

Facultad de Ciencias.

Departamento de Ecología y Geología



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Tesis Doctoral

Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante, inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas. Posible fuente de compuestos nutraceuticos.

Programa de doctorado: Biotecnología Avanzada

2023

Doctoranda:

Virginia Casas Arrojo

Director:


Roberto T. Abdala Díaz





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Virginia Casas Arrojo

 <https://orcid.org/0000-0002-2170-6323>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña VIRGINIA CASAS ARROJO

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTUDIO DE LOS POLISACÁRIDOS DE ALGAS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, INMUNOMODULADORA Y CITOTÓXICA SOBRE LAS LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS. POSIBLE FUENTE DE COMPUESTOS NUTRACÉUTICOS.

Realizada bajo la tutorización de DR. ROBERTO T. ABDALA DÍAZ y dirección de DR. ROBERTO T. ABDALA DÍAZ (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 20 de ENERO de 2023

Fdo.: VIRGINIA CASAS ARROJO Doctorando/a	Fdo.: ROBERTO T. ABDALA DÍAZ Tutor/a
Fdo.: ROBERTO T. ABDLA DÍAZ	





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Director/es de tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS.

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA

**Estudio de los polisacáridos de algas con actividad
antioxidante, inmunomoduladora y citotóxica sobre las
líneas celulares tumorales humanas. Posible fuente de
compuestos nutracéuticos.**



Virginia Casas Arrojo

TESIS DOCTORAL

Marzo 2023

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGIA

Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante, inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas. Posible fuente de compuestos nutracéuticos.

Memoria presentada por:

Virginia Casas Arrojo

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Málaga en el
Programa oficial de Doctorado en

BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Prof. Dr. Roberto T. Abdala Díaz

Prof. Contratado Doctor de Ecología

Universidad de Málaga

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA Y GEOLOGÍA

D. Roberto T. Abdala Díaz, Profesor de Ecología del Departamento de Ecología y Geología (Área de Ecología) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante, inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas. Posible fuente de compuestos nutracéuticos*” presentada por el Licenciada y Máster Virginia Casas Arrojo, ha sido realizado bajo nuestra dirección y el trabajo presentado y las publicaciones que lo avalan no han sido utilizados en tesis anteriores. Y considerando que representa el trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su exposición y defensa para optar al grado de Doctor en Biotecnología avanzada.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firma el presente en Málaga a 24 de enero del 2023.

Fdo: Roberto T. Abdala Díaz

“El aspecto más triste de la vida actual es que la ciencia gana en conocimiento más rápidamente que la sociedad en sabiduría”

(Isaac Asimov)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	I
ABSTRACT	IV
AGRADECIMIENTOS	VII
ABREVIATURAS.....	X
INTRODUCCIÓN	1
1. Algas.....	2
1.1. Clases de algas	2
1.1.1. Macroalgas	3
1.1.2. Microalgas.....	3
1.2. Tecnología y cultivo de algas.....	5
1.2.1. Tecnología y cultivo de macroalgas	6
1.2.2. Tecnología y cultivo de microalgas	10
✓ Cultivo fotoautotrófico de microalgas:.....	17
✓ Cultivo heterotrófico en microalgas:.....	17
✓ Cultivo mixotrófico en microalgas:	17
1.3. Biotecnología de las algas.....	19
1.3.1. Sector energético	20
1.3.2. Sector agroalimentario	21
1.3.3. Sector nutracéutico y cosmeceúticos.	24
1.4. Algas utilizadas en este estudio.....	27
1.4.1. <i>Laminaria ochroleuca</i> Bachelot Pylaie	27
1.4.2. <i>Gelidium corneum</i> (Hudson) J.V.Lamouroux.....	27
1.4.3. <i>Porphyra umbilicalis</i> Kützing	28
1.4.4. <i>Porphyridium purpureum</i> (Bory) K.M. Drew & R. Ross.....	29
1.4.5. <i>Euglena gracilis</i> G.A. Klebs	29
2. Polisacáridos	30
2.1. Clasificación de polisacáridos.....	32
2.1.1. Agar	33
2.1.2. Carragenanos	34
2.1.3. Alginatos	35
2.1.4. Ulvanos	37
2.1.5. Fucooidanos o fucanos.....	37
2.1.6. Laminarianos	38

2.2. Estacionalidad de los polisacáridos	39
2.3. Bioactividad de los polisacáridos	39
2.3.1. Actividad antioxidante	41
2.3.2. Actividad citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.....	41
2.3.3. Actividad inmunomoduladora.....	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
RESUMEN DE LOS RESULTADOS	46
CONCLUSIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS I: Artículos que avalan la Tesis	79
ANEXO I.a. Immunomodulatory and antioxidant activities of sulfated polysaccharides from <i>Laminaria ochroleuca</i> , <i>Porphyra umbilicalis</i> , and <i>Gelidium corneum</i>	80
ANEXO I.b. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from <i>Porphyridium cruentum</i> . (S.F.Gray) Nägeli.....	92
ANEXO I.c. Adaptation of autotrophic to heterotrophic culture of <i>Porphyridium purpureum</i> (Bory) K.M. Drew & R.Ross: characterization of biomass and production of exopolysaccharides.	115
ANEXO I.d. Immunomodulatory, antioxidant and anticancer capacity of polysaccharides from <i>Euglena gracilis</i> G.A. Klebs	129
ANEXOS II: Otros artículos publicados.....	154
ANEXO II.a. Estudio de la actividad antioxidante y antitumoral del propóleo. Study on the antioxidant and antitumoral activity of propolis.	155
ANEXO II.b. UV photoprotection, cytotoxicity and immunology capacity of red algae extracts.	163
ANEXO II.c. <i>In vitro</i> evaluation of the antitumoral and antiangiogenic effects of extracts from <i>Spondias mombin</i> . L. Leaves.....	180
ANEXO II.d. Antioxidant and cytotoxic effects on tumor cells of exopolysaccharides from <i>Tetraselmis suecica</i> (Kylin) butcher grown under autotrophic and heterotrophic conditions.	190
ANEXO II.e. Evaluation of cytotoxic effect against tumour cells of the acidic polysaccharides of the fungus <i>Nothophellinus andinopatagonicus</i>	214
ANEXO II.f. Sulfated polysaccharide extracted from the green algae <i>Codium bernabei</i> : physicochemical characterization and antioxidant, anticoagulant and antitumor activity.	222
ANEXO II.g. Brazilian beach-cast seaweeds: antioxidant, photoprotection and cytotoxicity properties.	241
ANEXO II.h. <i>In vitro</i> cytotoxic capacity against tumor cell lines and antioxidant activity of acidic polysaccharides isolated from the Andean Patagonian fungus <i>Phylloporia boldo</i>	259

ANEXOS III: Metodología	267
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS ELEMENTAL (DETERMINACIÓN DE C, N, H, S, O)	268
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNAS (Factor de Lourenço).	270
DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES (Dubois et al. 1965) (Dubois et al. 1956).....	271
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN LÍPIDOS (Folch et al 1957).	274
DETERMINACIÓN DE COMPUESTO INORGÁNICOS (Ismail 2017) (Ismail 2017).....	278
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS (Folin and Ciocalteu 1927) (Folin and Ciocalteu 1927)	280
DETERMINACIÓN DE CLOROFILA <i>a</i> y CAROTENOIDES TOTALES.....	283
DETERMINACIÓN DE FICOBILIPROTEÍNAS.....	285
EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS	287
PROTOCOLO DE DERIVATIZACIÓN DE MONOSACÁRIDOS (para la caracterización mediante GC-MS).....	291
CARACTERIZACIÓN MEDIANTE FT-IR.....	295
ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL ENSAYO ABTS.	297
ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL ENSAYO DPPH.	300
ENSAYO DE CONTAMINACIÓN POR LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS).....	303
CULTIVO DE CÉLULAS	305
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR MTT	308
ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	311
DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS THP-1 A MACRÓFAGOS	315
DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS (IL-6 y TNF- α).	317
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON MARCAJE ISOBÁRICO <i>TANDEM MASS TAG</i> (TMT).....	319
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS SIN MARCAJE (Digestión asistida por gel) (Label free quantification - LFQ)	322
ENSAYO DE ESTUDIO <i>IN-VIVO</i> SOBRE RATONES MACHOS BALB/C.	326

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutracéuticos.*

RESUMEN

RESUMEN

El uso de productos naturales para combatir diferentes patologías, o para obtener un beneficio, de manera general, en los seres humanos es un hecho que lleva realizándose durante cientos de años. Desde hace relativamente poco tiempo, la investigación se ha centrado en el medio acuático, principalmente en el marino, para paliar las necesidades existentes.

Las algas, son organismos capaces de sintetizar numerosas moléculas activas gracias a la gran diversidad de especies. Esto, junto a la necesidad de encontrar nuevas alternativas tanto para hacer frente a diferentes enfermedades como a la industria del sector energético o alimentario, hace que su aprovechamiento a día de hoy, sea un objetivo importante en la lucha por el conocimiento. En muchos casos, los resultados obtenidos en las diferentes investigaciones sobre metabolitos o moléculas activas de algas son bastante alentadores.

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio de la bioactividad de polisacáridos de algas (macro y microalgas) como fuente de posibles nutraceuticos. Para ello se colectaron biomasa de diferentes macroalgas: *Laminaria ochroleuca*, *Gelidium corneum*, y *Porphyra umbilicalis* (Cádiz) y se cultivaron microalgas en fotobioreactores tubulares: *Porphyridium purpureum* y *Euglena gracilis* y se procedió a la extracción de los polisacáridos objeto de estudio.

Tanto en la biomasa como en los polisacáridos extraídos se les realizaron un análisis elemental de CNHS. Se realizó también una caracterización los polisacáridos mediante la espectroscopía FTIR y la cromatografía GC-MS.

Para determinar la bioactividad de los polisacáridos extraídos, se procedió a diversos ensayos: 1) actividad antioxidante, centrándonos en el ensayo ABTS y DPPH, b) ensayos MTT para el estudio de la actividad citotóxica con células gingivales humanas sanas (HGF-1) y líneas celulares tumorales humanas: leucemia humana (U-937 y HL-60), cáncer de mama (MCF-7), cáncer de colon (HTC-116), cáncer del pulmón (NCI-H460) y melanoma humano (G-361), c) citometría de flujo con leucemia humana (HL-60) y d) actividad inmunomoduladora con células de macrófago de ratón (RAW 264.7).

- Los resultados obtenidos de los polisacáridos de algas estudiadas mostraron un potencial uso como nutraceuticos en cuanto a la bioactividad estudiada. Así, los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antioxidante fue adecuada en todos los

polisacáridos, principalmente en los de *L. ochroleuca*. En cuanto a la actividad inmunomoduladora los resultados de los polisacáridos estudiados fueron positivos en todos ellos y en el caso de la actividad citotóxica, los mejores resultados se obtuvieron en los polisacáridos de *E. gracilis* sobre las líneas celulares tumorales MCF-7, NCI-H460, U-937, HL-60 y HTC-116, corroborándose esto con un estudio proteómico realizado con los polisacáridos de dicha alga en la línea celular HGF-1. En dicho análisis se identificaron 5 proteínas claves involucradas en su actividad biológica (AHSG, MYL12B, TMSB10, SOD2 y MT2).

Concluimos que los polisacáridos de las algas estudiadas pueden tener un gran interés para la industria farmacéutica en la elaboración de nuevos nutracéuticos.

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutracéuticos.*

ABSTRACT

ABSTRACT

The use of natural products to combat different pathologies, or to obtain a benefit, in a general way, in human beings is a fact that has been carried out for hundreds of years. Since relatively recently, research has focused on the aquatic environment, mainly the marine environment, to alleviate existing needs.

Algae are organisms capable of synthesizing numerous active molecules thanks to the great diversity of species. This, together with the need to find new alternatives both to deal with different diseases and the industry of the energy or food sector, makes its use today an important objective in the fight for knowledge. In many cases, the results obtained in the different investigations on metabolites or active molecules of algae are quite encouraging.

The main objective of this doctoral thesis is the study of the bioactivity of algae polysaccharides (macro and microalgae) as a source of possible nutraceuticals. For this, biomass of different macroalgae was collected: *Laminaria ochroleuca*, *Gelidium corneum* and *Porphyra umbilicalis* (Cádiz) and microalgae were cultivated in tubular photobioreactors: *Porphyridium purpureum* and *Euglena gracilis*, and the polysaccharides under study were extracted.

Both the biomass and the extracted polysaccharides were subjected to an elemental analysis by CNHS. A characterization of the polysaccharides was also carried out using FTIR spectroscopy and GC-MS chromatography.

To determine the bioactivity of the extracted polysaccharides, various assays were carried out: 1) antioxidant activity, focusing on the ABTS and DPPH assay, b) MTT assays for the study of cytotoxic activity with healthy human gingival cells (HGF-1) and human tumor cell lines: human leukemia (U-937 and HL-60), breast cancer (MCF-7), colon cancer (HTC-116), lung cancer (NCI-H460) and human melanoma (G-361), c) flow cytometry with human leukemia (HL-60) and d) immunomodulatory activity with mouse macrophage cells (RAW 264.7).

The results obtained from the algae polysaccharides studied showed a potential use as nutraceuticals in terms of the bioactivity studied. Thus, the results obtained in the study of antioxidant activity were adequate in all polysaccharides, mainly in those of *L. ochroleuca*. Regarding the immunomodulatory activity, the results of the polysaccharides studied were positive in all of them and in the case of cytotoxic activity, the best results

were obtained in the polysaccharides of *E. gracilis* on the tumor cell lines MCF-7, NCI-H460, U-937, HL-60 and HTC-116, corroborating this with a proteomic study carried out with the polysaccharides of said algae in the HGF-1 cell line. In this analysis, 5 key proteins involved in its biological activity were identified (AHSG, MYL12B, TMSB10, SOD2 and MT2).

We conclude that the polysaccharides from the algae studied may be of great interest to the pharmaceutical industry in the development of new nutraceuticals.

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutracéuticos.*

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo a mi director de Tesis Dr. Roberto T. Abdala Díaz por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral con él y tener la paciencia que ha tenido a lo largo de este camino para poder concluirlo, aunque en algunos momentos han sido bastante tedioso. Siempre confió en mí, incluso cuando los ánimos estaban bajos, y me animó para seguir en esta gran etapa constructiva. He aprendido mucho tanto en lo profesional como en lo personal viendo que, aunque a veces el trabajo nos sobrepasaba se podía sacar paso a paso.

Como no, agradecer siempre el apoyo que he recibido de mis padres, M^a Ángeles y Jesús, que sin ellos esto no hubiese sido posible. Siempre han tenido buenas palabras y han sabido que decir y que hacer para que los ánimos no decayesen. La ayuda ofrecida por mi madre, la Dra. M^a de los Ángeles Arrojo Agudo, en el laboratorio, en la elaboración de artículos, en el cuidado de mis hijos, cuando los ensayos requerían mi presencia en el laboratorio,... ha sido esencial para empezar y acabar este trabajo de investigación. Realmente tengo mucha suerte de tener los padres que tengo.

A mi hermana y mi cuñado, Patricia y Gabriel, que cada vez que tenía problemas con el ordenador, problemas en la descarga de programas, cosa que era frecuentemente, editar correctamente la tesis, y mil cosas más, estaban ahí para ayudarme. Siempre les estaré agradecida.

A mi marido, Gonzalo, que, aunque vemos las cosas de diferente forma, y esto a veces causaba cierta tensión, me apoyó, a su manera, en la realización de este trabajo de investigación y comprendió que esto era importante para mí.

A mis hijos Jorge y Nuria, que, aunque son aún pequeños para comprender que es eso de una Tesis Doctoral, siempre me han ayudado. Sabían que, cuando me sentaba a trabajar con el ordenador, no debían interrumpirme continuamente con preguntas que no venían al caso y entendían que en algunos momentos no podía estar con ellos tanto como nos hubiese gustado. Han sido unos verdaderos campeones.

A mi tía Montse, que, con nuestras largas charlas de risas, y a veces llantos, me ha ayudado a seguir adelante en todo momento, me has dado fuerzas, siempre confiado en mí y sabiendo que conseguiré todo aquello que me proponga.

A mis compañeros de departamento, en especial a Félix y Julia. Ellos me ayudaron cuando tenía dudas en la realización de los ensayos y compartimos charlas, de vez en

cuando, cuando el trabajo nos lo permitía. Y en general a todo el departamento por acogerme en este camino que está a punto de terminar.

A las chicas y chicos que me ayudaron y me enseñaron en el laboratorio de cultivo celular del SCAI, que siendo de otros departamentos, siempre hubo una relación muy cercana y cordial. En especial quiero agradecer esto a Laura, Paloma, José, Mary, Alba, Clara, Patricia, Juan y como no, a la responsable de esta área, Auxi por sus charlas de ánimo, amabilidad y ayuda.

A Lara, que, aunque no he trabajado con ella, siempre tuvo palabras de ánimo y apoyo en esta carrera de fondo en el que, a día de hoy, voy viendo la meta.

A Casimiro, por su gran ayuda y profesionalidad. Siempre estuvo para echarme una mano en todo lo que necesitaba, con una sonrisa en la cara, y me brindaste la posibilidad de trabajar contigo. Eres una gran persona y gran profesional.

No podía olvidarme de una gran amiga, ya Doctora, Geovanna Parra, que incluso en la distancia me dabas fuerzas para continuar. Ha sido un placer conocerte y poder trabajar a tu lado el tiempo que estuviste, en tu estancia, en nuestro departamento. Eres un gran ejemplo a seguir. Espero de corazón que todo te vaya muy bien.

Finalmente, y no por ello menos agradecida, quería agradecer a la Prof. Dra. Claudia Pérez Manrique por todo lo que me ha ayudado. En este caso, las videoconferencias y el WhatsApp han hecho posible que hayamos podido continuar nuestro contacto, que comenzó con una pequeña estancia suya en Málaga en 2017, y aún continúa. Has sido un gran apoyo, siempre has estado para ayudarme, fuese la hora que fuese, siempre me contestabas. Espero que nos volvamos a ver. Te deseo lo mejor.

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutracéuticos.*

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- α -CHCA:** Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (*α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*)
- AA%:** Porcentaje de actividad antioxidante (*Percentage scavenging activity*)
- Abs:** Absorbancia (*Absorbance*)
- ABTS:** 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid*)
- AC-EPS:** Exopolisacáridos ácidos (*Acidic exopolysaccharides*)
- AC-AT EPS:** Exopolisacáridos ácidos de cultivo autotrófico (*Acidic exopolysaccharides from autotrophic culture*)
- AC-HT EPS:** Exopolisacáridos ácidos de cultivo heterotrófico (*Acidic exopolysaccharides from heterotrophic culture*)
- AE:** Agricultura Ecológica
- AHSG:** Proteína Alfa-2-HS-glicoproteína (*Alpha-2-HS-glycoprotein*)
- AIE:** Agencia Internacional de la Energía
- ANOVA:** Análisis de la varianza (*Analysis of variance*)
- APC:** Aloficocianina (*Allophycocyanin*)
- Api:** Apiosa (*Apiose*)
- Arb:** Arabinosa (*Arabinose*)
- ATCC:** American Type Culture Collection
- BALB/c:** Cepa de ratón común albina de laboratorio
- BHT:** Butilhidroxitolueno (*Butylhydroxytoluene*)
- B-PE:** Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)
- CaCl₂:** Cloruro cálcico (*Calcium chloride*)
- Cetavlon:** Bromuro de O-N-cetilpiridinio (*O-N-cetylpyridinium bromide*)
- CEN/TC 454:** Comité Europeo de Normalización “*Algae and algae products*”
- CG-MS:** Cromatografía de gases-espectrometría de masas (*Gas chromatography-mass spectrometry*)
- Chl a:** Clorofila a
- C:N:** Relación estequiométrica entre Carbono y Nitrógeno
- CO:** Monóxido de carbono
- CO₂:** Dióxido de carbono
- CTN 319:** Comité Técnico de Normalización “*Algas y productos derivados de algas*”
- DHB:** Ácido 2,5-dihidroxi benzoico (*2,5-dihydroxybenzoic acid*)
- DMEN:** Dulbecco's modified Eagle's medium
- DMSO:** Dimetilsulfóxido (Dimethyl Sulfoxide)
- DPPH:** 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)
- DW:** Peso seco (*Dry weight*)

- EDTA:** Ácido etilendiaminetetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- EFSA:** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- EgPs:** Polisacáridos de *Euglena gracilis* (Polysaccharides from *Euglena gracilis*)
- EPA:** Ácido eicosapentatoico
- EPS:** Exopolisacáridos (*Exopolysaccharides*)
- EtOH:** Etanol (*ethanol*)
- EU:** Unidad de endotoxinas (*Endotoxin Units*)
- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ONUAA, o más conocida como FAO
- FBS:** Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)
- FCS:** Suero fetal de ternera (Fetal calf serum)
- FDR:** Tasa de descubrimiento falso (*False discovery rate*)
- FT-IR:** Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*)
- Fuc:** Fucosa (*Fucose*)
- G-361:** Línea celular de melanoma maligno humano (Human malignant melanoma cell line)
- Gal:** Galactosa (*Galactose*)
- Glc:** Glucosa (*Glucose*)
- Glc-A:** Ácido glucurónico (*Glucuronic acid*)
- H:** Hidrógeno elemental
- HCl:** Ácido clorhídrico (*Hydrochloric acid*)
- HGF-1:** Línea celular fibroblastos gingivales (*Gingival fibroblast cell line*)
- HL-60:** Línea celular de leucemia humana (leucemia promielocítica aguda) (*Human leukemia cell line (Acute promyelocytic leukemia)*)
- H₂O:** Agua
- H₂SO₄:** Ácido sulfúrico (*Sulfuric acid*)
- HTC-116:** Línea celular de cáncer de colon humano (Human colon cancer cell line)
- HT-EPS:** Exopolisacáridos de cultivos heterotróficos (*Heterotrophic EPS*)
- IC₅₀:** Concentración necesaria para producir una inhibición del 50% (*Half maximal inhibitory concentration*)
- IL-6:** Interleucina 6 (*Interleukin 6*)
- i.p.:** administración intraperitonea (*Intraperitoneal administration*)
- IR:** Infrarrojo
- JACUMAR:** Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
- KBr:** Bromuro de potasio

