato mediante la oxidación de los taninos con yodato potásico como se describe en el ensayo de Mueller-Harvey (2001). Estos taninos son convertidos en metil-galato (un componente estructural común) mediante metanólisis y este, en medio ácido con adición de yodato, genera un cromóforo de color rojo que es medido a una longitud de onda de 525 nm.

2.3.3.5. *Determinación de la actividad pro-vitamina A de los extractos.*

Para ello se procedió al cálculo previo del contenido en carotenos equivalentes en la muestra siguiendo el procedimiento de medición espectrofotométrica a 480 y 750 nm del extracto en acetona al 90% siguiendo el método descrito por Britton (1985). Este valor fue corregido a concentración equivalente de vitamina A según se describe en Mahan y Escott-Saump (2008).

2.4. Reactivos.

Todos los reactivos, empleados para la preparación de las determinaciones fueron provistos por la empresa Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania).

Las solventes empleados para las fases separadoras del cromatógrafo de grado HPLC fueron proporcionados, también, por la empresa Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). A su vez, Todos los estándares (fucoxantina, violaxantina, neoxantina, astaxantina, luteína, zeaxantina, licopeno y β -caroteno) fueron proporcionados por DHL Water and Environment (Dinamarca) con una pureza superior al 99% y fueron diluidos en metanol puro de grado HPLC.

2.5. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el empleo del paquete estadístico SPSS versión 19 con el fin de poder comparar las diferencias entre los grupos, estos fueron evaluados mediante el estudio ANOVA unidireccional seguido del test post-hoc de Tuckey-Kramer para diferencias significativas con valores $p < 0,05$.

Los resultados que se muestran han sido expresados como el valor de la Media \pm Desviación Estándar (S.D.), donde n es el número de réplicas realizadas para cada una de las muestras comparadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Todas las muestras analizadas consistieron en polvo liofilizado de microalga, ya que es la forma en la que se comercializa este tipo de microorganismos. Esto permite hacer una comparativa de sus propiedades nutraceuticas de forma más precisa y real. No obstante, la bibliografía suele emplear biomasa fresca para realizar los análisis, lo que proporciona los valores del microorganismo en estado natural pero que no sería lo más adecuado en este estudio, ya que el procesado de la biomasa para su comercialización puede afectar a la capacidad antioxidante respecto del producto fresco sin procesar.

El estudio de la biomasa liofilizada, por el contrario, nos permite conocer la efectividad real de las microalgas en su uso como suplemento dietético y fuente de sustancias bioactivas para animales y humanos.

3.1. Caracterización de los pigmentos fotosintéticos de las microalgas.

Tal y como se ha comentado previamente, las microalgas son organismos fotosintéticos, cuyo proceso de captación de energía lumínica se basa en un proceso oxigénico. Este proceso, en condiciones normales, produce la liberación de especies reactivas del oxígeno, así como otros radicales libres, al medio intracelular y al cloroplasto. Este estrés oxidativo inducido por el normal funcionamiento del cloroplasto podría desembocar en procesos de lipoperoxidación de las membranas, así como en el deterioro de biomoléculas e, incluso, en casos más severos, la alteración del propio genoma, inducción del envejecimiento, del proceso apoptótico celular y muerte celular. Es por este motivo que, las microalgas, para su defensa, han producido diversos compuestos antioxidantes con el fin de reducir y evitar los daños oxidativos [Madhavi y Salunkhe, 1995].

Ciertas microalgas, como es el caso de *C. onubensis* [Toimil, 2021] deben su actividad antioxidante al contenido en ácidos grasos insaturados [Mei *et al.*, 2006], así como a su riqueza en diversas sustancias con acción antioxidante, las cuales generan una acción sinérgica [Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006].

Por este motivo, previo al estudio de la actividad antioxidante de cada una de las microalgas de estudio, se realizará la caracterización de los pigmentos fotosintéticos presentes en cada una de las microalgas de estudio que, posteriormente, actuarán de forma directa en la citada acción sinérgica antioxidante.

En todos los casos, se procederá a la diferenciación entre los pigmentos carotenoides y los clorofílicos debido a su diferente rango de absorción lumínica, así como la diferente acción en el metabolismo celular.

3.1.1. Caracterización de los pigmentos del grupo de las clorofilas.

Las clorofilas son uno de los principales grupos de pigmentos presentes en todas las plantas y algas cuya función principal es la captación y empleo de la energía lumínica con el fin de obtener energía para realizar el proceso fotosintético celular. En este grupo se distinguen esencialmente tres tipos de clorofilas la clorofila-a, la clorofila-b y la clorofila-c (aunque existen otras como la c2, d y f en menor concentración). Estas biomoléculas son compuestos reducidos de las porfirinas con un átomo de magnesio unido al centro del anillo aromático el cual, en ciertos casos, puede incluir una cadena de fitol [Nagini *et al.*, 2015].

En cuando a su poder antioxidante, se ha descrito que la clorofila-a (y todos sus isómeros y derivados) presentan una mayor acción en la reducción del estrés oxidativo celular que otros compuestos del grupo [Hsu *et al.*, 2013], siendo explicada mediante la interrupción de la cadena de peroxidación al interaccionar directamente con los radicales oxigenados (peroxi- y alcoxi-) [Rigane *et al.*, 2013]. Especialmente destaca la acción de la clorofila-a y la feofitina (biomolécula resultado de la degradación de a clorofila-a) en las etapas iniciales de la peroxidación lipídica, siendo hasta 200 veces más potente que el α -tocoferol [Hsu *et al.*, 2013] que es la forma de la vitamina E (ácido ascórbico o α -tocoferol) que preferentemente se absorbe y acumula en los seres humanos.

3.1.1.1. Perfil clorofílico de las microalgas de estudio.

El alga de estudio *C. onubensis* ha sido ampliamente caracterizada desde el punto de vista pigmentario debido a varios estudios realizados en el seno del grupo de investigación BIO-214 de la Universidad de Huelva con el fin de potenciar la formación de compuestos de interés comercial en estos, no obstante, la muestra empleada se trataba de un cultivo nativo sin modificación de las condiciones de crecimiento, mostrándose unos niveles de clorofilas normales para la especie, en los cuales la máxima producción perceptible se encontraba dentro de la familia de la clorofila-a, seguido por la clorofila-b y la feofitina-a (Fig. 3.1.), alcanzando los valores que se recogen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Contenido en pigmentos del grupo de las clorofilas presentes en la microalga *C. onubensis* en condiciones de crecimiento estándar junto con los valores obtenidos para cada una de las algas comerciales de estudio ordenados de mayor a menor contenido en pigmentos totales.

	Clorofila-a ($\mu\text{g/g}$ peso seco)	Clorofila-b ($\mu\text{g/g}$ peso seco)	Clorofila-c ($\mu\text{g/g}$ peso seco)	Feofitina-a ($\mu\text{g/g}$ peso seco)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	8460 \pm 90	800 \pm 200	2330 \pm 150	7070 \pm 120
<i>Coccomixa onubensis</i>	10098 \pm 20	3108 \pm 43	676 \pm 6	2099 \pm 400
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	7020 \pm 60	710 \pm 20	1670 \pm 170	700 \pm 400
<i>Tetraselmis suecica</i>	4200 \pm 110	2080 \pm 80	1700 \pm 80	1100 \pm 200
<i>Isochrysis galbana</i>	1860 \pm 20	1400 \pm 190	2090 \pm 160	510 \pm 40

A su vez, entre las algas comerciales estudiadas, encontramos bibliografía que describe una gran diversidad de acciones antioxidantes, desde el alto contenido en polifenoles presente en el alga *I. galbana* y *T. suecica* [Widowati *et al.*, 2017], hasta la riqueza en carotenoides presente en *P. tricornutum* [Kawee-ai *et al.*, 2013]. A pesar de ello, existe poca

bibliografía que muestre un perfil completo de estas algas, si bien, en todos los casos se trata de algas con un alto contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides, tal y como se ha podido comprobar en el estudio realizado (Fig. 3.1), en los cuales se apreciaron contenidos en clorofilas totales del rango de los 10 mg/g de peso fresco en todos los casos, desglosándose en los rangos mostrados en la Tabla 3.1.

Diversos estudios realizados en animales hemos demostrado que la acción de peroxidación lipídica de compuestos lipoproteínicos como el colesterol LDL inducen el aumento del riesgo cardiovascular al inducirse la formación de células espumosas precursoras de la formación de placas de ateroma inductoras de la aterosclerosis [Park y Oh, 2011]. Es por este motivo que la presencia de altos contenidos en clorofilas de la familia de la clorofila-a y de la feofitina-a produciría una mejora notable del estado del individuo que tomase un suplemento algal rico en estas biomoléculas, al actuar de forma directa sobre los radicales libres del grupo peroxi- que pudieran generarse fruto de una dieta rica en lípidos de origen animal, reduciendo el riesgo al actuar en la etapa inicial de esta enfermedad derivada de la acción oxidativa del organismo.

Tal y como se puede apreciar en la Fig. 3.1, en condiciones estándar de crecimiento, el alga *C. onubensis* presenta un contenido del 76% del total de pigmentos clorofílicos en forma de clorofila-a e isómeros y compuestos de degradación de estos, por lo que su potencial acción antioxidante sería elevada según los estudios realizados por Hsu y Rigane (2013), siendo de especial interés para la reducción de la acción de peroxidación lipídica y, por ende, siendo potencial su empleo como nutracéutico antioxidante para el control de los procesos de peroxidación lipídica en animales inductores de la aterosclerosis y como reductor del riesgo cardiovascular.

Como se puede apreciar en la comparativa de valores totales medidos, el alga *P. tricornutum* es la que presentó una mayor riqueza en los compuestos altamente antioxidantes, siendo una clara opción para el uso como nutracéutico.

I. galbana, a su vez, mostró un contenido muy elevado de clorofila-c, mostrando niveles de casi dos veces más que de clorofila-a, resultados similares a los proporcionados en Montero *et al.*, 2002, mostrando que el método de cálculo y extracción de los pigmentos empleados son consecuentes con la bibliografía.

En último lugar, las microalgas *N. gaditana* y *T. suecica* mostraron elevados valores de clorofila-a y feofitina-a, mostrándose, en ambos casos, un contenido correspondiente casi al 75% del total de pigmentos extraídos, no obstante, su baja concentración total en comparación con *P. tricornutum* (cuyo contenido casi triplica al total presente en las otras dos algas) hace que no sean potenciales fuentes de antioxidantes para el control de la lipoperoxidación lipídica, basándonos en los contenidos en pigmentos clorofílicos.

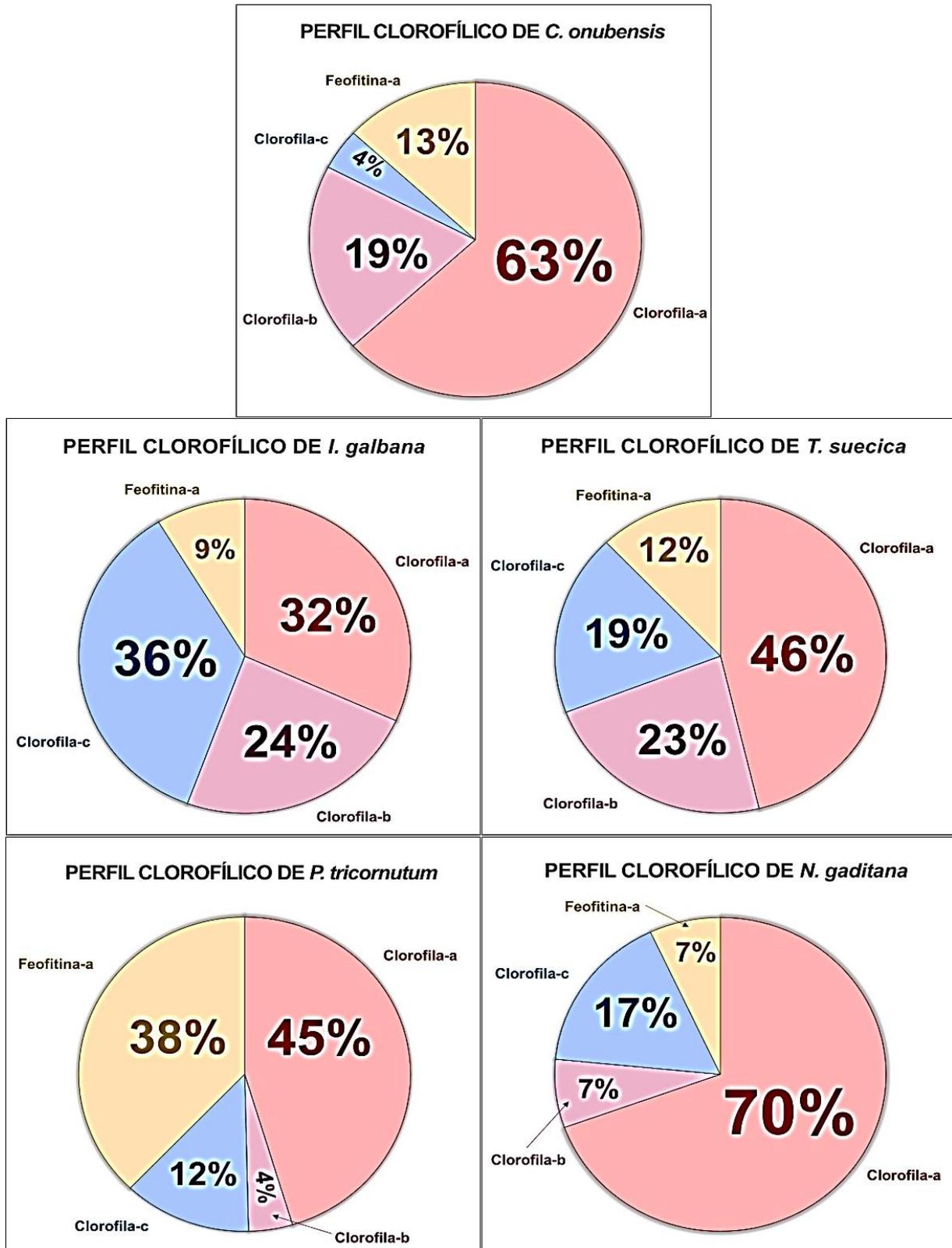


Fig. 3.1. Relación del contenido en pigmentos del grupo de las clorofilas presentes en la microalga *C. onubensis* en condiciones de crecimiento estándar junto con los valores obtenidos para cada una de las algas comerciales de estudio.

Como se puede apreciar en la Fig. 3.1, los perfiles obtenidos para cada una de las algas muestran una clara diferenciación entre las cuatro especies comerciales, así como para el

caso de *C. onubensis*, siendo el extracto más homogéneo y equilibrado el presente en la *I. galbana*, la cual, además, presenta el valor más bajo de feofitina-a que, según la bibliografía, al tratarse de un compuesto de degradación de la clorofila-a indica que la mayor parte de su acción fotosintética se deriva del empleo de otros pigmentos. Las algas *T. suecica* y *N. gaditana* mostraron un perfil similar entre sí y con respecto a *C. onubensis*, diferenciándose en la presencia más elevada de clorofila-b en el caso de *T. suecica* y siendo la mayor diferencia con nuestro alga de estudio el contenido en clorofila-a presente en esta.

Tal como se observó previamente, en el caso de las cuatro algas comerciales, la que presentaría una mayor acción antioxidante derivada de los pigmentos fotosintéticos se correspondería con la *P. tricornutum*, al presentar un cómputo global del 83% del total de pigmentos fotosintéticos de este grupo en forma de clorofila-a y feofitina-a, siendo una clara propuesta como nutracéutico para el control del estrés oxidativo y el riesgo de sufrir riesgos cardiovasculares.

Estos valores obtenidos para *P. tricornutum* superan los presentes en *C. onubensis*, la cual muestra un 76% del total de pigmentos clorofílicos dentro del grupo a, respecto de *P. tricornutum*, no obstante, *C. onubensis* ha resultado ser la segunda microalga del conjunto estudiado mostrando un contenido porcentual de clorofila-a similares a las de *N. gaditana* y superiores a las de *I. galbana* y *T. suecica*, lo que indica que *C. onubensis* también podría ser un potencial antioxidante derivado del contenido en clorofilas del grupo a.

Como se comentó previamente, desde el punto de vista de la reducción del estrés oxidativo, los pigmentos clorofílicos con una mayor acción antioxidante son la clorofila-a y la feofitina-a, siendo especialmente interesantes los niveles presentes en *C. onubensis* y *P. tricornutum*. En la Fig. 3.2 se recoge la comparativa de los diferentes niveles medidos para cada una de las algas mostrando si existen diferencias significativas entre las cinco microalgas.

Todos los grupos de estudio mostraron rangos de clorofilas con diferencias significativas a las obtenidas en *C. onubensis*, siendo ésta la que presentaba una mayor riqueza en clorofila-a y clorofila-b, alcanzando niveles de hasta un 16% más de clorofila-a que la siguiente *P. tricornutum* (el alga con mayor contenido en clorofila-a del grupo comercial). En cuanto a la clorofila-b, *C. onubensis* presentó un contenido un 33% mayor que *T. suecica*, quien, a su vez, fue la muestra con mayor contenido en este pigmento del conjunto de microalgas comerciales.

En cuanto al contenido en clorofila-c, *C. onubensis* mostró niveles significativamente más bajos que el conjunto de algas comerciales, las cuales, a su vez, mostraron valores semejantes entre sí y sin diferencias significativas. Siendo el valor de *C. onubensis* en clorofila-c, 2 veces inferior que el contenido presente en estas algas. Finalmente, de nuevo, todas las algas presentaron rangos variables y con diferencias significativas para el contenido en feofitina-a. Esto significa que la formación de este isómero de degradación varía en función a la especie a considerar.

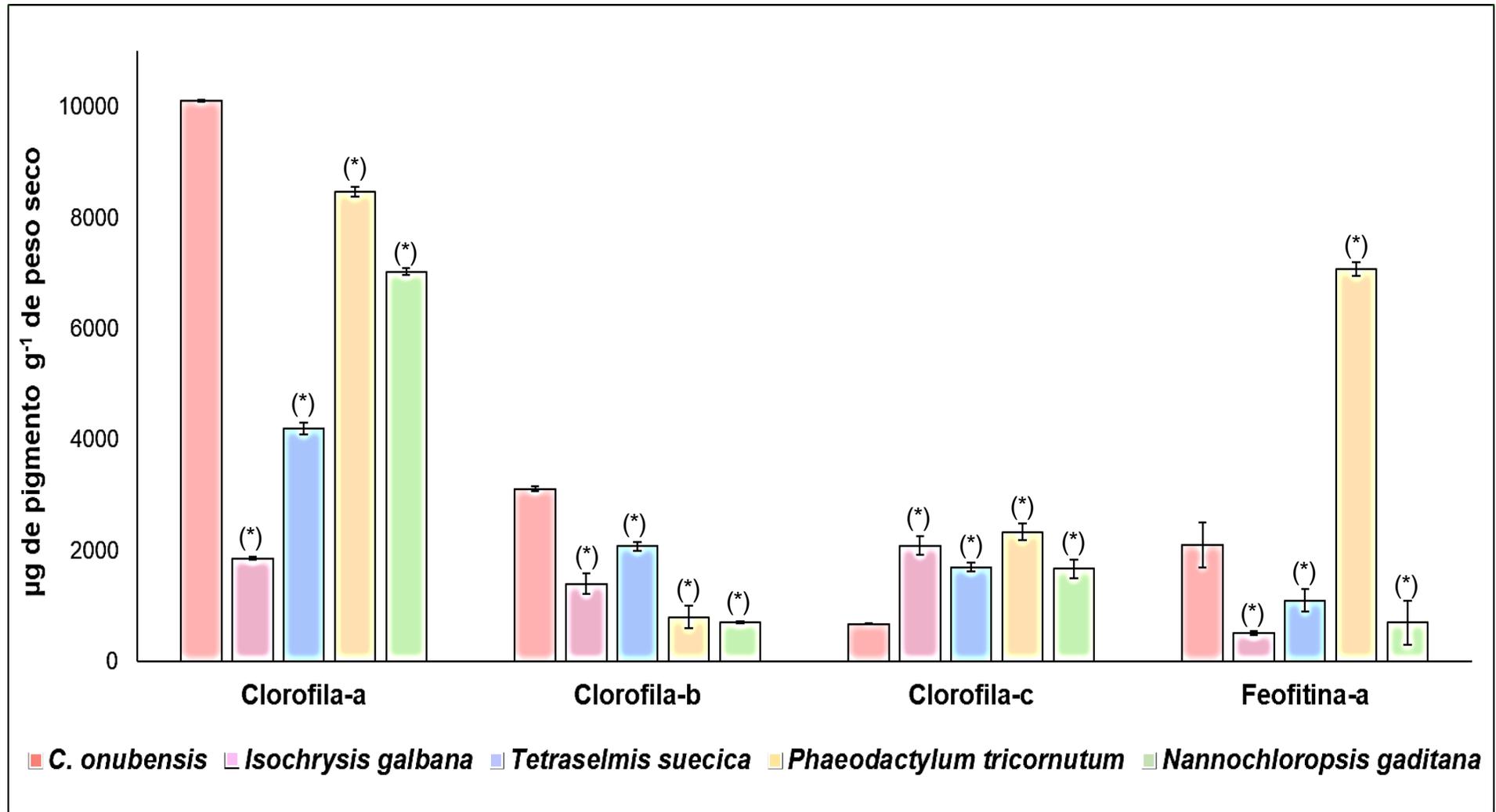


Fig. 3.2. Niveles totales obtenidos de los pigmentos clorofílicos para cada uno en las diferentes algas estudiadas.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los valores obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para $p < 0.05$.

La feofitina-a es un compuesto de degradación de la clorofila-a que surge como derivado de la senescencia de una colonia. Este producto de pérdida del ion magnesio de la clorofila por la presencia de un grupo H⁺ induce en el alga una disminución de la productividad en la fijación de energía lumínica. Esta degradación suele verse aumentada cuando el medio se encuentra acidificado, al aumentar la movilidad de los iones metálicos. Al realizarse la relación entre los niveles de absorbancia a 664 nm y 665 nm medida para cada uno de los casos, se apreció que las muestras analizadas de *C. onubensis*, *T. suecica* y *P. tricornutum* presentaron valores muy similares y próximos a 1,7, lo que significa que estas especies presentan niveles de feofitina-a reducidos en comparación con los niveles de clorofila-a siendo el estado fisiológico de estas células excelente tras la acidificación del medio. En cambio, los niveles obtenidos para *I. galbana* y *N. gaditana* se mostraron más próximos a 1 y con diferencias significativas a los obtenidos en las otras muestras. Esto indica que las muestras empleadas para el estudio de *I. galbana* y *N. gaditana* comercializadas presentan una alta degradación, posiblemente derivado de un estado senescente, que no debería ser el más adecuado para su comercialización.

A pesar de esto, la feofitina-a, al estar conformada por los mismos anillos que la clorofila-a, sigue teniendo un alto nivel antioxidante comparable con el obtenido por el pigmento original. Al realizar el estudio comparativo, se apreció que *P. tricornutum* fue la microalga con mayor contenido en este pigmento, siendo sus niveles 2,3 veces superior a *C. onubensis* mostrando diferencias significativas para un valor de $p < 0.05$, al igual que con respecto al resto de componentes. A su vez, *C. onubensis* mostró un contenido de feofitina-a similar a los obtenidos para la *T. suecica* mostrando diferencias significativas y de hasta un 75% más que la muestra de *I. galbana*, y de un 66% más que la muestra de *N. gaditana*.

Dado que, según cita la bibliografía, la principal acción antioxidante derivada de los pigmentos fotosintéticos del grupo de las clorofilas proviene de la presencia de clorofila-a y feofitina-a (Fig 3.3), se procedió a la comparativa de los valores obtenidos de la suma de ambos pigmentos, obteniéndose los datos mostrados en la Tabla 3.2 para estimar la mayor o menor capacidad antioxidante de las microalgas debida a sus pigmentos fotosintéticos del grupo de la clorofilas.

Tabla 3.2. Contenido en clorofila-a y feofitina-a presentes en las microalgas de estudio ordenados de mayor a menor contenido en estos pigmentos.

	Clorofila-a + Feofitina-a ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	15530 \pm 150
<i>Coccomixa onubensis</i>	12200 \pm 400
<i>Tetraselmis suecica</i>	5300 \pm 300
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	4700 \pm 400
<i>Isochrysis galbana</i>	2380 \pm 50

Como se puede apreciar, los niveles presentes en las muestras de *C. onubensis* y *P. tricornutum* fueron de hasta 2 veces los obtenidos en el caso de la *T. suecica* y la *N. gaditana* y de hasta 5 veces más que los obtenidos en el extracto de la *I. galbana*.

Al realizar un análisis estadístico entre los cinco grupos (Fig. 3.3.), se aprecia que los niveles alcanzados por parte de *C. onubensis* y *P. tricornutum* muestran diferencias significativas para un valor de $p < 0.05$. A su vez, ambas microalgas mostraron diferencias significativas frente al resto de extractos de estudio, siendo los valores de *T. suecica* y *N. gaditana* similares y sin diferencias significativas.

De esta forma se puede deducir que las dos algas que muestran el mayor potencial antioxidante derivado de la presencia de compuestos fotosintéticos del grupo de las clorofilas son la *P. tricornutum* y la *C. onubensis*, presentando esta última unos niveles similares y comparables (con un 90% de semejanza) a los presentes en *P. tricornutum*. Siendo en ambos casos de especial interés para el empleo como nutraceuticos antioxidantes preventivos ante la acción de la lipoperoxidación lipídica inductora del riesgo cardiovascular.

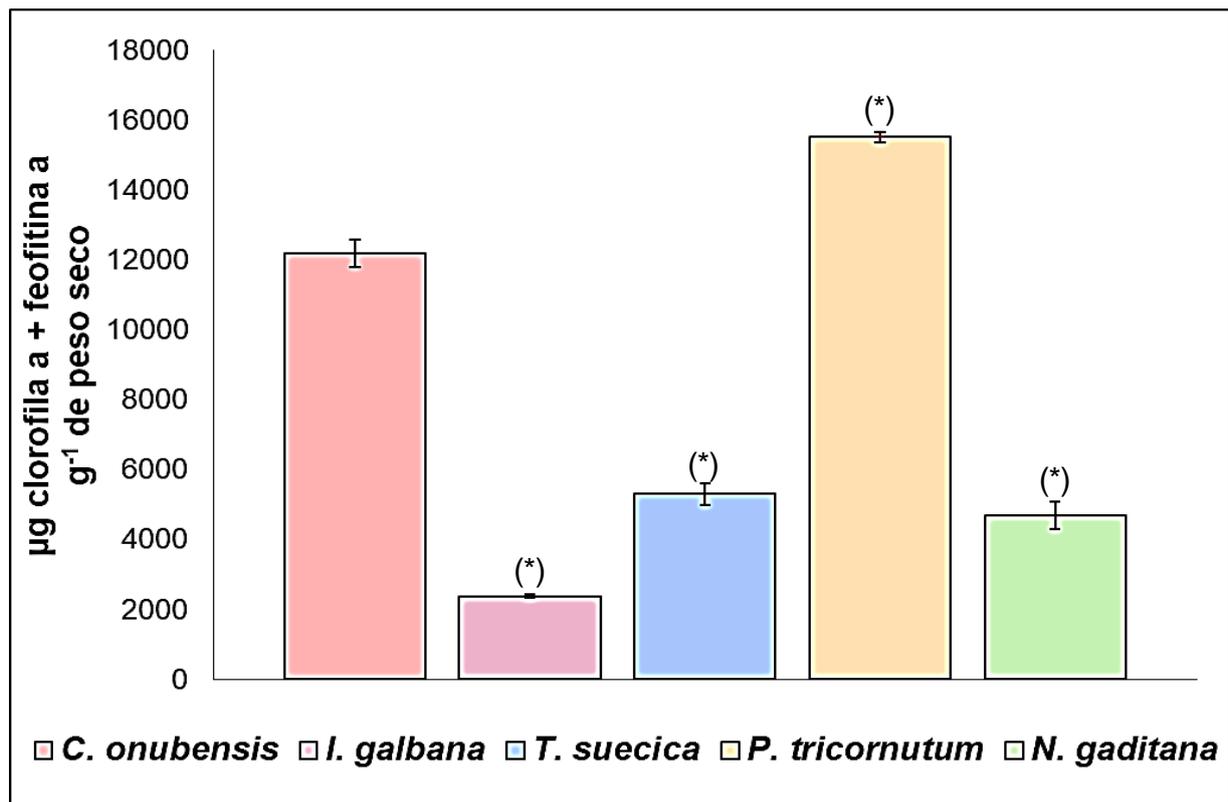


Fig. 3.3. Contenido en clorofila-a + feofitina-a presentes en las microalgas de estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

3.1.2. Análisis de los pigmentos del grupo de los carotenoides en las microalgas estudiadas.

Los pigmentos del grupo de los carotenoides, al igual que las clorofilas, se tratan de pigmentos liposolubles de origen vegetal que únicamente pueden entrar en el organismo a través de la dieta. La función esencial de estos es la de fotoprotección del sistema fotosintético y, en humanos, destaca su acción provitamínica A. Ciertos estudios han demostrado que la ingesta de carotenoides, además, fortalece el sistema inmunológico, disminuye el riesgo de sufrir enfermedades degenerativas como el cáncer, previene de enfermedades cardiovasculares, la degeneración muscular y la formación de cataratas [Bauernfeind, 1981]; dependiendo del tipo de carotenoide, la acción frente a una dolencia es más importante, es por ello que, posteriormente, se analizarán los carotenoides por separado.

En una dieta equilibrada estos pigmentos son aportados por frutas y hortalizas y, en pequeña proporción, por fuentes de origen animal y aditivos alimentarios como los colorantes. Es por este motivo que se recomienda el consumo elevado de frutas y hortalizas con el fin de aumentar la producción de vitamina A y reducir el riesgo de sufrir diversas enfermedades crónicas [Stahl y Sies, 2007] antes citadas. Los carotenoides son los que han demostrado tener unos efectos antioxidantes más importantes y son considerados una gran fuente de nutraceuticos [Vaquero et al., 2014], tanto es así, que muchos sistemas de biorrefinería de microalgas estudian la modificación de las condiciones de los cultivos con el fin de potenciar la formación de estos pigmentos, al ser compuestos precursores de la formación de vitamina A [Bishop y Zubeck, 2012; Spolaore et al., 2006].

Existe una gran variedad de carotenoides, los cuales, a su vez, se diferencian en función de sus isómeros y modificaciones estructurales. En los siguientes apartados se estudiarán concretamente los carotenoides más comunes presentes en las microalgas que presentan una mayor acción nutraceutica, como son la fucoxantina, la neoxantina, la violaxantina, la astaxantina, la luteína, la zeaxantina, el licopeno y el β -caroteno, los cuales serán cuantificados en las diferentes microalgas con el fin de obtener una visión específica de la acción nutraceutica de cada una de ellas.