- LAL:** Lisado de amebocitos de *Limulus* (*Limulus ameocyte lysate*)
- LINKFISH:** Investigar el vínculo entre los hábitats de algas sublitorales y las comunidades de peces en el Mar Mediterráneo (Investigating the link between sub-littoral algae habitats and fish communities in the Mediterranean Sea)
- LPS:** Lipopolisacáridos (*Lipopolysaccharides*)
- Mann:** Manosa (*Mannose*)
- MCF-7:** Línea celular humana de adenocarcinoma de mama (*Breast adenocarcinoma human cell line*)
- MeOH:** Metanol (*Methanol*)
- MS/MS:** Espectrometría de masas en tándem
- MT2:** Metalotioneína-2 (*Metallothionein-2*)
- MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*)
- MYL12B:** Cadena ligera reguladora de miosina 12B (*Myosin regulatory light chain 12B*)
- N:** Nitrógeno elemental
- N₂:** Nitrógeno molecular
- N₁ y N₂:** Densidad celular (*Cell density*)
- NaCl:** Cloruro sódico
- NCI-H460:** Línea celular humana de cáncer de pulmón (*Lung cancer cell line*)
- NO_x:** Óxidos de nitrógeno
- N-Prot factor:** Factor de conversión del contenido en nitrógeno en contenido en proteínas
- O:** Oxígeno elemental
- PB:** Tampón fosfato (*Phosphate Buffer*)
- PBS:** Solución salina tamponada con fosfato (*Phosphate buffered saline*)
- PcSPs:** Polisacáridos sulfatados de *Porphyridium purpureum* (*Sulfated polysaccharides from Porphyridium cruentum*)
- PMA:** forbol-12-miristato-13-acetato (*phorbol-12-myristate-13-acetate*)
- PSM:** Coincidencias espectrales de péptidos (*Peptide spectral matches*)
- PVPP:** Polivinilpirrolidona (*Polyvinylpyrrolidone*)
- RAW 264.7:** Línea celular de macrófago murino (*Murine macrophage cell line*)
- Rha:** Ramnosa (*Rhamnose*)
- Rib:** Ribosa (*Ribose*)
- RNase-A:** Enzima ribonucleasa pancreática bovina A (Bovine pancreatic ribonuclease A enzyme)
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*)
- R-PC:** Ficocianina (*Phycocyanin*)
- RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium

- S:** Azufre elemental
- SD:** Desviación estandar (*Standard Deviations*)
- SEM:** Error estandar de la media (*Standard error of the mean*)
- SO₂:** Dióxido de azufre
- SOD2:** Superóxido dismutasa -2 (*Superoxide dismutase -2*)
- TA50:** Acetonitrilo al 50% (v/v), ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) en agua destilada (*50% (v/v) acetonitrile, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in distilled water*)
- TC:** Carbono total
- T-AT EPS:** Exopolisacáridos totales de cultivo autotrófico (*Total exopolysaccharides from autotrophic culture*)
- TCD:** Sensor de la conductividad térmica diferencial (*Differential thermal conductivity sensor*)
- TE:** Equivalente trolox
- TEAB:** Tampón de bicarbonato de trietilamonio (*Triethylammonium bicarbonate buffer*)
- T-EPS:** Exopolisacáridos totales (*Total exopolysaccharides*)
- THP-1:** Monocitos humanos (*Human monocytes cell*)
- T-HT EPS:** Exopolisacáridos totales de cultivo heterotrófico (*Total exopolysaccharides from heterotrophic culture*)
- TMS:** Trimetilsililo (*Trimethylsilyl*)
- TMSB10:** Timosina beta-10 (*Thymosin beta-10*)
- TMT:** Etiqueta de masa en tándem (*Tandem Mass Tag*)
- TN:** Nitrógeno total
- TNF- α :** Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor alpha*)
- TP:** Tampón fosfato (*Phosphate buffer*)
- TPH:** Hidrocarburos totales de petróleo
- U-937:** Línea celular de leucemia humana (*Human leukemia cell line*)
- UV:** Radiación ultravioleta
- V:** Volumen (*Volume*)
- VEH:** Solución de vehículo salino (*Saline vehicle solution*)
- W:** Peso (*Weight*)
- WBCs:** Leucocitos (*White blood cells*)
- Xyl:** Xilosa (*Xylose*)

* Se respeta la nomenclatura en inglés que está en las publicaciones.

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutracéuticos.*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Algas

Las algas son organismos que pertenecen al reino Protista, es decir, aquel que agrupa a los organismos que no pueden ser considerados animales, plantas, hongos o bacterias. Y es que, aunque son popularmente conocidas como las "plantas del mar", no se puede identificar a las algas con los vegetales, ya que no presentan todas sus características y funciones, sin embargo, poseen los mismos ciclos naturales que las plantas terrestres. Se consideran auténticas verduras de mar, formadas por células fotosintéticas eucariotas o procariotas, unicelulares o pluricelulares. Son cosmopolitas y viven prácticamente en todos los medios, aunque están relacionadas fundamentalmente con el medio acuático. Se desarrollan también en ambientes variados y extremos como el suelo, la nieve o el hielo, sobre otros vegetales y diferentes ambientes acuícolas. Estas son tan abundantes que, generalizando, se puede afirmar que, en los ecosistemas acuáticos, las algas son los principales productores primarios y la base de la cadena trófica.

De las algas y otras especies marinas se obtienen gran cantidad de productos beneficiosos. Hasta la fecha, se han aislado miles de ellos de fuentes marinas, y cada año se descubren cientos de compuestos nuevos y se depositan en bases de datos como MarinLit (una base de datos de productos y literatura marinas naturales; disponible en <https://pubs.rsc.org/marinlit/>). Entre la amplia variedad de vida marina, aproximadamente el 90% de las especies de flora marina son algas, que son responsables de aproximadamente el 50% de la fotosíntesis global (John 1994).

1.1. Clases de algas

Las algas forman uno de los grupos de seres vivos más amplios y versátiles en términos de tamaño, forma y función ecológica (Vonshak 1986), es por ello que existen diversos criterios de clasificación de las algas: a nivel citológico, características fotoquímicas, tipos de sustancias de reserva o composición de la pared celular, estructura celular de las algas, tipos de reproducción. (2019).

Uno de los criterios más sencillos para realizar la clasificación, es en función de la complejidad dividiéndolas en: macroalgas o algas pluricelulares y microalgas o algas unicelulares. Otro es en función de los pigmentos que poseen: algas pardas (Phaeophyceae), algas rojas (Rhodophyceae) y algas verdes (Chlorophyceae).

1.1.1. Macroalgas

Son organismos pluricelulares capaces de realizar la fotosíntesis. A pesar de su gran variedad, poseen unas estructuras morfológicas comunes muy simples conocidas como talos, que tan solo da soporte al alga, filoides, donde se produce la absorción de los nutrientes que se encuentran en el ambiente, como minerales, y es donde se realiza la fotosíntesis, y rizoides, como estructura de fijación al sustrato. El tamaño es muy variable pudiendo medir desde 1cm como *Prasiola crista* a incluso más de 50 metros como *Macrocystis pyrifera*.

Las macroalgas tienen gran importancia en los ecosistemas acuáticos pues su principal función es la producción primaria. Son productoras de oxígeno por la realización de la fotosíntesis, al igual que las plantas y microalgas, evita la erosión de los fondos marinos y son refugio de pequeños peces e invertebrados así como soporte de huevos de diversas especies como se pudo observar en el proyecto LINKFISH (Investigating the link between sub-littoral algae habitats and fish communities in the Mediterranean Sea) (Instituto Español de Oceanografía 2015). De ellas además obtenemos beneficios directos para los humanos pues poseen altas propiedades nutricionales, nutracéuticas y medicinales (Ito and Hori 1989; Rupérez et al. 2013; Hamed et al. 2015; Cunha and Grenha 2016; Tanna and Mishra 2018).

Las macroalgas comúnmente han sido clasificadas en (Mansilla and Alveal 2004):

- Algas pardas o feofíceas (Phaeophyceae) son las de mayor tamaño, existen unas 1500 especies. Las más usadas comercialmente son *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida* y *Sargassum fusiforme*.
- Algas rojas o rodofíceas (Rhodophyceae) con las de 3000 especies. Las más usadas comercialmente son *Porphyra spp.*, *Eucheuma spp.*, *Kappaphycus alvarezii* y *Gracilaria spp.*

Algas verdes o clorofíceas (Chlorophyceae) suman unas 6000 a 7000 especies. Las más usadas comercialmente son *Enteromorpha clathrata*, *Monostroma nitidum*, *Caulerpa spp.* y *Ulva sp.*

1.1.2. Microalgas

Son organismos unicelulares microscópicos (2-200µm), polifilético, su metabolismo puede ser heterótrofo o autótrofo y suelen ser eucariontes, aunque las cianobacterias

procariontes son incluidas como microalgas (Greenwell et al. 2010). Son responsables de la producción anual de 52.000 millones de toneladas de carbono orgánico, lo que significa un 50% del carbono total fijado (Field et al. 1998). Crecen en una amplia gama de ambientes, desde acuáticos como agua dulce, salada y aguas residuales, hasta en el suelo y en el microhábitat de la rizosfera vegetal (Andrade et al. 2021). Requieren fuentes de carbono, luz, nutrientes y una temperatura apropiada para su total desarrollo. Su tasa de crecimiento es mucho mayor que el de las plantas con una eficiencia fotosintética muy superior pues carecen de raíces y estructuras de elevado tamaño (Mata et al. 2010; Acien et al. 2017). Su biodiversidad es grande; hay especies que viven en agua dulce como *Chlorella vulgaris* o *Euglena gracilis*, otras en aguas saladas como *Nannochloropsis oculata*. Comprenden más de 30.000 especies muy heterogéneas, pero gracias a técnicas de microscopía electrónica y técnicas de biología molecular se han podido establecer relaciones filogenéticas entre las distintas clases de microalgas, pudiendo clasificarlas en cianobacterias (organismos procariontes, como *Spirulina sp.*, *Nostoc sp.* o *Microcystis sp.*) y algas eucariotas (como *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta), *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta)).

Tabla 1: Clasificación de las algas según su pigmento.

	CLOROFICEAS	FEOFICEAS	RODOFICEAS
PARED CELULAR	Celulosa, pectina, xilano, manano	Celulosa, pectina, ficocoloides	Celulosa, pectina, xilano, galactanos
PIGMENTOS	Clorofila a y b, carotenoides	Clorofila a y c, carotenoides, β -caroteno y fucoxantina	Clorofila a y d. Ficobiliproteínas y carotenoides
TIPOS DE CLOROPLASTOS	1 o 2 forma de taza, banda, anillo abierto. Discoidales, pequeños y numerosos	1 o más alargados, cinta, red, laminados, irregulares, estrellados Discoidales, pequeños y numerosos.	Discoidales, pequeños, irregulares, numerosos, banda.
SUSTANCIA DE RESERVA	Almidón, grasas	Laminaria y D-manitol, grasa, aceite, vesículas de fucosano	Almidón de florídeas, manitol. Fitostroles
TIPO DE CRECIMIENTO	Apical Hetetotrico	Intercalar, apical heterotrico, tricotático	Apical, uniaxial y multiaxial
NIVEL DE ORGANIZACIÓN	Unicelular, multicelular, colonia o cenobio, filamentoso ramificado	Filamentoso uniseriado	Unicelular, multicelular, filamentoso ramificado o sin ramificar y folioso.
REPRODUCCIÓN	Asexual vegetativa por fragmentación o sexual por ciclo haploide o haploide/diploide	Vegetativa por fragmentación o sexual por alternancia de generaciones isomorfas	Vegetativa por fragmentación, monosperas, aplanosporas o sexual por oogamia, singamia o meiosis
HABITAT	Dulceacuícola (80%) y marino (40%)	Marino (99,9%) y dulceacuícola (0,1%)	Marino (96%) y dulceacuícola (4%)
IMPORTANCIA ECONÓMICA Y BIOLÓGICA	Fotosíntesis, ficobiontes, disminución de oxígeno en agua	Productores primarios, sustrato para animales y uso para fertilizantes.	Alimentos, detritos, industria.

Se muestran los tres pigmentos en los cuales se pueden clasificar las algas, y sus características: pared celular, pigmento, tipos de cloroplastos, sustancia de reserva, tipo de crecimiento, nivel de organización, reproducción, hábitat e importancia económica y biológica.

1.2. Tecnología y cultivo de algas.

Debido al aumento de la población mundial, a la creciente escasez de tierra apta para el cultivo, a la falta de agua para el riego de las plantaciones y al impacto del cambio climático, el cual ha variado los períodos de lluvia en el planeta, la alimentación se ha

vuelto un tema importante a tratar para la población mundial. Además, se espera que la población aumente en alrededor de 2 mil millones de personas en los próximos 30 años, llegándose a 9,7 mil millones en 2050 según el Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas, 2019, por lo que, en comparación con 2010, el mundo necesitará un 56% más de alimentos para 2050 (WRI 2018-2019 Annual Report 2019). Esto debe hacerse sin utilizar más tierra y reduciendo las emisiones. Se argumenta que una disminución de proteínas animales es una opción buena para alcanzar una cadena de suministro de alimentos sostenible en el futuro. Algunas algas son ricas en proteínas, llegando incluso a un 47% de proteína (peso seco) (Černá 2011). Los lechos de algas además, pueden ser varias veces mayor que la de los sistemas terrestres por lo que convierte a las algas en una fuente prometedora de proteínas vegetales (Leigh et al. 1987). Las algas contienen otros compuestos interesantes desde el punto de vista alimenticio como altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, minerales, ... Es por ello que, gobiernos de muchos países e investigadores tenga un mayor interés en los recursos que nos ofrecen los sistemas acuáticos especialmente el medio marino, como es el cultivo de las algas.

1.2.1. Tecnología y cultivo de macroalgas

El cultivo de algas en el mar está demostrando ser una alternativa de producción de biomasa cada vez más competitiva para alimentos y usos relacionados. Tanto es así, que esta ha aumentado exponencialmente en los últimos años (Radulovich et al. 2015). Supone el 24% de la acuicultura marina mundial. La producción mundial de algas se multiplicó por mil entre 1950 y 2019, pasando de 34.700 toneladas a 34,7 millones de toneladas (FAO 2021). En 2019, en términos de volumen (medido en peso húmedo), las algas rojas y las algas pardas fueron el segundo y tercer grupo, respectivamente, de especies más importantes de la acuicultura mundial, sin embargo, el cultivo de algas verdes se ha visto reducido y con una tendencia descendente desde principios de la década de 1990. Las estadísticas de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ONUAA, o más conocida como FAO) registraron 42 países o territorios con una producción de cultivo de algas marinas nada despreciable en 2019, sin embargo China, Indonesia, República de Corea, Filipinas y República Popular Democrática de Corea representaron el 98% (Ipacuicultura. 2021).

La existencia de vastas áreas marinas aptas para el cultivo de algas hace que los defensores de las algas imaginen una próxima revolución de las algas como así se indica en el manifiesto “Seaweed revolution a manifesto for a sustainable future” (Doumeizel et al. 2020).

Existen distintas formas de cultivo de las macroalgas y esto dependerá del tipo de especie que se quiera cultivar. Los principales métodos son:

- Cultivo directo al mar: se lleva a cabo con macroalgas que se desarrollen mediante la propagación vegetativa, como *Eucheuma sp.*, *Sargassum sp.*, *Gracilaria sp.* o *Caulerpa sp.*, de tal forma que, fragmentos de estas son enganchadas a una cuerda de material sintético, en posición vertical u horizontal según la especie, quedando flotando o sumergidas donde reciben los nutrientes, sin necesidad de uso de fertilizantes, y la luz solar necesaria para su total desarrollo. Estas cuerdas quedan sujetas a un sistema de anclaje y de flotación. Las líneas de algas han de ser monitorizadas mensualmente. Cumplen además la función de limpieza de impurezas del agua, realizan la fotosíntesis y crean un ecosistema en torno a ellas. En este sistema tenemos dos variantes:

- Sistema suspendido o long-line: La línea principal o madre se encuentra suspendida de forma horizontal sobre la superficie o a una determinada profundidad. Esta se encuentra unida a unos cabos y a unos sistemas de anclajes normalmente hormigón llamado “muerto”. La longitud de esta línea suele ser de unos 100 metros.

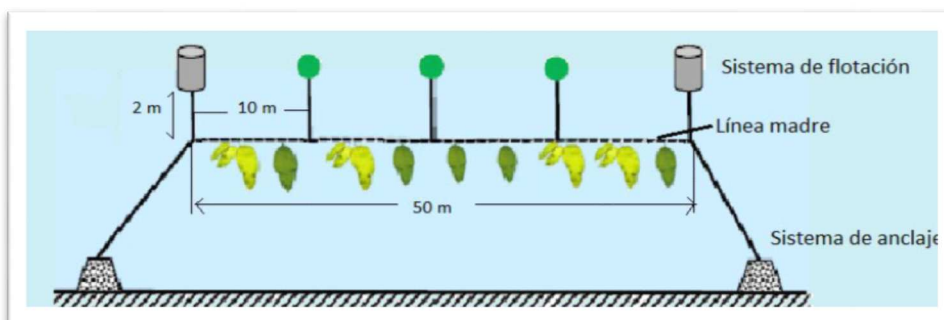


Figura 1: Esquema de un sistema de cultivo suspendido o long-line de macroalgas.

(Fuente: Agrotendencia.tv)



Imagen 1: Sistema cultivo de fondo de algas. (Fuente: Agrotendencia.tv)

- Sistema de cultivo de fondo: No necesita estructuras externas, simplemente se siembra directamente en el sustrato en sistemas intermareales o submareales.



Imagen 2: Sistema cultivo de fondo de algas. (Fuente: Agrotendencia.tv)

- Cultivo mixto mar-centro de cultivo: Tanto el desarrollo como la recolección se realiza en el mar, pero la semilla y la siembra se realiza en el laboratorio, es por ello que este método necesita de personas cualificadas y mucho trabajo. Este método se usa por ejemplo en *Porphyra sp.*, *Laminaria sp.*, *Undaria sp.*, *Monostroma sp.* y *Gracilaria sp.*

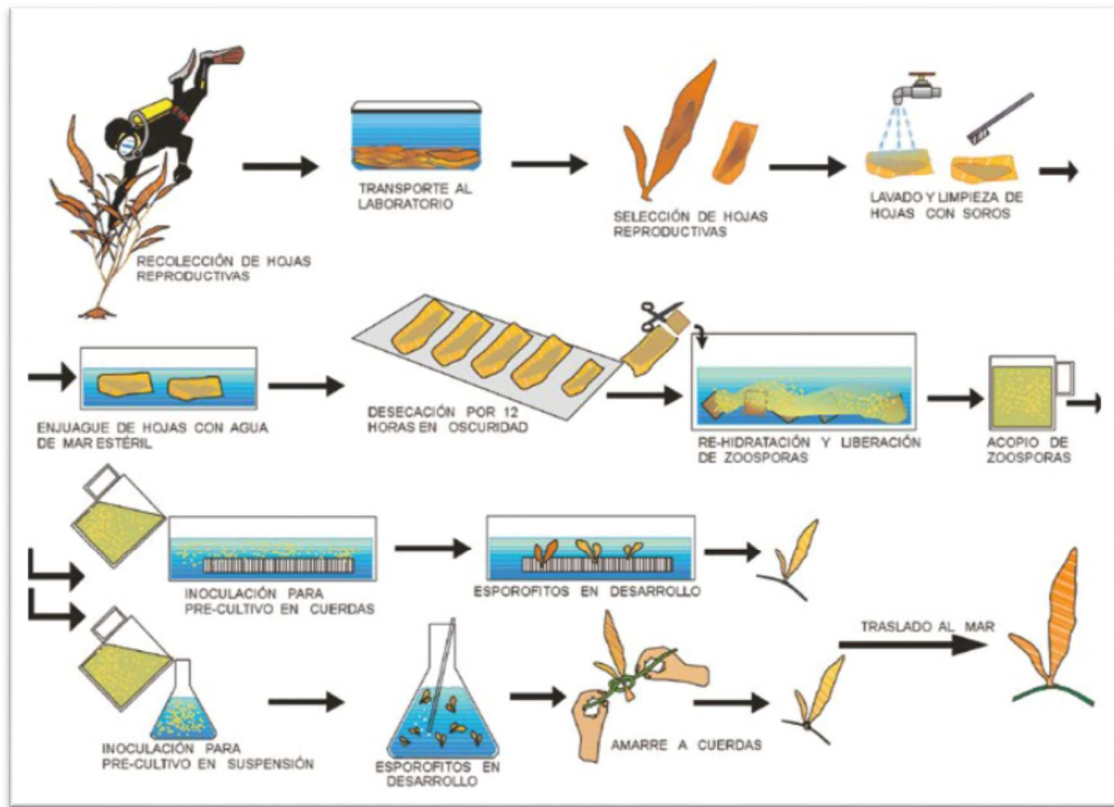


Figura 2: Resumen esquemático del procedimiento de producción de macroalgas pardas en laboratorios (Fuente: Ávila et al 2010).

- Cultivo tierra adentro: Todo el proceso se realiza en las instalaciones en tierra, de esta manera se controlan todas las variables. Esto conlleva mucho más trabajo, inversión y expertos que los anteriores métodos.



Imagen 3: Cultivo de algas tierra adentro. (Fuente: Agrotendencia.tv)

En España existe una clara diferencia en el desarrollo normativo según las diferentes Comunidades Autónomas con respecto a la explotación de las macroalgas, siendo Galicia, la que presenta mayor normativa al respecto, donde sí se nombra y se regulan específicamente las macroalgas, debido a la mayor explotación de diferentes especies de macroalgas. En el caso de Andalucía, al ser la explotación mucho más escasa, el marco normativo, en cuanto a la regulación de la explotación de macroalgas, también lo es, limitándose tan solo a las leyes generales de pesca marítima, medioambiente o acuicultura. En cuanto al cultivo de macroalgas (ficocultura) no existe de momento una legislación específica según el informe “Elaboración de indicadores de sostenibilidad para la explotación de macroalgas en España” (Cremades Ugarte et al. 2016) que indica que “se incluye de manera general en las diferentes reglamentaciones que cada Comunidad Autónoma ha establecido para el desarrollo de la actividad acuícola y que a modo de resumen, se encuentran reflejadas en el documento “Gobernanza en la Acuicultura Española 2013” editado por la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. En este documento se describe extensamente el marco político y la reglamentación general para la acuicultura en España en sus diferentes regiones.

1.2.2. Tecnología y cultivo de microalgas

El empleo de las microalgas como alimento se retoma al siglo XVI, cuando los aztecas recolectaban probablemente cianobacterias en el lago Texoco para la elaboración de panecillos. Más recientemente en 1890 se consiguió aislar y mantener de forma axénicas *Chlorella vulgaris*, pero no fue hasta 1940 cuando realmente comenzaron los estudios más específicos de fisiología y bioquímica de estos microorganismos teniendo el origen de la producción de microalgas a gran escala, usando diatomeas, en Alemania. En 1960, se comenzó a comercializar a gran escala *Chlorella sp.* en Japón, en 1970 *Spirulina sp.* en México y en 1977 también *Spirulina sp.* en Tailandia. A principios de los 80, el cultivo y el comercio a gran escala principalmente en Asia, de *Chlorella sp.*, superaban los 1000 kg de microalga al mes, en 46 fábricas. En 1986, *Dunaliella salina* se sumó al cultivo a gran escala principalmente por su contenido en β -carotenos, implantándose plantas de producción en Australia, Estados Unidos e Israel. Hasta el día de hoy, las instalaciones plantas de producción y comercialización de microalgas siguen en expansión debido a su fuente nutricional y energética. Según las estadísticas de la

FAO, en 2019, se obtuvo una producción mundial de microalgas de 56.456 toneladas abastecidas principalmente por 56.208 toneladas de *Spirulina sp.* (*Arthrospira sp.*), cultivada en diez países (China, Chile, Francia, Grecia, Túnez, Burkinafaso, República Centroafricana, República de Chad, Bulgaria y España) y cuatro microalgas verdes (*Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris*, *Tetraselmis spp.* y *Dunaliella salina*) con un total de 248 toneladas, cultivadas en cuatro países (China, Chile, Francia y España) (Cai et al. 2021). Actualmente existen más de 30.000 especies de microalgas catalogadas, sin embargo menos 100 se han estudiado y no más de 10 cepas son utilizadas para explotación comercial (Acien et al. 2017).

Antes de pensar en el sistema de cultivo a usar, es imprescindible elegir una zona con las características adecuadas para instalar la planta de producción según el destino del uso de la biomasa y el tipo de microalga a cultivar. La composición de macronutrientes, es decir, lípidos, proteínas y carbohidratos de la biomasa de microalgas producida, se ve afectada por las variaciones de las condiciones ambientales y culturales, como la intensidad de la luz, la temperatura, el dióxido de carbono, la composición de nutrientes del medio de cultivo y el pH (Li et al. 2012; Zhu et al. 2015; Andrade et al. 2016; Metsoviti et al. 2019; Papapolymerou et al. 2019; Guzmán et al. 2021). Entre los factores ambientales, la luz y la temperatura son dos de los más importantes que afectan el crecimiento de las algas y la producción de biomasa (Li et al. 2012). La temperatura óptima y los requisitos de luz varían entre las diferentes especies de algas.

De manera general podemos clasificar los métodos de cultivos en dos, sistemas cerrados y sistemas abiertos. La diferencia fundamental entre ellos es que, en los sistemas cerrados las condiciones de cultivo están mucho más controladas, con un menor riesgo de contaminación, a cambio de costes más cuantiosos, es por ello que se usan principalmente con cepas de microalgas que contienen compuestos valiosos y con un valor de retorno que les permita asumir los costes derivados de su cultivo. En el caso de los sistemas abiertos priman la economía aceptando un menor control del entorno pues son más susceptibles a contaminaciones por otras algas o bacterias (Fernandez Sevilla 2014). La productividad y la eficiencia suelen ser menores en los sistemas abiertos si lo comparamos con los cerrados. Sin embargo, lo principal en todo cultivo de microalgas, ya sean en sistemas abiertos como cerrados, es que se deben usar los medios de cultivo que contengan todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la reproducción de las microalgas.

- **Sistemas o fotobiorreactores abiertos:** Pueden ser naturales (estanques, lagunas o lagos) o artificiales (Open Ponds, Tanques circulares o Raceways), siendo necesario una fuente de luz, agua y CO₂.
- **Open-Ponds:** son balsas de agua con una determinada profundidad donde las microalgas crecen sin ningún tipo de mezclado, por tanto, no es considerado como un fotobiorreactor estricto pues no hay manipulación de las condiciones naturales. Los costes de operación son muy bajos pero tiene un crecimiento escaso (Posten 2009). Este tipo de sistemas se usan para microalgas extremófilas, es decir, capaces de sobrevivir en condiciones extremas, como *Dunaliella sp.*

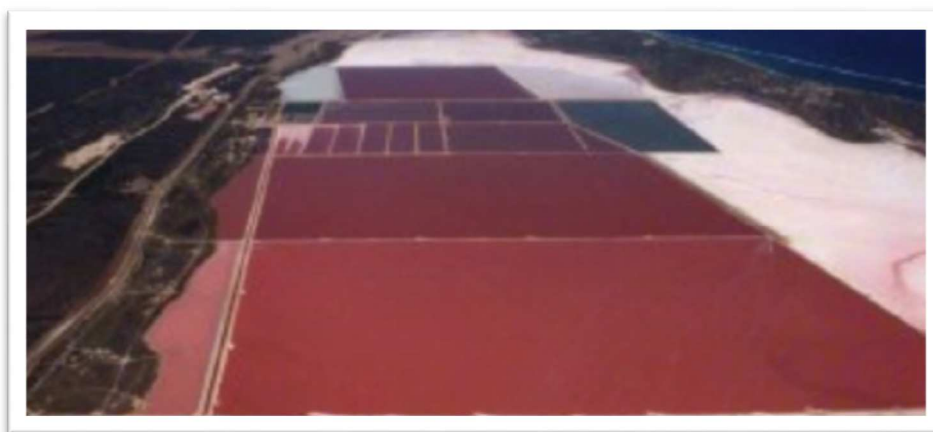


Imagen 4: Sistema de “Open Ponds”. (Fuente: <https://w3.ual.es/>)

- **Tanques circulares:** Este sistema tiene algunos inconvenientes, como la superficie que ocupa, el elevado coste en la construcción y su alto consumo de energía debido a que la agitación se produce gracias a una pala que gira recorriendo toda la superficie. A pesar de esto, es uno de los sistemas más usados en Indonesia, Japón y Taiwán para la producción de *Chlorella sp.* (Lee 2001).



Imagen 5: Sistema de cultivo en estanques circulares de *Chlorella sp.* en Yaeyama en la isla de Okinawa, sur de Japón. (Fuente: Imen Hamed, 2016).

- Raceways: Son canales ovalados en un circuito cerrado y poco profundos donde el cultivo circula y se mezcla, para favorecer el crecimiento y producción de las microalgas, mediante palas, inyectoras de aire, hélices, de manera que es un sistema más sofisticado. La productividad no es muy alta, aunque si es mayor que en el caso de las balsas.



Imagen 6: Sistema de cultivo de microalgas en raceways. (Fuente: Guzmán J.L. et al, 2021)

- Sistemas o fotobiorreactores cerrados: A diferencia de los sistemas abiertos, en los cerrados existe una barrera física entre el cultivo de microalgas y el entorno que los rodea y permite un mejor control de las variables. Además, el cultivo está

menos expuesto a contaminación externa. En el mercado encontramos diferentes tipos de fotobiorreactores cerrados entre los que destacan:

- *Tubulares*: Son los más extendidos a nivel comercial. Consta de dos partes, una columna de burbujeo donde se produce el proceso de aireación y control de la temperatura, y un lazo o receptor solar por donde circula las microalgas mediante una bomba de impulsión (Guzmán et al. 2021).



Imagen 7: Fotobiorreactores cerrado tipo tubular. (Fuente: Guzmán J.L. et al, 2021)

- *Planos*: En ellos los cultivos quedan dispuestos entre dos láminas de un material transparente verticales o inclinados orientada de manera que la luz incida directamente sobre ellas. Suelen tener un sistema de aireación, aunque a veces es por una bomba e incluso algunos también llevan un sistema de refrigeración (Acien Fernández et al. 2013).



Imagen 8: Fotobiorreactor cerrado plano (Fuente: Acien et al., 2013)

- Columnas: Son fotobiorreactores tubulares consistentes en columnas verticales de material transparente cuyo radio oscila entre 5 y 50 cm y la altura normalmente entre 1 y 4 m. La aireación se realiza por la inyección de aire rico en CO₂ desde el fondo de la columna. El problema de este sistema es que al estar en posición vertical no son buenas captadoras de luz, especialmente a mediodía, que es precisamente cuando la radiación solar es máxima.



Imagen 9: Fotobiorreactores tubulares. (Fuente: <https://www.energetica21.com/>)

- Bolsas de plástico: Es el sistema más económico, pero tiene una vida útil muy corta pues entre otros problemas aparece la biopelícula rápidamente esto hace que su uso a gran escala resulta muy caro. Es fácil sin embargo poner en marcha y su instalación es rápida. Consiste en suspender una bolsa de plástico con una sonda de alimentación de CO₂ y en cuyo interior se encuentra el cultivo de microalgas.

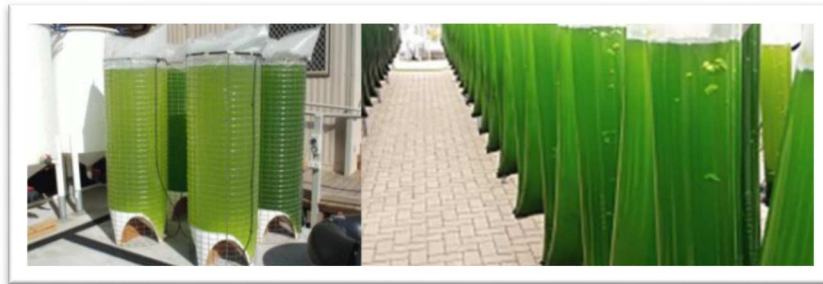


Imagen 10: Cultivo de microalgas en bolsas de plástico. (Fuente: Archivo digital UPM)

Tal y como expone Acien et al., (2017) “la producción de microalgas es un proceso complejo que debe ser adecuadamente planeado y realizado, siendo las principales etapas las siguientes: 1) preparación del medio de cultivo; 2) producción de biomasa en fotobiorreactores; 3) cosechado de la biomasa; 4) tratamiento de aguas para recirculación o vertido; y 5) estabilización de la biomasa o su transformación en productos finales” (Acien et al. 2017). Todas ellas tienen un papel importante dentro del proceso productivo. Sin embargo, la producción de biomasa en los fotobiorreactores es la más compleja y relevante debido a la gran cantidad de factores que afectan a la operación del sistema, y donde el control de procesos juega un papel fundamental para conseguir maximizar dicha producción.

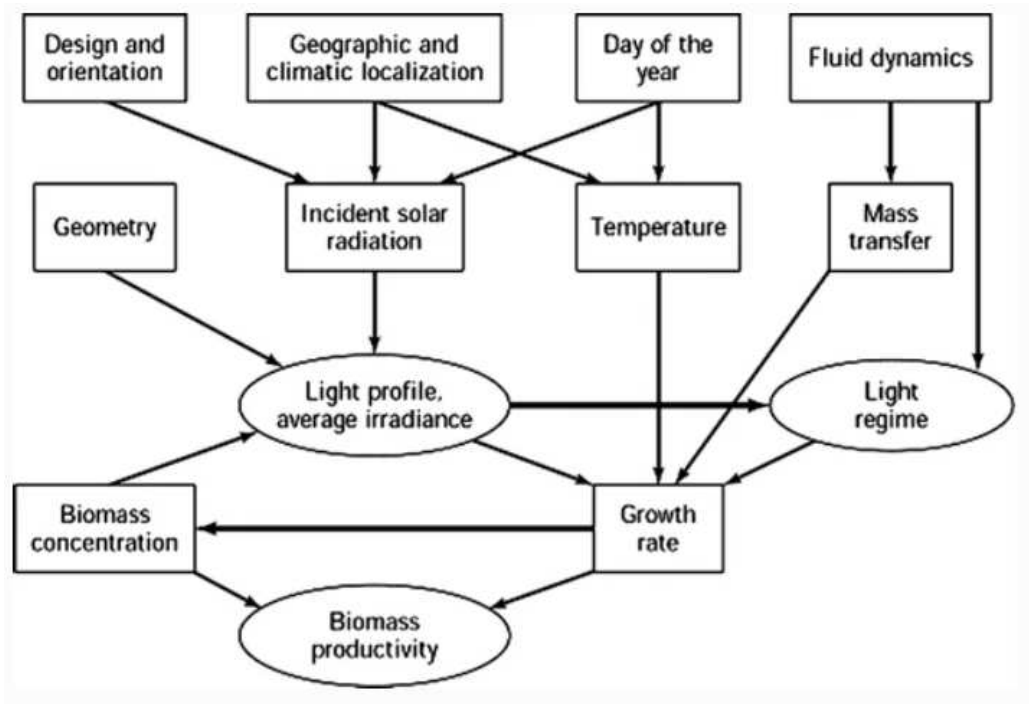


Figura 3: Relación entre los principales factores que influyen en la productividad de la biomasa de cultivos en masa de microalgas (Fuente: de Molina Grima, 1999).

Por las características fisiológicas y nutrición las microalgas se pueden desarrollar en distintas condiciones tróficas como fotoautotróficas, heterotróficas y mixotróficas, diferenciándose por el tipo de energía y la fuente de carbono a utilizar (Velea et al. 2017).

✓ Cultivo fotoautotrófico de microalgas:

Este tipo de cultivo ha sido el más usado desde la década de 1960 para el crecimiento de estas a nivel comercial (Chew et al. 2018). En él, las microalgas gracias a la fotosíntesis, captan la energía de la luz procedente del sol y transforma el carbono inorgánico en energía química (Yin et al. 2020). Esta se considera más económica que los otros dos cultivos pues usan la luz solar, los gases residuales de las industrias y el CO₂ para su mantenimiento y crecimiento. Sin embargo, requiere mucho espacio a nivel industrial y tiempo. Existen cepas, no obstante, que han mostrado mejores rendimientos, en producción de biomasa, en cultivos heterótrofos y mixótrofos.

✓ Cultivo heterotrófico en microalgas:

En este tipo de cultivo la única fuente de energía o de carbono son los compuestos orgánicos (e. g., glucosa y acetato) para crecimiento y síntesis de productos metabólicos (Murwanashyaka et al. 2020). La mayoría de las microalgas son estrictamente autótrofas, sin embargo, un número determinado de especies son capaces de vivir en condiciones de ausencia total de luz, por fermentación o pueden adaptarse de un cultivo autótrofo a heterótrofo. Las microalgas capaces de crecer en cultivo heterotrófico tienen una extraordinaria capacidad de absorción de carbono orgánico y nutrientes sin necesidad de luz solar, lo que permite que pueda cultivarse en prácticamente en cualquier tanque cerrado, disminuyéndose en gran medida la superficie de tratamiento a utilizar. Este ahorro de superficie, así como el fácil mantenimiento, hacen que el proceso sea atractivo también desde el punto de vista económico.

✓ Cultivo mixotrófico en microalgas:

Las algas capaces de vivir en este tipo de cultivos, tienen la impresionante capacidad de elegir entre los dos modos de vivir en función de las condiciones ambientales en las que vive por lo que crecen más rápido y sintetizan compuestos a través de rutas fotoautótrofas o heterótrofas (Khan et al. 2018). Es una estrategia de supervivencia ventajosa cuando es limitada la disponibilidad de luz y/o escasean los nutrientes inorgánicos en los ambientes donde medran (Pålsson and Granéli 2004). Sin embargo, aun teniendo ventajas en cuanto a menos costes de luz y compuestos orgánicos comparados con los cultivos autótrofos y heterótrofos (Khan et al. 2018), las empresas

biotecnológicas tienen dificultades para implementar una producción mixotrófica de microalgas bajo condiciones favorables de cultivo así como maximizar el rendimiento y la productividad en este tipo de sistemas (D'Imporzano et al. 2017).

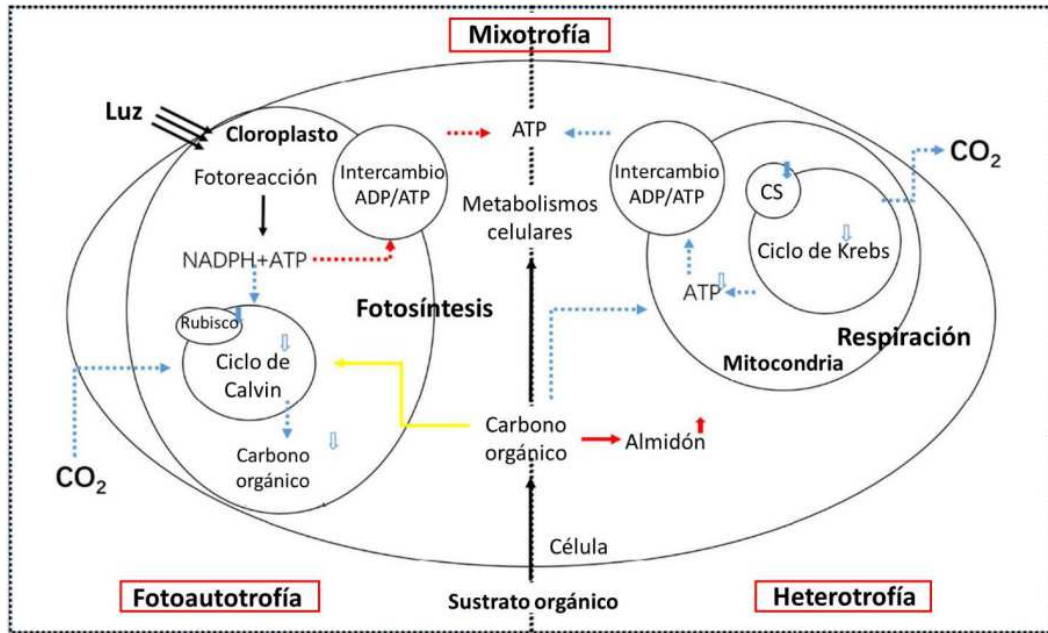


Figura 4: Características de los principales modos metabólicos de las microalgas, considerando su grado de compartimentalización, sustratos, intermediarios y productos formados por estos biosistemas. Abreviaturas: ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; Rubisco: ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa; CS: citrato sintasa. (Fuente: Capa Robles W., 2022 (Capa Robles 2022)).

A día de hoy, aun cuando las mejoras tecnológicas alcanzadas son importantes, el establecimiento de procesos basados en microalgas tiene una miríada de cuellos de botella, particularmente en las tecnologías de producción en masa. Los principales inconvenientes están asociados al costo de construcción y operación, el escalamiento, la transferencia de masa y un conocimiento limitado sobre los nuevos sistemas de cultivo. No existe un sistema de cultivo ideal universalmente, y la tecnología ideal aún depende del producto objetivo, las especies de microalgas y las condiciones ambientales (Maroneze et al. 2021).

1.3. Biotecnología de las algas

La biotecnología de algas es un campo emergente centrado en la investigación y el desarrollo de aplicaciones tecnológicas de algas, así como en sus derivados y bioprocesos, para proporcionar bienes o servicios. Gracias a estudios realizados sobre las algas, se ha podido observar que la importancia de estas no sólo radica en que sean los principales productores primarios, sino también que son fuente de sustancias bioactivas con aplicaciones en muchos sectores como el energético (biodiesel, biogás, bioetanol,...) (Sjors van Iersel et al. 2009; Castillo et al. 2017), el sector agroalimentario (alimentación humana, alimentación animal y como fertilizantes para plantas) (Montelongo 2018; García Reina 2020) y el sector nutracéutico y cosmético (Udayan et al. 2017; El-Chaghabby and Rashad 2021).

Actualmente, España se encuentra entre los países europeos con mayor número de compañías productoras de algas. Sin embargo, hoy en día, la mayoría de los países, no tienen normativa específica para su consumo como si ocurre en Francia (Mabeau and Fleurence 1993). Si existe una regulación para el empleo de las macroalgas y microalgas como son:

- El **Reglamento (UE) 231/2012**, por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios, entre ellos los procedentes de las algas marinas, que figuran en los anexos II y II del **Reglamento (CE) 1333/2008** del Parlamento Europeo y del consejo.
- El **Reglamento (UE) 2015/2283**, relativo a los nuevos alimentos, entendiéndose como nuevo alimento a “todo aquello que no haya sido utilizado en una medida importante para el consumo humano en la Unión antes del 15 de mayo de 1997”.
- La **Recomendación (UE) 2018/464 de la comisión**, relativa al control de metales y yodo en las algas marinas, las plantas halófilas y los productos a basa de algas marinas.
- El **Reglamento (CE) 889/2008**, donde se regula la producción aplicable a la cosecha y cultivo de algas destinadas a ser utilizadas como pienso para animales en acuicultura, este Reglamento, también debe aplicarse a la producción de microalgas destinadas a la alimentación humana.

- La **Directiva 2009/28/CE**, relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables, en la que la biomasa procedente de algas supondrá, en el futuro, una fuente de energía renovable.
- El **Reglamento (CE) 834/2007**, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos.
- El **Reglamento (UE) 1379/2013**, del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establece la organización común de información al consumidor de los productos de pesca y acuicultura, en los cuales podemos encontrar actualmente las algas (BOE, 2013).

En 2017 se constituyó en España un Comité Técnico de Normalización, el **CTN 319**, cuyo objetivo es el de normalizar el sector de las algas y sus productos derivados. Su actividad se centra en el seguimiento de las normas e informes técnicos que se están desarrollando dentro del Comité Europeo de Normalización, **CEN/TC 454 Algae and algae products**, siendo uno de sus proyectos el desarrollo de especificaciones para los principales usos de las algas y sus derivados: alimentación humana y animal, cosmética, farmacéutica.