3.1.2.1. Perfil de carotenoides de cada una de las microalgas estudiadas.

C. onubensis ha sido sujeto de estudio para la caracterización de sus componentes bioquímicos en múltiples ocasiones por nuestro equipo de investigación, proporcionando siempre unos resultados bastante positivos para su empleo como nutraceutico y alimento funcional. Entre otros, debido a la alta presencia de carotenoides, en especial en forma de luteína y β -caroteno, los cuales han representado cerca del 70% del total de los carotenoides de la microalga [Toimil, 2021].

Al igual que muchos otros cultivos, *C. onubensis* ha sido estudiada con el fin de favorecer el aumento de la producción de ciertos carotenoides, en especial la luteína. Esto es debido a que, en condiciones de cultivo normales, este compuesto era el mayoritario y, gracias a sus

potenciales usos nutracéuticos e industriales, ha sido el objetivo de dichas mejoras en la productividad. Estudios realizados en el seno del grupo de investigación BIO-214 de la Universidad de Huelva lograron fomentar la productividad y el enriquecimiento de esta microalga en luteína mediante la inyección tras ciclos de incubación de aire rico en CO₂, gracias a la ácido-tolerancia de esta microalga acidófila, unido a su alta eficiencia en el uso del carbono [Vaquero, 2012]. Con el fin de poder llevar a cabo una comparativa realista, se empleó, al igual que en el caso del estudio de clorofilas, una cepa de *C. onubensis* cultivada en condiciones normales, mostrando un perfil de pigmentos tras su estudio en HPLC normal y consecuente con los resultados analíticos obtenidos en estudios previos (Fig. 3.4); un pico máximo de carotenoides para la luteína y en el caso de las clorofilas correspondiente a los estereoisómeros de la clorofila-a.

Por otro lado, *I. galbana* es una Haptophyta que ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista antioxidante, al estar altamente enriquecida en fucoxantina, alcanzando valores de hasta 6 mg g⁻¹ de este carotenoide [Kim *et al.*, 2012]. A su vez, ha demostrado ser una microalga de gran interés industrial, al mostrar incrementos notables en dicho carotenoide, de hasta 3 veces su concentración inicial [Hobson, *et al.*, 1979], y de fácil extracción en diversos extractantes de carácter polar, lo que favorece su manipulación y tratamiento como nutracéutico en forma de extracto bioactivo [Herrmann *et al.*, 2010].

T. suecica, en cambio, debe esencialmente su acción antioxidante a los ácidos grasos poliinsaturados que presenta, capaces de ser extraídos en fracciones específicas bioactivas [Parra-Riofrío *et al.*, 2020]. En cuanto a los carotenoides, *T. suecica* ha demostrado ser una rica fuente de carotenoides como son la violaxantina y la luteína, presentando concentraciones de más de 80 mg 100 g⁻¹ en sus extractos metanólicos [di Lena *et al.*, 2018].

A diferencia de los anteriores, *P. tricornutum* presenta valores de carotenoides totales de 1760 mg 100 g⁻¹, superando hasta en 6 veces los niveles presentes en *T. suecica* [di Lena *et al.*, 2018], siendo su principal componente de interés la fucoxantina, con unas concentraciones comparables con las obtenidas en un extracto idéntico de *I. galbana* [Kim *et al.*, 2012]. Esta microalga, además, ha demostrado ser un potente antioxidante gracias a la presencia de ácidos grasos ω -3 EPA [Desbois *et al.*, 2009] los cuales, además, le confieren poder antimicrobiano frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).

En último lugar, la biomasa de *N. gaditana* también ha mostrado ser de interés como fuente de carotenoides al presentar altos contenidos en β -caroteno y violaxantina, así como de astaxantina y α -caroteno, algo que la diferencia del resto de especies del género *Nannochloropsis* [Lubián, 1982].

Tal y como se puede apreciar en las Fig. 3.5 a 3.8, los picos proporcionados por el cromatograma mostraban la presencia de los mismos carotenoides que se recogen en la bibliografía referenciada para las distintas algas estudiadas.

Tabla 3.3. Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de *C. onubensis* en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm.

Compuesto (nombre tradicional)	Tiempo de retención (min)	Area (10^5 mUA ²)	Concentración ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
Fucoxantina	6,12 \pm 0,03	1,70 \pm 0,08	1,29 \pm 0,06	274 \pm 13
Neoxantina	6,65 \pm 0,10	0,21 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	33 \pm 2
Violaxantina	8,5 \pm 0,0	0,50 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	77 \pm 2
Astaxantina	9,2 \pm 0,1	0,07 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02	9 \pm 4
Luteina + Zeaxantina	10,6 \pm 0,1	7,0 \pm 0,3	3,34 \pm 0,15	711 \pm 31
Licopeno	18,8 \pm 0,1	2,93 \pm 0,12	2,33 \pm 0,09	495 \pm 20
Beta Caroteno	20,3 \pm 0,1	0,96 \pm 0,03	0,58 \pm 0,02	123 \pm 4

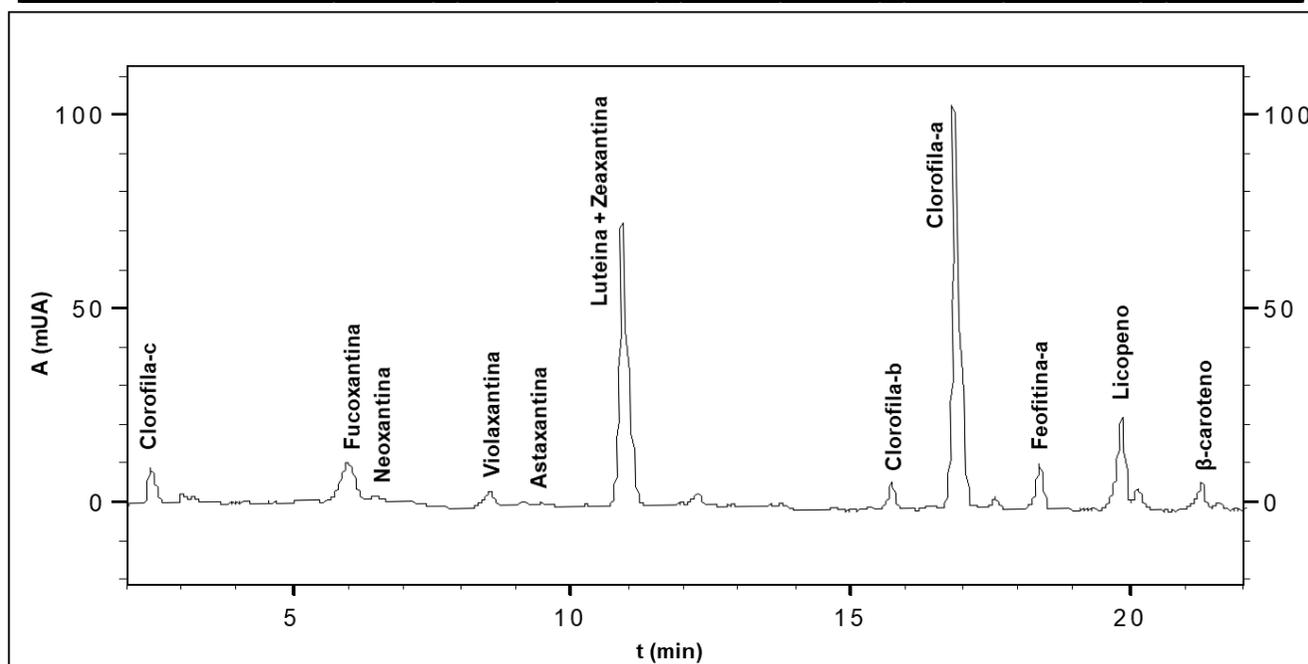


Fig. 3.4. Cromatograma de medición del extracto metanólico de *C. onubensis* en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm (se trata de una de las imágenes representativas, no obstante, los valores de la tabla 3.3. muestran la media de todas las mediciones realizadas, $n=3$).

Tabla 3.4. Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de *I. galbana* en condiciones de normales, a una longitud de onda de 450 nm.

Compuesto (Nombre tradicional)	Tiempo de retención (min)	Area (10 ⁵ mUA ²)	Concentración (µg cm ⁻³)	Concentración (µg g ⁻¹ peso seco)
Fucoxantina	4,93 ± 0,09	2,9 ± 0,3	0,22 ± 0,02	72 ± 7
Neoxantina	5,91 ± 0,05	0,2 ± 0,1	0,012 ± 0,004	4,2 ± 1,4
Violaxantina	6,8 ± 0,2	2,42 ± 0,2	0,136 ± 0,011	45 ± 4
Astaxantina	7,5 ± 0,1	1,57 ± 0,1	0,114 ± 0,004	38,0 ± 1,3
Luteina + Zeaxantina	17,0 ± 0,3	10,56 ± 0,3	0,497 ± 0,074	170 ± 30
Licopeno	18,9 ± 0,2	1,99 ± 0,1	0,158 ± 0,011	53 ± 4
β-caroteno	20,0 ± 0,1	0,29 ± 0,06	0,017 ± 0,004	5,8 ± 1,2

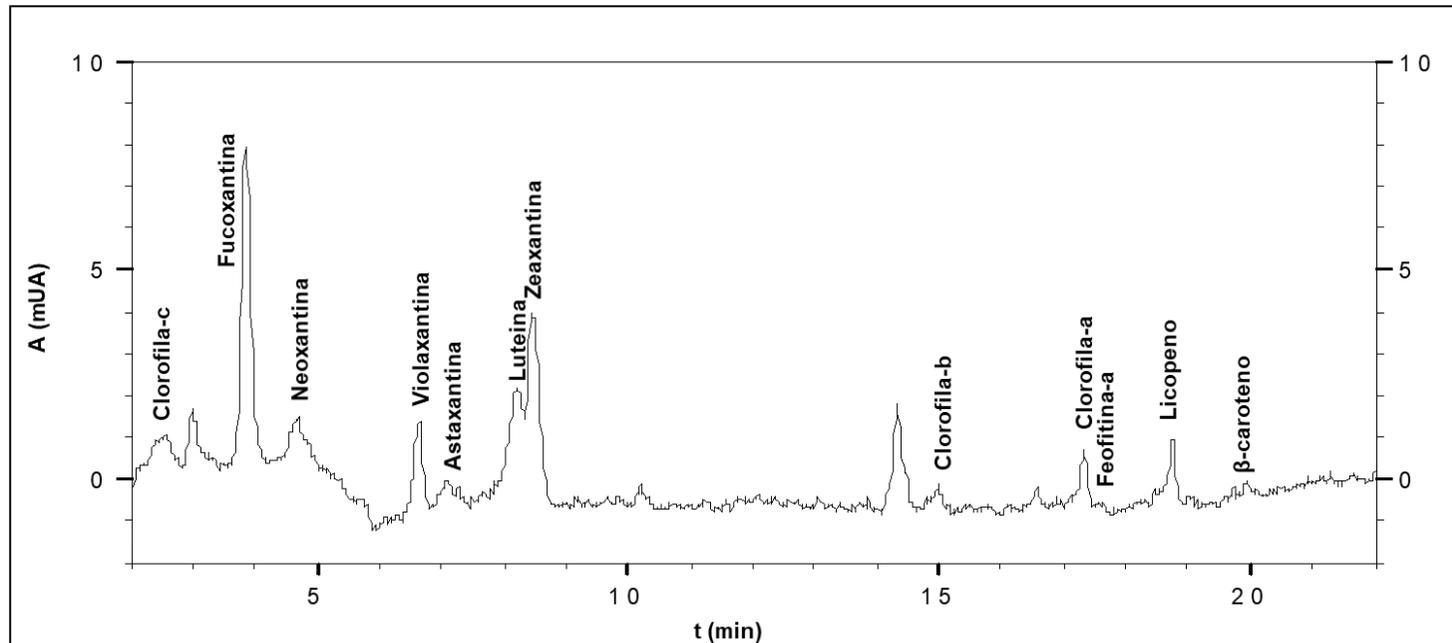


Fig. 3.5. Cromatograma de medición del extracto metanólico de *I. galbana* en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm (se trata de una de las imágenes representativas, no obstante, los valores de la tabla 3.4. muestran la media de todas las mediciones realizadas, n=3).

Tabla 3.5. Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de *T. suecica* en condiciones de crecimiento estándar, a una longitud de onda de 450 nm.

Compuesto (nombre tradicional)	Tiempo de retención (min)	Area (10^4 mUA ²)	Concentración ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
Fucoxantina	4,28 ± 0,06	1,08 ± 0,02	0,0792 ± 0,0012	20,7 ± 0,3
Neoxantina	5,46 ± 0,07	1,82 ± 0,03	0,138 ± 0,002	36,0 ± 0,6
Violaxantina	6,27 ± 0,02	1,88 ± 0,06	0,105 ± 0,003	27,6 ± 0,8
Astaxantina	7,71 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,0106 ± 0,0012	2,8 ± 0,3
Luteina + Zeaxantina	9,08 ± 0,05	12,364 ± 0,005	0,6790 ± 0,0003	177,5 ± 0,1
Licopeno	16,39 ± 0,02	1,47 ± 0,18	0,116 ± 0,014	30 ± 4
β -caroteno	20,40 ± 0,05	2,98 ± 0,03	0,1793 ± 0,0019	46,9 ± 0,5

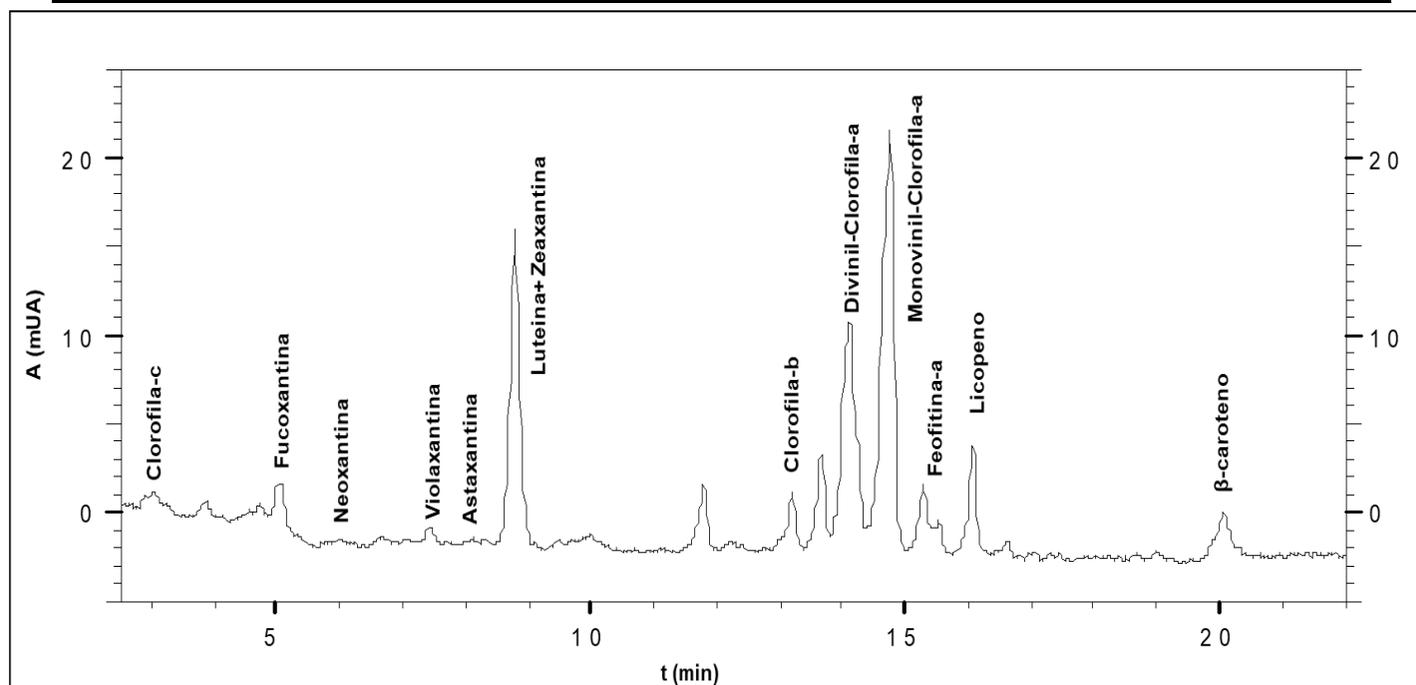


Fig. 3.6. Cromatograma de medición del extracto metanólico de *T. suecica* en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm (se trata de una de las imágenes representativas, no obstante, los valores de la tabla 3.5. muestran la media de todas las mediciones realizadas, $n=3$).

Tabla 3.6. Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de *P. tricornutum* en condiciones de crecimiento estándar, a una longitud de onda de 450 nm.

Compuesto (nombre tradicional)	Tiempo de retención (min)	Area ($\cdot 10^4$ mUA ²)	Concentración ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
Fucoxantina	4,94 \pm 0,13	35,1 \pm 0,4	2,57 \pm 0,03	895 \pm 10
Neoxantina	5,43 \pm 0,06	0,13 \pm 0,02	0,0098 \pm 0,0012	3,4 \pm 0,4
Violaxantina	7,10 \pm 0,15	12,11 \pm 0,61	0,68 \pm 0,03	236 \pm 12
Astaxantina	7,86 \pm 0,09	1,24 \pm 0,02	0,0898 \pm 0,0014	31,2 \pm 0,5
Luteína + Zeaxantina	8,69 \pm 0,16	13 \pm 3	0,72 \pm 0,14	250 \pm 50
Licopeno	19,3 \pm 0,1	1,66 \pm 0,15	0,132 \pm 0,012	46 \pm 4
β -caroteno	20,31 \pm 0,27	3,256 \pm 0,016	0,1958 \pm 0,0009	68,1 \pm 0,3

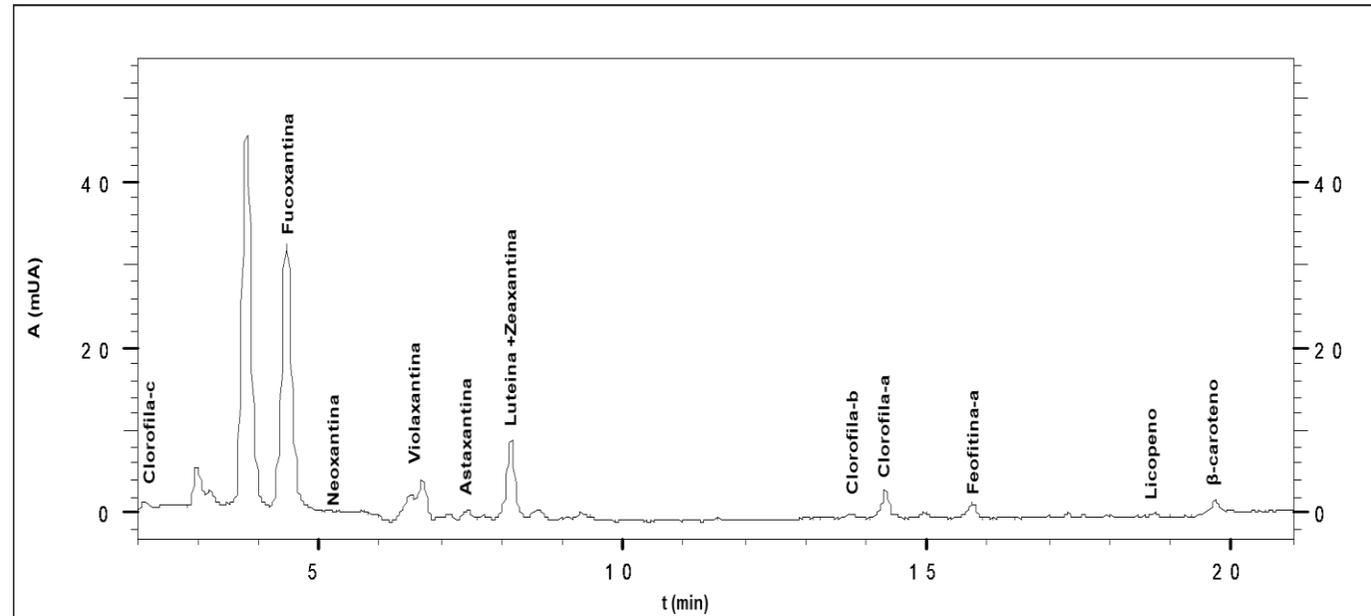


Fig. 3.7. Cromatograma de medición del extracto metanólico de *P. tricornutum* en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm (se trata de una de las imágenes representativas, no obstante, los valores de la tabla 3.6. muestran la media de todas las mediciones realizadas, $n=3$).

Tabla 3.7. . Resultados analíticos obtenidos a través del cromatograma de medición del extracto metanólico de *N. gaditana* en condiciones de crecimiento estándar, a una longitud de onda de 450 nm.

Compuesto (nombre tradicional)	Tiempo de retención (min)	Area ($\cdot 10^4$ mUA ²)	Concentración ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
Fucoxantina	3,71 \pm 0,04	1,09 \pm 0,15	0,080 \pm 0,011	28 \pm 4
Neoxantina	5,0 \pm 0,5	1,4 \pm 1,5	0,021 \pm 0,004	7 \pm 2
Violaxantina	6,3 \pm 0,9	4,0 \pm 1,3	0,251 \pm 0,036	89 \pm 13
Astaxantina	7,5 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2	0,145 \pm 0,017	51 \pm 6
Luteina + Zeaxantina	9,8 \pm 0,1	13,9 \pm 0,3	0,764 \pm 0,018	270 \pm 6
Licopeno	18,54 \pm 0,16	6,9 \pm 0,4	0,54 \pm 0,03	193 \pm 11
β -caroteno	19,6 \pm 0,3	8,2 \pm 0,3	0,491 \pm 0,019	174 \pm 7

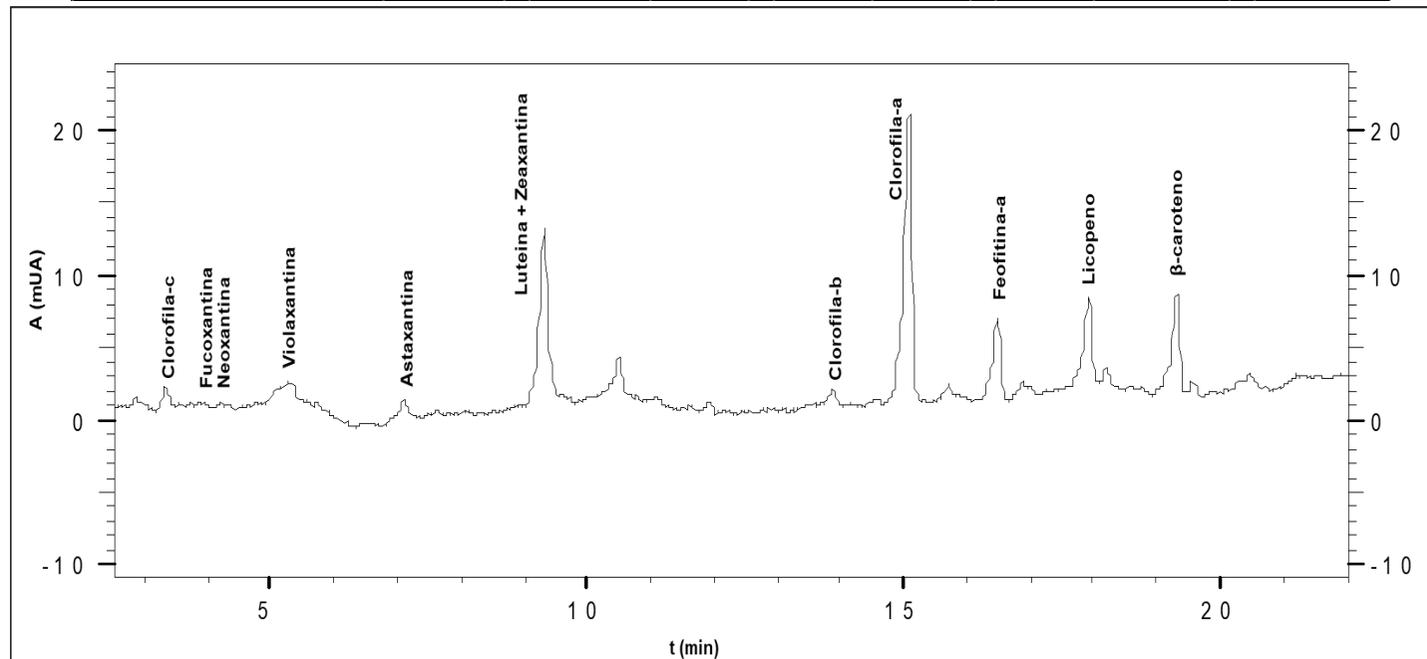


Fig. 3.8. Cromatograma de medición del extracto metanólico de *N. gaditana* en condiciones normales a una longitud de onda de 450 nm (se trata de una de las imágenes representativas, no obstante, los valores de la tabla 3.7. muestran la media de todas las mediciones realizadas, $n=3$).

Tal y como se puede apreciar en los datos aportados por la Tabla 3.3, la microalga extremófila *C. onubensis* presenta altas concentraciones en luteína, licopeno β -caroteno y fucoxantina, preferentemente, mostrando su máximo en el pico de luteína el cual muestra concentraciones finales próximas a $0,7 \text{ mg g}^{-1}$ de peso seco.

Los valores mostrados por estudios preliminares de concentración de este carotenoide en la *C. onubensis* para medios modificados mostraron unos resultados que se presentaban entre 2 y 8 mg g^{-1} , esto indica que la capacidad antioxidante derivada de este carotenoide puede ser potenciada hasta 10 veces modificando las condiciones de cultivo [Vaquero, 2012].

Como se puede apreciar, el contenido en Luteína + Zeaxantina, Licopeno (también conocido como ψ -caroteno) y β -caroteno correspondían a más del 75% del total de los carotenoides estudiados, resultado que concuerda con la bibliografía mostrada de estudios previos realizados con el cultivo estándar de *C. onubensis*, por lo que se puede confirmar que las condiciones de crecimiento, así como el método de extracción ha mostrado resultados comparables con los de la bibliografía.

Con el fin de poder obtener una visión general del perfil de carotenoides de esta microalga, se procedió a la creación de un diagrama porcentual (Fig. 3.9.).

Estos datos muestran grandes diferencias entre los perfiles de las distintas algas. Destaca esencialmente la riqueza en fucoxantina en el extracto de *P. tricornutum*, muy superior, tanto en cantidad como en relación con otros carotenoides, al resto de los extractos algales. Así mismo, se aprecia una alta concentración con respecto al total analizado en luteína y zeaxantina en los extractos de *T. suecica* y *N. gaditana*.

N. gaditana ha mostrado ser el principal productor de carotenos (β -caroteno y licopeno), alcanzando casi el 50% del total, superando a *I. galbana* tanto en cantidad como en proporción respecto del total.

Finalmente, el extracto de *I. galbana* muestra un perfil bastante equilibrado en el contenido de todos los carotenoides, destacando la presencia de carotenos (β -caroteno y licopeno) que corresponden a un 40% del total, la fucoxantina que muestra una concentración del 19%, luteína + zeaxantina con un 18% y violaxantina con un 12%.

En cambio, *P. tricornutum* con un 58% del total de carotenoides en forma de fucoxantina, presenta una gran afinidad con los datos aportados en la bibliografía, mostrándose sin diferencias significativas con respecto a la relación obtenida a partir del método de la bibliografía. *T. suecica* presenta altas concentraciones de luteína con contenidos del 52% del total analizado, lo cual también se corresponde en gran medida con los datos aportados por la bibliografía. A pesar de ello, el extracto obtenido para el caso de *T. suecica* no mostró una alta riqueza en violaxantina, al presentar únicamente un 8% del total analizado, lo mismo que le ocurrió al caso de *N. gaditana*.

En último lugar, el perfil obtenido para el caso de *N. gaditana* fue el más rico en β -carotenos, alcanzando el 21% del total, porcentajes que se mostraron en concordancia con los estudios previos realizados en la caracterización de las propiedades bioquímicas de este microalga que afirmaban ser rica en proteínas vegetales y caroteno [Lubián, 1982].

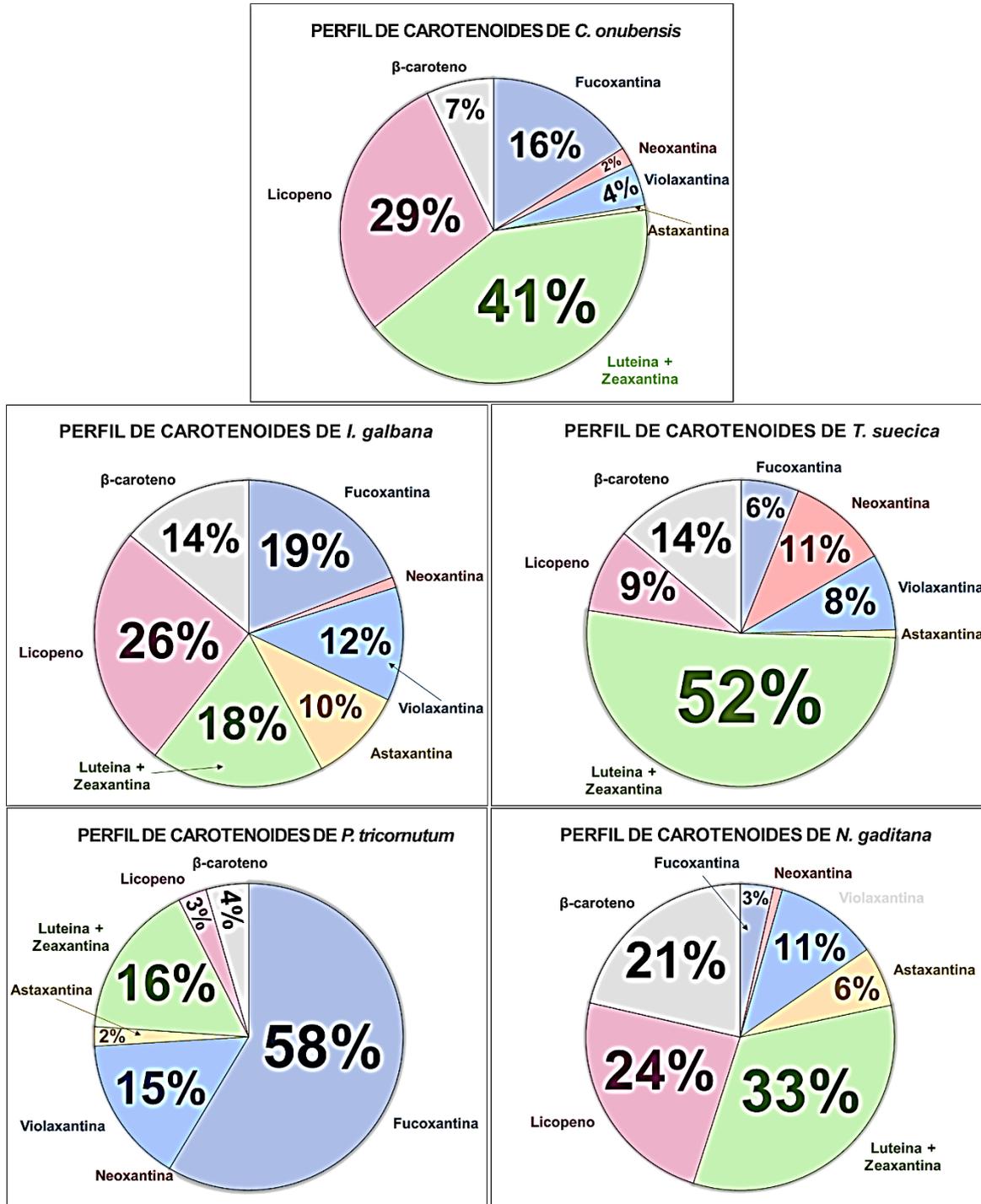


Fig. 3.9. Relación del contenido en pigmentos del grupo de las carotenoides presentes en la microalga *C. onubensis* en condiciones de crecimiento estándar junto con el perfil de carotenoides de cada una de las algas comerciales estudiadas.