1.3.1. Sector energético

Existen dos grandes problemas que enfrenta el mundo en el área energética: la disminución de las reservas petroleras y la contaminación causada por la quema de los combustibles fósiles. Es por ello, que la Agencia Internacional de la Energía (AIE) señala la necesidad de desarrollar tecnología que sustituya el uso de petróleo mediante tecnologías sustentables, renovables y que permitan cubrir la demanda energética de las actividades antropogénicas (Balat and Balat 2010). Debido a esto, se ha enfatizado el interés en la investigación para uso de biocombustibles, procedente principalmente de las microalgas, entendiendo por biocombustible, al conjunto de combustibles líquidos o gaseosos potencialmente renovables, elaborados a partir de materia vegetal, que pueden sustituir a los combustibles convencionales en motores de combustión para usarse en la generación de electricidad, calor y energéticos (Balat et al. 2008). Estos biocombustibles son el biodiesel (procedente de aceites obtenidos de plantas o algas), el bioetanol, butanol, hidrógeno y metano, todos sintetizados a partir de fuentes biológicas. Cabe destacar que, si se compara las ventajas ambientales que se obtiene del uso del biodiesel con respecto

el diésel convencional, se puede indicar que el biodiésel reduce las emisiones entre un 70 a un 90% con respecto al diésel convencional (Timilsina and Mevel 2013).

Las algas, principalmente las microalgas, son una opción muy prometedora para la obtención de biocombustibles pues tienen un rápido crecimiento, presentan una gran eficiencia fotosintética, capacidad de fijar CO₂, acumulan entre el 20 y 30% de triglicéridos (Chisti 2008), no requieren tierras para ser cultivadas, pueden cultivarse en aguas salobres (Amaro et al. 2011), se da una reducción de las emisiones reguladas como CO, NO_x, TPH (Hidrocarburos Totales de Petróleo) y material particulado (Linares-Fernández et al. 2012) y según el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento, la obtención de biomasa y lípidos se verá incrementada principalmente con la limitación de nitrógeno y fósforo (Beer et al. 2009; Scott et al. 2010). Sin embargo, hay que superar el principal factor que es el costo de producción de biomasa para lo cual, hay que optimizar los medios de cultivos, seleccionar y manipular las cepas y diseñar los fotobiorreactores (Linares-Fernández et al. 2012), por tanto, es necesario seguir realizando estudios de modificación genética para mejorar el rendimiento de las cepas de manera que, le confieran un rápido crecimiento y propiedades más beneficiosas para poder comercializarse con este fin, siendo las cianobacterias, *Chlamydomonas sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Synechocystis sp.*, las algas más estudiadas para este sector (Rittmann 2008; Snow and Smith 2012).

1.3.2. Sector agroalimentario

Las algas han sido consumidas desde hace siglos por países orientales como China, Japón y Corea, así como islas de Océano Pacífico, Índico y Atlántico, Chile y algunas zonas del Noroeste de Europa. La primera evidencia del uso de las algas como alimento fue en China en el siglo VI a.C. como así indicó el famoso escritor chino Sze Tsu que decía: “Las algas son una delicadeza apropiada para el más honorable de los invitados” además, de ser muy apreciadas por la Corte Imperial China por su alto valor medicinal. También los celtas y los vikingos mascaban alga dulce en sus viajes. En Europa, las algas del Mediterráneo fueron usadas por griegos y romanos para la medicina y como alimento para los animales (Pooja 2014). Sin embargo, en el resto del mundo, no ha sido hasta hace relativamente poco tiempo cuando ha empezado a consumirse directamente a pesar de que, desde el punto de vista nutricional, son alimentos hipocalóricos, especialmente ricos en minerales (yodo, calcio, hierro), vitaminas, fibras dietéticas solubles de alta calidad,

lípidos y proteínas que las hacen ser buena candidatas como un completo alimento (MacArtain et al. 2007; Patarra et al. 2011; Ramu Ganesan et al. 2020). Cabe destacar sin embargo, que las algas, son organismos bioacumuladores tanto de elementos esenciales y minerales, como elementos tóxicos como el plomo, cadmio, mercurio, cobre, manganeso, zinc y arsénico, por lo que en algunos países están regulados los valores máximos permitidos, en las algas, de metales pesados y otros minerales considerados tóxicos (Holdt Susan Løvstad and Kraan Stefan 2011). Es por ello, entre otras, que en Europa, en 2002, se creara la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), denominada «la Autoridad», siendo esta un órgano de referencia científica relativa a la seguridad alimentaria y que contribuye en el desarrollo y la creación de normas internacionales sobre seguridad alimentaria y acuerdos comerciales (El Parlamento Europeo Y El Consejo De La Unión Europea 2002), la cual ha recomendado que se revisen los límites de impurezas de elementos tóxicos como el arsénico, cadmio, yodo y mercurio, en aditivos alimentarios a base de algas marinas y algas, en particular para los lactantes y los niños de corta edad (Comisión Europea 2018).

En España concretamente, a pesar de poseer amplias costas y gran abundancia de especies, no ha habido una tradición marcada en el uso de algas, aunque, en los últimos años, se está revalorizando este producto y consiguiendo introducir las algas poco a poco en la dieta, principalmente en Galicia donde ya en la antigüedad se usaban las algas de arribazón como alimento para animales y en la agricultura.

Las algas comestibles más comunes por su alto contenido en nutrientes son las algas rojas del género *Porphyra sp.* (conocida como Nori) y *Palmaria palmata* (conocida como Dulse), las algas verdes (conocidas como Aonori) y *Spirulina sp.* y las algas pardas del género *Laminaria sp.* (conocida como Konbu), *Hizika fusiformis* (conocida como Hiziki), *Undaria pinnatifida* (conocida como Wakame) y *Durvillaea antártica* (conocida como Cochayuyu) (McHugh 1991). Sin embargo, existen otras algas que son usadas en la industria química y alimentaria para la obtención de ficocoloides como *Gelidium sp.*, para la obtención de agar, *Laminaria sp.* y *Fucus sp.*, para la obtención de alginatos y *Chodus sp.* y *Gigartina sp.*, para la obtención de carragenatos.

En la agricultura, las algas van tomando cada vez más relevancia pues, se pretende estimular los cultivos agrícolas con productos naturales. Sin embargo, según la Orden de 28 de mayo de 1998 sobre fertilizantes y afines (BOE de 02.06.98) las “algas” no pueden considerarse abonos, ni fertilizantes, ni nada, al igual que, legalmente, no existen los

“bioestimulantes” ni los “biofertilizantes” pero, contrariamente a la legislación comunitaria sobre fertilizantes y afines, el Reglamento (CEE) N° 2092/91 sobre agricultura ecológica (AE) (y el refundido con sus modificaciones, 1488/97), considera explícitamente tanto a las macroalgas como a las microalgas (vivas y fósiles) y a diversos extractos algales, aptos para la AE. Concretamente en el anexo VI. Sin embargo, no todas las algas sirven para la agricultura, ni tienen el mismo efecto sobre los cultivos ya que, dependiendo del tipo de especie algal, de su estado fisiológico, del método de procesado, de extracción y aplicación, la acción de los productos procedente de biomasa o extractos algales tendrán un buen resultado o no sobre los cultivos (García Reina 2020).

En la AE se toman algas que aumenten la productividad agrícola, garanticen la seguridad alimentaria y lleven a cabo una agricultura sostenible medioambiental permitiendo un desarrollo óptimo en los cultivos mejorando las condiciones del suelo, reteniendo la humedad, y siendo un potente bioestimulante gracias a su alto contenido en minerales y oligoelementos. Entre las algas marinas más usadas en el sector agrícola tenemos *Ascophyllum nodosum*, es la que mayor rendimiento tiene, ya que genera gran cantidad de agentes bioactivos en situaciones de estrés (2020) o *Lithothamnium sp. o maerl* (marl) que se utiliza en la corrección del pH de los suelos (Bacha 2019).

Cabe destacar también el uso de las algas en la alimentación animal tanto en la acuicultura como en piensos de rumiantes y monogástricos por sus propiedades importantes, principalmente como reemplazo parcial de las fuentes de proteína vegetal (Christaki (E. Χρηστάκη) et al. 2017). Las algas pertenecen a la lista no exhaustiva positiva de materias primas para la alimentación humana de la UE, apareciendo con dos denominaciones: harinas de algas (algas secas, harina de algas, aceite de algas, extracto de algas) y harinas de algas procedentes de microalgas (Bacha 2019). El valor nutricional de las algas depende de su tamaño, digestibilidad, composición química y presencia de sustancias con acción tóxicas como lectinas (Becker 2007) o propiedades anti-nutricionales como etanoles y ácido fítico (Rehman and Shah 2005) y metales pesados (Oliveira et al. 2009), por lo que es importante conocer las algas a usar en la alimentación animal. De las algas más usadas en rumiantes y monogástricos destaca *Ascophyllum nodosum*, aumenta el porcentaje de preñeces (McHugh 2003) y el contenido de grasa de la leche, proteínas y lactosa (Kulpys et al. 2009) en rumiantes, *Alsidium helminthocorton*, usado para el tratamiento antihelmíntico (Bacha 2019), microalgas como *Spirulina plantesis*, aumenta el peso de los lechones (Grinstead et al. 2000; McHugh 2003),

Schizochytrium sp., reduce el contenido de ácidos grasos saturados y aumenta los ácidos grasos insaturados en la leche de las vacas (Franklin et al. 1999), *Chorella sp.* y *Macrocystis pyrifera*, aumentan los ácidos grasos omega-3 en los huevos de las gallinas a las que se les suministra dichas algas en su dieta (Grigorova et al. 2006; Carrillo et al. 2008). En cuanto a la acuicultura, las microalgas son la base de la cadena alimentaria marina siendo estas, el alimento natural de los organismos filtradores y por tanto importantes en la producción de alimentos vivos para la larvicultura de peces y camarones. Aunque se conocen más de 10.000 especies de algas muy pocas desempeñan un papel vital en la acuicultura (FAO 2018). Cabe destacar que su valor nutricional depende en gran medida de las condiciones de cultivo así como la fase de cultivo, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Canavante Hors 2011). Entre las principales microalgas cultivadas como alimento acuícola cabe destacar especies de las *Isochrysis sp* y *Pavlova sp.*, *Phaeodactylum sp.*, *Chaetoceros sp.* y *Thalassiosira sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.* y *Rhodomonas sp.* (Canavante Hors 2011). Existen estudios que indican que, el empleo simultáneo de más de una especie de microalga como alimento suele producir mejores resultados respecto a los derivados del uso de dietas mono-específicas (Spolaore et al. 2006) así como el uso de polisacáridos (alginatos, carragenatos y ulvanos) usados como ingredientes funcionales en la acuicultura marina ya que, entre otras, poseen capacidad prebiótica e inmunoestimulante (Peso-Echarri et al. 2012). Las microalgas mezcladas con el pienso, son usadas en la fase larvaria de los peces y les brindan una serie de beneficios, pues son una fuente de micronutrientes, tienen efecto estimulador sobre el sistema inmune, además del efecto positivo sobre el estado fisiológico de las larvas debido a la diversificación de la flora bacteriana (Olsen et al. 2000), aumento la tasa de ingestión de alimento, aunque ello es variable según la especie en cultivo (Rocha et al. 2008). Sin embargo a día de hoy, desde el punto de vista económico, no es rentable la incorporación como macronutriente, en los piensos de larvas, las algas debido a su coste de producción sustituyendo a la harina de pescado aunque, se están realizando estudios para poder abaratar dichos costes y que los beneficios sean mayores (Vizcaíno Torres 2016).

1.3.3. Sector nutraceutico y cosmeceuticos.

Un *nutraceutico* es un término acuñado de "nutrición" y "farmacéutico", que se define como partes de un alimento o un alimento integral que tienen beneficios médicos

o para la salud, incluida la prevención y el tratamiento de enfermedades. El término *cosmecéutico* nace de la fusión de las palabras “cosmética” y “farmacéutica” y hace referencia a productos que contienen ingredientes bioactivos científicamente probados, con capacidad de crear actividad celular en la capa dérmica de la piel.

Las algas se han utilizado durante mucho tiempo como remedios tradicionales en el hemisferio oriental (Heo et al. 2009) por sus compuestos fitoquímicos y su naturaleza diversa (Khalid et al. 2018), es por ello que son consideradas una fuente, de beneficios para la salud insuficientemente explotada, de moléculas para el procesamiento de alimentos y la industria de nutracéuticos y cosmecéutica. Se ha demostrado que las algas rojas, verdes y pardas son una fuente importante de compuestos bioactivos que confieren importantes propiedades asociadas a prevenir y tratar diferentes enfermedades, tales como antihipertensivos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antimicrobianos, antitumorales, antivirales, neuroprotectores, cicatrizantes de tejidos, estimulantes del tiroides, antihiperlipidémico (Pangestuti and Kim 2011; Khalid et al. 2018; Martins et al. 2018). En las últimas décadas ha aumentado el descubrimiento de metabolitos únicos secundarios aislados de algas con importantes actividades biológicas como son los polisacáridos, los carotenoides y los polifenoles (Sanjeeva et al. 2016). Entre estos metabolitos tenemos los polisacáridos y las fibras, que presentan efectos positivos sobre enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad (Peñalver et al. 2020), los florotaninos de algas pardas (tipo de fenoles), que han mostrado interesantes propiedades bioactivas como anticancerígenas, antiinflamatoria, antioxidante, antialérgica, antiarrugas y estimulantes del crecimiento del cabello por lo que están siendo estudiados para su uso como cosmecéutico (Sanjeeva et al. 2016) y pigmentos naturales de las algas como clorofila *a*, feofitina *a*, feofórbidos *a*, pirofeofitina *a*, ficoeritrobilina, luteína, β -carotenos, fucoxantina y sifoxantina que exhiben diversas actividades biológicas beneficiosas tales como actividades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antiobesidad, antiangiogénicas, fotoprotector, antimutagénico y neuroprotectoras (Pangestuti and Kim 2011).

Las microalgas marinas son consideradas como una fuente importante de proteínas de alta calidad pudiéndose usar como suplemento directo o para la formulación de otros productos como nutracéuticos (Brown 2002). *Chorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Navicula incerta* y *Pavola lutheri* contiene péptidos con potencial terapéutico a los que

se les denominan péptidos bioactivos pues tienen aplicaciones potenciales en alimentos funcionales y nutracéuticos (Suleria et al. 2016).

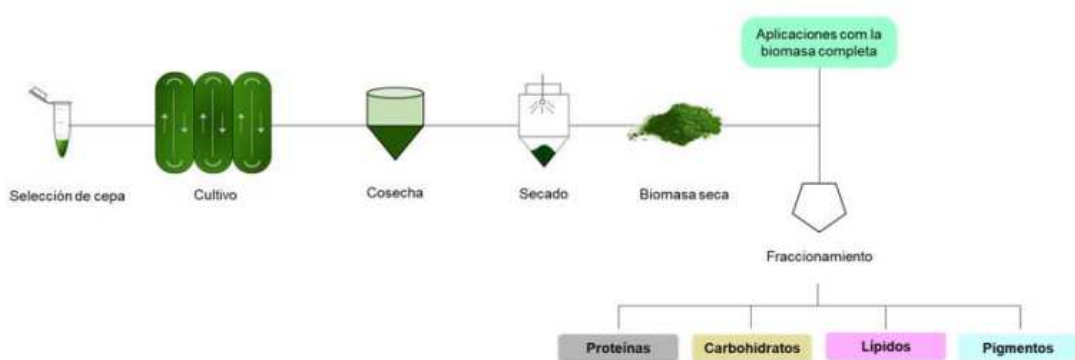


Figura 5: Microalgas, fuente de compuestos bioactivos. (Fuente: Manzoni et al., 2021).

El mercado de nutracéuticos y cosmocéuticos ha crecido sustancialmente debido al cambio del tratamiento a la prevención en la atención médica. Se cree que los nutracéuticos y cosmocéuticos serán una parte esencial de la atención médica preventiva en el futuro (Chew et al. 2019) y las algas están teniendo cada vez más importancia en este sector, pero ha de seguir investigándose.



Figura 6: Propiedades biológicas de las algas (Fuente: Peñalver et al., 2020).

1.4. Algas utilizadas en este estudio

Las macroalgas utilizadas en esta investigación han sido:

1.4.1. *Laminaria ochroleuca* Bachelot Pylaie

Alga parda o feoficea (Phaeophyta), también conocida como Kombu. No es una especie común, aunque en las zonas que se encuentra lo hace de forma masiva, formado un bosque de laminarias de gran valor ecológico junto con otras especies como *Laminaria hyperborea* y *Saccorhiza polyschides*. Crecen de forma silvestre en zonas rocosas del infralitoral en aguas frías y templadas pudiendo llegar a medir 3'5 m de altura. Se extiende principalmente por el Atlántico y en el Mar Mediterráneo llegando hasta Marruecos. Es una de las algas comestibles más comercializadas con un sabor dulce e intenso, rica en fibras insolubles, minerales y oligoelementos. Posee importantes propiedades como antioxidante, antihipercolesterolemia, anticoagulante, bactericida,...(Peñalver et al. 2020)



Imagen 11: *Laminaria ochroleuca* Bachelot Pylaie (Fuente: www.algaebase.org)

1.4.2. *Gelidium corneum* (Hudson) J.V.Lamouroux

Alga roja o rodoficea (Rhodophyta). Presente en el intermareal todo el año sobre sustrato rocoso, en aguas frías con alta exposición solar. Se extiende desde las Islas Británicas a Cabo Verde, Brasil, Australia, Nueva Zelanda, Caribe y en el Mar Mediterráneo. Su tamaño oscila entre 20 y 35cm de longitud. Es una especie formadora de dosel, jugando un papel ecológico importante al proporcionar hábitat y refugio para

muchos otros organismos (Bustamante et al. 2014). Se utiliza tradicionalmente para la extracción de agar, ya que produce un agente gelificante de la más alta calidad usándose en la industria alimenticia (Gaspar et al. 2019) como aditivo alimentario y en la investigación como medio de cultivo para otros organismos.



Imagen 12: *Gelidium corneum* (Hudson) J.V.Lamouroux (Fuente: www.algaebase.org)

1.4.3. *Porphyra umbilicalis* Kützing

Alga roja o rodoficea (Rhodophyta), también conocida como Nori. Presente en el intermareal medio y superior todo el año sobre sustrato rocoso. Se encuentra principalmente en costas atlánticas septentrionales. Tiene un tamaño pequeño de 13 cm de largo y 10 cm de ancho. El extracto del alga se utiliza en cosmética como protector de piel además es un alga comestible con un alto contenido en sales minerales, especialmente yodo y hierro. Una propiedad importante de este alga es su alto contenido en ácido eicosapentanoico (EPA) que constituye casi el 48% del contenido total de ácidos grasos (Fleurence et al. 1994).



Imagen 13: *Porphyra umbilicalis* Kützing (Fuente: www.algaebase.org)

En cuanto a las microalgas estudiadas fueron:

1.4.4. *Porphyridium purpureum* (Bory) K.M. Drew & R. Ross

Este alga era conocida como *Porphyridium cruentum* (S.F. Gray) Nägeli. A día de hoy se considera un sinónimo *Porphyridium purpureum* según www.algaebase.org. Es una microalga roja (Rhodophyta) unicelular con un diámetro celular de 6 a 10 μm . Se encuentran fundamentalmente en ambientes marinos, sobre todo en regiones tropicales de forma silvestre o puede cultivarse en laboratorio en medio salinos. Es capaz de sintetizar y secretar grandes cantidades de polisacáridos al medio de cultivo (Guil-Guerrero et al. 2004). Tiene propiedades protectoras para la piel (Rodríguez-Concepcion et al. 2018) y actividad antihiperglucémica (Setyaningsih et al. 2020). Sus exopolisacáridos presentan beneficios biológicos como hipocolesterolémicos (Dvir et al. 2009), antivirales (Huheihel et al. 2002), inmunomoduladores (Abdala Díaz et al. 2010), antitumorales (Sun et al. 2012) y antioxidantes (Tannin-Spitz et al. 2005). También es una fuente rica en lípidos y ácidos grasos poliinsaturados (Shiran et al. 1996; Cohen et al. 1997; Khozin-Goldberg et al. 2000), que proporcionan beneficios para la salud al reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, niveles altos de colesterol (Ginzberg et al. 2000), inflamación y riesgo de cáncer (Patil et al. 2007).