Las variaciones porcentuales que comprobamos pueden ser debidas al proceso de tratamiento de las algas (liofilización y almacenamiento en frío), ya que esta preparación favorece la pérdida de compuestos por evaporación y degradación. No obstante, el alimento funcional será empleado y comercializado en polvo liofilizado, por lo que los resultados obtenidos que se muestran son los más próximos a los que cabría esperar tras su preparación y venta (a diferencia de los presentes en la bibliografía que emplean material fresco), permitiendo conocer la propiedades reales del alimento en el caso de ser empleado como nutracéutico en animales y humanos.

3.1.2.2. Comparativa del contenido en carotenoides entre las microalgas de estudio.

Tal y como se comentó previamente, los carotenoides presentan grandes ventajas como suplemento alimentario debido a sus propiedades nutracéuticas, entre la que destaca ser precursor de la vitamina A, un potente antioxidante natural presente en los animales que solo puede ser sintetizado mediante la ingesta de ciertos alimentos ricos en compuestos pro-vitamínicos.

De forma general, todos los carotenoides presentan esta propiedad, destacando la acción pro-vitamina A de compuestos como la luteína, la zeaxantina o el β -caroteno. No obstante, el estudio de los carotenoides totales presentes en un alimento funcional puede dar una buena aproximación del potencial como nutracéutico y antioxidante, al presentarse correlación directa con el poder antioxidante total, al ser dicha vitamina A, junto con la vitamina C y los polifenoles los principales agentes antioxidantes ingeridos en forma de alimentos en las dietas [Gómez-Ariza *et al.*, 2010].

En los estudios cromatográficos previos, se analizaron 8 tipos de carotenoides. Para obtener una visión realista del poder antioxidante derivado del contenido en carotenoides, se procedió al estudio de los carotenoides totales. Con estos datos podremos obtener una visión comparativa de la capacidad real de producción de estos compuestos de interés nutracéutico en cada una de las microalgas estudiadas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Contenido en carotenoides totales presentes en las microalgas de estudio.

Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	<i>C. onubensis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. tricorutum</i>	<i>N. gaditana</i>
Carotenoides totales analizados	1720 \pm 40	380 \pm 20	342 \pm 4	1530 \pm 50	810 \pm 20

Tal y como se aprecia en la Fig. 3.10, *C. onubensis* presenta el mayor contenido en carotenoides, mostrando diferencias significativas con todas las demás algas del estudio, y superando en un 10% el contenido en carotenoides totales de *P. tricorutum*, quien presentó el mayor valor en carotenoides de todas las algas comerciales.

A su vez, *C. onubensis* muestra valores un 52,9% mayores que los de *N. gaditana* y un 80,1% mayores que *I. galbana* y *T. suecica*, quienes presentaron valores similares sin diferencias significativas entre sí para $p < 0.05$.

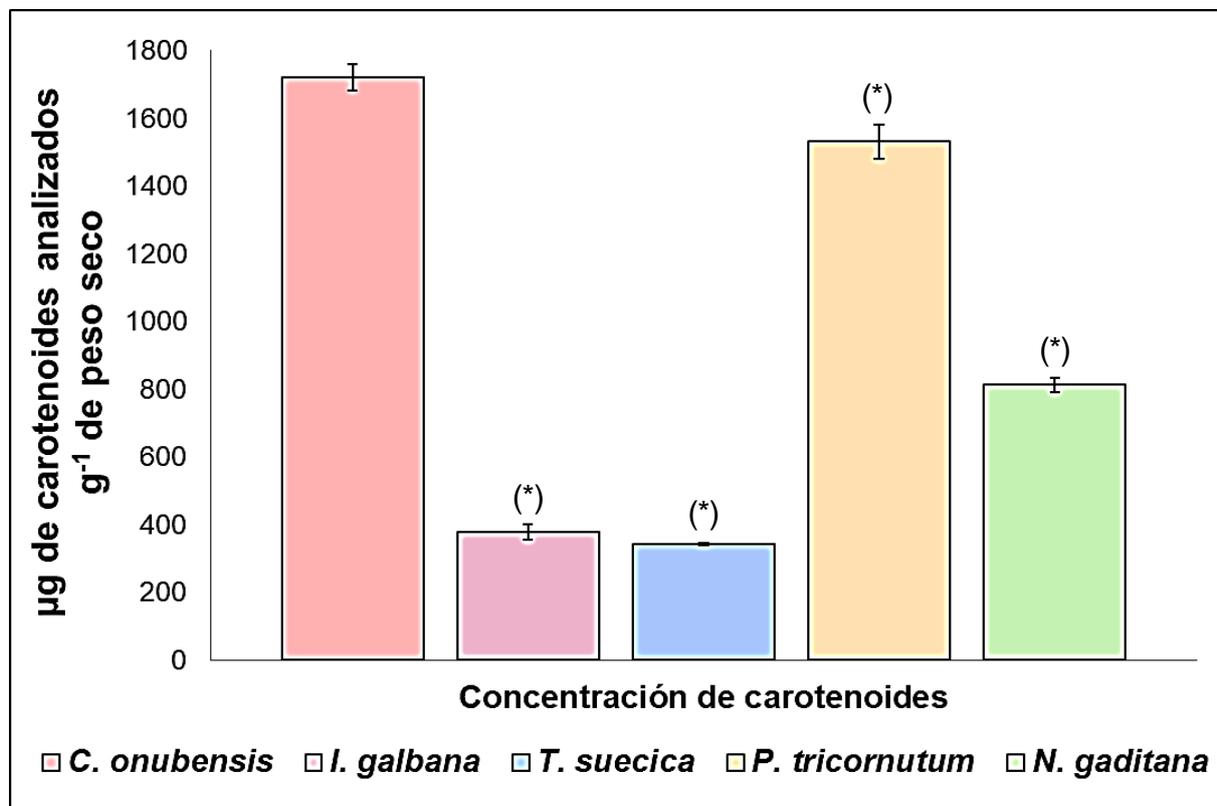


Fig. 3.10. Contenido en carotenoides totales analizados presentes en las microalgas del estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

Esta riqueza en carotenoides apreciable en *C. onubensis* se muestra en gran concordancia con trabajos previos de nuestro grupo, que afirman que dicha microalga presentaría un gran potencial como nutraceutico al ser rica en PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados) y carotenoides [Toimil, 2021]. No obstante, al mejorar los niveles presentes en *P. tricornutum* (el alga de referencia para todo estudio de nutraceuticos relacionados con carotenoides) [Kang *et al.*, 2013; Kawee-ai *et al.*, 2013; Neumann *et al.*, 2019], la posiciona como un organismo con alto poder nutraceutico, y, en especial, como agente antioxidante.

Seguidamente se procederá al estudio pormenorizado de cada uno de los carotenoides más relevantes, con el fin de poder conocer las ventajas nutraceuticas de cada microalga estudiada.

3.1.2.2.1. Comparativa del contenido en fucoxantina presente en las algas del estudio.

La fucoxantina es uno de los principales componentes pigmentarios del grupo de los carotenoides que, junto con la clorofila-a y la clorofila-c en el complejo clorofila-a/c son los encargados de fijar la mayor parte de la radiación lumínica las microalgas [Owens y World, 1986].

Tal y como se apreció previamente, *P. tricornutum* fue una de las microalgas que mostró de un alto contenido en fucoxantina con respecto al total de carotenoides analizados, alcanzando valores de hasta el 75% del total medido. Esta alta concentración ya había sido reportado por estudios preliminares [Kawee-ai *et al.*, 2013].

Según trabajos previos realizados, la fucoxantina presenta un alto poder antioxidante, mayor incluso que el poder ejercido por el ácido ascórbico, el butilhidroxianisol o el tocoferol [Xia *et al.*, 2013]. Este estudio, realizado mediante el método de inhibición de DPPH empleando peróxido de hidrógeno, mostró que la presencia de este carotenoide aumentaba consecuentemente la acción antioxidante, alcanzando los valores del ácido ascórbico para concentraciones de 0,2 mg mL⁻¹ y sin mostrar saturación en la respuesta (a diferencia del propio ácido ascórbico).

Por otro lado, diversos estudios han manifestado que la fucoxantina contribuye a la atenuación de la acumulación de tejido adiposo blanco y a la reducción de peso inducida por dietas hipercalóricas, a la disminución del contenido en glucosa sérica en ratones diabéticos [Maeda *et al.*, 2007] y a la acción antitumoral, al inducir los procesos apoptóticos en células PC-3 de cáncer de próstata al encontrarse en adición con neoxantina [Kotake-Nara *et al.*, 2005-I], también actúa como inductor de la apoptosis en leucemia promyelocítica humana [Kotake-Nara, 2005-II]

Según nuestro estudio, *C. onubensis* presentó un alto contenido en fucoxantina (0,274 mg g⁻¹ de peso seco), lo que equivale a 3,27 veces menos del contenido presente en *P. tricornutum*, la microalga con mayor contenido en este compuesto. Según la bibliografía anteriormente referenciada, este contenido sería aproximadamente 10 veces menos la acción antioxidante ejercida por parte del ácido ascórbico. Esto, unido a otros compuestos, provocará una alta acción antioxidante en el estudio del DPPH, al ser esta acción un producto sinérgico.

Tabla 3.9. Contenido en fucoxantina presente en las microalgas de estudio.

Concentración (µg g ⁻¹ peso seco)	<i>C. onubensis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>N. gaditana</i>
Fucoxantina	274 ± 13	72 ± 7	20,7 ± 0,3	900 ± 10	28 ± 4

Según la bibliografía (Xia *et al.*, 2013) el contenido en fucoxantina de *C. onubensis* le otorgaría un elevado poder antioxidante, muy superior al de las chlorophytas del estudio.

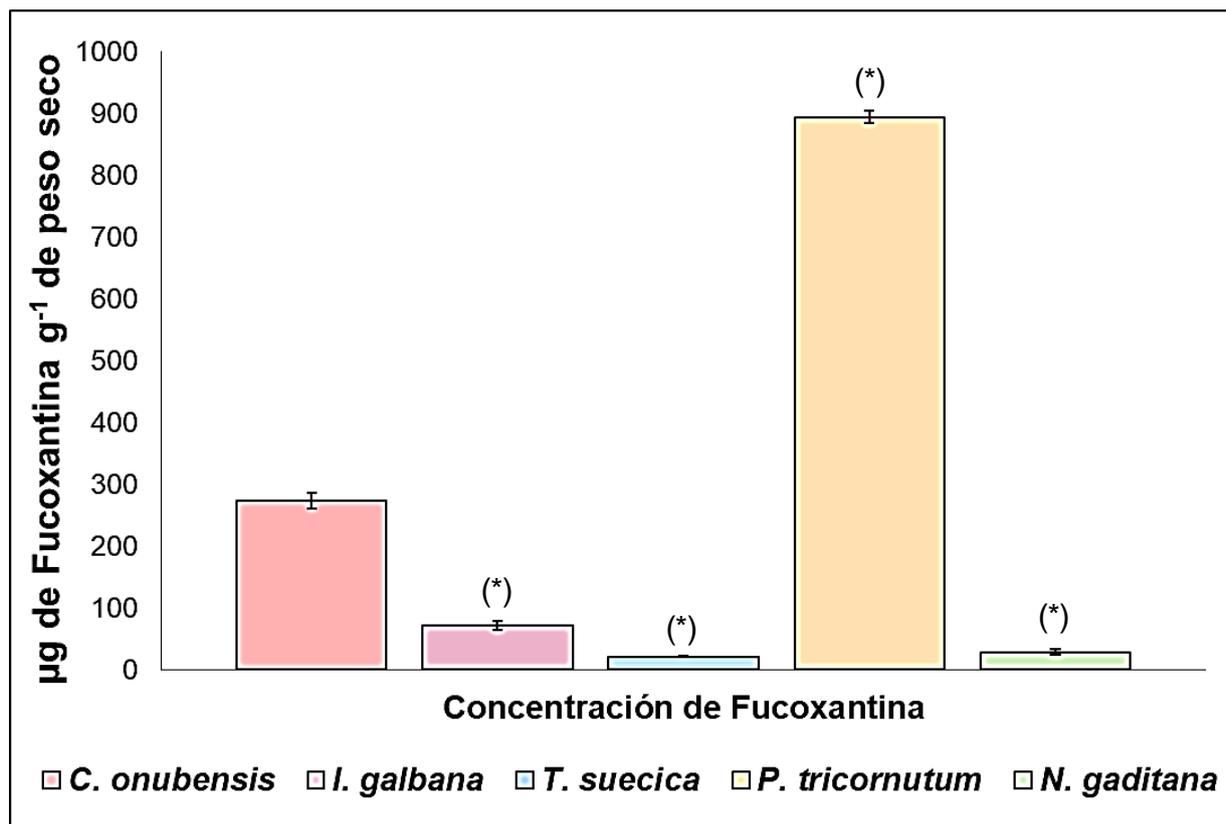


Fig. 3.11. Contenido en fucoxantina presente en las microalgas de estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

Las altas concentraciones en este tipo de carotenoide por parte de un alga verde podrían ser debido a la necesidad de aumentar la eficiencia de captación de radiación lumínica para la generación de nuevas estructuras para la preservación de la especie en condiciones tan adversas como son las del río Tinto. Esto es debido a que la fucoxantina suele presentarse en mayor medida en algas pardas como *P. tricornutum*, ya que permiten captar la luz a mayor profundidad al ser altamente eficiente con la captación de luz polarizada [Restrepo, 2015] pero también puede ejercer un papel como protector antioxidante de los radicales libres inducidos por la alta irradiancia del río Tinto

De esta forma, se puede concluir que *C. onubensis* presenta un contenido elevado en fucoxantina, superior al presente en otras especies de su misma división filogenética y mayores a los de gran parte de las microalgas comerciales, únicamente superado por *P. tricornutum*; presentando así un alto poder antioxidante e interés como nutraceutico anti-obesidad, para el control de los niveles de glucosa séricos y antitumoral [Navarro, 2020].

3.1.2.2.2. Comparativa del contenido en neoxantina presente en las algas del estudio.

La neoxantina es un carotenoide del grupo de las xantofilas que se presenta en forma de isómeros trans y 9-cis cuya finalidad esencial es proteger a la célula contra el estrés foto-oxidativo [Neuman *et al.*, 2014], al ser un intermediario de la biosíntesis de la hormona ácido abscísico involucrada en procesos de respuesta al estrés ambiental, salinidad del suelo, tolerancia al frío, estrés térmico y tolerancia a metales pesados [Frinkelstein, 2013] y se produce a partir de la violaxantina en el ciclo de las xantofilas [Demming-Adams *et al.*, 1996].

Además, junto con la fucoxantina, han demostrado tener poder anticancerígeno, al inducir la apoptosis de células malignas. A diferencia del carotenoide anterior, la neoxantina suele encontrarse en mayores concentraciones en vegetales de hojas verdes, como las espinacas.

Los resultados comparativos de todas las muestras de algas estudiadas mostraron una clara concentración mayoritaria en las dos especies de la división Chlorophyta, siendo mayor en *T. suecica* con valores superiores a los de *C. onubensis*, tal y como se recoge en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Contenido en neoxantina presente en las microalgas del estudio.

Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	<i>C. onubensis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>N. gaditana</i>
Neoxantina	33 \pm 2,3	4,2 \pm 1,4	36,0 \pm 0,6	3,4 \pm 0,4	7 \pm 2

Como se observa en la Fig. 3.12, *T. suecica* muestra el mayor contenido en neoxantina de todas las muestras analizadas, seguido por *C. onubensis* con un 3.7% menos de contenido y diferencia significativa para $p < 0.05$. En ambos casos, con un contenido muy superior al del resto de microalgas analizadas.

A pesar de tener valores inferiores a *T. suecica* y con diferencias significativas, dicha diferencia es muy pequeña, resultando ser ambas los mayores productores de neoxantina presentes entre las algas estudiadas. Por ello, y debido a las propiedades nutraceuticas de este carotenoide, serían potenciales nutraceuticos por la presencia de este compuesto de interés en suplementación alimentaria.

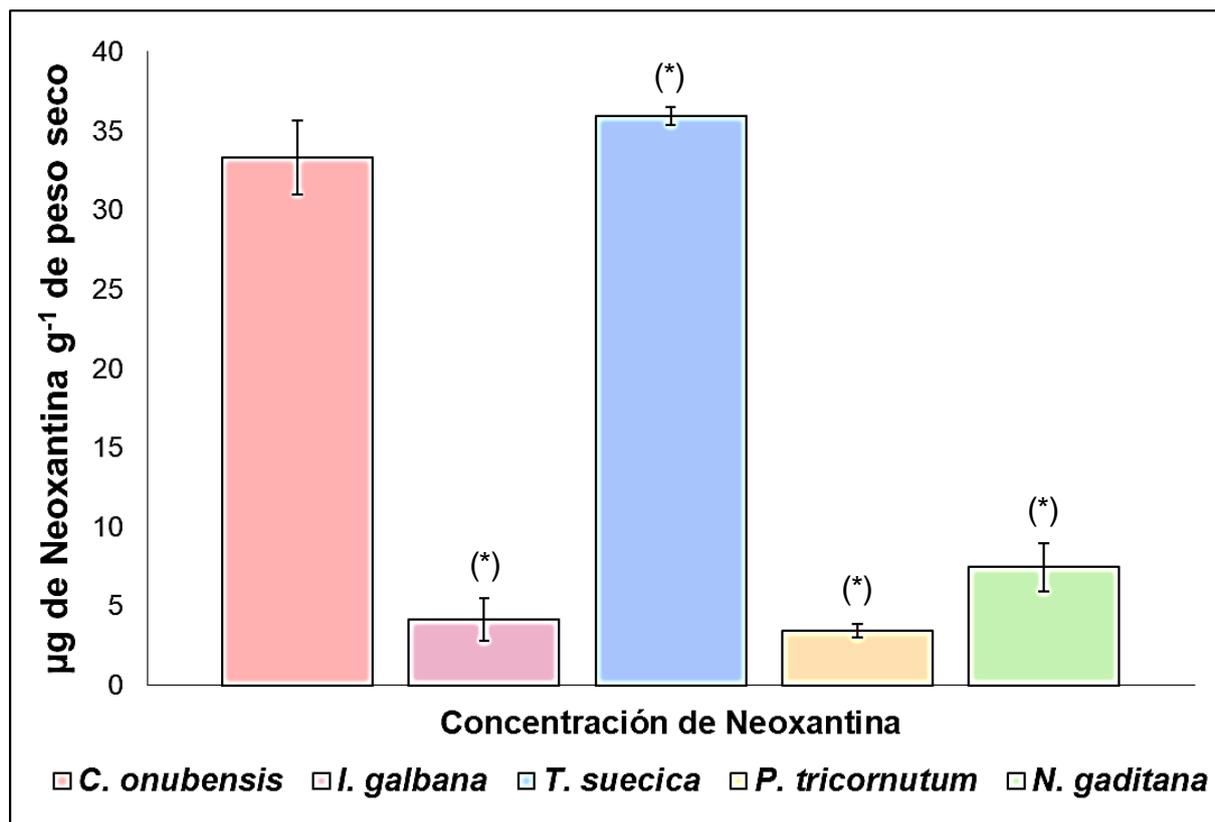


Fig. 3.12. Contenido en neoxantina presente en las microalgas del estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

3.1.2.2.3. Comparativa del contenido en violaxantina presente en las algas de estudio.

La violaxantina es otro de los compuestos carotenoides de interés en un alimento. En el caso de las microalgas, éste pigmento derivado del α -caroteno, se presenta en alta concentración en rodofitas, crisofíceas, clorofitas y *viola tricolor* [Salazar, 2000]. Al igual que ocurre con la neoxantina, la violaxantina se encuentra dentro del ciclo de las xantofilas, pudiéndose convertir desde zeaxantina por catálisis por la enzima depoxidasa. Esto sucede cuando la energía lumínica supera la capacidad de fotosíntesis como mecanismo de defensa por disipación térmica [Niyogi, 1999].

Al igual que el resto de carotenoides, la violaxantina presenta grupos insaturados que actúan frente a la acción oxidativa de las especies reactivas del oxígeno (EROs) a través de la oxidación de este compuesto. A su vez, ha resultado ser de gran interés al inhibir la peroxidación lipídica y hemólisis de los glóbulos rojos [Fu *et al.*, 2011].

Este pigmento se encuentra en especial concentración en Clorofíceas, como *T. suecica* y *C. onubensis*, y, además, *N. gaditana*, debido al alto contenido en α -caroteno que posee,

tal y como se aprecia en la Tabla 3.11. Siendo el valor máximo el observado en *P. tricornutum*, alcanzando valores de hasta 3 veces el de *C. onubensis*.

Este incremento específico de *P. tricornutum* puede ser debido a las condiciones de cultivo del fabricante, ya que, según la bibliografía, *P. tricornutum* presenta la capacidad de incrementar su contenido en Violaxantina en función de cambios pequeños de las condiciones del medio. Así, pequeñas variaciones del medio pueden hacer incrementar el contenido de violaxantina reduciéndose los niveles de zeaxantina por epoxidación del alqueno ligada a la baja luminosidad, o convertirla sin posibilidad de revertir la reacción en diadinoxantina y ésta a fucoxantina [Manfellotto *et al.*, 2020].

A su vez, y como se puede apreciar en la Fig. 3.13, la violaxantina presente en *P. tricornutum* se muestra anexionada a otro carotenoide (posiblemente diadinoxantina, según la bibliografía citada previamente), lo que podría haber llevado a una sobreestimación del contenido real en este carotenoide para el caso de *P. tricornutum*. A pesar de ello, los efectos derivados de la ingesta de violaxantina son muy similares a los proporcionados por este segundo pigmento que solo se encuentra en las diatomeas, por lo que el error, en la estimación de su capacidad antioxidante, es muy reducido.

Tabla 3.11. Contenido en violaxantina presente en las microalgas del estudio.

Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	<i>C. onubensis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>N. gaditana</i>
Violaxantina	77,1 \pm 1,7	45 \pm 4	27,6 \pm 0,8	236 \pm 12	89 \pm 13

Al observar la Fig. 3.13, se aprecia como *P. tricornutum* muestra el mayor contenido en violaxantina, tal y como se apreciaba en la Tabla 3.11. A su vez, *N. gaditana* ostenta el segundo puesto en riqueza, con contenidos un 62% más bajos que *P. tricornutum* y sin diferencias significativas a los valores obtenidos para el caso de *C. onubensis*.

Finalmente, se aprecia que *C. onubensis* muestra un contenido más elevado que *T. suecica*, con diferencias significativas y valores que superan el 64% de incremento y algo menores que en el caso de *I. galbana* con un incremento del 41,2%.

Con los datos obtenidos se puede deducir que la microalga con la mayor acción antioxidante derivada de la presencia de violaxantina sería *P. tricornutum*, algo que se correlaciona en gran medida con lo esperable para el caso de las diatomeas de la familia Phaeodactylaceae [Dambek, 2012], seguida de *C. onubensis* y *N. gaditana*, dos microalgas caracterizadas por presentar un alto contenido en carotenos.

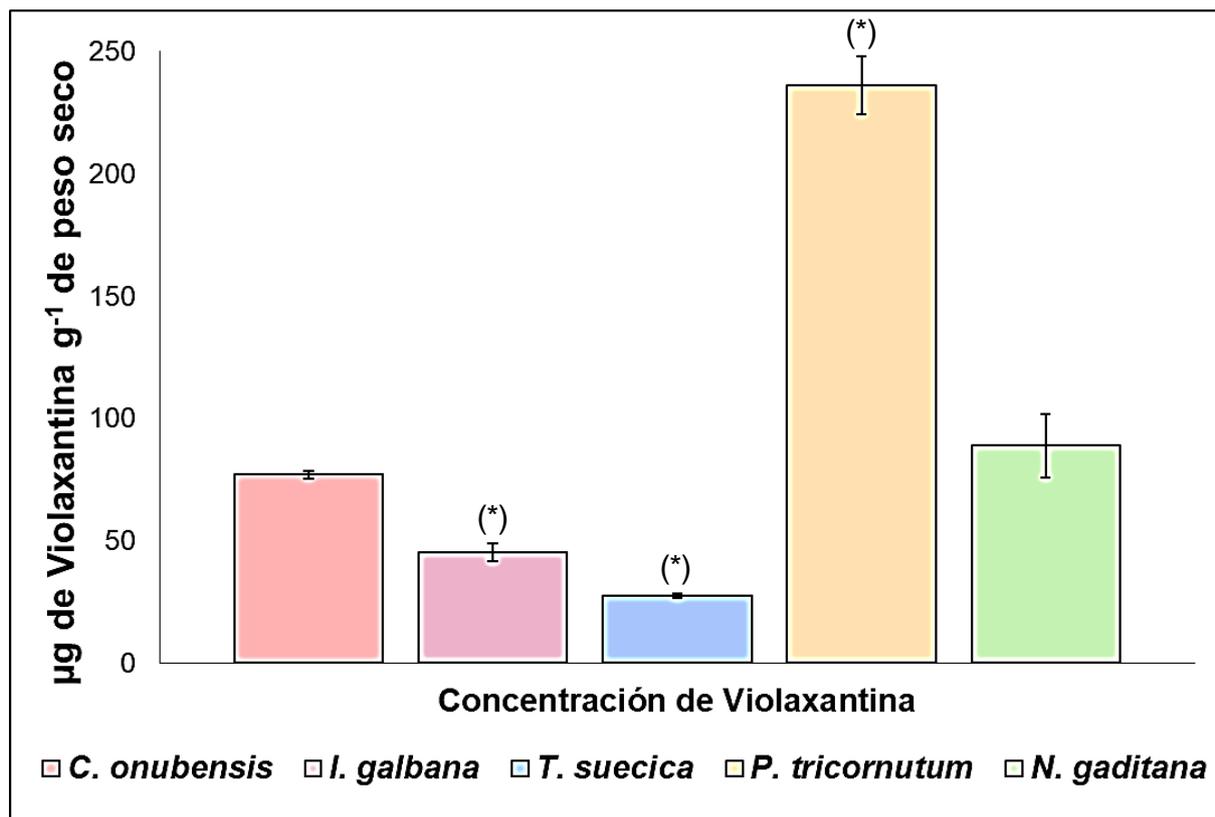


Fig. 3.13. Contenido en violaxantina presente en las microalgas del estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

3.1.2.2.4. Comparativa del contenido en astaxantina presente en las algas del estudio.

La astaxantina se considera otra de las xantofilas con mayor efecto antioxidante, aunque, a diferencia de otros carotenoides, este pigmento del grupo de los terpenoides no se convierte en vitamina A (retinol) al ser ingerida a través de la dieta [Guerin *et al.*, 2003]. No obstante, existen estudios que indican que la astaxantina presenta hasta diez veces más poder antioxidante que otros carotenoides como el α -tocoferol, el α -caroteno, la luteína, el β -caroteno y el licopeno [Naguib, 2000].

Este pigmento se puede acumular en peces y crustáceos, así como en las plumas de algunas aves que se alimentan a partir de dichos crustáceos [McGraw y Hardy, 2006; Hussein *et al.*, 2006] y en ciertos microorganismos como algunas levaduras y ciertas microalgas del grupo de las clorofitas de agua dulce como *Haematococcus pluvialis* o *Chlorella zofingiensis* [Han *et al.*, 2013] confiriéndoles un característico color rosado.

Tras los análisis realizados se pudo comprobar que este pigmento no fue especialmente abundante en las dos especies de clorofitas estudiadas (*C. onubensis* y *T. suecica*), y que, sin embargo, sí lo era en el resto de extractos (Tabla 3.12). No obstante, en ninguno de los casos con niveles que puedan ser de interés comercial, al no alcanzarse en ningún caso

los 8 mg dosis recomendada diaria de este antioxidante para el control de los efectos en sangre de las dietas hipercalóricas y los efectos oxidativos provocados por la acumulación de EROs mitocondrial [Mashhadi *et al.*, 2018].

Tabla 3.12. Contenido en astaxantina presentes en las microalgas del estudio.

Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	<i>C. onubensis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>N. gaditana</i>
Astaxantina	9 \pm 4	38,0 \pm 1,3	2,8 \pm 0,3	31,2 \pm 0,5	51 \pm 6

El estudio realizado mostró que *C. onubensis* carecía de cantidades importantes de astaxantina, siendo *N. gaditana*, la que presentó la mayor concentración de este pigmento (Fig. 3.14).