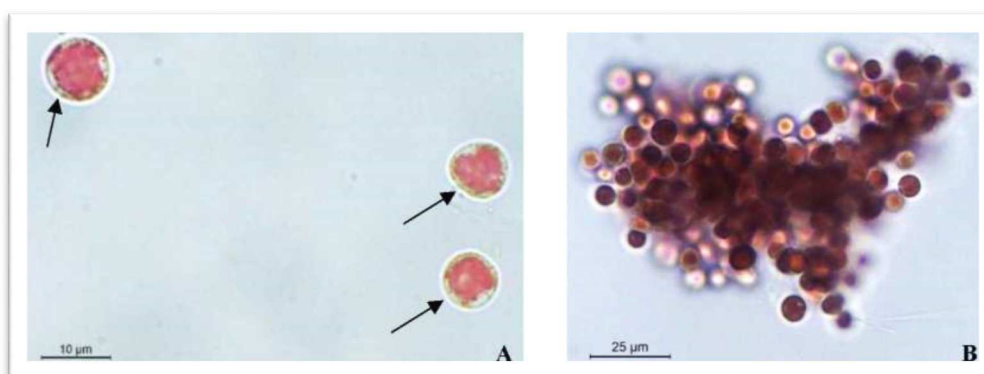


Imagen 14: *Porphyridium purpureum* (Bory) K.M. Drew & R. Ross. (Fuente propia)

1.4.5. *Euglena gracilis* G.A. Klebs

Es un protista unicelular flagelado acuático que, en vida libre, forma parte del plancton de aguas dulces. Puede ser cultivado de manera eficiente en condiciones controladas de laboratorio y con diferentes fuentes de carbono. Es capaz de tener un

crecimiento fotoautotrófico (usando luz solar), heterotrófico (usando una fuente de carbono externa) y mixotrófico (combinando ambos modos) (Rodríguez-Zavala et al. 2010; Šantek et al. 2010). Puede cambiar de forma constantemente, desde muy alargada hasta casi esférica, debido a su superficie celular extremadamente flexible. Mide entre 20 -100 μm según la forma que forme. Es muy activa, nada por medio de un flagelo de longitud similar a su cuerpo alargado, pero en condiciones de estrés pierde el flagelo y adopta una forma esférica. Tiene fototaxis positivo debido a que posee un orgánulo simple sensible a la luz denominada mancha ocular compuesto por fotorreceptores y una mancha adyacente de pigmento. Sintetiza diversos productos de interés como proteínas que contienen aminoácidos esenciales, pro (vitaminas), lípidos y el paramilón (β -1,3-glucano) (Rodríguez-Zavala et al. 2010; Pollak et al. 2012). El polisacárido de reserva paramilón, presenta especial interés ya que se ha descrito como inmunoestimulante, antimicrobiano, (Russo et al. 2017; Gissibl et al. 2018) reducen los niveles de colesterol y exhiben actividades antidiabéticas, antihipoglucémicas y hepatoprotectoras (Barsanti et al. 2011). Este protista es considerado además, como un organismo con potencial biotecnológico en la biorremediación de sistemas acuáticos impactados por elementos potencialmente tóxicos (García et al. 2011; García-García et al. 2014, 2018)

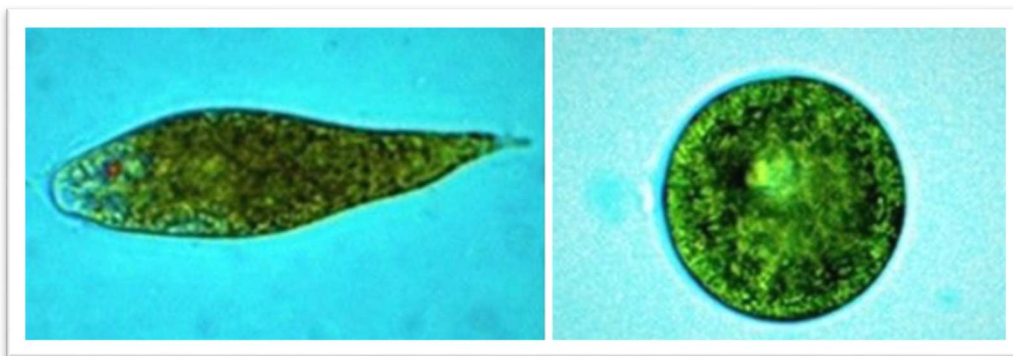


Imagen 15: *Euglena gracilis* G.A. Klebs (Fuente: biodiversidadvirtual.org)

2. Polisacáridos

Las algas se consideran un buen reservorio de compuestos con importantes actividades biológicas y biomédicas, como se ha indicado anteriormente, siendo los polisacáridos sulfatados muy abundantes en las algas (Renn 1997). Los polisacáridos son polímeros de azúcares unidos por enlaces glicosídicos con gran cantidad de aplicaciones

comerciales, siendo muy investigados en los últimos años, para el estudio y desarrollo de productos farmacéuticos y potentes sustancias bioactivas (Li et al. 2008; Suleria 2016). Estos poseen diversos efectos beneficiosos como actividad inmunoestimulante y prebiótica, que los convierten en compuestos funcionales prometedores y en una buena alternativa a la utilización de antibióticos (Wang et al. 2006; Peso-Echarri et al. 2012), actividad hipocolesterolemicas e hipolipidemicas (Panlasigui et al. 2003), antivirales (Kim et al. 2010), anticancerígenos (Teas and Irhimeh 2012), antidiabético (Vaugelade et al. 2000),... Por ejemplo, la harina de algas, compuesta por polisacáridos, proteínas y fibra dietética, se considera un antioxidante natural con alto valor nutricional y se recomienda su uso como alternativa o complemento a la harina común (Tanna and Mishra 2019).

Todas las algas presentan polisacáridos estructurales y de reserva, pero difieren en la composición específica de estos. En las algas pardas la familia de polisacáridos presentes son los laminarios (polisacáridos de reserva), alginatos, fucanos y celulosa (polisacáridos estructurales), en el caso de las algas rojas los polisacáridos son principalmente galactanos sulfatados (agar y carragenanos) y en menor cantidad xilanos, mananos y celulosa (polisacáridos estructurales) y almidón de florídeas (polisacárido de reserva) y en las algas verdes contienen almidón (polisacáridos de reserva) y celulosa, ulvanos, xilanos, mananos y polisacáridos iónicos que contienen grupos sulfato y ácidos urónicos (polisacáridos estructurales). El contenido sin embargo de los polisacáridos varía según el hábitat, la época del año, (Holdt Susan Løvstad and Kraan Stefan 2011) por lo que es importante tener esto en cuenta a la hora de la recolección de las algas para su posterior extracción de polisacáridos.

En Europa las algas se han empleado y se continúan utilizando para la extracción de ficocoloides, que son polisacáridos que se encuentran en la pared celular y que no tienen equivalente sintético siendo el agar, el carragenato y el alginato los más usados. Estos se emplean en multitud de industrias entre las que destacan la industria alimentaria como agentes gelificantes, espesantes y estabilizantes, la industria farmacéutica como dispersantes en muchas formas (geles, cápsulas, supositorios, óvulos), en la cosmética (cremas) y en otras industrias para artículos del hogar, pinturas. Es por tanto interesante ver que la presencia de las algas, gracias a su metabolitos, en productos de uso cotidiano, constituyen claros ejemplos de que estas se utilizan a través de las industrias alimentaria y cosmética (McLachlan 1985).

En la siguiente tabla se detallan los diferentes polisacáridos específicos de la pared celular y de reserva clasificados como fibras solubles e insolubles según los tres grandes grupos de macroalgas.

Tabla 2: Clasificación de los principales polisacáridos que constituyen la fibra alimentaria en las macroalgas.

	Fibra soluble	Fibra insoluble
Algas pardas (<i>Fucus</i> , <i>Laminaria</i> , <i>Undaria</i> , <i>Himanthalia</i>)	Laminarano <i>(1,3)-β-glucosa y (1,6)- β-glucosa, manitol</i> Alginato <i>β-(1,4)-ácido manurónico y α-(1,4)- ácido gulurónico</i> Fucano /Fucoidano /Furano <i>Fucosa sulfato, ácido manurónico, xilosa</i>	Celulosa <i>β-(1,4) glucosa</i>
Algas rojas (<i>Chondrus</i> , <i>Porphyra</i> , <i>Mastocarpus</i>)	Agar <i>D-galactosa y (3,6)-anhidro-D-galactosa sulfato</i> Carragenano <i>D-galactosa y (3,6)-anhidro-L-galactosa sulfato</i> Xilanos y Mananos	Celulosa <i>β-(1,4) glucosa</i>
Algas verdes (<i>Ulva</i> , <i>Enteromorpha</i>)	Xilano <i>Xilosa, ramificaciones arabinosa, glucosa, galactosa, ácidos urónicos</i> Ulvano <i>Ramnosa, xilosa, ácidos urónicos, sulfato</i> Galactanos sulfatados	Celulosa <i>β-(1,4) glucosa</i>

(Fuente: Jiménez-Escrig y Sánchez-Muniz, 2000; Holdt & Kraan, 2011; Jiao et al., 2011)

2.1. Clasificación de polisacáridos

Existen seis tipos básicos de polisacáridos muy usados en diferentes industrias: agar y carragenatos (se encuentran en determinadas especies de rodofitas), alginatos y laminaranos (en ciertas feofitas y microalgas), fucanos (en feofitas) y ulvanos (en clorofitas). Son sustancias gelificantes, viscosantes, estabilizantes y/o emulgentes en soluciones acuosas, ampliamente utilizadas como aditivo alimentario y de

nula toxicidad y han sido ampliamente estudiadas debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud.

2.1.1. Agar

Muchas personas piensan que este coloide hidrófilo extraído de ciertas algas rojas (clase Rhodophyceae) fue descubierto por Walther Hesse quién comunicó su hallazgo a Koch y lo incluyó rápidamente en su laboratorio para cultivar la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* citándolo en una de sus notas, siendo esta la primera referencia escrita sobre el agar (Koch 1882; Hesse 1992). Sin embargo, el agar-agar fue descubierto por el japonés Minora Tarazaemon quién notó que una sopa de alga en un clima frío se solidificó en una noche (Moller 2013). Esto es debido a que el agar es soluble en agua caliente y la solución forma un gel, alrededor de 32-40 °C, que luego no se derrite por debajo de 85 °C. Posee una gran cantidad de absorción de agua (hasta 20 veces su propio peso) y puede gelificar los alimentos a concentraciones muy bajas como 0,04%.

Según la especie de la cual se extraiga, el agar varía en su composición química y propiedades físicas (Moller 2013), por ello, cuando se menciona el agar, se acostumbra indicar su materia prima original ya que esto puede afectar a sus aplicaciones (McHugh 1987). Sin embargo, sus unidades principales son la agarosa y agarpectina (Tanna and Mishra 2019). La agarosa tiene una estructura lineal formada por unidades repetidas del disacárido agarobiosa (3,6 anhidro-L-galactosa y D-galactopiranosas) y la agarpectina contiene unidades repetidas de los disacáridos D-galactosa y L-galactosa con naturaleza ácida debido a los grupos éster sulfato, ácido pirúvico y ácido D-glucurónico (Craigie 1990; Synytsya et al. 2015).

Las principales especies de algas productoras de agar pertenecen a los géneros *Gelidium sp.*, *Gracilaria sp.* y *Pterocladia sp.*

Las aplicaciones del agar son múltiples usándose en diferentes sectores como la industria alimentaria humana como agente gelificante, estabilizador y para controlar la viscosidad, aunque no tiene valor nutritivo, en aplicaciones agrícolas como medio de cultivo, en aplicaciones biotecnológicas e ingeniería genética para la separación de proteínas, producción de interferón, interleucinas e insulina, en microbiología para cultivo de tejidos, bacterias (McHugh 1987).

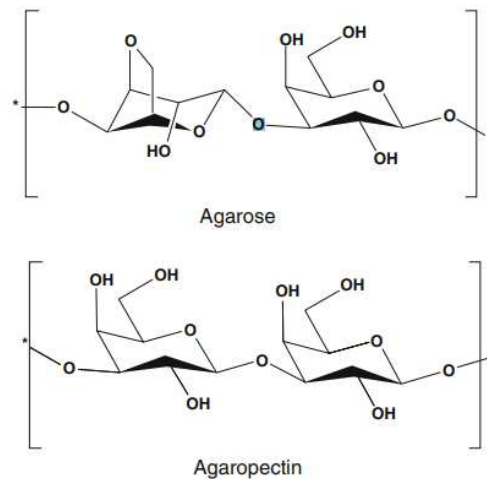


Figura 7: Estructura química del agar formada por unidades de agarosa y agarpectina
(Fuente: Anbuezhian, R. et al, 2015)

2.1.2. Carragenanos

Junto con el agar constituyen la principal familia de polisacáridos sulfatados, también llamados galactanos, de elevado peso molecular que se pueden extraer de las algas rojas. La principal diferencia entre los carragenanos y el agar es la presencia de D-galactosa y anhidro-D-galactosa en los carragenanos y de D-galactosa, L-galactosa o anhidro-D-galactosa en el agar, además del grado de sulfatación que es mucho mayor en los carragenanos (Gómez Ordóñez 2013). Por tanto, los carragenanos son polisacáridos compuestos de residuos alternados de β -D-Galactosa unidos por enlace 1,3 y α -D-Galactosa unidas por enlace 1,4. Hay tres tipos de carragenatos a nivel industrial: Kappa, Iota y Lambda que difieren por el número y posición del grupo sulfatado (Warrand 2006). Al igual que el agar, forman geles, y sólo se extrae de determinadas especies de algas rojas (*Eucheuma sp.*, *Kappaphycus sp.*, *Hypnea sp.*, *Chondrus sp.*). Este polisacárido tiene beneficios fisiológicos ya demostrados y estudiados como son la reparación de daños intestinales, la estimulación del sistema inmune en peces (Fujiki et al. 1997; Castro et al. 2004), la actividad antiviral principalmente contra el virus del papiloma humano (Buck et al. 2006; Roberts et al. 2007) y los cambios en la composición de la microbiota intestinal pues, estos compuestos no son metabolizados en el colon (Jimenez-Escrig and Sanchez-Muniz 2000; Warrand 2006). También se ha estudiado el favorecimiento de la proliferación de la mucosa intestinal en ratas con la adición de iota-carragenato en su dieta Lahaye & Kaeffer (1997) (Lahaye and Kaeffer 1997). Sin embargo, estos

polisacáridos han sido utilizados principalmente como suplemento inmunoestimulante en acuicultura (Cheng et al. 2008).

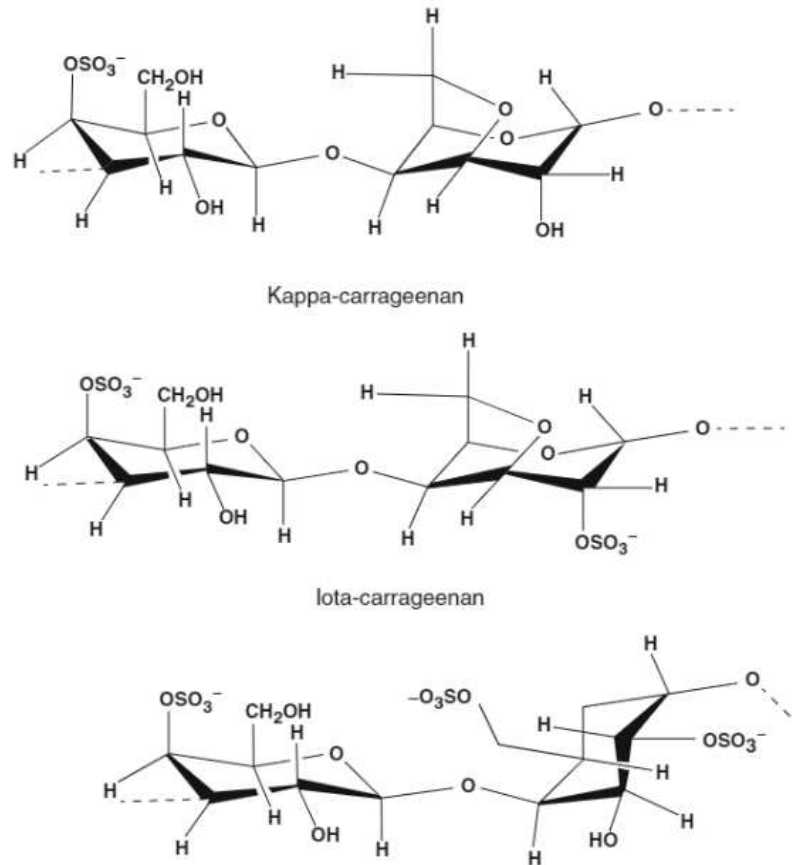


Figura 8: Estructura química de carragenatos: kappa (arriba), iota (medio) y lambda (abajo). (Fuente: Anbuezhian, R. et al, 2015).

2.1.3. Alginatos

Este biopolímero fue descubierto por primera vez por el británico E.CC. Stanford en 1881, pero fue Krefling el que 15 años más tarde, aisló el alginato y patentó el proceso para obtenerlo en estado puro (<https://alginato.online/historia/>).

Estos están presentes en la pared celular de las algas pardas o feofitas denominadas *kelp* como *Laminaria sp.*, *Ascophyllum sp.*, *Macrocystis sp.*, *Sargassum sp.*, *Ecklonia sp.*, *Durvillea sp.*, *Lessonia sp.* y *Turbinaria sp.* (Ayarza León 2014) y en algunas especies bacterianas, no se encuentra en plantas terrestres cuyo homólogo en estas serían las pectinas. Contienen monosacáridos denominados ácidos urónicos (manurónico y su epímero el gulurónico) unidos por enlaces α (1- 4) (Brownlee et al. 2005). Dichos monosacáridos, se pueden encontrar en tres paquetes diferentes, paquetes

homopoliméricos ricos en ácido manurónico que se suele encontrar principalmente en algas jóvenes, paquetes homopoliméricos ricos en ácidos gulurónico, en algas senescentes, donde debido a la enzima C5-epimerasa, el ácido manurónico es transformado en su epímero ácido gulurónico y, paquetes heteropoliméricos donde se alternan ambos ácidos (Brownlee et al. 2005). El porcentaje de estos paquetes dependen del origen del alginato, de la edad del tejido y de otros factores.

Los alginatos son usados en diferentes industrias como la textil, como agente espesante en pastas para teñir textiles, la alimentaria, como agente espesante o estabilizante en productos alimenticios, en aplicaciones biotecnológicas, como inmovilizador de agentes catalíticos para síntesis químicas, la medicina e industria farmacéutica por sus efectos beneficiosos para tratar enfermedades como en la hipercolesterolemia, hipertensión y diabetes, mejorando la actividad prebiótica y la respuesta inmune, aumentando la sensación de saciedad y como efecto preventivo del cáncer (McHugh 1987; Vaugelade et al. 2000; Hoebler et al. 2000; Warrand 2006; Ayarza León 2014).

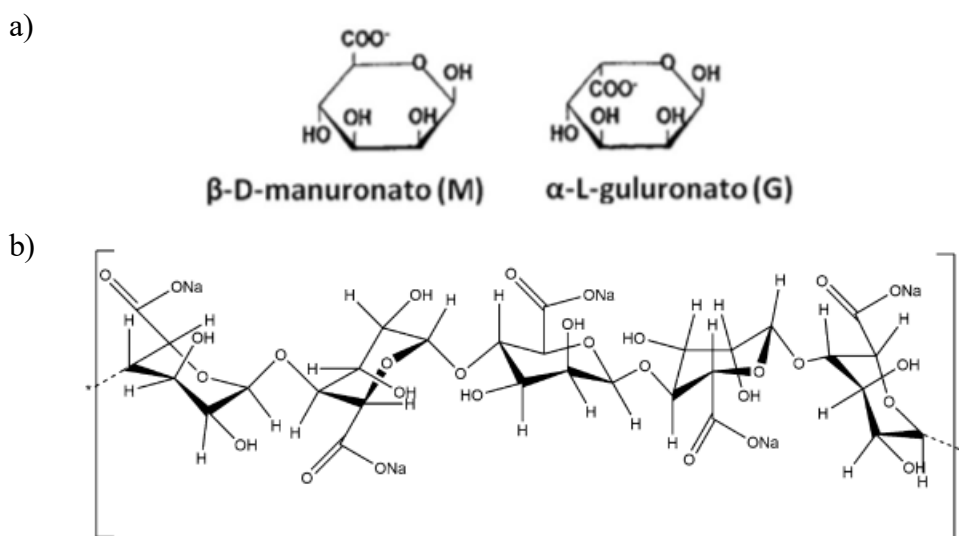


Figura 9: Estructura química del alginato: a) monómeros constituyentes; b) diversas formas estructurales en el polímero dependiendo de la secuencia adoptada por los monómeros. (Fuente: Ayarza León, J.L., 2014, Anbuezhian, R. et al, 2015).

2.1.4. Ulvanos

Es un polisacárido matricial polianiónico compuesto de ramnosa, ácido glucurónico e idurónico (cuyo poder quelante es superior al ácido glucurónico) y xilosas sulfatadas (Quemener et al. 1997; Tziveleka et al. 2019) que se encuentran en las paredes celulares de algas verdes principalmente en las especies pertenecientes al complejo *Ulva-Enteromorpha sp.* (Lahaye and Robic 2007; Robic et al. 2009). Oscila entre el 4 y 15% del peso seco de *Ulva*, en función de las especies, localidad y estación. Al igual que los demás ficocoloides, estos xiloramnoglucoromananos sulfatados son particularmente resistente a la biodegradación y, al igual que el alginato y carragenato, es capaz de formar geles en presencia de cationes divalentes y boro (Lahaye et al. 1996). Es bien conocido que estos polisacáridos poseen una gran variedad de actividades terapéuticas, antibacteriano, inmunoestimulante, antitumoral, antioxidante, antihiperlipidémico, antiviral y anticoagulante (Abd El-Baky et al. 2009; Wijesekara et al. 2011; Shi et al. 2017; Tziveleka et al. 2019). Es por ello, que se está desencadenado muchos estudios para su utilización en materiales híbridos, dada su eficacia potencial en aplicaciones biomédicas (Tziveleka et al. 2019).

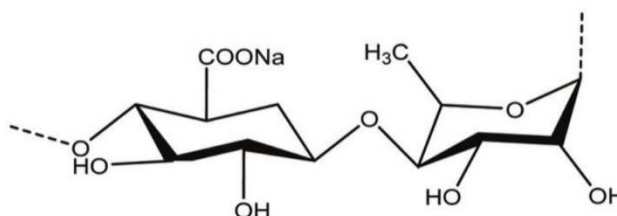


Figura 10: Estructura química de ulvanos. (Fuente: Feriedoon Shahidi y Md. Jiaur Rahman, 2018).

2.1.5. Fucoïdanos o fucanos

Son polisacáridos sulfatados que se encuentra en la pared celular o matriz extracelular de algas pardas, aunque también se han aislado a partir de microorganismos como cianobacterias y de invertebrados marinos como medusas, huevos de erizos marinos y pepinos de mar (Paulsen 2002; Cumashi et al. 2007; Yang and Zhang 2009; Senthilkumar et al. 2013). Son muy heterogéneos en cuanto a su estructura (Chizhov et al. 1999; Bilan et al. 2004) pues varía según la especie de alga parda, sin embargo, hay unas estructuras comunes. Conchie & Percival (1950) (Conchie and Perciva 1950) encontraron que estos, están compuestos principalmente de unidades de α -L-fucosa con

uniones (1→2) y la mayoría de los grupos sulfato se localizan en la posición C-4 de las unidades de fucosa. Los fucanos se pueden agrupar en dos tipos según su composición (Li et al. 2008): homofucanos, caracterizados por estar constituidos en más del 95% por L-fucosa sulfatada y heterofucanos, poseen una proporción menor de ésta, y además contienen porciones de otros azúcares neutros y ácidos urónicos (Duarte et al. 2001).