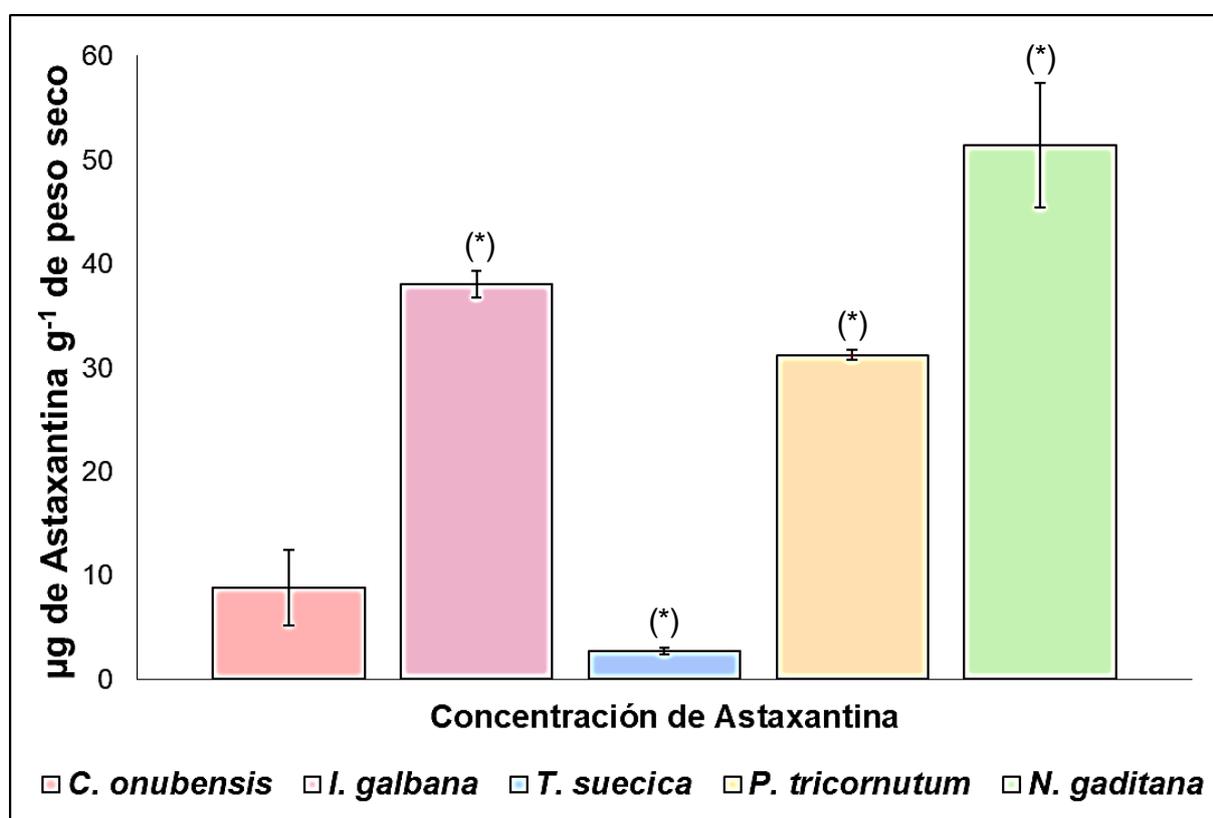


Fig. 3.14. Contenido en astaxantina presente en las microalgas del estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

Por otro lado, este compuesto no es de los mayoritarios en ningún caso, siendo de reducido interés con respecto a otros presentes, ya que se trata de un pigmento de tipo secundario y en concentraciones reducidas. Las únicas microalgas que presentan contenidos con interés industrial en este pigmento son *C. zofingiensis*, la cual ha logrado llegar a presentar concentraciones de 32 mg L⁻¹ de astaxantina [Sun *et al.*, 2008] y *H. pluvialis*, quien presenta

rutas de formación de astaxantina a través de β -caroteno como respuesta ante el estrés ambiental [Li, 2007]. Entre las especies que han demostrado tener este pigmento con niveles de interés industrial y nutracéutico, no se encuentra ninguna de las especies empleadas en este estudio [Han *et al.*, 2013].

3.1.2.2.5. Comparativa del contenido en luteína y zeaxantina presentes en las algas del estudio.

La luteína es otro de los carotenoides más importantes dentro del grupo de las xantofilas y el cual confiere tonalidades amarillas a las plantas, algas, bacterias fotosintéticas y a la yema del huevo [Fugmann *et al.*, 2000].

La zeaxantina, a su vez, es otra xantofila de color amarillo que se presenta en relación con la luteína. Ambos compuestos suelen ser estudiados en conjunto debido a sus propiedades, así como a sus similares características estructurales.

La luteína, junto con la zeaxantina, ha demostrado tener efectos antiinflamatorios, y muchos beneficios relacionados con la prevención de enfermedades oculares, al prevenir el deterioro macular derivado de la edad [Buscemi *et al.*, 2018] al encontrarse de forma natural en la mácula del ojo humano como pigmento fotoprotector [Bone, 2007], y al encontrarse la luteína especialmente en la periferia y la zeaxantina en el centro de la mácula lútea. Existen estudios que relacionan los bajos niveles de estos pigmentos con enfermedades maculares y como las cataratas en edades avanzadas [Lim *et al.*, 2014].

Además, estos compuestos son grandes antioxidantes, al presentar en su molécula un oxígeno singlete capaz de contrarrestar la acción de los radicales libres (esta acción es de mayor importancia en el caso de la zeaxantina) [Kijlstra *et al.*, 2012]. La acción de filtro azul que presenta la luteína, además, reduce el daño fototóxico de los fotorreceptores celulares [Junhans *et al.*, 2001], inhibe la cascada proinflamatoria de la citoquina [Chung *et al.*, 2017] y del factor de transcripción nuclear-factor-kB (NF-kB) [Liu *et al.*, 2017] y la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) [Rafi y Shafaie, 2005], así como la activación del sistema del complemento [Tian *et al.*, 2015]. Todo esto hace que la ingesta de alimentos ricos en luteína y zeaxantina sea de especial interés farmacéutico.

Ciertos estudios realizados por el departamento de Agricultura de los Estados Unidos y HAC mostraron que el consumo de un aguacate (contenido en luteína de 0,136 mg 100 g⁻¹ de peso fresco) por día durante un período de tiempo total equivalente a seis meses mejora los niveles base séricos de luteína en un 25%, favoreciendo una mejora en la memoria operativa y en la memoria espacial, favoreciendo el buen estado cognitivo [Scott *et al.*, 2017].

En este trabajo se ha observado que todas las algas estudiadas mostraban altos contenidos en estos dos pigmentos, apreciándose las máximas concentraciones en *C. onubensis*, *P. tricornutum* y *N. gaditana*. Siendo el contenido presente en *C. onubensis* el mayor de todos, tal y como se aprecia en la Tabla 3.13, observándose cantidades

superiores a los 0,711 mg de pigmento por cada gramo de peso seco, lo que equivaldría a más de 500 veces el contenido en este compuesto que el presente en una porción de aguacate.

Tabla 3.13. Contenido en luteína y zeaxantina presentes en las microalgas del estudio.

Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	<i>C. onubensis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>N. gaditana</i>
Luteína + Zeaxantina	710 \pm 30	69 \pm 3	177,52 \pm 0,07	250,0 \pm 50,0	270 \pm 6

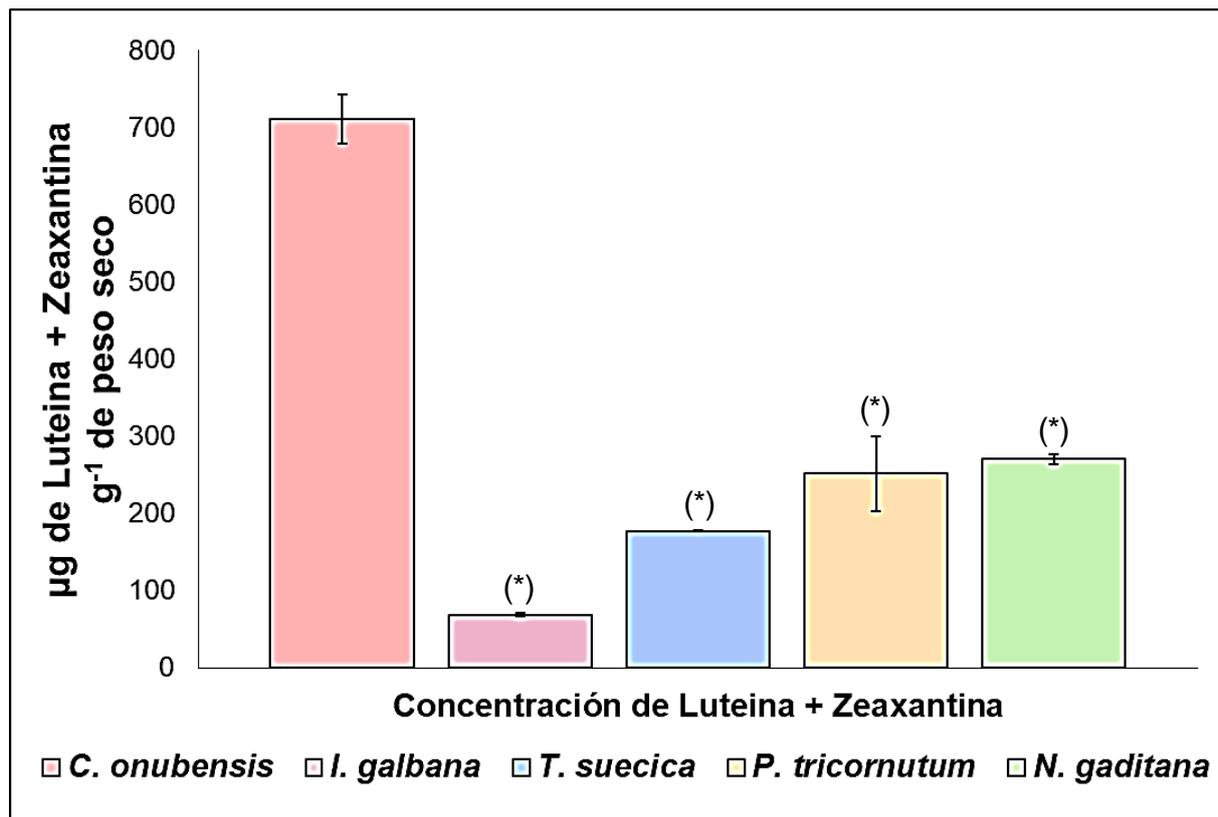


Fig. 3.15. Contenido en luteína y zeaxantina presente en las microalgas del estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p<0.05$.

Tal y como se puede observar en la Fig. 3.15, el contenido en luteína y zeaxantina de *C. onubensis* sobrepasa con creces los valores obtenidos para el resto de las algas estudiadas siendo un 75% mayor que el contenido presente en *T. suecica*, un 64,8% mayor que *P. tricornutum* y un 61,9% más que *N. gaditana*.

En general, los contenidos presentes en las microalgas comerciales fueron similares entre sí, siendo el valor más bajo el de la microalga *I. galbana*, que presentó un 72,5% menos que los del resto.

Estos resultados son consecuentes con la bibliografía referenciada sobre el contenido en luteína de la microalga *C. onubensis* [Vaquero *et al.*, 2012] pudiendo ser incrementado hasta en 10 veces al modificar las condiciones del medio de cultivo. Esto hace que *C. onubensis* muestre un gran potencial antioxidante e interés nutracéutico derivado de la presencia de estos compuestos.

3.1.2.2.6. Comparativa del contenido en licopeno presente en las algas del estudio.

El licopeno es un pigmento del grupo de los carotenoides con alta presencia en vegetales y que ha demostrado tener grandes efectos beneficiosos para la salud. También conocido como ψ -caroteno, forma parte de los carotenoides de la familia del caroteno, caracterizados por su alta apolaridad. Se presenta de forma concentrada en especies de vegetales, hongos y algas fotosintéticas con colores rojizos, debido al rango de absorbancia del compuesto, siendo una de las mayores concentraciones estudiadas la presente en los tomates (3 mg 100 g⁻¹ peso fresco) [Kerr Dow, 2005].

Según diversos estudios, al ser absorbido en el intestino como parte de la dieta, se transporta por lipoproteínas en la sangre y se almacena en el tejido adiposo, piel, hígado y glándulas suprarrenales, ejerciendo un alto poder antioxidante y protegiendo a las células del estrés oxidativo inducido por los EROs [Garrido *et al.*, 2013] previniendo enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento celular.

Este pigmento es el carotenoide predominante en los tejidos humanos, cuya concentración máxima se da en la próstata. Esta acumulación predominante en las células prostáticas han sido la explicación al alto poder antitumoral ligado al licopeno, el cual ha sido confirmado en estudios que concluyeron en que la ingesta de licopeno diaria reducía el riesgo de sufrir cáncer de próstata, al bloquear los mecanismos de inducción tumoral [Sharoni *et al.*, 2012]. Además, estudios epidemiológicos han sugerido que también reduce la posibilidad de sufrir patologías cancerosas en pulmón y tracto digestivo (cáncer de colon esencialmente) y reduce la posibilidad de sufrir síndrome de degeneración macular asociada a la edad [Giovannucci *et al.*, 2002].

El licopeno, estructuralmente, se trata de un tetraterpeno ensamblado a ocho unidades de isopreno, lo que lo hace insoluble en agua, rico en insaturaciones que le confieren un alto poder antioxidante, reduciendo la lipoperoxidación lipídica que, unido a la reducción de los niveles de colesterol LDL, disminuye el riesgo cardiovascular [Giovannucci *et al.*, 2002]. No obstante, a diferencia de otros pigmentos del grupo de los carotenos, el licopeno carece de la capacidad de conversión en vitamina A.

El alga *C. onubensis* presenta altos contenidos en licopeno (Fig. 3.16) (49,5 mg 100 g⁻¹ peso seco), superiores a los presentes en el tomate de ensalada (que presenta 3 mg 100 g⁻¹ de peso fresco) e incluso que del tomate “pera”(con 30 mg 100 g⁻¹ de peso fresco). Este valor indica el alto interés de este alga como antioxidante y como reductor del riesgo de sufrir dolencias asociadas al estrés oxidativo y el daño al material genético. A su vez, todas

las algas estudiadas mostraron valores comparables con los aportados por los tomates, siendo *T. suecica* la que mostró el menor contenido, siendo éste el mismo que tendrían 100 g de peso fresco de tomate de ensalada (Tabla 3.14).

Tabla 3.14. Contenido en licopeno presentes en las microalgas del estudio.

Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	<i>C. onubensis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>N. gaditana</i>
Licopeno	500 \pm 20	100 \pm 20	30 \pm 4	46 \pm 4	193 \pm 11

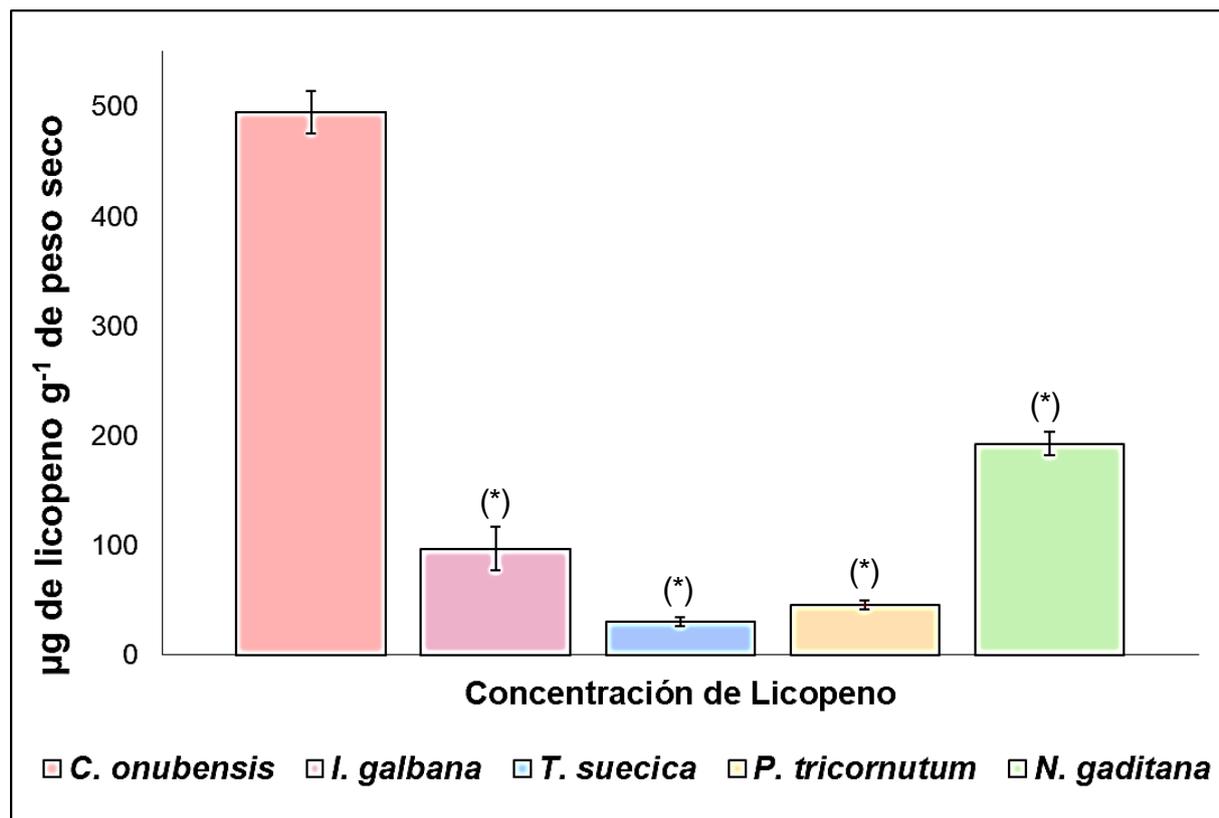


Fig. 3.16. Contenido en licopeno presente en las microalgas del estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p<0.05$.

Al realizar la comparativa de las muestras analizadas, se aprecia que *C. onubensis* es el alga con el mayor contenido en este pigmento antitumoral y antioxidante, mostrando concentraciones un 61,1% superiores que las encontradas en *N. gaditana*, que, según la bibliografía, es un alga de gran interés alimenticio debido a su alto contenido en compuestos de la familia del caroteno [Castejón, 2018]. *C. onubensis*, presentó diferencias significativas frente a todas las algas comerciales del estudio.

Este alto contenido en licopeno puede ser debido a la estrecha relación existente entre el pigmento (licopeno-B o γ -caroteno) y el β -caroteno (el cual es uno de los carotenoides más

abundantes en *C. onubensis* y otras microalgas, ya que forma parte de la ruta de carotenogénesis de algunos vegetales y microalgas [Naik *et al.*, 2003].

Con estos datos, se deduce que, gracias a la alta riqueza en licopeno presente en *C. onubensis*, esta microalga puede ser de especial interés como antioxidante natural, como reductor del riesgo cardiovascular y del padecer cáncer o degradación macular, lo cual, junto a su alto contenido en luteína, zeaxantina y fucoxantina, lo hace una buena propuesta para su empleo como nutracéutico asociado a la reducción de la posibilidad de sufrir las patologías señaladas.

3.1.2.2.7. Comparativa del contenido en β -caroteno presente en las algas del estudio.

El β -caroteno es el último de los pigmentos carotenoides analizados y uno de los más abundantes en los alimentos antioxidantes. Es un terpenoide compuesto por ocho isoprenos con anillos beta a los extremos, sintetizado a partir de un pirofosfato de geranilgeranilo con gran cantidad de insaturaciones que le confiere un extremado poder reductor con diversas funciones nutracéuticas [Van Arnum, 1998]. Las algas, generalmente, se encuentran enriquecidas en este compuesto, al ser fotoprotector, siendo especialmente rica *Dunaliella salina*, que lo sintetiza como respuesta a la alta salinidad del medio [Mercadante *et al.*, 1999].

Su principal función en humanos es la de precursor de la vitamina A, junto con el α -caroteno y la β -criptoxantina. Estos compuestos son absorbidos en el duodeno junto con la vitamina E transformándose cada molécula de β -caroteno en dos moléculas de vitamina A por la enzima *β -caroteno 15,15'-monooxigenasa* [van Bennekum *et al.*, 2005].

A su vez, diversos estudios han demostrado que la suplementación de la dieta con este pigmento puede disminuir las posibilidades de sufrir cáncer de páncreas, colorrectal, de próstata, de mama, melanoma y cáncer de piel en general [Druesne- Pecollo *et al.*, 2010], aunque paradójicamente ha demostrado ser inductor de cáncer de pulmón en fumadores [Misotti y Gnagnarella, 2013]. La suplementación en la dieta con este carotenoide en combinación con las vitaminas C y E reduce el riesgo de sufrir cataratas, gracias a su acción provitamínica A [Tao *et al.*, 2004]. También se ha descrito que presenta un leve efecto antiinflamatorio y estimulador de la producción de glóbulos blancos (anti-leucopénico) [Beliaev *et al.*, 1992].

En estudios previos realizados sobre la microalga extremófila *C. onubensis* [Garbayo *et al.*, 2012; Vaquero *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2016; Toimil, 2021] se apreció un alto contenido en este compuesto de gran interés nutracéutico, alcanzándose contenidos comparables con los presentes en alimentos ricos en β -caroteno como la ciruela amarilla, el melocotón, la mora, la naranja, la piña, el plátano e incluso más alta que los presentes en verduras como el calabacín y la col de Bruselas. Datos que se muestran en consonancia con los obtenidos en este trabajo (Tabla 3.16), dónde se observan contenidos del orden de 12 mg 100 g⁻¹ de peso seco, lo que correspondería aproximadamente al doble del contenido en

este pigmento que el presente en una zanahoria (para 100 g de porción comestible) [EFSA, 2010].

Cabe destacar que los valores máximos obtenidos para este pigmento se han encontrado en el cultivo de *N. gaditana* (Tabla 3.15), lo cual coincide con la bibliografía, al tratarse de una microalga altamente rica en compuestos del grupo del caroteno y, especialmente, en α y β -caroteno [Luvián, 1982], siendo, en este caso, el contenido medido de, aproximadamente 18 mg 100 g⁻¹ de peso seco; tres veces el valor presente en 100 g de la porción comestible de zanahoria.

En la Fig 3.17 se puede apreciar que *N. gaditana* es el alga que presenta un mayor contenido en β -caroteno, seguido de *C. onubensis*, mostrando niveles que se diferencian únicamente en un 29,3%. El resto de microalgas comerciales presentan niveles muy parejos, que rondan los 0,06 mg g⁻¹ de peso seco, lo que corresponde a un contenido un 61,9% menor que *C. onubensis*.

Tabla 3.15. Contenido en β -caroteno presentes en las microalgas del estudio.

Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	<i>C. onubensis</i>	<i>I. galbana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>P. tricornutum</i>	<i>N. gaditana</i>
Licopeno	495 \pm 20	97 \pm 20	30 \pm 4	46 \pm 4	193 \pm 11

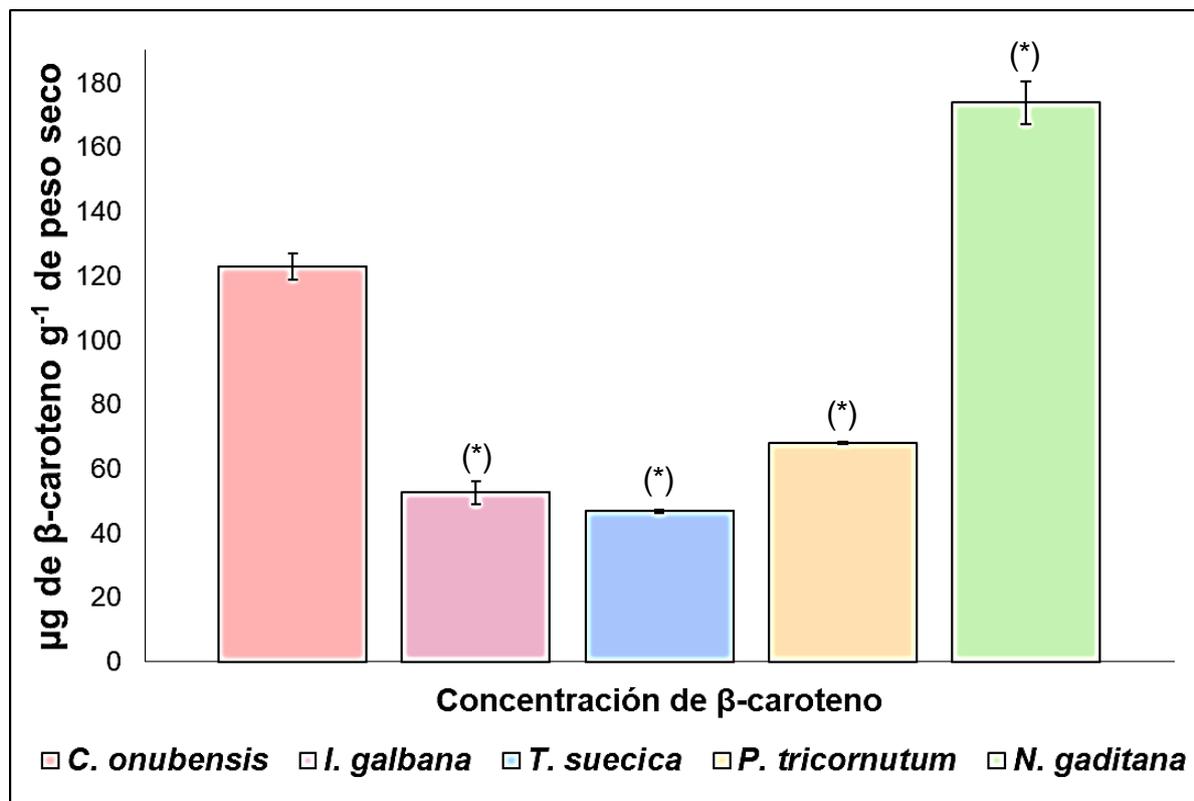


Fig. 3.17. Contenido en β -caroteno presente en las microalgas del estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que

los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a C. onubensis, para valores de $p < 0.05$.

De esta forma, vemos que *N. gaditana* y *C. onubensis* son los dos extractos que presentarían una mayor actividad antioxidante y propiedades nutraceuticas derivadas de la presencia de β -caroteno, siendo de especial interés para el control del envejecimiento tanto del derivado del proceso oxidativo normal de las células como del inducido por la dieta, así como preventivo del riesgo de sufrir cánceres variados, que unidos (en el caso de *C. onubensis*) a la presencia en alta concentración de otros pigmentos anticancerígenos, podría llevar a pensar que este alga posee un alto poder anticancerígeno.

3.1.3. Determinación de la actividad precursora de la vitamina A de las microalgas.

La actividad precursora de la vitamina A de las distintas microalgas se ha estimado mediante el cálculo de los equivalentes en vitamina A inducidos por la incorporación en la dieta de carotenoides, caracterizados en forma de equivalentes de β -caroteno, tal y como se recoge en Mahan y Escott-Saump (2008).

3.1.3.1. Determinación de los carotenoides totales mediante el empleo de equivalentes de β -caroteno.

Como se comentó en apartados anteriores, los carotenoides son un tipo de pigmentos fotosintéticos liposolubles de origen vegetal que pueden estar presentes en el ser humano tras la ingesta de determinados alimentos en la dieta. La acción de estos compuestos en las plantas es la de fotoprotección del sistema fotosintético, al captar longitudes de onda en las que los pigmentos mayoritarios (clorofilas) no trabajan, reduciendo la acción fotolítica y oxidante de los fotones. En cambio, en el organismo humano cobra otra función, como es la de precursor de la vitamina A [Bauernfeind, 1981].

A pesar de que todos los carotenoides son precursores de la vitamina A, el que presenta una mayor actividad biológica es el β -caroteno, llegando, en el caso de las algas, a corresponder a 9 veces el contenido de vitamina A generado en los humanos [Mahan y Escott-Saump, 2008].

Con el fin de poder obtener una visión comparativa de las concentraciones equivalentes, se procederá al estudio comparativo de cada microalga con diversos alimentos caracterizados por ser ricos en dichos carotenoides.

Así, el contenido de los μg equivalentes de β -caroteno presentes en 100 g de peso fresco de cada una de las algas empleadas en este estudio se calculó empleando el coeficiente de extinción molar de 2500 (valor que corresponde a la extinción de la absorbancia derivada de la presencia de β -caroteno en una muestra líquida medida a la longitud de onda de 480 nm) y aplicando la fórmula de Strickland y Parsons (1972), modificada por Britton (1985):

$$\mu\text{g-eq de } \beta\text{-caroteno } 100 \text{ g}^{-1} = \left(A \cdot V \cdot \frac{10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot P_{\text{mx}} (\text{g})} \right)$$

Donde:

- A = Absorbancia de la muestra corregida frente a la turbidez ($A_{480} - A_{750}$) (UA).
- V = Volumen total del extracto (25 mL).
- $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Coeficiente de absortividad molar del β -caroteno (2500 100 mL g⁻¹ cm⁻¹).
- P_{mx} = Peso de la muestra (g).

Tras realizar el ensayo, se obtuvieron los resultados recogidos en la Tabla 3.16 para cada una de las microalgas estudiadas.

Tabla 3.16. Contenido en carotenoides totales medido como $\mu\text{g-eq de } \beta\text{-caroteno } 100 \text{ g}^{-1}$ de peso fresco en cada una de las microalgas de estudio.

equivalentes de β-caroteno ($\mu\text{g-eq } \beta\text{-caroteno } 100 \text{ g}^{-1}$ de peso fresco)	
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	165 ± 3
<i>Coccomixa onubensis</i>	136 ± 3
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	118 ± 2
<i>Tetraselmis suecica</i>	71 ± 2
<i>Isochrysis Galbana</i>	69 ± 3

Como se puede apreciar en la tabla superior y en la Fig. 3.18, *N. gaditana* es la microalga que presenta una mayor concentración de carotenoides de todas las muestras analizadas. Esto se corresponde en gran medida con la bibliografía consultada, ya que ésta microalga se caracteriza por ser una fuente importante de carotenoides, destacando su contenido en α y β -caroteno [Luvián, 1982]. Algo que, además, concuerda con nuestros datos obtenidos mediante cromatografía.

En cuanto a *C. onubensis*, es la segunda microalga con mayor contenido en carotenos, alcanzando un valor de 0,136 mg-eq de β -caroteno 100 g⁻¹ de peso fresco mostrando diferencias significativas para un valor de $p < 0.05$ con respecto a todas las microalgas comerciales, siendo *I. galbana* y *T. suecica* las presentan un menor contenido en β -caroteno (un 95,92% menos que *C. onubensis*)

Todas las microalgas analizadas mostraron diferencias significativas entre sí para valores de $p < 0.05$, salvo en el caso de *I. galbana* y *T. suecica* quienes mostraron valores sin diferencias significativas entre sí, siendo las dos algas con menor contenido en carotenoides totales según este método de análisis.

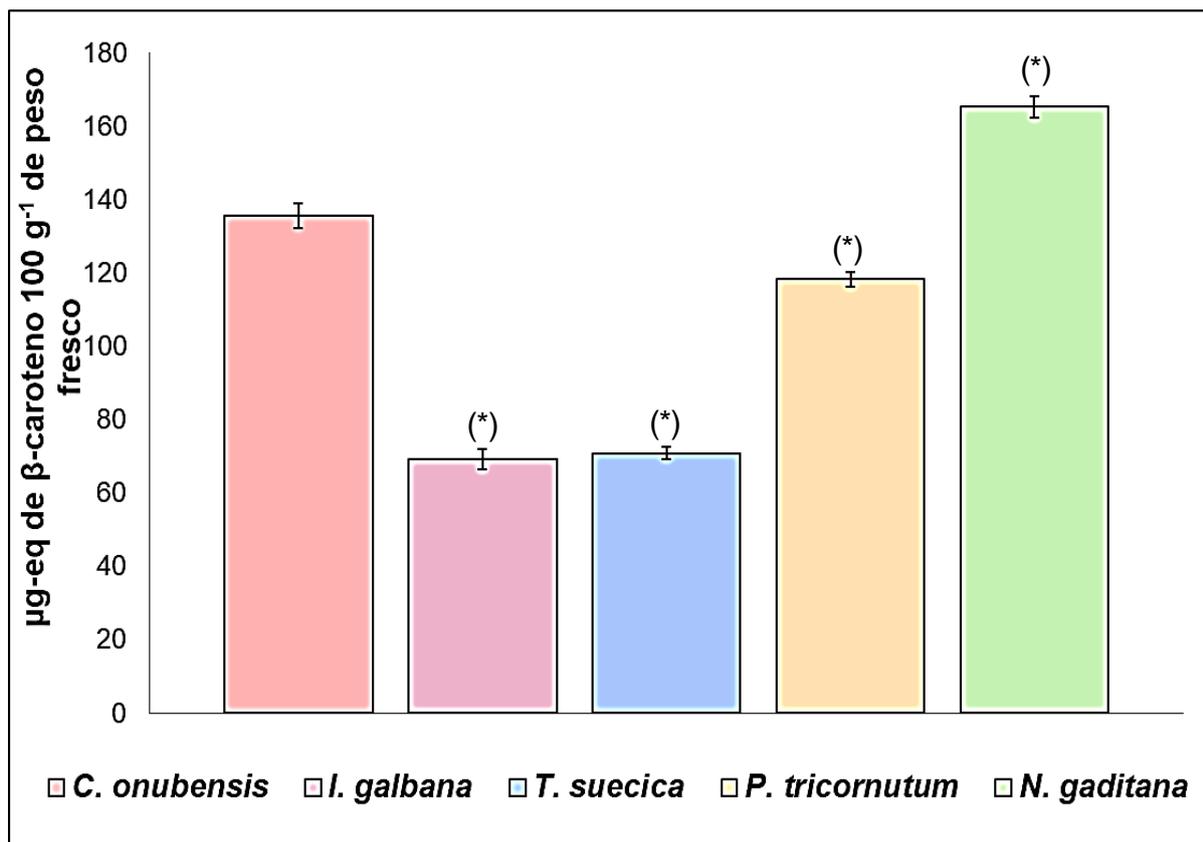


Fig. 3.18. Contenido en equivalentes de β-caroteno presente en las microalgas del estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p<0.05$.

Estos valores fueron a su vez comparados con los valores publicados para alimentos ricos en carotenoides, apreciándose que *N. gaditana* mostró un contenido en carotenoides totales superior al de cualquier hortaliza y fruta rica en carotenoides, únicamente superada por las judías verdes y *C. onubensis* mostró unas cantidades promedio de compuestos carotenoides superiores a las de frutas ricas en estos pigmentos como la ciruela amarilla, el melocotón, la mora, la naranja, la piña y el plátano y mucho más altas que las de vegetales de consumo como el calabacín y la col de Bruselas (Tabla 3.17), valores que se asemejan en gran medida con los recogidos por la bibliografía [del Valle, 2016; Toimil et al., 2021].

Los valores obtenidos para todas las microalgas del estudio muestran su alto poder antioxidante derivado de las propiedades de los pigmentos carotenoides, siendo todas ellas comparables con alimentos ricos en estos compuestos, además, se aprecia que *N. gaditana* y *C. onubensis* han resultado ser de las mejores fuentes de carotenoides en el caso de ser empleadas como suplemento dietético que la mayoría de frutas y verduras.

Tabla 3.17. Contenido en carotenoides en diferentes alimentos consumidos en España [modificado de Beltrán et al., 2012]

Muestras	Carotenoides totales ($\mu\text{g-eq } \beta\text{-caroteno } 100 \text{ g}^{-1}$ de peso fresco)
Zanahoria	671
Tomate rojo	592
Espinacas	573
Pimiento rojo	539
Judías verdes	166
<i>N. gaditana</i>	165
Mango	152
Cebolleta	142
<i>C. onubensis</i>	136
<i>P. tricornutum</i>	118
Ciruela amarilla	117
Mora	78
Col de Bruselas	77
Plátano	77
<i>T. suecica</i>	71
<i>I. galbana</i>	69
Melocotón	64
Piña	57
Naranja	48
Calabacín	23

3.1.3.2. Determinación de los equivalentes de vitamina A producidos por la ingesta de las microalgas.

La vitamina A es un conjunto de compuestos con actividad metabólica conocidos como retinol, retinal y ácido retinoico. Esta vitamina puede encontrarse preformada en ciertos productos animales, pero lo más común es su síntesis a partir de ellos en el propio organismo tras la ingesta de alimentos provitamínicos, como los carotenoides [Mahan y Escott-Saump, 2008].

La síntesis de esta vitamina necesaria para evitar enfermedades asociadas con la degradación macular y el buen estado de la piel y mucosas, entre otras, depende de varios aspectos como la digestibilidad de las proteínas presentes en el complejo pigmentario, la concentración de estos compuestos y el tipo de grasas presente en las dietas. Es por ello que, en el caso de los vegetales fotosintéticos comestibles, se ha llegado al consenso en el que se estima que 9 equivalentes de β -caroteno corresponderían a la formación de un equivalente de vitamina A.

De esta forma, los valores finales de vitamina A inducidos por la presencia de carotenoides derivados de la ingesta de las microalgas del estudio serían los recogidos en la Tabla 3.18.

Tabla 3.18. Contenido en equivalentes de vitamina A presente en las microalgas del estudio

Vitamina A equivalente ($\mu\text{g-eq vit A } 100 \text{ g}^{-1}$ de peso seco)	
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	27,6 \pm 1,7
<i>Coccomixa onubensis</i>	22,6 \pm 1,9
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	19,7 \pm 1,2
<i>Tetraselmis suecica</i>	11,8 \pm 1,0
<i>Isochrysis Galbana</i>	11,5 \pm 1,6

Dada la relación lineal existente entre el contenido de carotenoides totales y la vitamina A generada por el organismo, se aprecia una tendencia similar a la de los equivalentes de β -caroteno, siendo la mayor fuente de provitamina A la microalga *N. gaditana* y en segundo lugar *C. onubensis* (Fig. 3.19).

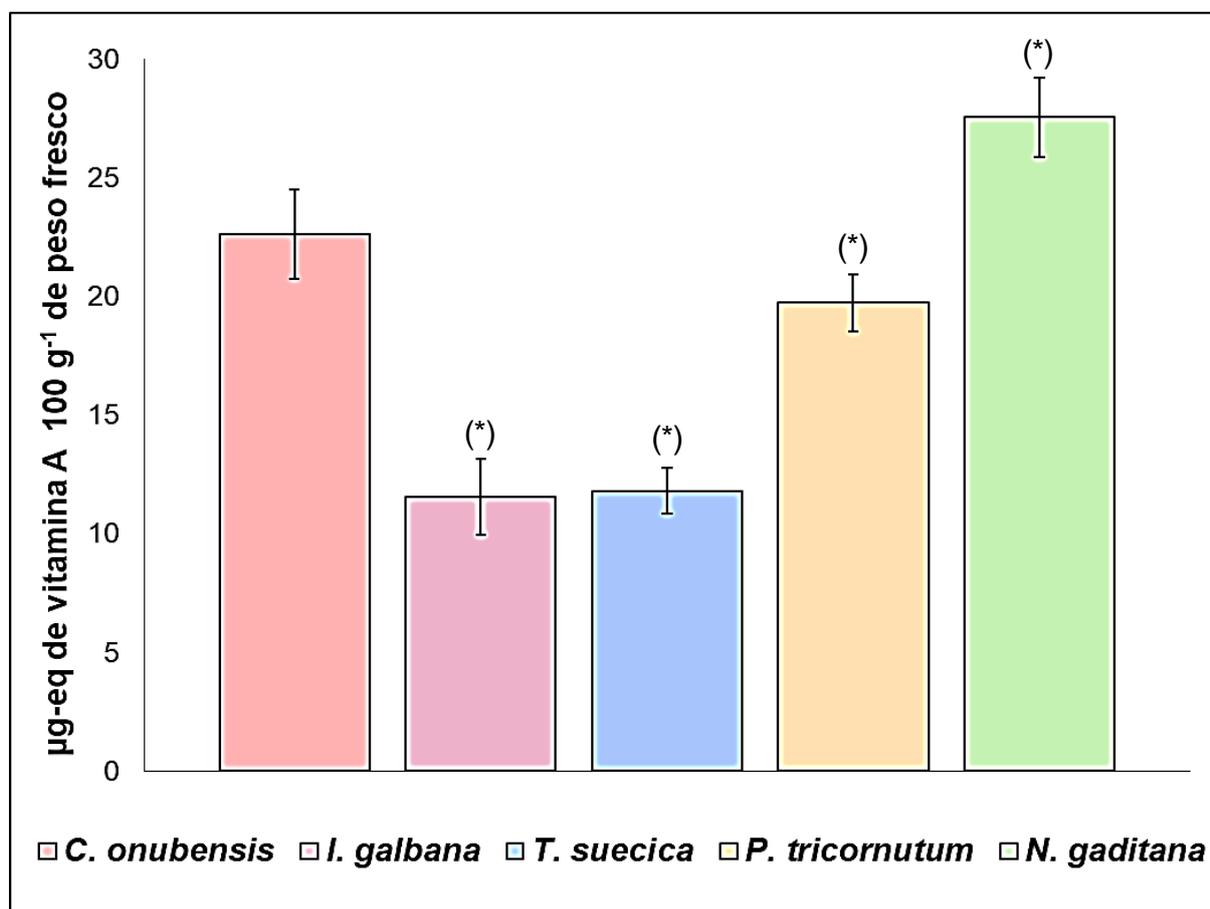


Fig. 3.19. Contenido en equivalentes de vitamina A presente en las microalgas del estudio.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

3.2. Cuantificación de los polifenoles presentes en las microalgas del estudio.

Los polifenoles son muchos y muy variados, pudiendo diferenciarse en función de sus estructuras, desde los más simples como los monómeros y los oligómeros hasta otros polímeros de alta complejidad y elevado peso molecular. De forma general se subdividen en dos grandes grupos: los flavonoides y los no flavonoides o también llamados taninos hidrolizables entre los que se encuentran las moléculas más sencillas; ácidos fenólicos, con esqueletos químicos de seis carbonos (C_6), ligados o no con esqueletos de dos a cuatro carbonos con la estructura C_6-C_4 [Vázquez-Flores *et al.*, 2012]. A su vez, los polifenoles flavonoides son moléculas complejas compuestas por dos anillos bencénicos (aromáticos), unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$) [Dai y Mumper, 2010].

Los polifenoles son los antioxidantes activos más abundantes en tejidos vegetales, lo que hace que su presencia en éstos sea muy abundante [Kinsella *et al.*, 1993], donde actúan de diversa forma en función de sus propiedades particulares. Su acción sobre las moléculas de LDL provoca que el gasto de antioxidantes, tales como la vitamina E o los carotenoides, disminuyan e, incluso, favorecen la regeneración de la vitamina E [Conner y Grisham, 1996] reduciendo la peroxidación lipídica sin reducir la respuesta antioxidante del organismo.

Entre las propiedades más relevantes para la salud humana se encuentra su acción antirradicálica, antimutagénica, anticarcinogénica, antimicrobiana y el retardo de la senescencia [Sohal y Weindruch, 1996]

Con el fin de poder caracterizar la cantidad total de los polifenoles presentes en cada una de las muestras de estudio, se ha procedido al análisis espectrofotométrico mediante el empleo de una recta de calibración (Fig. 3.20) expresada en $mg\text{-}eq\ L^{-1}$ de ácido gálico y se ha medido la absorbancia de cada una de las microalgas con un peso liofilizado de muestra equivalente a 0,04 mg peso fresco. De esta forma, se obtuvieron los datos de concentración equivalente en ácido gálico que se muestran en la Tabla 3.20. El ácido gálico es un ácido orgánico que se puede encontrar de forma libre o asociado a los taninos hidrolizables y que se emplea como patrón para determinar el contenido de fenoles de diversos analitos cuando se usa el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Como se puede apreciar, la recta de calibrado se hizo pasar por el origen en (0,0) con el fin de obtener unos resultados coherentes con la realidad, ya que la absorbancia para concentraciones de ácido gálico de $0\ mg\ mL^{-1}$ debe ser de 0 UA al elegirse como blanco el propio extractante de la muestra, por lo que el valor de absorbancia para la muestra de 0 mg/mL se sustrajo del resto de valores de absorbancia, tanto para la recta de calibrado como para las muestras de microalgas (Tabla 3.19).

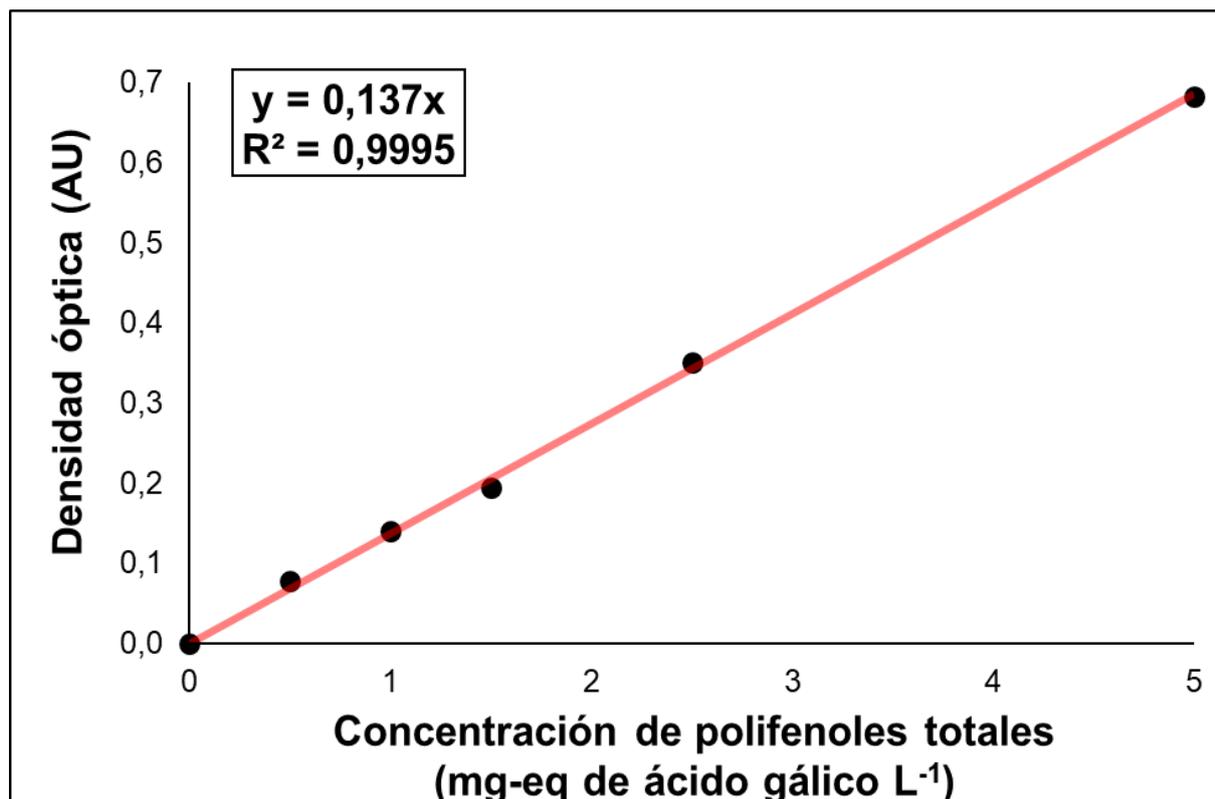


Fig. 3.20. Recta de calibrado para la medida de polifenoles totales obtenido como densidad óptica de la absorbancia de un patrón de ácido gálico (mg-eq de ácido gálico L⁻¹).

Los valores mostrados en la gráfica correspondían al valor medio \pm SD (n=6).

Tabla 3.19. Concentración de polifenoles totales presentes en las muestras microalgales para 100 g de peso fresco.

	Contenido en polifenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico 100 g ⁻¹ peso fresco)
<i>Coccomyxa onubensis</i>	150 \pm 5
<i>Isochrysis galbana</i>	98 \pm 5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	81 \pm 6
<i>Tetraselmis suecica</i>	76 \pm 5
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	49 \pm 4

La mayor fuente de polifenoles totales fue *C. onubensis*, correspondiente a $1,497 \pm 0,014$ mg-eq L⁻¹ de ácido gálico en 0,04 mg de peso fresco, lo que corresponde a 150 ± 5 mg-eq de ácido gálico 100 g⁻¹ de peso fresco. Este valor fue un 34,47% superior al obtenido para *I. galbana* la cual era considerada hasta ahora a la microalga con mayor contenido en polifenoles totales según la bibliografía [Widowati, 2017] con un 98 ± 5 mg-eq de ácido gálico 100 g⁻¹ de peso fresco. Todos los valores obtenidos mostraron diferencias significativas entre ellos para $p < 0,05$ salvo *T. suecica* y *P. tricornutum* que presentaron valores comparables entre ambos. Como podemos apreciar en la Fig. 3.21.

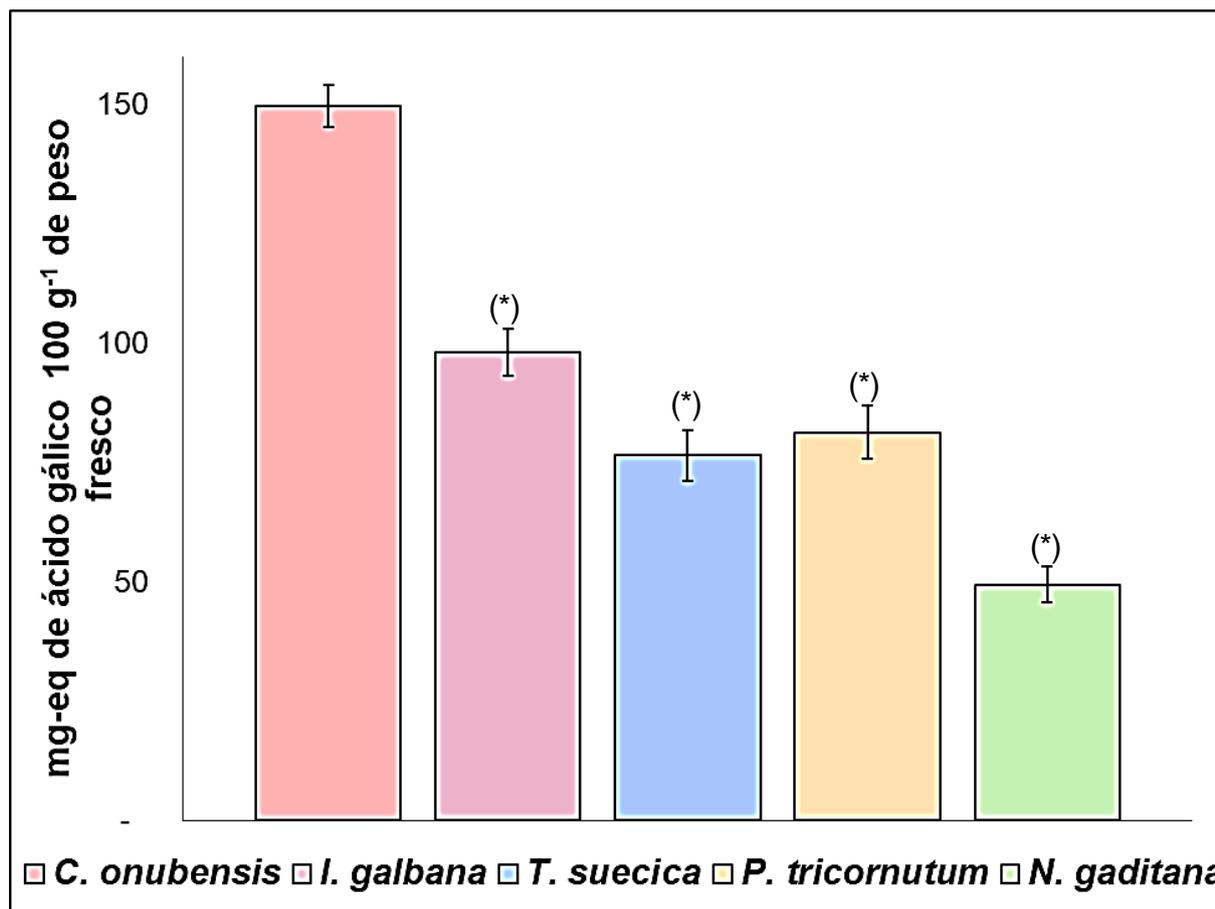


Fig. 3.21. Concentración de polifenoles totales presentes en las microalgas en función del peso fresco de cada alga..

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

La concentración de polifenoles totales presentes en *C. onubensis* fue superior a la de varias frutas y hortalizas ricas en polifenoles como es el caso del melón, la papaya, el mango, la piña, el brócoli, el tomate Cherry o la coliflor, tal como es referenciado en la bibliografía (Tabla 3.20), así como superior al contenido de la uva blanca.

Dado que los compuestos fenólicos de origen vegetal reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares al tener efectos antiinflamatorios significativos, como la inhibición de la expresión de genes de moléculas de adhesión, citocinas y otras (quimiocinas), la inhibición de la función plaquetaria o el aumento de la liberación de óxido nítrico del endotelio, así como la supresión de la activación del músculo liso y otros efectos sobre factores proinflamatorios como la endotelina y las metaloproteinasas de matriz [Jiang y Dutsing, 2013] sugieren que *C. onubensis* pudiera ejercer un importante papel como nutracéutico y protector cardio vascular.

Tabla 3.20. Comparación de valores de polifenoles totales para diferentes frutas y hortalizas en comparación con las microalgas del estudio [Modificado de Beltrán et al., 2012].

Muestras	Polifenoles totales (mg-eq ácido gálico 100 g ⁻¹ de peso fresco)
Mora	671
Uva negra	547
Haba	413
Uva tinta	355
Rúcula	275
Níspero	202
Espinaca	191
Nectarina	170
Naranja	152
<i>C. onubensis</i>	150
Uva blanca	149
Piña	127
Papaya	116
Brócoli	111
<i>I. galbana</i>	98
Tomate cherry	93
<i>P. tricornutum</i>	81
<i>T. suecica</i>	76
Coliflor	61
Mango	57
<i>N. gaditana</i>	49
Melón	36

Además, cabe destacar que la inflamación se encuentra directamente involucrada en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y eventos el síndrome coronario agudo, la reestenosis arterial y la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica. Esta actividad antiinflamatoria, unido a su acción antioxidante, muestra su importancia para evitar los riesgos de sufrir riesgo cardiovascular asociado a enfermedad aterosclerótica previniéndola, al reducir la acción de lipoperoxidación del LDL, precursor de dicha enfermedad [Conner y Grisham, 1996].

Con el fin de poder conocer de forma más específica las propiedades de cada uno de los extractos se procede al estudio diferenciado de cada uno de los dos grupos de polifenoles presentes en los tejidos vegetales: flavonoides y taninos; los cuales presentan propiedades exclusivas desde el punto de vista antioxidante y nutracéutico.

3.2.1. Determinación de polifenoles flavonoides.

El término flavonoides es un término genérico que identifica a unos metabolitos secundarios presentes en plantas cuya función esencial es la de protección celular frente a la fotooxidación derivada de la radiación ultravioleta.

Estos compuestos se encuentran en ciertos alimentos en forma de sustancias que contribuyen a la coloración de los mismos. Por ejemplo, las antocianinas son flavonoides cromóforos que confieren a los alimentos un color rojo, púrpura o malva y es típico de frutas, hortalizas e, incluso, del vino tinto. A su vez, las chalconas y auronas dan un color amarillo y las flavonas y flavonoles, crema o amarillo pálido [Brian y Camerón, 1992]. Los flavonoides son, además, los responsables del cambio de color en las superficies cortadas de las frutas como resultado de la oxidación enzimática de otros compuestos fenólicos a las conocidas quinonas.

Este grupo de polifenoles también contribuyen a dar la textura a las frutas y les confiere el amargor característico de algunos frutos, junto con algunos taninos [Brian y Camerón, 1992].

Estos compuestos poseen propiedades muy apreciadas en medicina como es su poder antimicrobiano y anticancerígeno, así como su poder preventivo del riesgo cardiovascular, ya que su ingesta disminuye el colesterol y mejora la resistencia de los capilares y vasos sanguíneos, lo que hace que su presencia como suplemente dietético o nutracéutico resulte de gran interés. En el caso de ser consumidos por humanos, ejercen un alto poder protector frente al daño oxidativo, así como a los daños inducidos por metales pesados como el plomo y el mercurio [Graf *et al.*, 2005].

Dado su alto poder antioxidante, es de gran importancia analizar este tipo de polifenoles específicamente en cada una de las microalgas del estudio, con el fin de valorar su poder antioxidante.

Así, tras realizar la determinación siguiendo las indicaciones propuestas en la metodología, se obtuvo una curva de calibración (Fig. 3.22), expresada como mg-eq de catequina L⁻¹ y, tras medir la absorbancia propia de cada una de las muestras, se extrapolaron los valores de concentración en polifenoles flavonoides para un peso liofilizado equivalente a 1 mg de peso fresco de microalga. De esta forma se obtuvieron los resultados de concentración equivalente de catequina (la catequina es un metabolito secundario procedente de las plantas que define al subgrupo de los flavanoles y que se presenta en la mayoría de los compuestos más antioxidantes del grupo de los flavonoides, por lo que se ha generalizado su empleo como referencia para el análisis indirecto de flavonoides a nivel mundial). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.22.

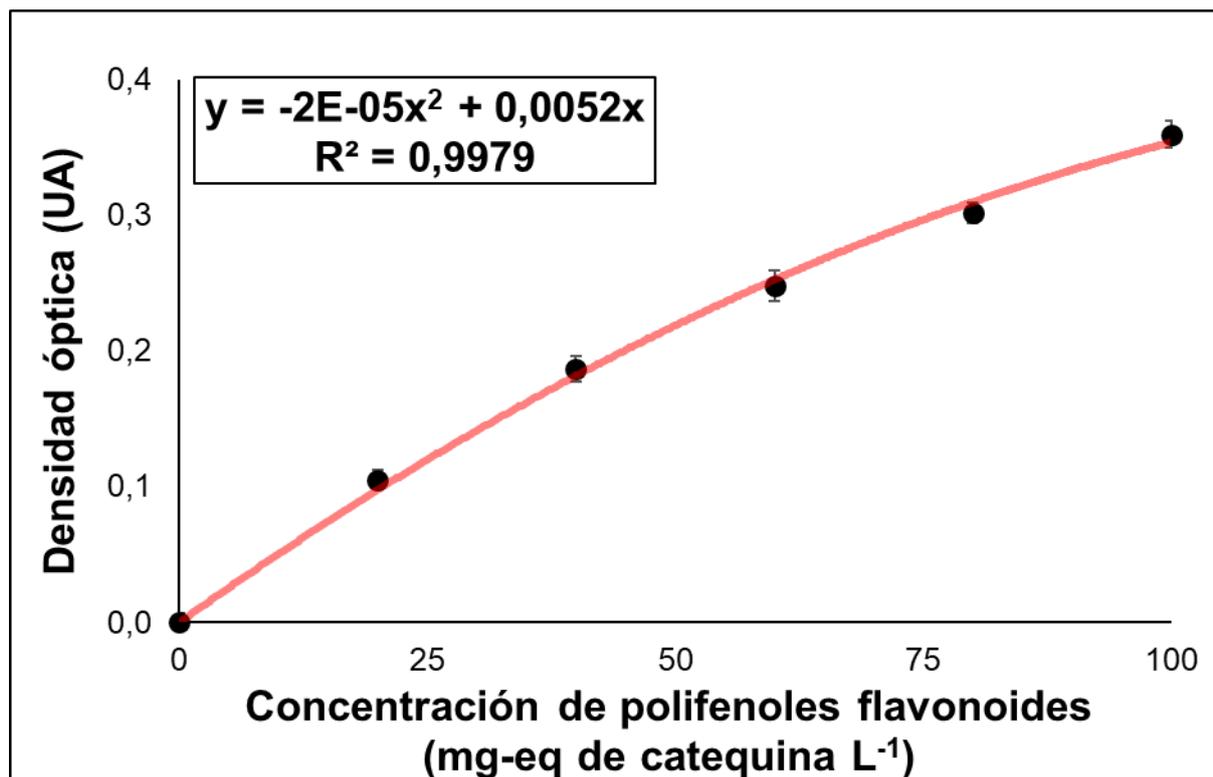


Fig. 3.22. Curva de calibrado para la medida de polifenoles flavonoides obtenido como densidad óptica de la absorbancia de un patrón de catequina (mg-eq de catequina L⁻¹).

Los valores mostrados en la gráfica correspondían al valor medio \pm SD (n=4).

Como se puede apreciar, la curva de calibrado muestra un patrón típico de incremento con saturación derivado del aumento de absorbancia en función al aumento de concentración del compuesto, limitado por la saturación en exposición debida a la alta concentración de dicho compuesto.

En cuanto a las muestras, todas mostraron valores comprendidos entre 7 y 12 mg-eq de catequina L⁻¹ de disolución, lo cual correspondió, tras la conversión por el factor de dilución a peso fresco a valores de entre 12 y 19 mg-eq de catequina 100 g⁻¹ de peso fresco, siendo la microalga con mayor concentración *C. onubensis* (Tabla 3.21).

Tabla 3.21. Concentración de polifenoles flavonoides presentes en las muestras microalgales para 100 g de peso fresco.

	Contenido en polifenoles flavonoides (mg equivalentes de catequina 100 g ⁻¹ peso fresco)
<i>C. occomyxa onubensis</i>	19,015 \pm 0,002
<i>Isochrysis galbana</i>	15,944 \pm 0,003
<i>Tetraselmis suecica</i>	15,913 \pm 0,003
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	14,396 \pm 0,002
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	12,563 \pm 0,002

Tal y como se puede apreciar en la Fig. 3.23, *C. onubensis* muestra el mayor contenido en flavonoides de todas las microalgas del estudio, algo que va parejo con el de polifenoles totales. A su vez, destaca el contenido en flavonoides presente en *T. suecica* en comparación con su contenido en polifenoles totales. Esto es debido a que es un alga con un elevado contenido en taninos condensados, los cuales se encuentran juntos en el grupo de los flavonoides, al ser estos polímeros derivados de un flavonoide llamado antocianidina [Widowati, 2017].