Estos, tienen importantes actividad biológica como antiinflamatorias, antitumoral y antimetastásico (Riou et al. 1996; Cumashi et al. 2007), pero principalmente propiedades anticoagulantes (Li et al. 2008) por tanto, tienen importantes aplicaciones en medicina y farmacología (Li et al. 2008; Ale et al. 2011; Flórez-Méndez and González 2019)

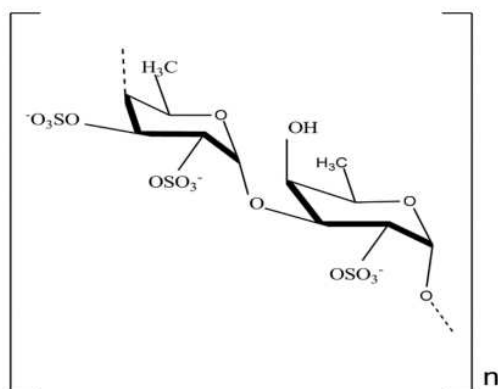


Figura 11: Estructura química de fucanos (Fuente: Silva et al., 2012)

2.1.6. Laminarios

Es el principal polisacárido de reserva de las algas pardas más concretamente en las Laminariales (*Laminaria sp.* y *Undaria sp.*) y Fucales (*Fucus sp.* y *Ascophyllum sp.*). La estructura y composición de estos varían según la especie, pero de forma general está formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -(1,3) y ramificado mediante enlaces β -(1,6) (Rioux et al. 2007). Esto son muy usados a nivel comercial como fibra alimentaria, como sustrato en bacterias prebióticas de colon (Gharbi et al. 2007), aunque se ha estudiado también su bioactividad como agente anticoagulante, antitumoral (Miao et al. 1999) y su capacidad de reducir el colesterol en sangre (Holdt Susan Løvstad and Kraan Stefan 2011).

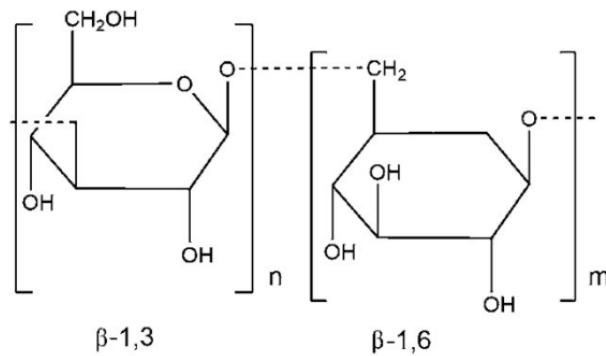


Figura 12: Estructura química del laminarano. (Fuente: Anbuezhian, R. et al, 2015).

2.2. Estacionalidad de los polisacáridos

Es bien conocido que la composición de los polisacáridos, y otros nutrientes, así como las propiedades biológicas de las algas, está condicionado por la localización geográfica, la calidad nutricional del agua de mar o cultivos, a factores relacionados con los procesos de obtención y extracción de polisacáridos (Rioux et al. 2007) y a las variaciones estacionales debido al estrés que esto puedan ocasionar a las algas. Así, los factores que pueden dar lugar a un mayor o menor estrés son: la temperatura atmosférica y del cultivo u océano, luz fotosintéticamente activa, radiación solar, salinidad, ataque de herbívoros. Esta variación estacional influye tanto en el contenido de hidratos de carbono, como en el de proteínas y en los pigmentos fotosintéticos (Troncoso 2014).

Cabe esperar que, en un muestreo en dos puntos durante un año, el rendimiento de polisacáridos presentes en la especie en cuestión sea mayor en el momento de mayor estrés ambiental.

2.3. Bioactividad de los polisacáridos

Las algas contienen sustancias bioactivas como polisacáridos, proteínas, lípidos y polifenoles con variada actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica, entre otras (Castro et al. 2006).

Centrándonos en los polisacáridos de algas, se ha observado que el grado de sulfatación y su peso molecular están directamente relacionados con su bioactividad (Schepetkin et al. 2005; Jiao et al. 2011). Un ejemplo de esto, es el estudio realizado por Senthilkumar, K. et al., 2013, (Senthilkumar et al. 2013) en el que observaron que el efecto anticoagulante se vio reducido al disminuir el peso molecular del polisacárido.

Son muchas las propiedades biológicas atribuibles a los polisacáridos, principalmente sulfatados, de las algas. Entre ellas las más relevantes son: actividad antioxidante, anticoagulante, antiviral, anticancerígena e inmunomoduladora que se recogen en distintos estudios (Jiao et al. 2011; De Jesus Raposo et al. 2015; Hentati et al. 2020). Además se han descrito otras propiedades menos conocidas para los polisacáridos de algas como pueden ser: actividad antimicrobiana, antiproliferativa, anti-inflamatoria (Wijesekara et al. 2011; Isaka et al. 2015), antiviral, antimicrobiana (Kadam et al. 2015), gastroprotectora (Ammar et al. 2015), protección hepática (Charles and Huang 2009), efecto en glucosa (Vaugelade et al. 2000) antiobesidad (Nakazono et al. 2016), antihiperlipidémico (Wang et al. 2017) y efecto prebiótico (Devillé et al. 2004).

Los estudios de la bioactividad de polisacáridos no sólo se centran en el ser humano. Existen otros tipos de estudios como los relacionados con el suplemento de polisacáridos de algas en la acuicultura marina, donde se ha observado los beneficios en los peces en su crecimiento, eficacia de la alimentación y la supervivencia, además de observarse la capacidad prebiótica e inmunoestimulante de dichos polisacáridos sobre ellos (Peso-Echarri et al. 2012).

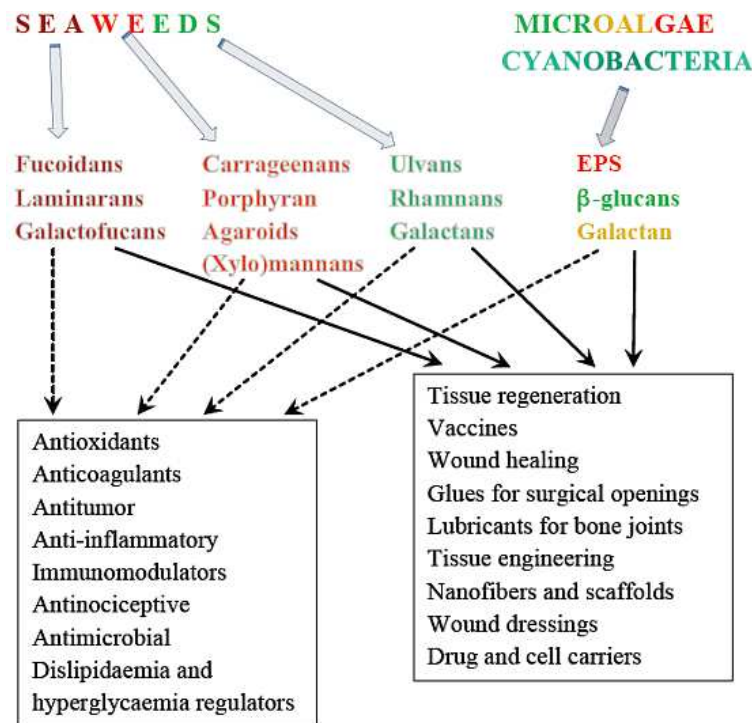


Figura 13: Bioactividad de polisacáridos de algas (Fuente: De Jesus Raposo, F.M. et al., (2015)).

2.3.1. Actividad antioxidante.

Existe una tendencia emergente hacia la exploración de macromoléculas biológicas como proteínas, péptidos, polisacáridos y glicoproteínas que derivan de fuentes vegetales, animales y microbianas que poseen características prometedoras para la salud como macromoléculas antioxidantes (Song et al. 2020). Así, polisacáridos extraídos de distintas algas (Shao et al. 2013; Shanura Fernando et al. 2017) y microalgas (Trabelsi et al. 2016), poseen capacidad antioxidantes para controlar enfermedades mediadas por estrés oxidativo, como daño hepático, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, colitis y cáncer de mama (Madhujith et al. 2022). Nemzer et al., (2019) (Nemzer et al. 2019) ha sugerido tres mecanismos distintos para el efecto anterior: derribando ROS, regulando el sistema antioxidante y las vías de señalización mediadas por el estrés oxidativo.

En el estudio realizado por Madhujith, T. et al., (2022) (Madhujith et al. 2022) muestra una gran cantidad de artículos que informan sobre la actividad antioxidante de macromoléculas biológicas extraídas de distintos organismos.

2.3.2. Actividad citotóxica sobre las línea celulares tumorales humanas.

En el medio acuático existen una gran cantidad de organismos que sintetizan compuestos que ejercen excelentes propiedades antitumorales y se han desarrollado como fármacos anticancerígenos prometedores que luego se aprobaron o se encuentran actualmente en fase de validación en ensayos clínicos (Wang et al. 2020).

Dentro del medio marino, la flora marina, que hace referencia a: bacterias, actinobacterias, cianobacterias y hongos (también conocidos como microflora), y microalgas, macroalgas, manglares y otras plantas superiores que viven en un ambiente marino, se considera una de las fuentes más ricas de candidatos a fármacos antitumorales en la Tierra como así se ha estudiado en diversas investigaciones (Wang et al. 2020). Sin embargo, debido a la falta de tecnología de extracción eficiente para obtener sus compuesto bioactivos, con respecto a la extracción en flora terrestre, la continua degradación de los hábitats marinos, falta de suministro sostenible, la baja producción, la complejidad estructural, las variaciones fenotípicas, hace que el desarrollo para la creación de fármacos contra el cáncer procedente del ambiente marino sea aún muy lejana (Sithranga Boopathy and Kathiresan 2010; Pereira 2019).

Uno de los metabolitos de la biomasa marina que está tomando gran interés son los polisacáridos de algas debido principalmente a su potencial anticancerígeno (Kim et al. 2011), con los que se han realizados ensayos *in-vivo* e *in-vitro* con resultados bastante alentadores como así se recoge en el trabajo realizado por Jin, J. et al., (2022) (Jin et al. 2022).

2.3.3. Actividad inmunomoduladora.

La farmacoterapia, con productos naturales, es una alternativa que va tomando un mayor interés como terapia ante enfermedades y patologías que, en el futuro, podrá sustituir o ayudar a la terapia tradicional siendo nulos o escasos sus efectos secundarios (Yu et al. 2018).

Macromoléculas biológicas, como son los polisacáridos, están siendo estudiados gracias a sus importantes y diversos papeles en procesos biológicos debido principalmente a su estructura, baja toxicidad y distintas actividades biológicas, especialmente en la regulación del sistema inmunológico (Schepetkin and Quinn 2006).

En la actualidad el estudio de la capacidad inmunomoduladora de los polisacáridos naturales está siendo muy investigado. Algunos de los números estudios realizados en polisacáridos de algas son: con los polisacáridos de *Enteromorpha intestinales*, donde se observó la inducción del factor de necrosis tumoral TNF- α en ratones interviniendo en los procesos celulares como la apoptosis de tumores (Jiao et al. 2009), los polisacáridos de *Gracilaria rubra* con ensayos *in-vitro* sobre la línea celular RAW 664.7 (Di et al. 2017), los β -glucanos de *Euglena gracilis* (llamados paramilon) que activaron las células NK y aumentaron los niveles de los dos mediadores proinflamatorios TNF- α e IL-6 (Russo et al. 2017; Barsanti and Gualtieri 2019). Además, se ha descubierto que los polisacáridos sulfatados extraídos de *Tribonema sp.* aumentaron la viabilidad de las células macrófagas y mejoraron la expresión de citoquinas (Chen et al. 2019). Estos son sólo algunos de los estudios realizados con polisacáridos de algas con capacidad inmunomoduladora.

Se cree que los principales mecanismos por los que los polisacáridos protegen a las células son mediante la activación de la respuesta inmunitaria del huésped (Li et al. 2016, 2017).

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutracéuticos.*

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS.

- 1- Los polisacáridos de *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis* y *Gelidium corneum* presentan actividad inmunomoduladora y antioxidante.
- 2- Los polisacáridos de *Laminaria ochroleuca* presenta actividad citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas: melanoma humano (G-361), cáncer de colon (HTC-116), cáncer mama (MCF-7 y leucemia humana (U-937).
- 3- Los cultivos heterotróficos de *Porphyridium purpureum* producen más polisacáridos que los cultivos autotróficos.
- 4- Los polisacáridos de *Porphyridium purpureum* y *Euglena gracilis* presentan actividad antioxidante, inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas: leucemia humana (U-937 y HL-60), cáncer de mama (MCF-7), cáncer de colon (HTC-116) y cáncer de pulmón (NCI-H460).

OBJETIVOS.

OBETIVO GENERAL: Estudio de polisacáridos extraídos de distintas macro y microalgas con potencial actividad antioxidante, citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas e inmunomoduladora.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

OBJETIVO 1: Estudio de la actividad antioxidante y inmunomoduladora de los polisacáridos ácidos de *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis* y *Gelidium corneum*.

OBJETIVO 2: Estudio de la actividad citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas de los polisacáridos ácidos de *Laminaria ochroleuca*.

OBJETIVO 3: Estudio de la actividad antioxidante, inmunomoduladora *in-vitro* e *in-vivo* y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas de los polisacáridos *Porphyridium purpureum*.

OBJETIVO 4: Estudio diferencial de la producción de exopolisacáridos en cultivos heterotróficos y autotróficos de *Porphyridium purpureum*.

OBJETIVO 5: Estudio *in vitro* de la actividad antioxidante, inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas de los polisacáridos *Euglena sp.*

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutracéuticos.*

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Durante el desarrollo de esta tesis se han generado 5 artículos de investigación. El contenido de todos ellos se resume a continuación.

Artículo 1:

Immunomodulatory and antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis*, and *Gelidium corneum*.

Son muchos los estudios que se están realizando sobre los polisacáridos de algas en los que se muestra la gran bioactividad que presentan por su actividad antioxidante, antitumoral, inmunomoduladora, anticoagulante, antiviral.

En el caso del estudio de *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis* y *Gelidium corneum*, que ha dado lugar a este artículo, se realizaron diversos ensayos para ver la bioactividad, siendo los resultados más llamativos los siguientes:

- Se observó que tanto la biomasa como los polisacáridos extraídos de estas algas poseen actividad antioxidante con los ensayos realizados (ABTS y DPPH) en biomasa y (ABTS) en polisacáridos. Principalmente en la biomasa y en los polisacáridos de *L. ochroleuca* con respecto a *P. umbilicalis*, y *G. corneum*.
- En cuanto a la determinación de citoquinas (TNF- α e IL-6), al poner en contacto los polisacáridos de estas algas con la línea celular RAW 264.7, se observó una secreción de estas citoquinas en todos los tratamientos. Sin embargo, los polisacáridos de *L. ochroleuca* son los que presentaron una mayor actividad inmunomoduladora pues los resultados mostraron una saturación de TNF- α y de IL-6 a las concentraciones de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de polisacárido respectivamente secretando unas concentraciones de citoquinas de 4187,79 pg mL^{-1} y 1217,06 pg mL^{-1} correspondientemente.
- Debido a los interesantes resultados de los polisacáridos de *L. ochroleuca*, con respecto a los obtenidos de *P. umbilicalis*, y *G. corneum*, se realizaron ensayos *in-vitro* con diferentes líneas celulares tumorales (U-937, G361, MCF-7 y HTC-116) a diferentes concentraciones de este polisacárido (0,0195 a 10 mg mL^{-1}), presentando la menor IC₅₀ en HTC-116 (IC₅₀= 436,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

En resumen, los polisacáridos de *L. ochroleuca* presentan un gran potencial para ser propuesto como componente para productos nutraceuticos.

Artículo 2:

Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Nägeli.

El estudio y uso de microalgas está aumentando en los últimos años debido a su gran utilidad en diferentes sectores por sus importantes componentes. En esta investigación nos centramos en el estudio de los exopolisacáridos extraídos de *P. purpureum* (PcSPs) y su posible aplicación como ingredientes en productos nutraceuticos,

Se realizaron diversos ensayos para ver la bioactividad de este compuesto y se caracterizó los PcSPs. Los resultados más destacados fueron:

- La caracterización de los PcSPs mediante el ensayo GC-MS identificó que el monosacárido predominante fue arabinosa seguido de α y β -galactosa, otros monosacáridos identificados fueron manosa, glucosa, fucosa, ácido glucurónico y en menor porcentaje xilosa y ribosa.
- En cuanto a la actividad antioxidante de la biomasa y de los PcSPs se observó que a las concentraciones estudiadas ambos poseen actividad antioxidante siendo máxima a la concentración de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.
- La actividad citotóxica de PcSPs sobre todas las líneas celulares tumorales estudiadas (HTC-116, U-937, HL-60, MCF-7, NCI-H460) presentó citotoxicidad a bajas concentraciones principalmente en la HL-60 con una IC_{50} de $1089,63 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esto se comprobó con la realización del ensayo de citometría sobre esta línea celular (HL-60) confirmándose que a concentraciones iguales y por encima de la concentración de la IC_{50} se producía un alto porcentaje de apoptosis en las células.
- Se pudo observar tanto los ensayos *in-vitro* como *in-vivo* que los PcSPs poseen efecto inmunomodulador. Así, en los ensayos *in-vitro* se observó que, al poner en contacto las células RAW 264.7 con diferentes concentraciones de PcSPs se produjo secreción de IL-6, llegando a saturación a la concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PcSPs. En el caso de TNF- α también se secretó y no se llegó a la saturación de esta citoquina en las concentraciones estudiadas de PcSPs.
- En cuanto a los ensayos *in-vivo* realizados en ratones machos Balb/C, se le administró intraperitoneal una solución salina con una determinada concentración

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

de PcSPs y se observó que no se produjo una respuesta antigénica o de hipersensibilidad en los ratones, por lo que parece seguro usar estos PcSPs al menos en el peritoneo, además tras la administración intraperitoneal los resultados mostraron que, los macrófagos sobrevivían más tiempo de lo normal en el peritoneo lo que puede ser una ventaja frente a la entrada de algún patógeno en la cavidad peritoneal.

Como conclusión, y en base a los resultados obtenidos se sugiere que, los PcSPs se pueden convertir en valiosos componentes nutraceuticos.

Artículo 3:

Adaptation of autotrophic to heterotrophic culture of *Porphyridium purpureum* (Bory) K.M. Drew & R.Ross: characterization of biomass and production of exopolysaccharides.

Las microalgas son organismos que cada vez están siendo más estudiadas dado sus importantes usos en las distintas industrias. Estas, son capaces de metabolizar compuestos inorgánicos, y algunos orgánicos, importantes para el ser humano. La síntesis de los metabolitos puede verse modificados según el cultivo usado como puede ser el caso de los exopolisacáridos (EPS) excretados al medio por *P. purpureum*.

En este estudio nos centramos en la comparación de la caracterización de la biomasa y la extracción de los EPS de *P. purpureum* en cultivos autótrofos y heterótrofos obteniendo los siguientes resultados:

- *P. purpureum* se adapta al cultivo heterótrofo a partir del autótrofo llegado a la fase estacionaria a los 10 días con una densidad celular de $7,2 \times 10^6$ células mL⁻¹ y una tasa de crecimiento promedio específica (μ) de 0,17 día⁻¹ en el cultivo autótrofo y de 8 días con una densidad celular de $5,3 \times 10^6$ células mL⁻¹ y una tasa de crecimiento promedio específica (μ) de 0,14 día⁻¹ en el cultivo heterótrofo.
- La biomasa del cultivo heterótrofo mostró un mayor contenido en C, N y relación C/N comparado con los obtenidos en el cultivo autótrofo. En cuanto al contenido de S, no se observaron diferencias significativas entre ambos cultivos.
- En cuanto a la composición bioquímica de la biomasa en el cultivo heterótrofo, el contenido en proteínas, lípidos y carbohidratos fue del orden de 1,1 veces mayor que en el cultivo autótrofo y de 2,8 en fenoles. Sin embargo, el contenido en compuestos inorgánicos y humedad fue mayor en el cultivo autótrofo.
- La actividad antioxidante de la biomasa por el método ABTS muestra mayor actividad en el cultivo autótrofo, a diferencia de los resultados obtenidos por el ensayo DPPH, en el que se obtuvo una mayor actividad antioxidante en el cultivo heterótrofo pues, este está correlacionado positivamente con el contenido en fenoles.

- El contenido en clorofila, carotenos y ficobiliproteínas se redujo en el cultivo heterótrofo con respecto al autótrofo.
- En cuanto a la cantidad de EPS ácidos y totales en los diferentes cultivos, se obtuvo la misma cantidad de EPS totales en el autótrofo (T-AT EPS) y en el heterótrofo (T-HT EPS), sin embargo, la cantidad de EPS ácidos en cultivos heterótrofos (AC-HT EPS) fue de 2,8 veces más que en el autótrofo (AC-AT EPS).
- En los EPS el contenido en C, N, S y C/N varió según el tipo de EPS y el cultivo. Así, el mayor % de C se observó en AC-AT EPS, de N fue en T-HT EPS, la relación C/N fue mayor en los EPS de cultivo autótrofo y de S se observó un mayor porcentaje en los EPS totales que en los ácidos.
- En el ensayo de caracterización de los EPS por GC-MS se observó que, los monosacáridos predominantes con respecto al resto de monosacáridos fueron, en ambos cultivos, galactopiranososa, galactosa, glucosa y ácido glucurónico. Donde, el % de glucosa y ácido glucurónico fue entre 12-15% mayor en HT EPS que en AT EPS, al contrario, ocurrió con xilosa y galactosa donde el % fue más alto en AT EPS que en HT EPS.
- Para finalizar, en el ensayo de actividad antioxidante de los EPS, mediante ABTS, se observó que no hubo diferencias significativas en los EPS de cultivo heterótrofo, sin embargo, si la hubo en el autotrófico con respecto al heterotrófico y con respecto a los EPS totales y ácidos en el autotrófico. Los resultados mostraron que la mayor actividad antioxidante se encontró en AC-AT EPS y la menor en T-AT EPS.