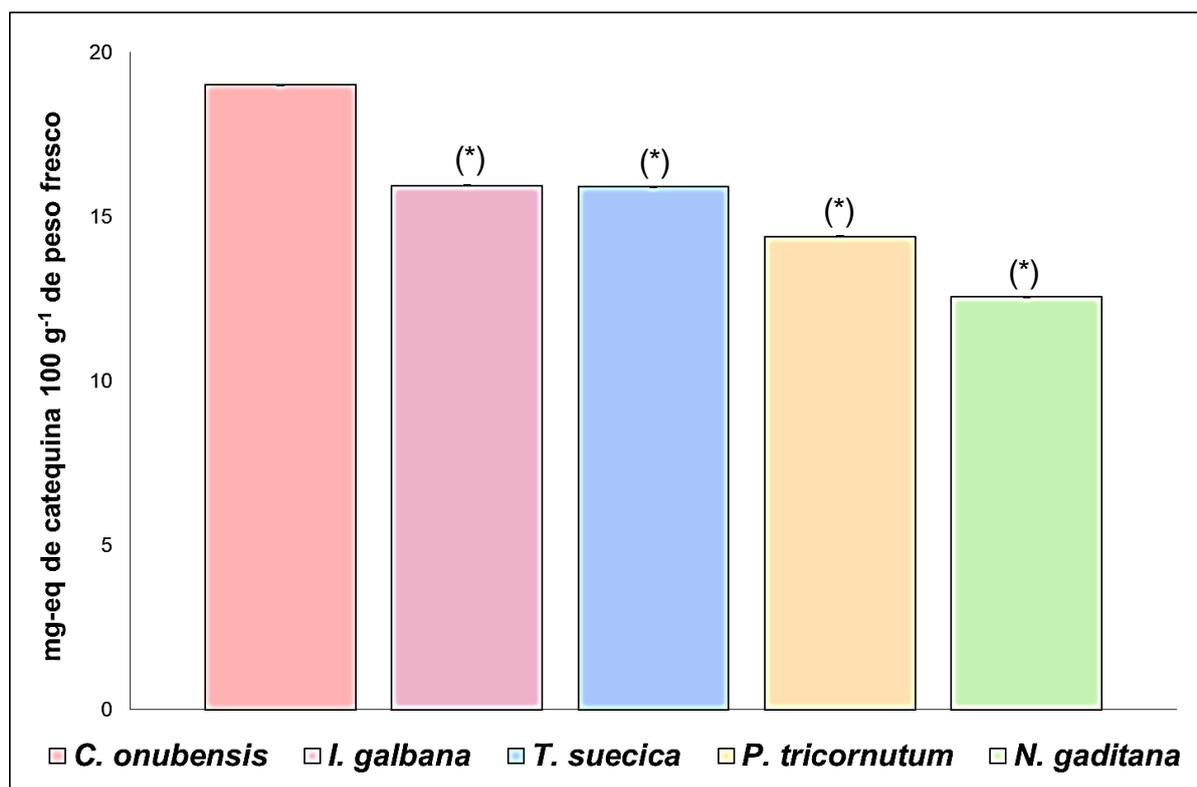


Fig. 3.23. Concentración de polifenoles flavonoides presentes en las microalgas en función del peso fresco de cada alga.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=4$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

C. onubensis mostró una concentración en flavonoides un 16,15% superiores a *I. galbana* y *T. suecica*, quienes no mostraron diferencias significativas entre sí, pero sí con respecto a *Coccomyxa onubensis* y un 24,29% superiores a *P. tricornutum* y un 33,93% superiores a los de *N. gaditana*.

Por otro lado, si se compara el contenido de polifenoles flavonoides de las microalgas con el de alimentos comercializados ricos en flavonoides (Tabla 3.22), apreciamos que *C. onubensis*, con de $19,015 \pm 0,002$ mg-eq de catequina 100 g⁻¹ de peso fresco, fue más rico en flavonoides que la ciruela negra, el haba, la uva negra, la nectarina, la manzana y el albaricoque, con resultados similares y comparables con los obtenidos en estudios previos

[Toimil, 2021; del Valle, 2016], siendo *I. galbana*, *T. suecica* y *P. tricornutum* menos ricas en flavonoides que la ciruela negra y *N. gaditana*, a su vez, menos que el haba.

Tabla 3.22. Comparación de valores de polifenoles flavonoides para diferentes alimentos ricos en este compuesto en comparación con las microalgas analizadas [Modificado de Bhagwat et al., 2014].

Muestras	Polifenoles flavonoides (mg-eq de catequina 100 g ⁻¹ de peso fresco)
Té verde	57,12
Arándano	37,24
Mora	37,06
<i>C. onubensis</i>	19,02
Ciruela negra	17,55
<i>I. galbana</i>	15,94
<i>T. suecica</i>	15,91
<i>P. tricornutum</i>	14,40
Haba	14,29
<i>N. gaditana</i>	12,56
Uva negra	10,14
Nectarina	7,98
Manzana	7,40
Albaricoque	4,79

Estos resultados ponen de manifiesto el gran interés antioxidante de la microalga *C. onubensis*, al mostrar un mayor contenido en polifenoles totales y, a su vez, en polifenoles flavonoides, siendo un buen alimento para el control del estrés oxidativo.

3.2.2. Determinación de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables).

Se conoce por el nombre de taninos hidrolizables a todos aquellos polifenoles que no se encuentran en el grupo de los flavonoides y que presentan un alto peso molecular, comprendido entre 500 y 3000 g mol⁻¹. Son considerados como productos de secreción de muchas plantas y su principal acción es de defensa frente a parásitos. Estas sustancias, de carácter no nitrogenado y estructura polifenólica, son solubles en agua, alcohol y acetona y poco solubles en éter y confieren a los frutos un sabor astringente [Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009; Peña Rodríguez, 2014].

Existen diversos tipos de taninos hidrolizables, pero el más estudiado es la pentagalolil glucosa (PGG), a la cual se le ha reconocido actividad anticancerígena, antidiabética y antioxidante en modelos experimentales *in vitro*. Con respecto a esta actividad anticancerígena, se ha probado que inhibe factores de crecimiento tumoral y vascular en cánceres de próstata y pulmón. No solo impidiendo el crecimiento del tumor, sino, además,

disminuyendo su tamaño, al impedir los procesos de angiogénesis, crecimiento vascular común en las metástasis [Zhang *et al.*, 2009].

No obstante, existe controversia respecto a la recomendación de la suplementación de la dieta con taninos de forma habitual, debido a su alta capacidad de anexión a las proteínas, especialmente las ricas en aminoácidos como la prolina, glicina y ácido glutámico. Esta acción hace que, por ejemplo, precipiten las proteínas presentes en la saliva [Soares *et al.*, 2011] lo que conduce a la sensación de astringencia de alimentos y bebidas de origen vegetal [Cala *et al.*, 2011], como el vino, la cáscara de manzanas, el hollejo de las uvas y algunas nueces. Algunos autores defienden que esta astringencia es un aviso para evitar su consumo [Cheynier, 2005].

Es por todo esto que los taninos han sido considerados como compuestos polifenólicos de gran interés nutracéutico, pero con efectos negativos que no deben ser pasados por alto a la hora de recomendar su consumo en una dieta de forma habitual. No obstante, el elevado potencial antioxidante que presentan y su acción anticancerígena puede conferir, en circunstancias adecuadas, un efecto protector en la salud del individuo.

Para proceder a su estudio y la caracterización del contenido en taninos de cada una de las muestras de microalga, se procedió al análisis espectrofotométrico mediante una recta de calibración (Fig. 3.24), expresada como mg-eq mL⁻¹ de metil-galato (un compuesto fenólico del grupo de los elagitaninos farmacológicamente activo empleado como referencia para la determinación indirecta de la concentración en taninos hidrolizables a nivel mundial) y, tras la medida de la absorbancia y extrapolación frente a la recta obtenida, se obtuvo la concentración en taninos hidrolizables para un peso liofilizado de microalga equivalente a 3 mg de peso fresco. Todos los valores obtenidos para las microalgas fueron recalculados a mg-eq de metil galato 100 g⁻¹ de peso fresco (Tabla 3.23) con el fin de obtener unos valores comparables con los de la bibliografía.

Como se puede apreciar, los valores mostrados en la recta de calibrado, se basaban en la corrección de la densidad óptica aportada por la disolución tratada presente en agua desionizada frente a la obtenida en medio ácido con HCl, tal y como se recoge en el método de Mueller-Harvey (2001).

Tal y como se puede apreciar en la Fig. 3.25, los valores de taninos muestran una relación similar a la observada para el caso de los polifenoles totales, mostrando en un claro primer puesto a *C. onubensis*, con concentraciones en taninos superiores a los 400 mg-eq de metil galato 100 g⁻¹ peso fresco, valor que corresponde a 1,65 veces más el contenido presente en *P. tricornutum*, quien ostenta el segundo puesto.

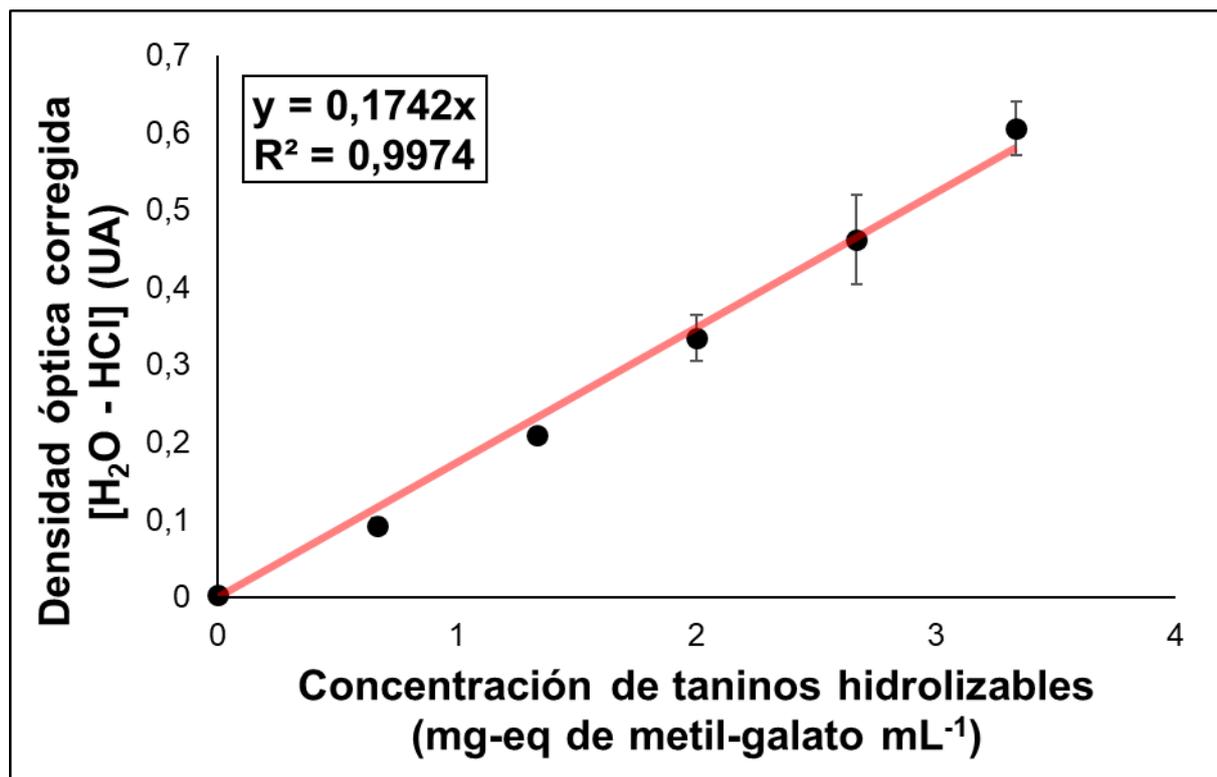


Fig. 3.24. Recta de calibrado para la medida de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables) obtenido como densidad óptica de la absorbancia de un patrón de metil-galato (mg-eq de metil-galato mL⁻¹).

Los valores mostrados en la gráfica correspondían al valor medio \pm SD ($n=4$).

Tabla 3.23. Concentración de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables) presentes en las muestras microalgales para 100 g de peso fresco.

	Concentración de taninos hidrolizables (mg equivalentes de metil galato 100 g ⁻¹ peso fresco)
<i>Coccomyxa onubensis</i>	435 \pm 10
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	263 \pm 18
<i>Isochrysis galbana</i>	196 \pm 11
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	72 \pm 12
<i>Tetraselmis suecica</i>	53 \pm 11

Cabe destacar que *T. suecica* muestra el contenido más bajo en taninos, algo que concuerda con trabajos previos que mostraban que esta microalga no destacaba por su contenido en estos compuestos polifenólicos, siendo su mayor contenido el presente en polifenoles del grupo de los flavonoides [Widowati, 2017]. En este mismo estudio, se apreció que *I. galbana* presentaba un alto contenido en taninos totales, algo que se puede ver en gran medida con los valores obtenidos en este trabajo, ya que, a pesar de presentar aproximadamente la mitad de taninos hidrolizables que *C. onubensis*, existe una proporción de taninos que no han sido analizados, los taninos condensados, que se presentan dentro del grupo de los flavonoides (analizados en su conjunto en el apartado previo).

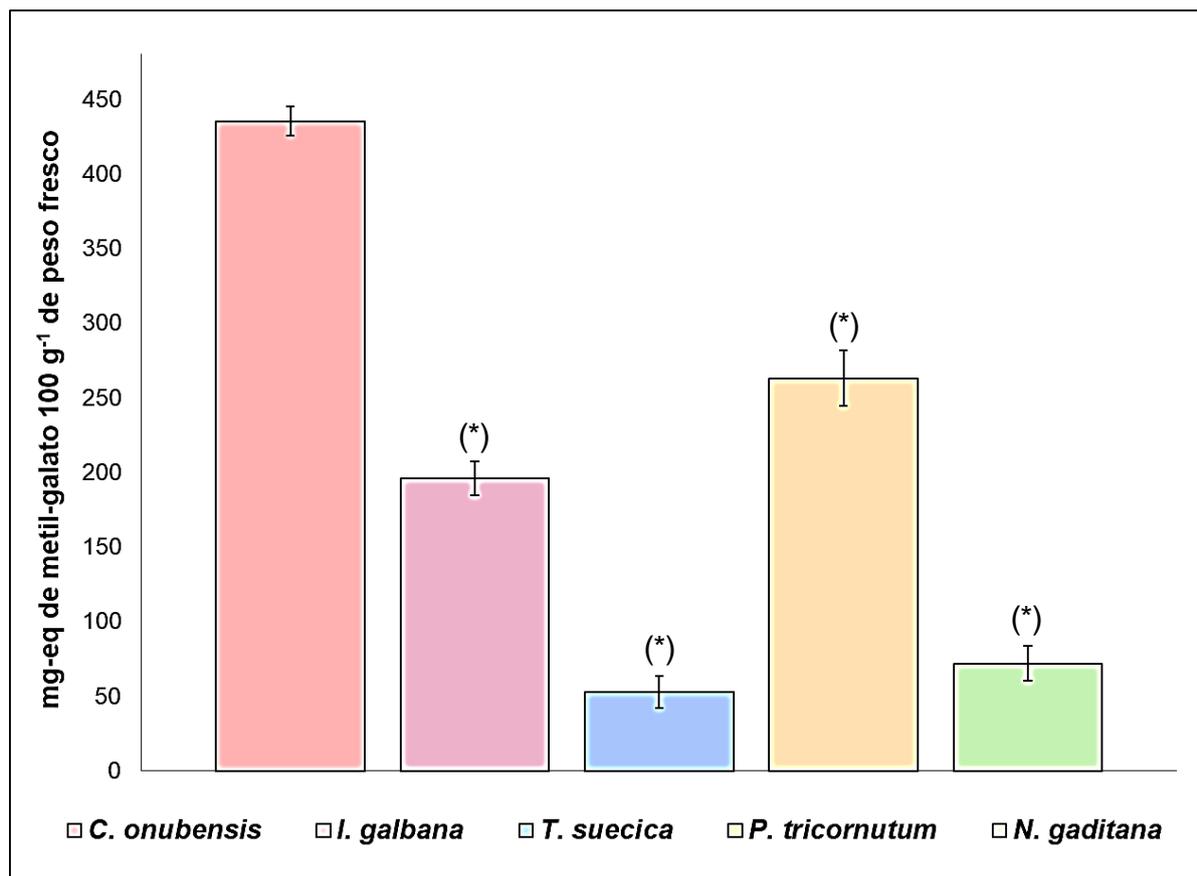


Fig. 3.25. Concentración de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables) presentes en las muestras microalgales en función al peso fresco del alga empleada.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=4$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p < 0.05$.

Comparando los resultados obtenidos para el caso de *C. onubensis* se observó que la concentración de taninos hidrolizables presentes fue superior al de varios alimentos ricos en estos compuestos como son los arándanos, la ciruela, la almendra, la fresa o la manzana roja (Tabla 3.24), tan solo mostró contenidos inferiores al de las judías rojas y las nueces pecán.

Según este estudio y los resultados descritos por Zhang y colaboradores en 2009 en *Rattus norvegicus* var. Long Evans, *C. onubensis* podría presentar gran interés como antioxidante y antitumoral, ya que la ingesta diaria de entre 0,4 y 2,5 g de taninos hidrolizables de extractos microalgales diarios mostraron que no solo inhibía el crecimiento tumoral y vascular para el cáncer de próstata y de pulmón en estos roedores, sino que, además, disminuía su tamaño.

Tabla 3.24. Comparación de valores de taninos hidrolizables para diferentes alimentos ricos en este compuesto en comparación con las muestra analizadas [Modificado de Wu et al., 2012].

Muestras	Taninos hidrolizables (mg-eq metil-galato 100 g ⁻¹ de peso fresco)
Judía roja	565
Nuez pecán	498
C. onubensis	435
Arándano rojo	434
Arándano negro	336
P. tricornutum	263
Ciruela	205
I. galbana	196
Almendra	185
Fresa	153
Manzana roja	146
Cebada	127
Nuez	76
Melocotón	75
Uva tinta	73
N. gaditana	71
T. suecica	53
Pera	50
Calabaza india	24

3.3. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente total (TEAC) de los extractos microalgales del estudio.

Como se ha estado viendo con anterioridad, existen diferentes compuestos presentes en las microalgas que presentan de forma independiente un alto poder antioxidante. Esto se debe a que las microalgas son microorganismos que realizan la fotosíntesis oxigénica y estas reacciones provocan la liberación de EROs y radicales libres. Es por este motivo que las microalgas han evolucionado conformando compuestos antioxidantes que las defiendan con el fin de evitar los procesos prooxidativos y el daño derivado de estos [Madhavi y Salunkhe, 1995].

La capacidad antioxidante total de una muestra, como ya se introdujo con anterioridad, es un proceso sinérgico de cada uno de estos compuestos analizados, de tal forma que todas las sustancias generadas actúan conjuntamente reduciendo la presencia de agentes oxidantes. Es por ello que la forma más representativa de valorar el potencial antioxidante de un compuesto nutracéutico se basa en el estudio de la capacidad antioxidante total [Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006].

En los últimos años se han desarrollado gran cantidad de métodos de evaluación de la capacidad antioxidante total de frutas y verduras con el fin de caracterizar la acción antioxidante de los alimentos basándose en diferentes aspectos, como la reducción de ciertos metales (FRAP), la capacidad de captación de radicales peroxilo (ORAC, TRAP), de radicales hidroxilo (ensayo de la deoxirribosa), el método del DPPH, de radicales generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (ABTS, DPPH), o la cuantificación de productos generados en la peroxidación lipídica (TBARs, oxidación de LDLs), entre otras [Toimil, 2021]. Con el fin de unificar criterios, todos los resultados obtenidos por los distintos métodos suelen ser expresados como $\mu\text{mol Trólox } 100 \text{ g}^{-1}$ de peso fresco del alimento, ya que, si existieran otros equivalentes de medida, al estar basados en reacciones diferentes de los antioxidantes, no sería posible realizar comparaciones entre los resultados.

Para estudiar la actividad antioxidante de cada una de las muestras, se ha elegido el método colorimétrico del DPPH, dado que se trata de un método sencillo, fiable y ampliamente empleado para la evaluación de la acción antioxidante total en el sector de la alimentación [Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006]. Para ello, se lleva a cabo la ponderación de la actividad antioxidante de las muestras mediante la extrapolación sobre una curva de inhibición de la oxidación de una muestra por parte de los radicales DPPH. En esta curva se emplea una concentración creciente de Trólox un análogo químico de la vitamina E capaz de reducir los radicales de DPPH por su alta acción antioxidante. Así, se obtuvo la curva de inhibición mostrada en la Fig. 3.26. Los valores representados en la curva corresponden a equivalentes de Trólox (mM).

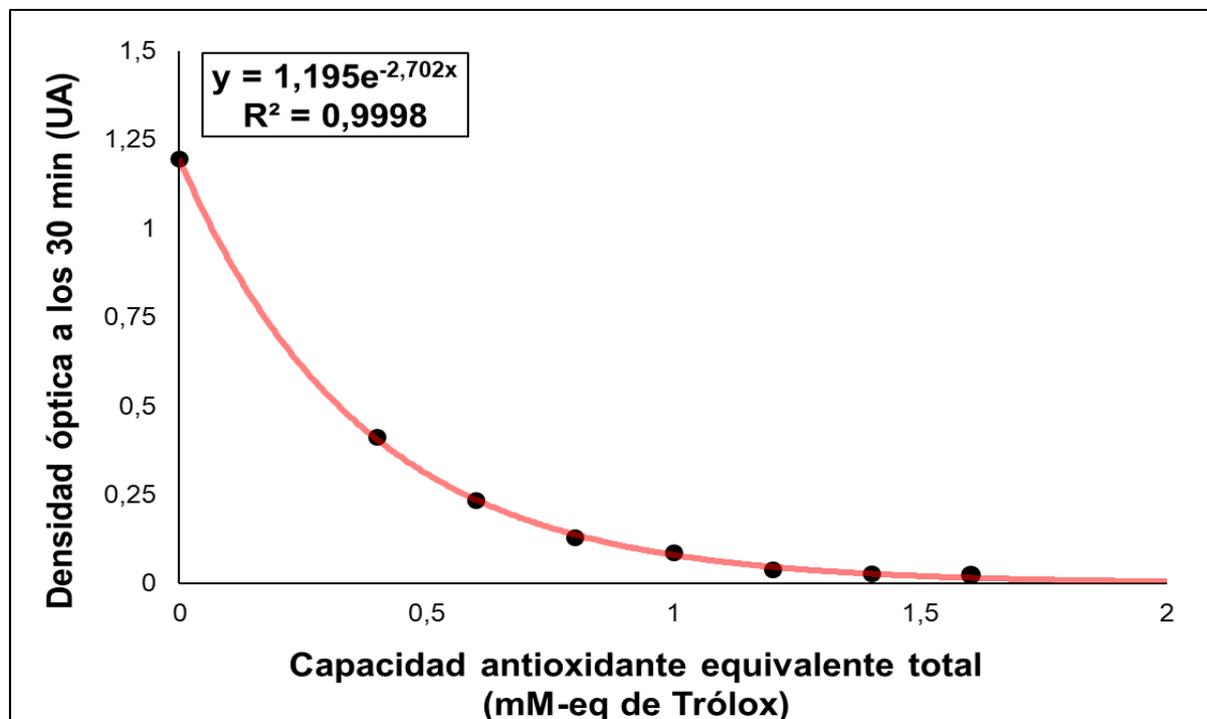


Fig. 3.26. Curva de calibrado para la medida de la actividad antioxidante total ($t=30$ minutos) obtenido como densidad óptica de la absorbancia de un patrón de Trólox (mM-eq de Trólox).

Los valores mostrados en la gráfica correspondían al valor medio \pm SD ($n=3$).

Para obtener los valores representados en la figura anterior para cada una de las muestras, se empleó el peso liofilizado equivalente a 0,4 gramos de peso fresco de la microalga, con el fin de evitar la saturación de la medida obtenida por el sistema analítico. Así, tras su conversión a los valores de concentración analítica normales empleados, se obtuvieron los datos recogidos en la Tabla 3.25.

Tabla 3.25. Capacidad antioxidante equivalente total de cada una de las microalgas del estudio en función al peso fresco de alga empleada para 30 minutos (TEAC tras 30 min).

Capacidad antioxidante equivalente total ($\mu\text{moles-eq}$ de Trólox 100 g^{-1} peso fresco)	
<i>Coccomyxa onubensis</i>	3,24 \pm 0,02
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	2,43 \pm 0,02
<i>Isochrysis galbana</i>	2,39 \pm 0,04
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	1,92 \pm 0,04
<i>Tetraselmis suecica</i>	1,92 \pm 0,06

Como se aprecia en la Fig. 3.27, la capacidad antioxidante equivalente total de *C. onubensis* superó los niveles obtenidos para todas las microalgas de nuestro estudio, siendo un 26,27% superior a *I. galbana*, un 40,88% superior que *T. suecica*, un 25,14% superior a *P. tricornutum* y un 40,73% superiores que el TEAC tras 30 minutos de *N. gaditana*. En todos los casos mostrando diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*.

Esto indica el claro poder antioxidante de la microalga *Coccomyxa onubensis*, al superar en gran medida todos los valores apreciados para el caso de las algas con mayor acción antioxidante que se encuentran actualmente en el mercado.

En cuanto a la comparativa de la capacidad antioxidante equivalente total ejercida por cada una de las muestras en función a la inhibición por reducción del radical DPPH de la microalga *C. onubensis* con respecto a otros alimentos con alta capacidad antioxidante (Tabla 3.26) se observa que es mejor antioxidante que muchas frutas consideradas superalimentos como el maracuyá, el cupuaçu (cacao blanco), la guanábana y la piña, a diferencia del resto de microalgas estudiadas, las cuales no presentan una acción antioxidante superior a la de la guanábana.

Estos resultados se encuentran en consonancia con toda la bibliografía consultada.

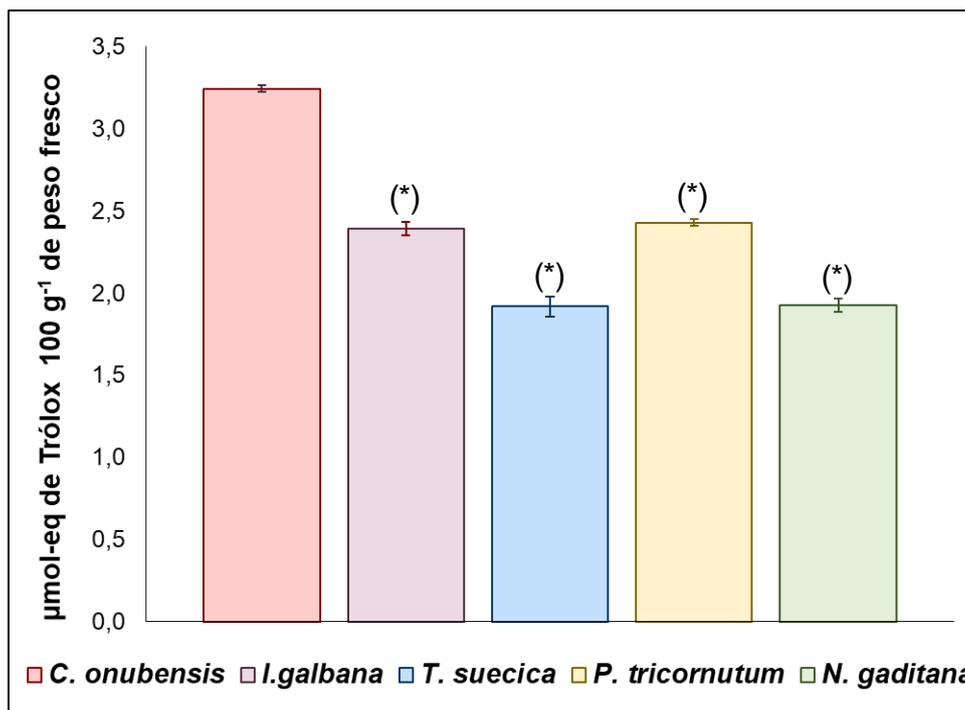


Fig. 3.27. Capacidad antioxidante equivalente total para 30 min (TEAC 30 min) de las distintas microalgas del estudio en función al peso fresco de microalga empleada.

Todas las algas fueron tratadas siguiendo el mismo procedimiento y en los mismos días, para aumentar la precisión de los valores, expresándose estos como media \pm SD ($n=3$) para cada microalga. (*) Significa que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a *C. onubensis*, para valores de $p<0.05$.

Tabla 3.26. Comparación de valores TEAC tras 30 min para alimentos antioxidantes en comparación con las microalgas analizadas [Modificado de Kuskoski et al., 2005].

Muestras	TEAC 30 min (μmol-eq Trólox 100 g ⁻¹ de peso fresco)
Acerola	53,2
Mango	12,9
Fresa	9,2
Uva	7,0
Açaí	6,9
Guayaba	5,9
Mora	4,3
<i>C. onubensis</i>	3,2
Guanábana	2,9
<i>P. tricornutum</i>	2,4
<i>I. galbana</i>	2,4
<i>T. suecica</i>	1,9
<i>N. gaditana</i>	1,9
Maracuyá	0,9
Cupuaçu	0,7
Piña	0,5

3.4. Breve resumen de los resultados obtenidos.

La Economía Circular es uno de los principales objetivos de todas las estrategias económicas a nivel nacional e internacional, siendo una de las principales preocupaciones las emisiones directas e indirectas de gases de efecto invernadero. Esta problemática podría ser reducida gracias al empleo de las microalgas dada su capacidad de captación de grandes cantidades de CO₂, permitiendo reducirse las emisiones globales de este gas a la atmósfera. Por este motivo es de gran importancia encontrar nuevos usos para estos nuevos recursos sostenibles.

En este trabajo se ha llevado a cabo la puesta en valor de la microalga extremófila *C. onubensis*, una microalga extraída del río Tinto y que es rica en proteínas vegetales (44,60%), fibra dietética (15,73%) e hidratos de carbono (24,80%) y con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) [del Valle, 2016]. Es por este motivo, que ésta microalga muestra un potencial uso como nutracéutico para la industria alimentaria y cosmética, destacando su posible acción antioxidante.