De estos resultados se desprenden que *P. purpureum* presenta interesantes diferencias en cuanto a su composición bioquímica según el tipo de cultivo, produciendo mayor cantidad de metabolitos como fenoles, proteínas, carbohidratos y lípidos en los cultivos heterotróficos. Además, en estos cultivos heterótrofos, se activa la acumulación, por peso, de monosacáridos específicos, como el ácido glucurónico, que por su bioactividad podría ser de interés biotecnológico e industrial.

Artículo 4:

Immunomodulatory, antioxidant and anticancer capacity of polysaccharides (glucans) from *Euglena gracilis* G.A. Klebs.

Las microalgas son organismos esenciales para la vida pues suelen ser muy eficientes en la fijación de CO₂ y en el aprovechamiento de la energía solar para producir biomasa, con una eficiencia hasta cuatro veces superior a la de las plantas. La importancia de las microalgas radica en su papel como productoras primarias en la cadena alimentaria, lo que las convierte en las primeras productoras de materia orgánica. Además, elaboran metabolitos que han sido estudiados con importantes propiedades, lo que ha dado lugar a que se fabriquen miles de productos a base de microalgas que van desde nutracéuticos a alimento para peces de acuicultura, suplemento dietético para animales y humanos e incluso cosméticos como cremas, champús, ...

Los resultados obtenidos en el estudio de esta microalga *Euglena gracilis* han sido los siguientes:

- El ensayo de análisis elemental de C, N, H y S en la biomasa y en los polisacáridos muestran un mayor contenido en C. El porcentaje de S en la biomasa es del 0,03%, y se incrementa en los polisacáridos hasta un 16%.
- En la caracterización de los EgPs mediante GC-MS se identificaron los siguientes monosacáridos glucosa, ribosa, manosa, galactosa y fucosa. Siendo el monosacáridos predominante la glucosa.
- La biomasa y los polisacáridos muestran actividad antioxidante mediante el método ABTS obteniendo el máximo de esta en ambos tratamientos a la concentración de 500 µg ml⁻¹. La biomasa también presenta actividad antioxidante detectada mediante el ensayo DPPH con un máximo a la concentración de 200 µg ml⁻¹.
- El estudio de la actividad citotóxica *in-vitro* de los EgPs mediante el ensayo MTT sobre las líneas HTC-116, U-937, HL-60, MCF-7 y NCI-H460 mostró citotoxicidad a bajas concentraciones principalmente en, HTC-116, U-937 y HL-60 obteniendo la IC₅₀ a 26,10 µg ml⁻¹, 27,54 µg ml⁻¹ y 18,20 µg ml⁻¹ respectivamente.

- La viabilidad celular en el ensayo MTT realizado en la línea celular HGF-1 con distinto número de células (más y menos proferativas) en contacto con distintas concentraciones de EgPs mostró que estos polisacáridos son más activos en las células en proliferación.
- La determinación de citoquinas IL-6 y TNF- α mostró un aumento exponencial a las concentraciones estudiadas en la línea celular RAW 264.7. Sin embargo, en el caso de la línea celular THP-1 la producción de TNF- α aumentó exponencialmente desde la concentración de EgPs 15,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ alcanzando su efecto máximo a 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$.
- El análisis de proteómica en la línea celular HGF-1 en contacto con EgPs, identificó 5 proteínas claves involucradas en su actividad biológica (AHSG, MYL12B, TMSB10, SOD2 y MT2).

Estos resultados muestran que los EgPs presentan capacidad anticancerígena, inmunomoduladora y antioxidante además de sobreexpresar 5 proteínas que interactúan entre sí y con el TNF- α y la IL-6. Al ser esta alga un producto natural sin efectos secundarios, debe ser considerado para el desarrollo de nutracéuticos que requieran su aplicación cuando se requiera la activación de macrófagos.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, podemos obtener las siguientes conclusiones:

En relación al objetivo 1 y 2:

Se ha confirmado que los polisacáridos de *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis*, y *Gelidium corneum*, tienen actividad antioxidante e inmunomoduladora, principalmente los de *Laminaria ochroleuca* con un $36,33 \pm 1,8\%$ de actividad antioxidante y con una saturación de IL-6 y TNF- α a la concentración de polisacárido de *Laminaria ochroleuca* de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Además, estos presentan potencial actividad citotóxica principalmente en la línea celular de cáncer de colon (HTC-116) obteniéndose la IC_{50} a $0,44 \text{ mg mL}^{-1}$.

En relación al objetivo 3:

Se ha determinado que los polisacáridos de *Porphyridium purpureum* poseen actividad antioxidante ($6,92 \pm 0,31\%$) e inmunomoduladora, principalmente por la activación en la línea celular RAW 264.7 de TNF- α , no llegando a saturación a las concentraciones estudiadas. Estos polisacáridos también tienen actividad citotóxica principalmente en la línea celular de leucemia humana (HL-60) con una IC_{50} de $1,1 \text{ mg mL}^{-1}$. En los ensayos *in-vivo*, se observó que se estimuló la migración de macrófagos a la zona del peritoneo, no produciendo respuesta antigénica o hipersensibilidad en ratones.

En relación al objetivo 4:

Se ha observado que *P. purpureum* se adapta al cultivo heterótrofo a partir de cultivo autótrofo, llegando a la fase estacionaria en 10 días. Además, se ha obtenido la misma cantidad de EPS totales en ambos tipos de cultivo y 2,8 veces más de EPS ácidos en el cultivo heterótrofo con respecto al cultivo autótrofo, acumulándose mayor cantidad de ácido glucurónico en los cultivos heterótrofos.

En relación al objetivo 5:

Se ha determinado que, los EgPs y la biomasa poseen actividad antioxidante con una actividad de $18,30 \pm 0,14\%$ y $5,40 \pm 0,26\%$ respectivamente. En estos polisacáridos se ha descrito además, su capacidad inmunomoduladora, por la activación en la línea celular RAW 264.7 de IL-6 y TNF- α , en la que no se ha llegado a la saturación a las concentraciones estudiadas de EgPs, y de TNF- α en la línea celular de monocitos humanos (THP-1) obteniendo un máximo de este a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. La actividad citotóxica estudiada muestra su actividad principalmente en la línea celular de leucemia humana (HL-60) con una IC_{50} de $0,018 \text{ mg mL}^{-1}$. En el análisis de proteómica, se han identificado en la línea celular de fibroblastos gingivales humanos (HGF-1) en contacto con EgPs, cinco proteínas claves involucradas en la actividad biológica (alfa-2-HS-glicoproteína (AHSG), cadena ligera reguladora de miosina 12B (MYL12B), timosina beta-10 (TMSB10), superóxido dismutasa-2 (SOD2) y metalotioneína-2 (MT2)).

En relación al objetivo general:

Con los estudios realizados, se ha observado que los polisacáridos de *L. ochroleuca* presenta una mayor actividad antioxidante ($36,33 \pm 1,8\%$) que el resto de las algas estudiadas. En el caso de la actividad inmunomoduladora, los polisacáridos de *E. gracilis* son los que presentan un mayor potencial en la actividad inmunomoduladora no llegando a la saturación de TNF- α e IL-6 a las concentraciones estudiadas y, en cuanto a la actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales humanas, los polisacáridos de *E. gracilis* son los que presenta una mayor actividad (MCF-7 ($0,11 \text{ mg mL}^{-1}$), NCI-H460 ($0,10 \text{ mg mL}^{-1}$), U-937 ($0,03 \text{ mg mL}^{-1}$), HL-60 ($0,018 \text{ mg mL}^{-1}$) y HTC ($0,03 \text{ mg mL}^{-1}$)).

Podemos concluir que, los polisacáridos de *E. gracilis* son los que presentan un mayor potencial para ser considerado como nutracéutico para la industria biotecnológica.

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutracéuticos.*

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Baky HH, El-Baz FK, El-Baroty GS (2009) Potential biological properties of sulphated polysaccharides extracted from the macroalgae *Ulva lactuca* L. Acad J Cancer Res 2:1–11
- Abdala Díaz RT, Chabrillón M, Cabello Pasini A, et al (2010) Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7. Ciencias Mar 36:345–353. <https://doi.org/doi.org/10.7773/cm.v36i4.1732>
- Acien Fernández FG, Fernández Sevilla JM, Molina Grima E (2013) Photobioreactors for the production of microalgae. Rev Environ Sci Biotechnol 12:131–151. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9307-6>
- Acien FG, Fernandez-Sevilla JM, Molina-Grima E (2017) Microalgae: The basis of mankind sustainability. In: In: Case Study of Innovative Projects - Successful Real Cases . InTech. pp 123–140
- Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS (2011) Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. Mar Drugs 9:2106–2130. <https://doi.org/10.3390/md9102106>
- Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX (2011) Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. Appl Energy 88:3402–3410. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.014>
- Ammar HH, Lajili S, Said R Ben, et al (2015) Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus *Cystoseira* . DARU, J Pharm Sci 23:4–11. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0089-6>
- Andrade GA De, Berenguel M, Guzmán JL, et al (2016) Optimization of biomass production in outdoor tubular photobioreactors Optimization of biomass production in outdoor tubular photobioreactors. J Process Control 37:58–69. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2015.10.001>
- Andrade DS, Amaral HF, Gavilanes FZ, et al (2021) Microalgae : Cultivation , Biotechnological , Environmental , and Agricultural Applications. In: N.R. M, L.C. GC, S. C (eds) Advances in the Domain of Environmental Biotechnology. Environmental and Microbial Biotechnology, Springer. Singapore, pp 635–701
- Ayarza León JL (2014) Los alginatos: 20000 usos de las algas submarinas. Rev Quim

- PUCP 28:379–395
- Bacha F (2019) Las algas en la alimentación de rumiantes. *Nutr Am Lat* 46–55
- Balat M, Balat H (2010) Progress in biodiesel processing. *Appl Energy* 87:1815–1835.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.01.012>
- Balat M, Balat H, Öz C (2008) Progress in bioethanol processing. *Prog Energy Combust Sci* 34:551–573. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>
- Barsanti L, Gualtieri P (2019) Paramylon, a potent immunomodulator from WZSL mutant of *Euglena gracilis*. *Molecules* 24:1–14.
<https://doi.org/10.3390/molecules24173114>
- Barsanti L, Passarelli V, Evangelista V, et al (2011) Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β -glucans. *Nat. Prod. Rep.* 28:457–466
- Becker EW (2007) Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv* 25:207–210.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Becker M, Zweckmair T, Forneck A, et al (2013) Evaluation of different derivatisation approaches for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of carbohydrates in complex matrices of biological and synthetic origin. *J Chromatogr A* 1281:115–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.053>
- Beer LL, Boyd ES, Peters JW, Posewitz MC (2009) Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr Opin Biotechnol* 20:264–271.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.06.002>
- Bermejo Román R, Álvarez-Pez JM, Acién Fernández FG, Molina Grima E (2002) Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *J Biotechnol* 93:73–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00385-6)
- Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, et al (2004) A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. *Carbohydr Res* 339:511–517. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.028>
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Brown MR (2002) Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. In: *Avances en Nutrición Acuacola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuacola*. Cancún, Quintana Roo, México, pp 281–292
- Brownlee IA, Allen A, Pearson JP, et al (2005) Alginate as a source of dietary fiber.

- Crit Rev FoodScience andNutrition 45:497–510.
<https://doi.org/10.1080/10408390500285673>
- Buck CB, Thompson CD, Roberts JN, et al (2006) Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. PLoS Pathog 2:0671–0680.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020069>
- Bustamante M, Tajadura J, Gorostiaga JM, Saiz-Salinas JI (2014) Response of rocky invertebrate diversity, structure and function to the vertical layering of vegetation. Estuar Coast Shelf Sci 147:148–155. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.06.001>
- Cai J, Lovatelli A, Aguilar-Manjarrez J, et al (2021) Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development. FAO Fisheries and Aquaculture Circular, Rome
- Canavante Hors JP (2011) Funciones de las microalgas en acuicultura. In: Las algas como recurso. Valorización. Aplicaciones industriales y tendencias, Centro Tec. Vigo, Spain, pp 193–205
- Capa Robles WR (2022) Mixotrofia fotosintética inducida en *Dunaliella salina*: rendimiento y rutas de biosíntesis de isoprenoides, β -caroteno y carotenogénesis
- Carrillo S, López E, Casas MM, et al (2008) Potential use of seaweeds in the laying hen ration to improve the quality of n-3 fatty acid enriched eggs. J Appl Phycol 20:721–728. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9334-4>
- Castillo OS, Torres-Badajoz SG, Núñez-Colín CA, et al (2017) Biodiesel production from microalgae: Progress and biotechnological prospects. Hidrobiologica 27:337–352. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/hidro/2017v27n3/rodriguez>
- Castro R, Piazzon MC, Zarra I, et al (2006) Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. Aquaculture 254:9–20.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.012>
- Castro R, Zarra I, Lamas J (2004) Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. Aquaculture 229:67–78.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00401-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00401-0)
- Černá M (2011) Seaweed proteins and amino acids as nutraceuticals. In: Se-kwon K (ed) Advances in Food and Nutrition Research, 1st edn. Elsevier Inc., N.Y., pp 297–312
- Charles AL, Huang TC (2009) Sweet cassava polysaccharide extracts protects against CCl4 liver injury in Wistar rats. Food Hydrocoll 23:1494–1500.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.011>
- Chen X, Song L, Wang H, et al (2019) Partial characterization, the immune modulation and anticancer activities of sulfated polysaccharides from filamentous microalgae *Tribonema sp.* *Molecules* 24:1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules24020322>
- Cheng AC, Chen YY, Chen JC (2008) Dietary administration of sodium alginate and κ -carrageenan enhances the innate immune response of brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121:206–215
- Chew KW, Chia SR, Show PL, et al (2018) Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *J Taiwan Inst Chem Eng* 91:332–344. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>
- Chew LY, Toh GT, Ismail A (2019) Application of proteases for the production of bioactive peptides. In: *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Elsevier Inc., pp 247–261
- Chisti Y (2008) Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol* 26:126–131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Chizhov AO, Dell A, Morris HR, et al (1999) A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res* 320:108–119. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00148-2)
- Christaki (E. Χρηστακη) E, Karatzia (M. Καρατζια) M, Florou-Paneri (Π. Φλωρου-Πανερη) P (2017) The use of algae in animal nutrition. *J Hell Vet Med Soc* 61:267–276. <https://doi.org/https://doi.org/10.12681/jhvms.14894>
<http://epublishing.ekt.gr>
- Cohen Z, Shiran D, Khozin I, Heimer YM (1997) Fatty acid unsaturation in the red alga *Porphyridium cruentum*. Is the methylene interrupted nature of polyunsaturated fatty acids an intrinsic property of the desaturases? *Biochim Biophys Acta-Lipids Lipid Metab* 1344:59–64. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0005-2760\(96\)00132-4](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0005-2760(96)00132-4)
- Comisión Europea (2018) Recomendación (UE) 2018/464 de la Comisión de 19 de marzo de 2018 relativa al control de metales y yodo en las algas marinas, las plantas halófilas y los productos a base de algas marinas. D. Of. la Unión Eur. L 78/16:16–18
- Conchie J, Perciva EGV (1950) Fucoidin part II. The Hydrolysis of a Methylated Puwidin prepared from *Fucus vesiculosus*. *J Chem Soc* 827–833.

- <https://doi.org/10.1039/JR9500000827>
- Craigie JS (1990) Cell walls. In: Cole KM, Sheath RG (eds) *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp 221–257
- Cremades Ugarte J, Cañavate Hors JP, Fernández Aldana J, Ojeda J (2016) Elaboración de indicadores de sostenibilidad para la explotación de macroalgas en España
- Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, et al (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17:541–552.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwm014>
- Cunha L, Grenha A (2016) Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. *Mar Drugs* 14:.
<https://doi.org/10.3390/md14030042>
- D'Imporzano G, Salati S, Varonesi D, et al (2017) Microalgae mixotrophic growth: Opportunity for stream depuration and carbon recovery. In: Tripathi BN, Kumar D (eds) *Prospects and Challenges in Algal Biotechnology*. Springer Nature, Singapore., pp 141–177
- De Jesus Raposo FM, Bernardo De Morais AM, Santos Costa de Morais RM (2015) Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar Drugs* 13:2967–3028. <https://doi.org/10.3390/md13052967>
- Devillé C, Damas J, Forget P, et al (2004) Laminarin in the dietary fibre concept. *J Sci Food Agric* 84:1030–1038. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1754>
- Di T, Chen G, Sun Y, et al (2017) Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. *J Funct Foods* 28:64–75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.005>
- Doumeizel V, Aass K, McNevin A, et al (2020) Seaweed Revolution: A manifesto for a sustainable future
- Duarte MER, Cardoso MA, Nosedá MD, Cerezo AS (2001) Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr Res* 333:281–293
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Biochem* 28:350–356.
<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dvir I, Stark AH, Chayoth R, et al (2009) Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals

- produced from the red microalga *Porphyridium sp* in rats. *Nutrients* 1:156–167.
<https://doi.org/10.3390/nu1020156>
- El-Chaghaby G, Rashad S (2021) An overview of algae prospects in cosmeceuticals. *J Egypt Women's Dermatologic Soc* 18:161–166.
https://doi.org/10.4103/jewd.jewd_22_21
- El Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea (2002) Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 enero 2002 se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. 1–18
- FAO (2021) Top 10 species groups in global, regional and national aquaculture 2019
- FAO (2018) The state of fisheries and aquaculture in the world 2018. Rome, Italy
- Fernandez Sevilla JM (2014) Obtenido de ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas: Fotobiorreactores para el cultivo masivo de microalgas. <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-7-fotobiorreactores.html>
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* (80-) 281:237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Fleurence J, Gutbier G, Mabeau S, Leray C (1994) Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *J Appl Phycol* 6:527–532.
<https://doi.org/10.1007/BF02182406>
- Flórez-Méndez J, González L (2019) Role of the consumption of fucoidans and beta-glucans on human health: An update of the literature. *Rev Chil Nutr* 46:768–775.
<https://doi.org/10.4067/S0717-75182019000600768>
- Folch J, Less M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
- Folin O, Ciocalteau V (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 73:627–648
- Franklin ST, Martin KR, Baer RJ, et al (1999) Dietary marine algae (*Schizochytrium sp.*) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *J Nutr* 129:2048–2052.
<https://doi.org/10.1093/jn/129.11.2048>
- Fujiki K, Shin D, Nakao M, Yano T (1997) Effects of K-Carrageenan on the Non-

- Specific of Carp *Cyprinus carpio*. *Fish Sci* 63:934–938
- García-García JD, Girard L, Hernández G, et al (2014) Zn-bis-glutathionate is the best co-substrate of the monomeric phytochelatin synthase from the photosynthetic heavy metal-hyperaccumulator *Euglena gracilis*. *Metallomics* 6:604–616.
<https://doi.org/10.1039/c3mt00313b>
- García-García JD, Peña-Sanabria KA, Sánchez-Thomas R, Moreno-Sánchez R (2018) Nickel accumulation by the green algae-like *Euglena gracilis*. *J Hazard Mater* 343:10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.008>
- García DC, González-Mendoza D, Cervantes-Díaz L, et al (2011) Respuesta fisiológica de *Euglena gracilis* al estrés por cobre. *Quim Nova* 34:1211–1214.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000700020>
- García Reina G (2020) Usos y aplicaciones de macroalgas, microalgas y cianobacterias en agricultura ecológica. In: IV Congreso Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE). Córdoba
- Gaspar R, Pereira L, Sousa-Pinto I (2019) The seaweed resources of Portugal. *Bot Mar* 62:499–525. <https://doi.org/10.1515/bot-2019-0012>
- Gharbi M, Dandrifosse G, Peulen O, Devill C (2007) Study on the effects of laminarin , a polysaccharide from seaweed , on gut characteristics. *J Sci Food Agric* 87:1717–1725. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Ginzberg A, Cohen M, Sod-Moriah UA, et al (2000) Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium sp.* have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *J Appl Phycol* 12:325–330.
<https://doi.org/10.1023/A:1008102622276>
- Gissibl A, Care A, Parker LM, et al (2018) Microwave pretreatment of paramylon enhances the enzymatic production of soluble β -1,3-glucans with immunostimulatory activity. *Carbohydr. Polym.* 196:339–347
- Gómez Ordóñez E (2013) Propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios in vitro e in vivo. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia
- Greenwell HC, Laurens LML, Shields RJ, et al (2010) Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges. *J R Soc Interface* 7:703–726. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0322>
- Grigorova S, Surdjiiska S, Banskalieva V, Dimitrov G (2006) The effect of biomass

- from green algae of *Chlorella* genus on the biochemical characteristics of table eggs. *J Cent Eur Agric* 7:111–116. <https://doi.org/10.5513/JCEA.V7I1.361>
- Grinstead GS, Tokach MD, Dritz SS, et al (2000) Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. *Anim Feed Sci Technol* 83:237–247. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00130-3)
- Guil-Guerrero JL, Navarro-Juárez R, López-Martínez J, et al (2004) Functional properties of the biomass of three microalgal species. *J Food Eng* 65:511–517. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.02.014>
- Guzmán JL, Acién FG, Berenguel M (2021) Modelado y control de la producción de microalgas en fotobiorreactores industriales. *Rev Iberoam Automática e Informática Ind* 18:1–18. <https://doi.org/10.4995/riai.2020.13604>
- Hamed I, Özogul F, Özogul Y, Regenstein JM (2015) Marine bioactive compounds and their health benefits: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 14:446–465. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12136>
- Hentati F, Tounsi L, Djomdi D, et al (2020) Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. *Molecules* 25:1–29
- Heo SJ, Hwang JY, Choi JI, et al (2009) Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 615:252–256. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.05.017>
- Hesse W (1992) Walther and Angelina Hesse—Early Contributors to Bacteriology. In an unassuming way, they moved agar from the kitchen to the lab, revolutionizing bacteriology. *ASM News* 5:425–428
- Hoebler C, Guillon F, Darcy-Vrillon B, et al (2000) Supplementation of pig diet with algal fibre changes the chemical and physicochemical characteristics of digesta. *J Sci Food Agric* 80:1357–1364. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200007\)80:9<1357::AID-JSFA657>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200007)80:9<1357::AID-JSFA657>3.0.CO;2-B)
- Holdt Susan Løvstad, Kraan Stefan (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J Appl Phycol* 23:543–597. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5>
- Huheihel M, Ishanu V, Tal J, Arad SM (2002) Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *J Biochem Biophys Methods* 50:189–200. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00186-5](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00186-5)