En estudios previos realizados por parte del grupo de investigación SEJ-523 se pudo confirmar que la microalga *C. onubensis* presentaba una alta capacidad antioxidante derivada de su alto contenido en polifenoles totales, flavonoides y carotenoides los cuales eran similares o incluso superiores a las cantidades promedio registradas en muchas frutas y verduras, lo que hacía a esta microalga una buena fuente de nutracéuticos como suplemento alimenticio.

En este estudio se ha tratado de confirmar que este poder antioxidante tiene interés comercial para su posterior aplicación como alimento funcional o nutracéutico, para lo cual se procedió a la comparativa entre diversas algas que, actualmente, se encuentran comercializadas y empleadas por la industria cosmética debido a sus múltiples propiedades entre las que destaca su alta acción antioxidante y su potencial antitumoral.

En la Tabla 3.27, se ha realizado una tabla sinóptica con una comparativa de los distintos compuestos de interés antioxidante y nutracéutico analizados con el fin de poder obtener una visión general de las algas de mayor interés y las posibilidades de estudio futuro de la microalga *C. onubensis*.

Tabla 3.27. Recopilación de los resultados analíticos obtenidos en el estudio del potencial nutracéutico de la microalga *C. onubensis*. (+++) Significa que la microalga presenta la mayor concentración obtenida en las analíticas para ese compuesto. (++) Significa que la microalga presenta la segunda mayor concentración obtenida en las analíticas para ese compuesto respecto de varias microalgas comerciales (^A) Significa que no existen diferencias significativas para $p < 0.05$ (^B) Significa que no existen diferencias significativas para $p < 0.1$. (sin marca) significa que no es relevante

	<i>Coccomyxa onubensis</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Tetraselmis suecica</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Nannochloropsis gaditana</i>
Pigmentos clorofícos totales	++			+++	
Clorofila-a	+++			++	
Clorofila-b	+++		++		
Clorofila-c		++		+++	
Feofitina-a	++			+++	
Clorofila-a + Feofitina-a	+++ ^B		++ ^B	+++ ^B	++ ^B
Pigmentos carotenoides totales	+++			++	
Fucoxantina	++			+++	
Neoxantina	+++ ^A		+++ ^A		
Violaxantina	++ ^A			+++	++ ^A
Astaxantina		++			+++
Luteína + Zeaxantina	+++				++
Licopeno	+++				++
β-caroteno	++				+++
Equivalentes espectrofotometría					
Equivalentes en β-caroteno	++				+++
Equivalentes en vitamina A	++				+++
Polifenoles totales	+++	++			
Flavonoides	+++	++ ^A	++ ^A		
Taninos hidrolizables	+++			++	
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL	+++	++ ^A		++ ^A	

Como se puede apreciar en la tabla anterior, *C. onubensis* ostenta el primer o el segundo puesto en casi todas las biomoléculas de alto valor analizadas, salvo en el caso de la clorofila-c y la astaxantina. Esto hace que *C. onubensis* presente un claro interés desde el punto de vista comercial.

Como se puede apreciar por su alta capacidad antioxidante, *C. onubensis* sería un claro objeto de estudio para el control del estrés oxidativo celular en animales, ya que, además de presentar compuestos antioxidantes, estos son activos tras la dieta, dado que estudios previos han mostrado acción por la ingesta de esta microalga en procesos derivados de la acción de estas sustancias (control de la glucosa, disminución de los niveles de LDL y control del balance del colesterol, mejora del perfil lipídico neuronal...). Es por ello que es de gran interés proceder al análisis de los marcadores del estado RedOx en animales alimentados con ésta microalga en posteriores estudios.

Como nutracéutico *C. onubensis*, además de presentar un alto capacidad antioxidante, superior al presente en todas las microalgas comerciales estudiadas, además, presentaría un potencial poder anticancerígeno por mostrar contenidos superiores a 0,4 gramos de taninos hidrolizables por cada 100 gramos de peso fresco, lo cual unido con su alto contenido en fucoxantina podría favorecer el control de tumores como el de próstata, el de pulmón o la leucemia.

Su alta concentración en carotenoides favorece una alta acción precursora de la vitamina A que favorece el control de ciertas enfermedades derivadas de la degeneración macular, lo cual, unido a su riqueza clara en luteína y zeaxantina podría reducir el riesgo de sufrir enfermedades como las cataratas o la retinopatía serosa.

Y, en último lugar, su composición podría inducir a una mejora en el estado del hipotálamo, llevando al individuo a calmar el estrés emocional por reducción del nivel basal del cortisol sérico derivado de su alta concentración en luteína y zeaxantina; dos compuestos carotenoides que se ha comprobado que afectan a la percepción del estrés emocional por la acción del hipotálamo, derivando en un mejor estado emocional y de salud en jóvenes universitarios con dietas suplementadas en estos compuestos [Stringham *et al.*, 2017; Stringham *et al.*, 2019].

4. CONCLUSIONES.

En este estudio hemos llevado a cabo el análisis de las propiedades protectoras de la microalga *C. onubensis* frente al estrés oxidativo y la comparativa con otras cuatro microalgas antioxidantes, y cuyo interés nutracéutico es notable y confirmado. Para ello se han analizado diversos componentes celulares con alto poder antioxidante con el fin de apreciar si existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas, obteniendo las siguientes conclusiones:

1º. La microalga acidófila *Coccomyxa onubensis* presenta un perfil clorofílico rico en clorofila-a, siendo la microalga con mayor concentración de este pigmento, no obstante, presenta escaso contenido de feofitina-a, lo que hace que su poder antioxidante derivado de ambos sea inferior que el de *P. tricornutum*, que presenta un 21.44% más en el contenido de ambos pigmentos.

2º. El perfil de *C. onubensis* muestra un elevado contenido de carotenoides como la luteína, la zeaxantina, la neoxantina y el licopeno, superando los niveles del resto de microalgas del estudio, a su vez, los niveles de fucoxantina y violaxantina se mostraron en rangos elevados, solo superado por *P. tricornutum*, presentando ésta microalga comercial un 69.42% y un 67.38% mayor contenido respectivamente. Al igual que para el caso del β -caroteno, únicamente superado por *N. gaditana* en un 29.35%.

3º. *C. onubensis* posee $0,136 \pm 0,003$ mg-eq de β -caroteno 100 g^{-1} de peso fresco lo que induce a la formación de $0,0226 \pm 0,0019$ mg-eq de vitamina A 100 g^{-1} de peso fresco. Este contenido en carotenoides totales corresponde al segundo mayor valor obtenido para las microalgas estudiadas, siendo únicamente superado por *N. gaditana* en un 17.97% y es mayor que el contenido presente en la ciruela amarilla, el melocotón, la mora, la naranja, la piña, el plátano, el calabacín y la col de Bruselas que presentan valores entre 0,023 y 0,117 mg-eq de β -caroteno 100 g^{-1} de peso fresco.

Estos valores confieren a *C. onubensis* un alto potencial antioxidante, así como acción antitumoral, antimutagénica y protectora del daño macular, antihiper glucemiante, antihiperlipidemiante y protectora del riesgo cardiovascular tal y como se observó en estudios previos.

4º. La cantidad de polifenoles totales presentes en la biomasa de la microalga *C. onubensis* es de 150 mg-eq de ácido gálico 100 g^{-1} peso fresco, un valor similar al presente en la piña y la papaya y superior al del brócoli, el tomate Cherry, la coliflor, el mango y el melón. Este contenido en polifenoles totales es superior en un 34,47% el nivel presente en *I. galbana* y confiere a *C. onubensis* un potencial uso como nutracéutico derivado de sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antirradicálica, antimutagénica, anticarcinogénica, antimicrobiana y de retardo de la senescencia.

5º. El análisis de los flavonoides mostró un contenido de $19,015 \pm 0,002$ mg-eq de catequina 100 g^{-1} de peso fresco. Contenido que fue un 16,15% superiores al de *I. galbana* y *T.*

suecica, las dos microalgas con mayor contenido en flavonoides y superior al de la ciruela negra, el haba, la uva negra, la nectarina, la manzana y el albaricoque, con resultados similares y comparables con los obtenidos en estudios previos, lo que muestra su alto interés como alimento funcional y nutracéutico por sus propiedades antioxidante.

- 6º. El contenido en taninos hidrolizables de la microalga *C. onubensis* fue de 435 ± 10 mg-eq de metil-galato 100 g^{-1} de peso fresco. Este contenido fue un 39,56% superior al de *P. tricornutum* y mayor que el que poseen los arándanos, la ciruela, la almendra, la fresa o la manzana roja. Dicho valor implica según la bibliografía un alto poder anticancerígeno, pudiendo inhibir el crecimiento tumoral y vascular para el cáncer de próstata y de pulmón en roedores e impidiendo su crecimiento e, incluso, reduciendo el tamaño del tumor.
- 7º. La capacidad antioxidante total de la microalga de estudio, alcanzó los $3,24 \pm 0,02$ μmol -eq de Trólox 100 g^{-1} de peso fresco, un valor superior al presente en la guanábana, el maracuyá, la piña o el cacao blanco y que supera en un 25,13% los niveles proporcionados por *P. tricornutum*, que es la microalga comercial con mayor capacidad antioxidante total. Estos niveles además de permitir controlar el estado redox celular, permitiría favorecer un buen estado de salud a los individuos suplementados con este *C. onubensis* al inducir la reducción del riesgo de cardiovascular.
- 8º. Finalmente, los datos expuestos, sugieren en conjunto que la microalga extremófila *Coccomyxa onubensis* presenta un alto potencial antioxidante y puede ser útil en su empleo como alimento funcional, suplemento alimenticio y, o, nutracéutico, dando pie a próximos estudios de sus efectos *in vivo*.

5. RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS.

4.1. Libros, revistas y artículos científicos.

ABALDE, J., CID, A., FIDALGO, P., TORRES, E. y HERRERO, C. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Laboratorio de Microbiología. Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de La Coruña. ISBN: 978-84-97497-69-5. <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>

ADL, S.M., SIMPSON, A.G., FARMER, M.A., ANDERSEN, R.A., ANDERSON, O.R., BARTA, F.R., y JAMES, T.Y. (2005). *The new higher level Classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists*. Journal of Eukaryotic Microbiology. Vol. 52(5): pp. 399-451. DOI: 10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.

AMADOR, V.M. (2020). *Estudio del efecto hipolipidémico de la microalga "Coccomyxa onubensis" en los roedores modelo de laboratorio Long Evans (Study of the hypolipidemic effect of the Coccomyxa onubensis micro-algae in Long Evans Laboratory rodents model)*. Trabajo de Fin de Grado. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva. Huelva.

ARNON, D.I. (1949). *Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxylase in Beta Vulgaris*. Plant Physiology. Vol. 24: pp 1-15.

BATISTA, A.P., GOUVEIA, L. BANDARRA, N.M., FRANCO, J.M. y RAYMUNDO, A. (2013). *Comparision of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products*. Journal of Algal Research. Vol. 2 (2): pp 164-173.

BAUERNFEIND, J. (1981). *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. New York, N.Y.: Academic Press.

BELIAEV, I.K., ZARAIKII, A.V., LIMBERG, V.K. y VAKULOVA, L.A. (1992). *Modification of the body's resistance to acute ionizing radiation by synthetic beta-carotene*. Vopr. Med Khim. Vol. 38 (6): pp. 39-42.

BENAVIDES, F.J. y GUÉNET, J.L. (2003). *Sistemática de los roedores utilizados en el laboratorio*. En; Benavides, F.J. *Manual de Genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid. España.

BERNABÉ, J., AVILÉS, F., CERDÁ, B., MULERO, F., GARCÍA-VIGUERAS, C., LEAL, M., ABELLAN, J., PARRA, S. y ZAFRILLA, M.P. (2010). *Biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con síndrome metabólico*. Reunión nacional Sociedad Española de Hipertensión, liga española para la lucha contra la hipertensión arterial. Zaragoza.

BISHOP, W.M. y ZUBECK, H.M. (2012). *Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements*. Journal of Nutrition and Food Sciences. Vol. 2(5): pp. 1-6.

BOVERIS, A., CADENAS, E. y STOPPANI, O.M. (1976). *Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. Biochemistry Journal. Vol 156 (2): pp 435-444. DOI: 10.1042/bj1560435.



BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME y BERSET C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.* Food Science and Technology. Vol. 28 (1): pp. 25-30. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

BRENNAN L. YyOWENDE, P. (2010). *Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.* Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 14 (2): pp 557-577.

BRIAN, A. y CAMERON, G. (1992). *Ciencia de los alimentos, nutrición y salud.* México. Editorial Limusa.

BONE, R.A. (2007). *Macular pigment response to a supplement containing meso-zeaxanthin, lutein and zeaxanthin.* Nutrition and metabolism. Vol. 4: pp. 12.

BUSCEMI, S., CORLEO, D., DI PACE, F., PETRONI, M.L., SATRIANO, A. y MARCHESINI, G. (2018). *The effect of lutein on eye and extra-eye health.* Nutrientes. Vol. 10 (9): pp. 1321. DOI: 10.3390/nu10091321.

CALA, O., FABRE, S., PINAUD, N., DUFOURC, E.J., FOUQUET, E., LAGUERRE, M. y PIANET, I. (2011). *Towards a molecular interpretation of astringency: synthesis, 3D structure, colloidal state, and human saliva protein recognition of procyanidins.* Planta medica. Vol. 77 (11): pp. 1116- 1122.

CASTEJÓN, N. (2018). *Nuevas fuentes de aceites ricos en omega-3 para la producción de lípidos saludables mediante tecnologías limpias de extracción y modificación enzimática.* Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.

CHEN, J., JIANG, Y., MA, K.Y., CHEN, F. y CHEN, Z.-Y. (2011). *Microalga decreases plasma cholesterol by down-regulation of intestinal NPC1L1, hepatic LDL receptor and HMG-CoA reductase.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 59 (12): pp 6790-6797. Doi: 10.1021/jf200757h

CHEYNIER, V. (2005). *Polyphenols in foods are more complex than often thought.* The American journal of clinical nutrition. Vol. 81 (1): pp. 223S-229S.

CHUNG H.Y., RASMUSSEN H.M. y JOHNSON E.J. (2004). *Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men.* J. Nutr. Vol. 134: pp. 1887–1893. DOI: 10.1093/jn/134.8.1887..

CLESCERI, L.S., GREENBERG, A.E. y EATON, A.D. (1998). *Standard method for the examination of water and wastewater.* American Public Health Association. Water Environment Federation. Edición 1. 1220 pp. ISBN 978-087-5532356.7

CONNER, E.M. y GRISHAM, M.B. (1996). *Inflammation, free radicals, and antioxidants.* Nutrition, 12(4), pp. 274-277.

DAI, J., y MUMPER, R.J. (2010). *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties.* Molecules, Vol. 15. (10): pp. 7313-7352.

DAMBEK, M., EILERS, U., BREITENBACH, J., STEIGER, S., BÜCHEL, C. y SANFMANN, G. (2012). *Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in*

Phaeodactylum tricornutum. Journal of Experimental Botany. Vol. 63 (15): pp. 5607-5612. DOI: 10.1093/jxb/ers211.

DAVIS, R.A., JR, WELTY, A.T., BORREGO, J., MORALES, J.A., PENDÓN, J.G. y RYAN, J.G. (2000). *Rio Tinto estuary (Spain): 5000 years of pollution*. Environmental Geology. Vol: 39 (10): pp1107-1116. Doi:10.1007/s002549900096.

DEL RÍO, E., GARCÍA GÓMEZ, E. MORENO-FERNÁNDEZ, J.G., GUERRERO, M. y GARCÍA-GONZÁLEZ, M. (2017). *Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture by two high-yield strains, Chlorococcum oleofaciens and Pseudokirchneriella subcapitata*. Journal of Algal Research. Vol. 23: pp 37-42.

DEL VALLE, C. (2016). *Valoración de la microalga "Coccomyxa onubensis" como suplemento dietético*. Trabajo de Fin de Grado. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva. Huelva.

DEMIMING-ADAMS, B, GILMORE, A.M. y ADAMS, W.W. (1996). *Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants*. The FASEB Journal. Vol 10: pp. 403-412.

DESBOIS, A.P., MEARN-SPRAGG, A. y SMITH, V.J. (2009). *A fatty acid from the diatom Phaeodactylum tricornutum is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Marine Biotechnology, 11(1), pp. 45-52.

DI LENA, G., CASINI, I., LUCARINI, M. y LOMBARDI-BOCCIA, G. (2018). *Carotenoid prolifing of five Microalgae species from large-scale production*. Food Research International. Vol. 120: pp. 810-818. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.11.ruesne-.043.

PECOLLO, N., LATINO-MARTEL, P., NORAT, T., BARANDON, R., BERTRAI, S., GALAN, P. y HERCBERG, S. (2010). *Beta-carotene supplementation and cancer risk: a sistematic review and metaanalysis of randomized controlled trials*. International Journal of Cancer. Vol. 127 (1): pp. 172-184. DOI: 10.1002/ijc.25008.

FIELD, C.B., BEHRENFELD, M.J., RANDERSON, J.T., y FALKOWSKI, P. (1998). *Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components*. Science. Vol. 281 (5374): pp. 237-240. DOI: 10.1126/science.281.5374.237.

FINKELSTEIN, R (2013). *Abscisic acid synthesis and response*. The arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists. Ed. 11. DOI: 10.1199/tab.0166.

FORJÁN, E., NAVARRO, F., CUARESMA, M., VAQUERO, I., RUÍZ-DOMÍNGUEZ, M .C., GOJKOVIC, Z., VÁZQUEZ, M., MÁRQUEZ, M., MOGEDAS, B., BERMEJO, E., GIRLICH, S., DOMÍNGUEZ, M .J., VÍLCHEZ, C., VEGA, J. M. y GARBAYO, I. (2015) *Microalgae: fast-growth sustainable green factories*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. Vol 45 (16): pp 1705-1755. Doi: 10.1080/10643389.2014.966426.

FU, H., XIE, B., MA, S., ZHU, X., FAN, G. y PAN, S. (2011). *Evaluation of antioxidant activities of principal carotenoids available in water spinach (Ipomoea aquatica)* Journal of Food. Composition. Analisis. Vol. 24: pp. 288–297. DOI: 10.1016/j.jfca.2010.08.007.

FUGMANN, B., LANG-FUGMANN, S. y STEGLICH, W. (2014). *RÖMPP Encyclopedia Natural Products*. Primera Edición (2000). Georg Thieme Verlag ISBN 3-13-179551-4

FUENTES, J.L., HUSS, V.A.R., MONTERO, Z., TORRONTERAS, R., CUARESMA, M., GARBAYO, I. y VILCHEZ, C. (2016). *Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga Coccomyxa onubensis sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)*. Journal of Applied Phycology. Vol. 28: pp. 3269-3279.

GALVÁN, L. (2011). *Modelización hidrológica de río Odiel. Aplicación al estudio de la contaminación por drenaje ácido de minas*. Tesis doctoral. Departamento de Geodinámica y Paleontología. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva. Huelva,

GARBAYO, I., TORRONTERAS, R., FORJÁN, E., CUARESMA, M., CASAL, C., MOGEDAS, B., RUÍZ-DOMÍNGUEZ, M.C., MÁRQUEZ, C., VAQUERO, I., FUENTES-CORDERO, J.L., FUENTES, R., GONZÁLEZ DEL VALLE, M. y VÍLCHEZ, C. (2012). *Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva (Spain)*. Journal of Phycology. Vol. 48: pp 607-614.

GARRIDO, M., GONZÁLEZ-FLORES, D., MARCHENA, A.M., PROPR, E., GARCÍA-PARRA, J., BARRIGA, C. y RODRÍGUEZ, A.B. (2013). *A lycopene-enriched virgin olive oil enhances antioxidant status in humans*. Journal of Scientific Food Agricultural. Vol. 93: pp. 1830-1826.

GEORGÉ, S., BRAT, P., ALTER, P. y AMIOT, M.J. (2005). *Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products*. Journal of agricultural and Food Chemistry. Vol. 53 (3): pp. 1370-1373. DOI: 10.1021/jf048396b

GIOVANUCCI, E., RIMM, E.B., STAMPFER, M.J. y WILLETT, W.C. (2002). *A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk*. Journal of natural cancer inst. Vol. 94 (5): pp 391-398. DOI: 10.1093/jcni/94.5.391.

GRAF, B.A., MILBURY, P.E. y BLUMBERG, J.B. (2005). *Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence*. Journal of medicinal food, Vol. 8 (3): pp. 281-290.

GRANADO-LORENCIO, F., HERRERO-BARBUDO, C., ACIÉN-FERNÁNDEZ, G., MOLINA-GRIMA, E., FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M., PÉREZ-SACRISTÁN, B. y BLANCO-NAVARRO, I. (2009). *In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae Scenedesmus almeriensis*. Food Chemistry. Vol. 114: pp 747-752.

GÓMEZ-ARIZA, J.L., GARCÍA-BARRERA, T., GOMEZ-JACINTO, V., GARBAYO, I. y VILCHEZ, C (2010). *Microalgae, new paths to functional foods. I Jornadas del Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario*. Córdoba, 26-28 septiembre 2010. Córdoba: Ed. Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, pp. 77-80.

GOODAM, S.T. (1998). *Medical cell biology*. Vol. II: pp. 27-65. USA: Goodam, S.T., ed. Lippincott-Raven Publishers.

GUDIÉL-URBANO, M. y GOÑI, I. (2001-a). *Bioavailability of nutrients in rats fed with edible seaweeds, Nori (Porphyra tenera) and Wakame (Undaria pinnatifida), as a source of dietary fibre*. Food Chemistry. Vol. 76: 281-286.

- GUDIÉL-URBANO, M. y GOÑI, I (2001-b).** Effect of edible seaweeds (*Undaria pinnatifida* and *Porphyra tenera*) on the metabolic activities of intestinal microflora in rats. *Nutrition Research*. Vol. 22: 323-331.
- GUERIN, M., HUNTLEY, M.E y OLAIZOLA, M. (2003).** *Haematococcus astaxanthin: application for human health and nutrition*. *Trends in Biotechnology*. Vol. 21: pp. 210-216.
- HALLIWELL, B (1990).** *How to characterize a biological antioxidant*. *Free Radical Research Communication*. Vol. 9: pp 1-32.
- HALLIWELL, B. (1993).** *The chemistry of free radicals*. *Toxicology and Industrial Health*. Vol. 9 (1-2): pp 1-21.
- HALLIWELL, B. (1995).** *How to characterize an antioxidant: an update*. *Biochemistry Society Sympos.* Vol 61: pp 73-101.
- HAN, D., LI, Y. y HU, Q. (2013).** *Astaxanthin in microalgae: Pathways, functions and biotechnological implications*. *Algae*. Vol. 28 (2): pp. 131-147. DOI: 10-4490/algae.2013.12.2.131.
- HERRMANN, M, JOPPE, H., PERTILE, P. y ZANELLA, L. (2010).** Extracts of *Isochrysis* sp. European patent application. Bulletin 2010/13. Application number: 09171485.7.
- HSU, C., CHAO, P., HU, S. y YANG, C. (2013).** *The antioxidant and free radical scavenging activities of chlorophylls and pheophytins*. *Food and Nutrition Sciences*. Vol. 4 (8): pp. 1-8.
- HUSSEIN, G., SANKAWA, U., GOTO, H., MATSUMOTO, K. y WATANABE, H. (2006).** *Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition*. *Journal of natural products*. Vol. 69: pp. 443-449.
- JIANG, F. y DUSTING, G.J. (2003).** *Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects*. *Current vascular pharmacology*. Vol. 1 (2): pp. 135-156.
- JUNGHANS, A., SIES, H. y STAHL, W. (2001).** *Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes*. *Arch. Biochemistry Biophysics*. Vol. 391: pp. 160–164. DOI: 10.1006/abbi.2001.2411
- KANG, M-J, KIM, S-M, CHOI; H-N., JANG, Y-H y KIM, J-I. (2013).** *Antioxidant effect of *Phaeodactylum tricorutum* in mice fed high-fat diet*. *Food Science and Biotechnology*. Vol. 22: pp. 107-113. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0015-y>
- KAWEE-AI, A., KUNTIYA, A. y KIM, S.M. (2013).** *Anticholinesterase and antioxidant activities of fucoxanthin purified from the microalga *Phaeodactylum tricorutum**. *Natural Product Communications*. Vol. 8 (10): pp. 1381-1386.
- KERR DOW, F. (2005).** *Qualified Health claims: Letter regarding tomatoes and prostate cancer (Lycopene health claim coalition)* (Docket No. 2004Q-0201). FDA.
- KIJLSTRA, A., TIAN, Y., KELLY, E.R. y BERENDSCHOT, T.T. (2012).** *Lutein: More than just a filter for blue light*. *Prog. Retin. Eye Res.* Vol. 31: pp. 303–315. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2012.03.002

KIM, S.M., KANG, S-W, KWON, O-N, CHUNG, D. y PAN, C-H (2012). *Fucoxanthin as a major carotenoid in Isochrysis aff. Galbana: Characterization of extraction for commercial application.* Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. Vol. 55 (4): pp. 477-483. DOI: 10.1007/s13765-012-2108-3

KINSELLA, J.E., FRANKEL, E., GERMAN, B. y KANNER, J. (1993). *Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods: physiological mechanisms by which flavonoids, phenolics, and other phytochemicals in wine and plant foods prevent or ameliorate some common chronic diseases are discussed.* Food technology. Vol. 47(4): pp. 85-89.

KOTAKE-NARA, E., ASAI, A. y NAGAO, A., (2005-I). Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. Cancer Letters. Vol 220: pp 75-84.

KOTAKE-NARA, E., TERASAKI, M. y NAGAO, A. (2005-II). Characterization of apoptosis induced by fucoxanthin in human promyelocytic leukemia cells. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol 69: pp. 224-227

KUMAR, A., ERGAS, S., YUAN, X., SAHU, A., ZHANG, Q., DEWULF, J. y VAN LANGENHOVE, H., (2011). *Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via Microalgae: recent developments and future directions.* Trends in biotechnology. Vol. 28 (7): pp. 371-380. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.04.004

LI, Y. (2007). *The role of carotenogenesis in the response of the green algae Haematococcus pluvialis to oxidative stress.* Ph.D. dissertation. Universidad de Hong Kong. Hong Kong. 157 pp.

LIM, L.S., MITCHELL, P., SEDDON, J.M., HOLZ, F.G. y WONG, T.Y. (2012) *Age-related macular degeneration.* Lancet. Vol. 379: pp. 1728–1738. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.

LIU, M., QI-LI, X., WEBER, C., YONG-LEE, C., BROWN, J. y HAI-LIU, R. (2002). *Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 50 (10), pp: 2920-2930. DOI: 10.1021/jf0111209.

LIU, Y.C., WILKINS, M., KIM, T., MALYUGIN, B. y MEHTA, J.S. (2017). *Cataracts.* Lancet. Vol. 390: pp. 600–612. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30544-5.

LÓPEZ- MUÑOZ, I., ABALDE, J. y HERRERO, C. (1992). *Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz.* Nove Acta Científica Compostelana (Biología). Vol. 3: pp 59-65.

LUBIAN, L.M. (1982). *Nannochloropsis gaditana sp. Nov., una nueva Eustigmatophyceae marina.* Lazaroa. Vol. 4: pp. 287-293.

MADHAVI, D.L., y SALUNKHE, D.K. (1995). *Toxicological aspects of food antioxidants.* Food antioxidants. Cap. 5. Pp. 281-374. Boca Raton (FL):CRC Press.

MAEDA, H., HOSOWAKA, M., SASHIMA, T. y MIYASHITA, K. (2007). *Dietary combination of fucoxanthin and Fish Oil attenuates the weight gain of White adipose tissue and decreases blood glucosa in obese/Diabetic KK-Ay mice.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 55 (19): 7701-7706. DOI: 10.1021/jf071569n.

MAHAN, K. y ESCOTT-SAUMP, S. (2008). *Krause: Dietoterapia*. Ed. Elsevier-Masson. 12ª edición. Pp. 1376. México. ISBN: 978-84-458-1910-4

MANFELLOTTO, F., STELLA, G.R., FALCIATORE, A., BRUNET, C. y FERRANTE, M.I. (2020). *Engineering of unicelular alga Phaeodactylum tricornutum for enhancing carotenoid production*. Vol. 9: 757. DOI:10.3390/antiox9080757.

MARGALEF, R. (1983). *Limnología*. Ediciones Omega. Primera edición. 1010 pp. Barceona. España. ISBN: 978-8428207140

MASHHADI, N.S., ZAKERKISH, M., MOHAMMADIASL, J., ZAREI., M., MOHAMMADSHAHI, M. y HAGHIGHIZADEH, M.H. (2018). *Astaxanthin improves glucosa metabolism and reduces blood pressure in patients with type 2 diabetes mellitus*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. Vol. 27 (2): pp. 341-346. DOI: 10.6133/apjcn.052017.11.

MCGRAW, K.J., y HARDY, L.S. (2006). *Astaxanthin is responsable for the pinl plumaje flush in Franklin's and ring billed gull*. Journal of Field Ornithology. Vol. 77: pp. 29-33.

MELLADO, D., GONZÁLEZ CLAVIJO, E., TORNOS, F. y CONDE, C. (2006). *Geología y estructura de la Mina de Río Tinto (Faja Pirítica Ibérica, España)*. Geogaceta. Vol. 40 (2006): pp 231-234. ISSN: 0213683X.

MEI, L.I., XITAO, X., RENHAO, X.U.E., y ZHILI, L.I.U (2006). *Effects of strontium-induced stress on marine Microalgae Pitymonas subcordiformis (Chlorophyta: Volvocales)*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. Vol 24 (2): pp. 154-160.

MERCADANTE, A.Z., STECK, A. y PFANDER, H. (1999). *Carotenoids from Guava (Psidium guajava L.): Isolation and Structure Elucidation*. Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 47 (1): pp. 145-151. DOI: 10.1021/jf980405.

MISOTTI, A.M. y GNAGNARELLA, P. (2013). *Vitamin supplement consumption and breast cancer risk: a review*. E cancer medical Science. Vol. 7: pp. 365. DOI: 10.3332/ecancer.2013.365.

MONTERO, O., SOBRINO, C., PARÉS, G. y LUBIÁN, L.M. (2002). *Fotoinhibición y recuperación de cinco microalgas con clorofila-c tras breves exposiciones selectivas a la radiación solar*. Ciencias marinas. Vol. 28 (3): pp. 223-226.

MUELLER-HARVEY, I. (2001). *Analysis of hydrolysable tannins*. Animal Feed Science and Technology. Vol. 91 (1-2), pp: 3-20. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00227-9)

NAGINI, S., PALITTI, F. y NATAJARAN, A. (2015). *Chemopreventive potential of chlorophyllin: A review of the mechanisms of action and molecular targets*. Nutrition and Cancer. Vol. 67(2): pp. 203-11.

NAGUIB, J.M.A. (2000). *Antioxidant Activities of Astaxanthin and related carotenoids*. Journal of Agricultural Food chemistry. Vol. 48 (4): pp. 1150-1154.

NAIK, P.S., CHANEMOIGASOUNDHARAM, A., PAUL-KHURANA, S.M. y KALLOO, G. (2003). *Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants*. Current Science. Vol. 85: pp. 1423-1430.

NAVARRO, F., ARROYO-LUQUE, A., MARTÍN-GONZÁLEZ, S.F., BELLO-GOMEZ, R.I., DE CABO-MORENO, R.C., BURGESS, J.R.; NAVAS- LLORET, P. y VILLALBA-MONTORO, J.M. (1999). *Protective Role of Ubiquinone in Vitamin E and Selenium- Deficient Plasma Membranes.* BioFactors (Oxford). Vol. 9 (2-4): pp 163-170.

NAVARRO, F., FORJÁN, E., VÁZQUEZ, M., TOIMIL, A., RUÍZ-DOMÍNGUEZ, MC., MONTERO-LOBATO, Z. y VÍLCHEZ, C. (2015) *Antimicrobial activity of the acidophile microalga Coccoomyxa Onubensis.* European Journal of Phycology. ISSN 0967-0262. Doi: 10.3390 md110x000x.

NAVARRO, F., FORJÁN, E., VÁZQUEZ, M., MONTERO, Z., BERMEJO, E., CASTAÑO, M. A., TOIMIL, A., CHAGÜACEDA, E., GARCÍA-SEVILLANO, M. A., SÁNCHEZ, M., DOMÍNGUEZ, M. J., PÁSARO, R., GARBAYO, I., VÍLCHEZ, C. y VEGA, J. M. (2016) *Microalgae as a safe food source for animals: nutritional characteristics of the acidophilic microalga Coccoomyxa onubensis.-* Food & nutrition research. Vol. 60 (1). DOI: 10.3402/fnr.v60.30472.

NAVARRO, F., FORJÁN, E., VÁZQUEZ, M., TOIMIL, A., MONTERO, Z., RUIZ-DOMÍNGUEZ, M.C., GARBAYO, I., CASTAÑO, M.A. VÍLCHEZ, C. y VEGA, J.M. (2017). *Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga Coccoomyxa onubensis.* European Journal of Phycology. Vol. 65: pp 38–43.

NAVARRO, F., TOMIL, A., RAMÍREZ, S., MONTERO, Y., FUENTES, J.L., PERONA, J.S., CASTAÑO, M.A., PÁSARO, R., VEGA, J.M y VÍLCHEZ, C. (2020). *The acidophylic microalga Coccoomyxa onubensis and atorvastatin equally improve antihyperglycemic and antihyperlipidemic protective effects on rats fed on high-fat diets.* Journal of Applied Phycology. Vol. 32: pp. 3923-3931. DOI: 10.1007%2Fs10811-020-02280-4.

NEUMAN, H., GALPAZ, N., CUNNINGHAM JR, F.X. ZAMIR, D. y HIRSCHBERG, J. (2014). *The tomato mutation nxd1 reveals a gene necessary for neoxanthin biosynthesis and demonstrates that violaxanthin is a sufficient precursor for abscisic acid biosynthesis,* Plant Journal. Vol. 78 (1): pp. 80–93. DOI:10.1111/tpj.12451. PMID 24506237

NEUMANN, U., DERWENSKUS, F., FLISTER, V.F., SCHMID-STAIGER, U., HIRTH, T. y BISCHOFF, S.C (2019). *Fucoxanthin, a carotenoid derived from Phaeodactylum tricornutum exerts antiproliferative and antioxidant activities in vitro.* Antioxidants (Basel). Vol. 8 (6): 183. DOI: 10.3390/antiox8060183

NIYOGI, K.K. (1999). *Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches.* Annual Revision of Physiology and Molecular Biology of Plants. Vol. 50: pp. 333-359.

OWENS T.G. y WOLD E.R. (1986), *Light-harvesting function in the diatom Phaeodactylum tricornutum.* Plant Physiology. Vol. 80: pp. 732–738. doi: 10.1104/pp.80.3.732.

PARK, J-G. y OH, G. T. (2011). *The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis.* BMB Reports. Vol. 44 (8): pp. 497-5050. DOI: 10.5483/bmbrep.2011.44.8.497. PMID: 21871172.

PARRA-RIOFRIO, G., GARCÍA-MÁRQUEZ, J, CASAS-ARROJO, V., URIBE-TAPIA, E. y ABDALA-DÍAZ, R.T. (2020). *Antioxidant and cytotoxic effects on tumor cells of exopolysaccharides from Tetraselmis suecica (Kyllin) Butcher grown under autotrophic and heterotrophic conditions.* Marine Drugs. Vol. 18. (11): 534. DOI: 10.3390/md18110534.

PEARCE, D.W. y TURNER, R.K. (1989). Chapter 1: *Introductory Chapter: Economics, Natural Resources and Sustainable Development* en *Economics of Natural Resources and the Environment*. Hernel Hempstead: pp 1-6. Harvester Wheatsheat. Londres ISBN 978-0801839870.

PEREZ- JIMÉNEZ, J. y SAURA-CALIXTO, F. (2006). *Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays*. Food Research international. Vol. 39 (7): pp. 791-800.

PEÑA, C. (2014). *Caracterización y estudio de la reactividad de extractos tánicos condensados e hidrolizables. Análisis de las propiedades físico-químicas y mecánicas de resinas fenólicas de tipo novolaca modificadas con dichos extractos*. Universidad del País Vasco. Escuela Universitaria Politécnica. Departamento de Ingeniería Química y del Medio Ambiente. Donostia – San Sebastián. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatearen Argitalpen Zerbitzua.

PERMAN, R., MA, Y., MCGILVRAY, J. y COMMON, M. (1996). Chapter 5. *Welfare economics and the environment* en *Natural Resource and Environmental Economics*. Tercera Edición (2003). Pearson Education Limited: pp. 105-165. Edinburgo. ISBN 0-273-65559-0

PHOENIX, V.R., BENNETT, P.CP, ENGEL, A.S., TYLER, S.W. y FERRIS, F.G. (2006). *Chilean high-altitude hot-spring sinters: a model system for UV screening mechanism by early Precambrian cyanobacteria*. Geobiology. Vol 4: pp 15-28

PORRAS-LOAIZA, A.P. y LÓPEZ-MALO, A. (2009). *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. Vol. 3 (1): pp. 121-134.

QUITRAL R., V., MORALES G., C., SEPÚLVEDA L., M. y SCHWARTZ M., M. (2012). *Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional*. Revista chilena de nutrición. Vol. 39 (4): pp 196-202. Diciembre 2012. Santiago. Chile.

RAFI M.M. y SHAFAYE Y. (2007). *Dietary lutein modulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene and protein expression in mouse macrophage cells (RAW 264.7)*. Mol. Nutr. Food Res. Vol. 51:pp. 333–340. DOI: 10.1002/mnfr.200600170.

RESTREPO, N. (2015). *Extracción, purificación y análisis del contenido de fucoxantina en algas pardas del caribe colombiano*. Trabajo de grado para otra al título de Biólogo Marino. Programa de Biología Marina. Departamento de Ciencias Biológicas y ambientales. Facultad de Ciencias naturales e ingeniería. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. Colombia.

RIGANE, G., BOUAZIZ, M., SAYADI, S. y SALEM, R. (2013). *Effect of storage on refined olive oil composition: stabilization by addition of chlorophyll pigments and squalene*. Journal of Oleo Science. Vol. 62 (12): pp. 981-987.

ROMERO-LÓPEZ, T.D.J. y ECHEVERRÍA-LAZO, H. (1999). *Grado de pureza del extracto clorofílico obtenido de chlorella sp.* Vol. 33 (1): pp 15 – 26. Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela).

ROMERO, P. (2015). *Ensayos de bioseguridad de la microalga Coccoomyxa onubensis y elaboración de piensos modificados para experimentación animal*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Huelva. Huelva.

ROMERO-ZARCO, C. (2018). *Algas en Botánica*. Sevilla: Ed. Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Facultad de Biología.

SALAZAR, M. (2000). *Carotenoides distribución en el mundo vegetal y animal*. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de México-I. Apartado P. 55-535. México D.F. 09340.

SALVADOR, N. (2012). *Biología general del reactivo biológico*. Unidad de Producción Animal. Instituto Santiago Ramón y Cajal, CSIC, Madrid.

SARMIENTO, A., NIETO, J.M., OLÍAS, M., y CÁNOVAS, C. (2008). *Environmental impact of mining activities in the Odiel river basin (SW Spain)*. Water Air and Soil Pollution. Vol. 199 (1): pp 323-341. Mayo 2008. DOI: 10-1007/s11270-008-9882-x

SCOTT, T.M., RASMUSSEN, H.M., CHEN, O., y JOHNSON, E.J. (2017). *Avocado Consumption increases macular pigment density in older adults: a randomized, controlled trial*. Nutrients. Vol. 9(9): pp. 919. <https://doi.org/10.3390/nu9090919>

SILVERMAN, M.P. y LUNDGREN, D.G. (1959). *Studies on the chemoautotrophic iron bacterium Ferrobacillus ferrooxidans. I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields*. Journal of Bacteriology. Vol. 77: pp 642-647.

SHARONI, Y., LINNEWIEL-HERMONI, K., KHANIN, M., SALMAN, H., VEPRIK, A., DANILENKO, M. y LEVY, J. (2012). *The role of lycopene and its derivatives in the regulation of transcription systems: Implications for cancer prevention*. American Journal of Clinical Nutrition. Vol. 96 (5): 1173S-1178S. DOI: 10.3945/ajcn.112.034645.

SOARES, S., VITORINO, R., OSORIO, H., FERNANDES, A., VENÂNCIO, A., MATEUS, N. y DE FREITAS, V. (2011). *Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols*. Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 59 (10): pp. 5535-5547.

SOHAL, R.S. y WEINDRUCH, R. (1996). *Oxidative stress, caloric restriction, and aging*. Science. Vol. 273 (5271): pp. 59-63.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E. y ISAMBERT, A. (2006). *Commercial applications of microalgae*. Journal of bioscience and bioengineering, 101(2), pp. 87-96.

STAHL, W. y SIES, H. (2007). *Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight*. Molecular biotechnology, Vol. 37(1): pp. 26-30.

STEFFEN, W., RICHARDSON, K., ROCKSTRÖM, J., CORNELL, S.E., FETZER, I., BENNETT, E. M., BIGGS, R., CARPENTER, S.R., DE VRIES, W., DE WIT, C.A., FOLKE, C., GERTEN, D., HEINKE, J., MACE, G.M., PERSSON, L.M., RAMANATHAN, V., REYERS, B. y SÖRLIN, S. (2015). *Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet*. Science. Vol. 347 (6223): pp. 1-10.

STRINGHAM, N.T., HOLMES, P.V. y STRINGHAM, J.M. (2017). *Supplementation with macular carotenoids reduces psychological stress, serum cortisol, and sub-optimal symptoms of physical and emotional health in young adults*. Nutritional Neuroscience. DOI: 10.1080/1028415X.2017.1286445

STRINGHAM, N.T., HOLMES, P.V. y STRINGHAM, J.M. (2019). *Effects of macular xanthophyll supplementation on brain-derived neurotrophic factor, pro-inflammatory cytokines, and cognitive performance.* *Physiology and Behavior*, Vol. 211: 112650.

SUN, Z., WANG, Y., Li, Y., -T., HUANG, J-C y CHEN, F. (2008). *Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta).* *Process Biochemistry*. Vol. 43: pp. 1288-1292.

TAO, J., DAVIS, R., NAVANEETHAN, S.D., y MATHEW, M. (2004). *Antioxidant supplementation for preventing and slowing the progression of age-related cataract.* *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Issue 1. Art. No.: CD004567 DOI:10.1002/14651858.cd004567

TIAN Y., KIJLSTRA A., VAN DER VEEN R.L., MAKRIDAKI M., MURRAY I.J. y BERENDSCHOT T.T. (2015). *Lutein supplementation leads to decreased soluble complement membrane attack complex sC5b-9 plasma levels.* *Acta Ophthalmol.* Vol. 93: pp. 141–145. DOI: 10.1111/aos.12535.

TOIMIL, A. (2021). *Aplicaciones farmacológicas y Alimentarias de la microalga extremófila *Coccomyxa onubensis*.* Tesis Doctoral. Programa de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Huelva. Huelva. España. ISBN: por definir.

TURRENS, J.F. y BOVERIS, A. (1980). *Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.* *Biochemistry Journal*. Vol. 181 (2). Pp 421-427. DOI: 10.1042/bj1910421.

YOUNG, A., PHILLIP, D. y SAVILL, J. (1997) *Carotenoids in higher plant photosynthesis.* In: PESSARAKLI, M. (Ed.). *Handbook of photosynthesis*. Tercera Edición (2016), pp 575-596. New York: Marcel Dekker. ISBN: 978-148-2230734

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M. y TELSER, J. (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* *International Journal of Biochemistry. Cell boil.* Vol 39 (1): pp 44-84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.

VAN BENNEKUM, A., WERDER, M., THUAHNAI, S.T., HAN, C-H., DUONG, P., WILLIAMS, D.L., WETTSTEIN, P. y SCHULTHERSS, G. (2005). *Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary β -carotene and cholesterol.* *Biochemistry*. Vol. 44 (11): pp. 4517-4525. DOI: 10.1021/bi0484320.

VAN HAVER, H. (2007). *Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials.* *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 46 (2008): pp S2–S70.

VAN ARNUM y SUSAN D. (1998), «*Vitamin A*». *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (45), New York: John Wiley. pp. 99-107. ISBN 978-0-471-23896-6. DOI: 10.1002/0471238961.2209200101181421.a01.

VAQUERO, I., RUIZ-DOMÍNGUEZ, M.C., MÁRQUEZ, M. y VÍLCHEZ, C. (2012). *Cu-mediated biomass productivity enhancement and lutein enrichment of the novel microalga *Coccomyxa onubensis*.* *Process biochemistry*. Vol. 47(5): pp. 694-700.

VÁZQUEZ-FLORES, A.A., ÁLVAREZ-PARRILLA, E., LÓPEZ-DÍAZ, J.A., WALL-MEDRANO, A., y DE LA ROSA, L.A. (2012) *Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo*. Tecnociencia Chihuahua. Vol. 6 (2): pp. 84-93.

WANG, B., LI, T.T., ZHONG, R.T., CHEN, H.B., XIA, X., GAO, L.Y., y ZHAO, C. (2019). *CO₂ bio-mitigation using Microalgae*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 79 (5): pp. 707-718. DOI: 10.1007/s00253-008-1518-y.

WIDOWATI, I., ZAINURI, M., PANCASAKTI KUSUMANINGRUM, H, SUSILOWATI, R., HARDIVILLIER, Y., LEIGNEL, V., BOURGOUGNON, N y MOUGET, J-L. (2017). *Antioxidant activity of three Microalgae Dunaliella slaina, Tetraselmis chunii, and Isochrysis galbana clone Tahiti*. Earth and Environmental Science. Vol. 55 (2017): 012067. SOI: 10.1088/1755-1315/55/1/012067.

WILLCOX, J.K., ASH, S.L. y CATIGNANI, G.L. (2004). *Antioxidants and Prevention of chronic disease*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol 44: pp 275-295.

XIA, S., WANG, K., WAN, L., LI, A., HU, Q. y ZHANG, C. (2013). *Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom Odontella aurita*. Marine Drugs. Vol 11 (7): pp 2667-2681. DOI: 10.3390/md11072667.

ZENG, X., DANQUAH, M.K., CHEN, X.D., y LU, Y., (2011). *Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production*. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 15 (6): pp. 3252-3260. DOI: 10.1016/j.rser.2011.04.014

ZHANG, J., LI, L., KIM, S.H., HAGERMAN, A.E. y LÜ, J. (2009). *Anticancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose*. Pharmaceutical research, 26(9), pp. 2066-2080.

4.2. Referencias de figuras.

4.2.1. Libros, revistas y artículos científicos.

FIG. 1.3.a y FIG. 1.3.b FORJÁN, E., VÍLCHEZ, C. y VEGA, J.M. (2015). *Biología de microalgas. XI. Microalgas extremófilas. 6. El río Tinto y Coccomyxa onubensis: ejemplos de ambiente extremo y de microalga acidófila*. Ed. Cepasa y Autores. Huelva. España. p. 228-240. ISBN: 978-84-617-2314-0. Dep. Legal: H 201-2014.

FIG. 1.4.a. ROMERO, P. (2015). *Ensayos de bioseguridad de la microalga Coccomyxa onubensis y elaboración de piensos modificados para experimentación animal*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Huelva.

FIG. 1.4.b. FUENTES, J.L., HUSS, V.A., MONTERO, Z., TORRONTERAS, R.S., CUARESMA, M.C., GARBAYO, I. y VÍLCHEZ, C.L. (2016). *Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga Coccomyxa onubensis sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)*. Journal of Applied Phycology. Vol. 28: pp 3269-3279.

TABLA 3.20. BELTRÁN B, ESTÉVEZ R, CUADRADO C, JIMÉNEZ S y OLMEDILLA ALONSO B. (2012). *Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A*. En Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Instituto

de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC).

TABLA 3.22. BHAWAT, S., HAYTOWITZ, D.B. y HOLDEN, J.M. (2014). *USDA Database for the flavonoids content of Selected Foods. Release 3.1.* U. S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Beltsville Human Nutrition Research Center.

TABLA 3.24. WU, Y., LI, X., XIANG, W., ZHU, C., LIN, Z., WU, Y., LI, J., PANDRAVADA, S., RIDDER, D., BAI, G., WANG, M.L., TRICK, H.N., BEAN, S.R., TUINSTR, M.R., TESSO, T.T. y YU, J. (2012) *Presence of tannins in sorghum grains is conditioned by different natural alleles of Tannin1.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 109 (26): pp. 10281-10286.

TABLA 3.26. KUSKOSKI, E.M., ASUERO, A.G., TRONCOSO, A.M., MANCINI-FILHO, J. y FETT, R. (2005). *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.* Food Science and Technology. Vol. 25 (4): pp. 726-732.

4.2.2. Páginas web.

FIG. 1.1.a. y FIG. 1.2.a. RED DE INFORMACIÓN AMBIENTAL DE ANDALUCÍA (REDIAM) (2008). *WMS Red Hidrográfica (tramos) de la cartografía de las Bases de Referencia Hidrológica de Andalucía.* Escala 1:20000. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. [recurso en línea]. Visualizado 9-11-2019.

http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/rediam/menuitem.04dc44281e5d53cf8ca78ca731525ea0/?vgnnextoid=a2d2431458a2b310VgnVCM1000001325e50aRCRD&vgnnextchannel=cff74e7a1ac44410VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextfmt=rediam&lr=lang_es

FIG. 1.1.b. y FIG. 1.2.b. INSTITUTO DE ESTADÍSTICA Y CARTOGRAFÍA DE ANDALUCÍA (2015). *Datos Espaciales de Referencia de Andalucía (DERA).* Escala 1:10000. Junta de Andalucía. Consejería de Economía, conocimiento, Empresas y Universidad. [recurso en línea]. Visualizado 9-11-2019.

<https://www.juntadeandalucia.es/institutodeestadisticaycartografia/DERA/index.htm>

4.3. Otras referencias.

4.3.1. Congresos.

RODRÍGUEZ, M. (2019). *Implicaciones de la Economía Circular para el sector acuícola.* Congreso Nacional de Acuicultura, Cartagena, Murcia.

4.3.2. Páginas web.

DUFOUR, J. (2017). *Biorrefinerías: Microalgas como sustrato para la producción de moléculas plataforma (carboxilatos).* [recurso en línea]. Visualizado 31/08/2021. Última modificación: 5/10/2017.

<https://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2017/10/05/133642>

PROGRAMA POCTEFA INTERREG (2018). *Economía Circular y Microalgas: Bioproductos para las industrias química, energética y agropecuaria.* [recurso en línea]. Visualizado 01/03/2021. Última modificación 25/10/2018.

<https://www.poctefa.eu/blog/noticia/economia-circular-y-microalgas-bioproductos-para-las-industrias-quimica-energetica-y-agropecuaria/>

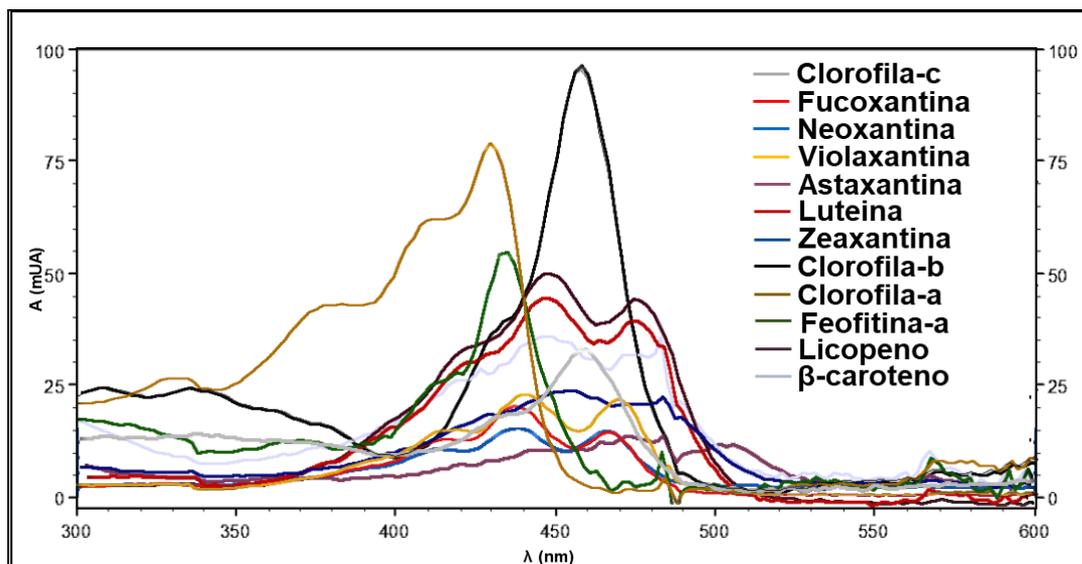
4.3.3. Otros textos.

BOJA - REAL DECRETO 1/2016 (2016). Plan Hidrológico de cuenca 2015-2021. Ciclo de Planificación Hidrológica 2015/2021. *Demarcación Hidrográfica del Tinto, Odiel y Piedras. Anejo 2 Inventario de Recursos Hídricos.* Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Andalucía. Andalucía. España.

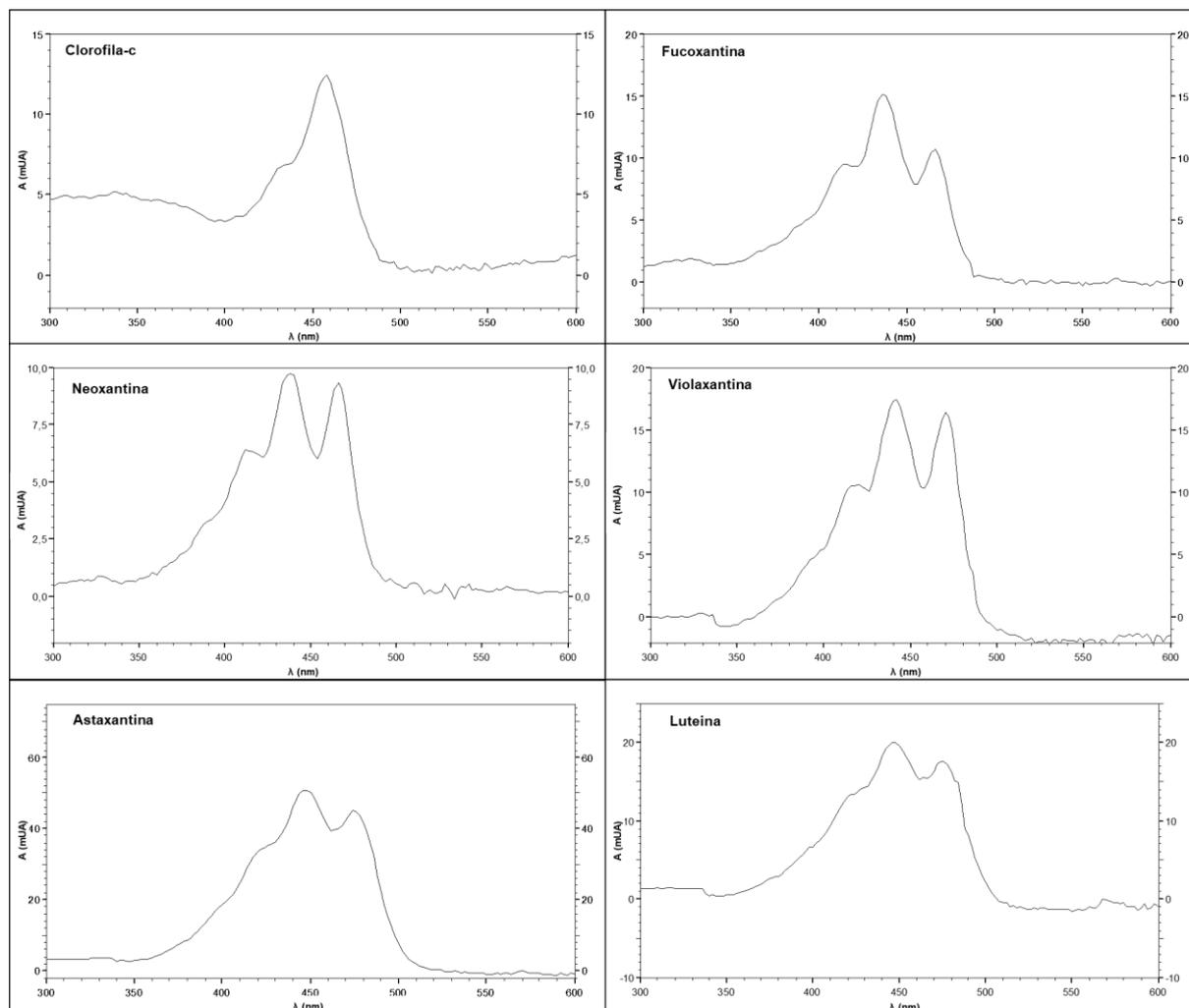
EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2010). *Zanahoria. CArrot. Daucus carota L.* Resumen del Informe anual 2010 de EFSA. Parma. Italia.

PARLAMENTO EUROPEO (2020). *Estrategia de Bioeconomía actualizada – Una bioeconomía sostenible para Europa.* Artículo 136 del Reglamento interno.

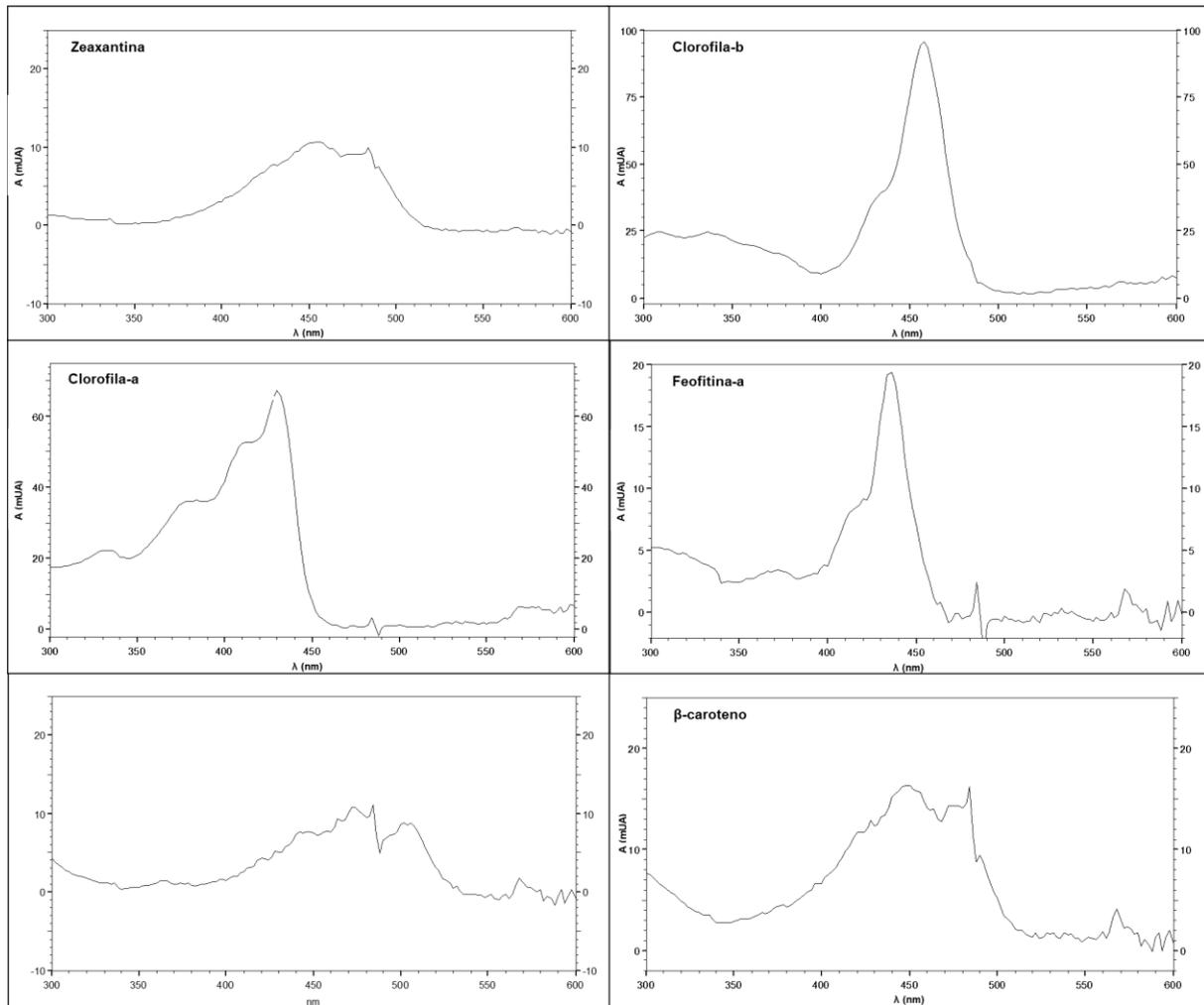
5. ANEXOS.



Anexo I. Fig. 5.1. Espectro de absorción característico de los pigmentos caracterizados en el mix comercial de DHL Water and Environment (Dinamarca).



Anexo II. Fig. 5.2. Espectros de los pigmentos individualizados (1).



Anexo III. Fig. 5.3. Espectros de los pigmentos individualizados (2).