- Instituto Español de Oceanografía (2015) Investigating the link between sub-littoral algae habitats and fish communities in the Mediterranean Sea Final Report Summary - LINKFISH (Investigating the link between sub-littoral algae habitats and fish communities in the Mediterranean Sea)
- Ipacuicultura. (2021) El cultivo de algas marinas en 2019 representó el 28,9 % de toda la producción acuícola mundial.
http://www.ipacuicultura.com/noticias/en_portada/7
- Isaka S, Cho K, Nakazono S, et al (2015) Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*) . Int J Biol Macromol 74:68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.043>
- Ismail BP (2017) Ash content determination. In: Food Analysis Laboratory Manual, Food Science Text Series, 5th edn. Springer International, Minnesota, pp 117–119
- Ito K, Hori K (1989) Seaweed: Chemical composition and potential food uses. Food Rev Int 5:101–144. <https://doi.org/10.1080/87559128909540845>
- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS (2011) Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. Mar Drugs 9:196–233.
<https://doi.org/10.3390/md9020196>
- Jiao L, Li X, Li T, et al (2009) International Immunopharmacology characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. Int Immunopharmacol 9:324–329.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.12.010>
- Jimenez-Escrig A, Sanchez-Muniz F (2000) Dietary fiber from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. Nutr Res 20:585–598
- Jin J, Yadav D, Madhwani K, et al (2022) Seaweeds in the oncology Arena: Anti-cancer potential of fucoidan as a drug - A Review. Molecules 27:1–26.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules27186032> Academic
- John D (1994) Biodiversity and conservation: An algal perspective. Phycol 38:3–15
- Kadam SU, Tiwari BK, Smyth TJ, O'Donnell CP (2015) Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology. Ultrason Sonochem 23:308–316.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.007>
- Khalid S, Abbas M, Saeed F, et al (2018) Therapeutic potential of seaweed bioactive

- compounds. In: Sabyasachi M (ed) Seaweed Biomaterials
- Khan MI, Shin JH, Kim JD (2018) The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact* 17:1–21.
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Khozin-Goldberg I, Yu HZ, Adlerstein D, et al (2000) Triacylglycerols of the red microalga *Porphyridium cruentum* can contribute to the biosynthesis of eukaryotic galactolipids. *Lipids* 35:881–889. <https://doi.org/10.1007/S11745-000-0597-8>
- Kim EJ, Park SY, Lee J, et al (2010) Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterol* 2010, 10:1–11
- Kim S, Thomas NV, Li X (2011) Anticancer compounds from marine macroalgae and their application as medicinal foods. In: *Marine Medicinal Foods*, 1st edn. Elsevier Inc., pp 213–224
- Koch R (1882) Die ätiologie der tuberculose. *Aus Berliner Klin Wochenschrift* 1:457–465. [https://doi.org/10.1016/s0174-3031\(82\)80099-1](https://doi.org/10.1016/s0174-3031(82)80099-1)
- Kochert AG (1978) Carbohydrate determination by the phenol–sulfuric acid method. Cambridge Univ. Press, Cambridge
- Kulpys J, Paulauskas E, Simkus A, Jeresiunas A (2009) The influence of weed *Spirulina platensis* on production and profitability of milking cows. *Vet ir Zootech* 46:24–29
- Lahaye M, Kaeffer B (1997) Seaweed dietary fibres: Structure, physico-chemical and biological properties relevant to intestinal physiology. *Sci des Aliment* 17:563–584
- Lahaye M, Ray B, Baumberger S, et al (1996) Chemical characterisation and gelling properties of cell wall polysaccharides from species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). *Hydrobiologia* 326–327:473–480.
<https://doi.org/10.1007/BF00047848>
- Lahaye M, Robic A (2007) Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 8:24–30
- Lee Y-K (2001) Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *J Appl Phycol* 13:307–315.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1017560006941>
- Leigh EG, Paine RT, Quinn JF, Suchanek TH (1987) Wave energy and intertidal productivity. *Proc Natl Acad Sci* 84:1314–1318.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.84.5.1314>
- Li B, Lu F, Wei X, Zhao R (2008) Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules* 13:1671–1695. <https://doi.org/10.3390/molecules13081671>
- Li Q, Wang J, Zha X, et al (2016) Structural characterization and immunomodulatory activity of a new polysaccharide from jellyfish. *Carbohydr Polym* 1:188–194. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.031>
- Li S, Gao A, Dong S, et al (2017) International Journal of Biological Macromolecules Purification, antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from soybean residue fermented with *Morchella esculenta*. *Int J Biol Macromol* 96:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.007>
- Li Y, Zhou W, Hu B, et al (2012) Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains *Chlorella kessleri* and *Chlorella protothecoide* cultivated in highly concentrated municipal wastewater. *Biotechnol Bioeng* 109:2222–2229. <https://doi.org/10.1002/bit.24491>
- Linares-Fernández LC, Montiel-Montoya J, Millán-Oropeza A, Badillo-Corona JA (2012) Production of biofuels obtained from microalgae. *Ra Ximhai Rev Soc y Desarro Sustentable* 8:101–115
- Lourenço SO, Barbarino E, De-paula JC, et al (2002) Amino acid composition , protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol Res* 50:233–241
- Lourenço SO, Barbarino E, Lavín PL, et al (2004) Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *Eur J Phycol* 39:17–32. <https://doi.org/10.1080/0967026032000157156>
- Mabeau S, Fleurence J (1993) Seaweed in food products : biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci Technol* 4:103–107
- MacArtain P, Gill CIR, Brooks M, et al (2007) Nutritional value of edible seaweeds. *Nutr Rev* 65:535–543. <https://doi.org/10.1301/nr.2007.dec.535-543>
- Madhujith T, Wedamulla NE, Gamage DAS (2022) Biological macromolecules as antioxidants. In: Nayak AK, Dhara AK, Pal D (eds) *Biological Macromolecules*. pp 139–164
- Mansilla A, Alveal K (2004) Generalidades sobre las macroalgas. In: *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*. pp 346–362
- Maroneze MM, Alberto C, Herrera M, Martínez Jiménez A (2021) Perspectivas sobre

- los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica. *BioTecnología* 25:11–34
- Martins RM, Nedel F, Guimarães VBS, et al (2018) Macroalgae extracts from Antarctica have antimicrobial and anticancer potential. *Front Microbiol* 9:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00412>
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 14:217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- McHugh DJ (1987) *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds*, FAO Fisher. Rome
- McHugh DJ (1991) Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. *Hydrobiologia* 221:19–29. <https://doi.org/10.1007/BF00028359>
- McHugh DJ (2003) *A Guide to the Seaweed Industry*. Rome
- McLachlan J (1985) Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization*. *Plant Soil* 89:137–157. <https://doi.org/10.1007/BF02182240>
- Merkle RK, Poppe I (1994) Carbohydrate composition analysis of glycoconjugates by gas-liquid chromatography/mass spectrometry. *Methods Enzymol* 230:1–15. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)30003-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)30003-8)
- Metsoviti MN, Katsoulas N, Karapanagiotidis IT, Papapolymerou G (2019) Effect of nitrogen concentration, two-stage and prolonged cultivation on growth rate, lipid and protein content of *Chlorella vulgaris*. *J Chem Technol Biotechnol* 94:1466–1473. <https://doi.org/10.1002/jctb.5899>
- Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, et al (1999) Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Int J Cancer* 83:424–431
- Moller G (2013) ¿De dónde viene el agar? In: *Microbiologiageneraluvg*. <https://microbiologiageneraluvg.wordpress.com/2013/10/19/de-donde-viene-el-agar/>
- Montelongo SP (2018) Determinación de metales y elementos traza en algas: Evaluación nutricional y toxicológica. Universidad de la Laguna
- Murwanashyaka T, Shen L, Yang Z, et al (2020) Kinetic modelling of heterotrophic microalgae culture in wastewater: storage molecule generation and pollutants

- mitigation. *Biochem Eng J* 107523. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107523>
- Nakazono S, Cho K, Isaka S, et al (2016) Anti-obesity effects of enzymatically-digested alginate oligomer in mice model fed a high-fat-diet. *Bioact Carbohydrates Diet Fibre* 7:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2016.02.001>
- Nemzer B V, Kalita D, Yashin AY, et al (2019) In vitro antioxidant activities of natural polysaccharides: An overview. *J Food Res* 8:78–93. <https://doi.org/10.5539/jfr.v8n6p78>
- Oliveira MN de, Freitas ALP, Carvalho AFU, et al (2009) Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, Brazil. *Food Chem* 115:254–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.004>
- Olsen AI, Olsen Y, Attramadal Y, et al (2000) Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 190:11–25. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00396-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00396-3)
- Pålsson C, Granéli W (2004) Nutrient limitation of autotrophic and mixotrophic phytoplankton in a temperate and tropical humic lake gradient. *J Plankton Res* 26:1005–1014. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbh089>
- Pangestuti R, Kim SK (2011) Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J Funct Foods* 3:255–266. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>
- Panlasigui LN, Baello OQ, Dimatangal JM, Dumelod BD (2003) Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers. *Asia Pac J Clin Nutr* 12:209–214
- Papapolymerou G. , Karayannis V. , Besios A. , et al (2019) Scaling-up sustainable *Chlorella vulgaris* microalgal biomass cultivation from laboratory to pilot-plant photobioreactor, towards biofuel. *Glob NEST J* 21:37–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.30955/gnj.002777>
- Patarra RF, Paiva L, Neto AI, et al (2011) Nutritional value of selected macroalgae. *J Appl Phycol* 23:205–208. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9556-0>
- Patil V, Källqvist T, Olsen E, et al (2007) Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquac Int* 15:1–9. <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>
- Paulsen BS (2002) Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. *Phytochem Rev* 1:379–387. <https://doi.org/10.1023/A:1026020404143>

- Peñalver R, Lorenzo JM, Ros G, et al (2020) Seaweeds as a functional ingredient for a healthy diet. *Mar Drugs* 18:1–27. <https://doi.org/10.3390/md18060301>
- Pereira F (2019) Have marine natural product drug discovery efforts been productive and how can we improve their efficiency? *Expert Opin Drug Discov* 14:717–722. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1604675>
- Peso-Echarri P, Frontela-Saseta C, González-Bermúdez CA, et al (2012) Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. *Rev Biol Mar Oceanogr* 47:373–381. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000300001>
- Pollak DW, Bostick MW, Yoon H, et al (2012) Isolation of a $\Delta 5$ desaturase gene from *Euglena gracilis* and functional dissection of its HPGG and HDASH motifs. *Lipids* 47:913–926. <https://doi.org/10.1007/s11745-012-3690-1>
- Pooja SL (2014) Algae used as medicine and food-A short review. *J Pharm Sci Res* 6:33–35
- Posten C (2009) Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng Life Sci* 9:165–177. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>
- Quemener B, Lahaye M, Bobin-Dubigeon C (1997) Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. *J Appl Phycol* 9:179–188. <https://doi.org/10.1023/A:1007971023478>
- Radulovich R, Neori A, Valderrama D, et al (2015) Farming of seaweeds. In: *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*, Elsevier. Amsterdam, pp 27–59
- Ramu Ganesan A, Subramani K, Shanmugam M, et al (2020) A comparison of nutritional value of underexploited edible seaweeds with recommended dietary allowances. *J King Saud Univ - Sci* 32:1206–1211. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.009>
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rehman ZU, Shah WH (2005) Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chem* 91:327–331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.019>
- Renn D (1997) Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: Status,

- needs and prospects. Trends Biotechnol 15:9–14. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10069-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10069-X)
- Riou D, Collic-Jouault S, Pinczon du Sel D, et al (1996) Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. Anticancer Res 16:1213–1218
- Rioux L, Turgeon SL, Beaulieu M (2007) Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. Carbohydr Polym 69:530–537. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.01.009>
- Ritchie RJ (2006) Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. Photosynth Res 89:27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Rittmann BE (2008) Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. Biotechnol Bioeng 100:203–212. <https://doi.org/10.1002/bit.21875>
- Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, et al (2007) Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. Nat Med 13:857–861. <https://doi.org/10.1038/nm1598>
- Robic A, Lerat Y, Lahaye M (2009) Ultrastructure of Ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. Biopolymers 91:652–664. <https://doi.org/10.1002/bip.21195>
- Rocha RJ, Ribeiro L, Costa R, Dinis MT (2008) Does the presence of microalgae influence fish larvae prey capture? Aquac Res 39:362–369. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01746.x>
- Rodríguez-Concepcion M, Avalos J, Bonet ML, et al (2018) A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. Prog Lipid Res 70:62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>
- Rodríguez-Zavala JS, Ortiz-Cruz MA, Mendoza-Hernández G, Moreno-Sánchez R (2010) Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. J Appl Microbiol 109:2160–2172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04848.x>
- Rupérez P, Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A (2013) Biological activity of algal sulfated and nonsulfated polysaccharides. In: Hernandez-Ledesma B, Herrero M (eds) Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources. Chicago, IL: John Wiley & Sons, Ltd. and Institute of Food Technologists, pp 219–247

- Russo R, Barsanti L, Evangelista V, et al (2017) *Euglena gracilis* paramylon activates human lymphocytes by upregulating pro-inflammatory factors. *Food Sci Nutr* 5:205–214. <https://doi.org/10.1002/fsn3.383>
- Sanjeeva KKA, Kim EA, Son KT, Jeon YJ (2016) Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. *J Photochem Photobiol B Biol* 162:100–105. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.027>
- Šantek B, Felski M, Friehs K, et al (2010) Production of paramylon, a β -1,3-glucan, by heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* on potato liquor. *Eng Life Sci* 10:165–170. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900077>
- Schepetkin IA, Faulkner CL, Nelson-overton LK, et al (2005) Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. *Int Immunopharmacol* 5:1783–1799. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.05.009>
- Schepetkin IA, Quinn MT (2006) Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 6:317–333. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.10.005>
- Scott SA, Davey MP, Dennis JS, et al (2010) Biodiesel from algae: Challenges and prospects. *Curr Opin Biotechnol* 21:277–286. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.005>
- Scotter MJ, Castle L, Roberts DPT (2006) Estimation of sucrose esters (E473) in foods using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Addit Contam* 23:539–546. <https://doi.org/10.1080/02652030600631877>
- Senthilkumar K, Manivasagan P, Venkatesan J, Kim SK (2013) Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. *Int J Biol Macromol* 60:366–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.030>
- Setyaningsih I, Prasetyo H, Agungpriyono DR, Tarman K (2020) Antihyperglycemic activity of *Porphyridium cruentum* biomass and extra-cellular polysaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biol Macromol* 156:1381–1386. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.178>
- Shanura Fernando IP, Asanka Sanjeeva KK, Samarakoon KW, et al (2017) FTIR characterization and antioxidant activity of water soluble crude polysaccharides of Sri Lankan marine algae. *Algae* 32:75–86.

- <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.12.1>
- Shao P, Chen X, Sun P (2013) In vitro antioxidant and antitumor activities of different sulfated polysaccharides isolated from three algae. *Int J Biol Macromol* 62:155–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.023>
- Shi Q, Wang A, Lu Z, et al (2017) Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds. *Carbohydr Res* 453–454:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.10.020>
- Shiran D, Khozin I, Heimer YM, Cohen Z (1996) Biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga *Porphyridium cruentum*. I: The use of externally supplied fatty acids. *Lipids* 31:1277–1282. <https://doi.org/10.1007/BF02587913>
- Sithranga Boopathy N, Kathiresan K (2010) Anticancer drugs from marine flora : An overview. *J Oncol* 2010:1–18. <https://doi.org/10.1155/2010/214186>
- Sjors van Iersel, Gamba L, Rossi A, et al (2009) Algae-based Biofuels: A review of challenges and opportunities for developing countries
- Snow AA, Smith VH (2012) Genetically engineered algae for biofuels: A key role for ecologists. *Bioscience* 62:765–768. <https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.8.9>
- Song R, Wu Q, Yun Z, Zhao L (2020) Advances in antioxidative bioactive macromolecules. *IOP Conf Ser Earth Env* 512:012094. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/512/1/012094>
- Soria AC., Brok M., Sanz ML., Martínez-Castro I (2012) Comprehensive sampling and sample preparation. *Analytical techniques for scientists*.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101:87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Strickland JDH, Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, 2nd ed. Ottawa
- Suleria HAR (2016) Marine processing waste - In search of bioactive molecules. *Nat Prod Chem Res* 4:. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000e118>
- Suleria HAR, Masci P, Gobe G, Osborne S (2016) Current and potential uses of bioactive molecules from marine processing waste. *J Sci Food Agric* 96:1064–1067. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7444>
- Sun L, Wang L, Zhou Y (2012) Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydr Polym* 87:1206–1210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.097>

- Synytsya A, Copáková J, Kim WJ, Park YI (2015) Cell wall polysaccharides of marine algae. In: Kim SK (ed) Springer handbook of marine biotechnology. Heidelberg: Springer, Berlin, pp 543–590
- Tanna B, Mishra A (2018) Metabolites unravel nutraceutical potential of edible seaweeds: An emerging source of functional food. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 17:1613–1624. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12396>
- Tanna B, Mishra A (2019) Nutraceutical potential of seaweed polysaccharides: structure, bioactivity, safety, and toxicity. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 18:817–831. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12441>
- Tannin-Spitz T, Bergman M, Van-Moppes D, et al (2005) Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium sp.* *J Appl Phycol* 17:215–222. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-0679-7>
- Teas J, Irhimeh MR (2012) Dietary algae and HIV / AIDS : proof of concept clinical data. *J Appl Phycol* 24:575–582. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9766-0>
- Timilsina GR, Mevel S (2013) Biofuels and climate change mitigation: A CGE analysis incorporating land-use change. *Environ Resour Econ* 55:1–19. <https://doi.org/10.1007/s10640-012-9609-8>
- Trabelsi L, Chaieb O, Mnari A, et al (2016) Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella sp.* *BMC Complement Altern Med* 16:210. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1198-6>
- Troncoso MA (2014) Caracterización de los polisacáridos presentes en *Nothogenia fastigiata* (Bory de Saint-Vincent) P.G. Parkinson: Actividad Biológica y Aspectos fisiológicos
- Tziveleka LA, Ioannou E, Roussis V (2019) Ulvan, a bioactive marine sulphated polysaccharide as a key constituent of hybrid biomaterials: A review. *Carbohydr Polym* 218:355–370. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.074>
- Udayan A, Arumugam M, Pandey A (2017) Nutraceuticals From Algae and Cyanobacteria. In: Rastogi RP, Madamwar D, Pandey A (eds) *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*, Elsevier. pp 65–89
- Vaugelade P, Hoebler C, Bernard F, et al (2000) Non-starch polysaccharides extracted from seaweed can modulate intestinal absorption of glucose and insulin response in the pig. *Reprod Nutr Dev EDP Sci* 40:33–47. <https://doi.org/10.1051/rnd>

- Velea S, Oancea F, Fischer F (2017) Heterotrophic and mixotrophic microalgae cultivation. Elsevier Ltd.
- Vizcaíno Torres AJ (2016) Evaluación de la harina de algas como ingrediente en piensos de peces marinos.
- Vonshak A (1986) Laboratory Techniques for the Cultivation of Microalgae. In: Richmon A (ed) Handbook of Microalgal Mass Culture, CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, pp 117–145
- Wang E, Sorolla MA, Darshini P, et al (2020) From seabed to bedside : A review on promising marine anticancer compounds. *Biomolecules* 10:248.
<https://doi.org/10.3390/biom10020248>
- Wang X, Li W, Xiao L, et al (2017) In vivo antihyperlipidemic and antioxidant activity of porphyran in hyperlipidemic mice. *Carbohydr Polym* 174:417–420.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.040>
- Wang Y, Han F, Hu B, et al (2006) In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Nutr Res* 26:597–603. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2006.09.015>
- Warrand J (2006) Healthy polysaccharides. In: Food Technology and Biotechnology. pp 355–370
- Wijesekara I, Pangestuti R, Kim SK (2011) Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr Polym* 84:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>
- WRI 2018-2019 Annual Report (2019) Bigger Problems, Better Solutions
- Yang L, Zhang LM (2009) Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydr Polym* 76:349–361. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.015>
- Yin Z, Zhu L, Li S, et al (2020) A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresour Technol* 301:122804.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>
- Yu Y, Shen M, Song Q, Xie J (2018) Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources : A review. *Carbohydr Polym* 183:91–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.009>
- Zhu S, Wang Y, Shang C, et al (2015) Characterization of lipid and fatty acids

- composition of *Chlorella zofingiensis* in response to nitrogen starvation. J Biosci Bioeng 120:205–209. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.12.018>
- (2019) Diferentes tipos de algas. In: <https://www.botanical-online.com/animales/algas-clases>. <https://www.botanical-online.com/animales/algas-clases>
- (2020) El papel de las algas en la agricultura sostenible y residuo cero. In: MAFA Biosci. <https://www.mafa.es/el-papel-de-las-algas-en-la-agricultura-sostenible-y-residuo-cero/>

ANEXOS I: Artículos que avalan la Tesis

ANEXO I.a. Immunomodulatory and antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis*, and *Gelidium corneum*.

Roberto T. Abdala Díaz, V. Casas Arrojo, M. A. Arrojo Agudo, C. Cárdenas, S. Dobretsov and F. L. Figueroa.

Abdala Díaz RT, Casas Arrojo V, Arrojo Agudo MA, et al (2019) Immunomodulatory and antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis* and *Gelidium corneum*. Mar Biotechnol 21:577–587.

<https://doi.org/10.1007/s10126-019-09905-x>

Abstract

Seaweeds of the genera *Laminaria*, *Gelidium*, and *Porphyra* have been used in both food and non-food industries due to their unique properties and characteristic biological activity. This study assesses the antioxidant activity and immunomodulatory properties of the acidic polysaccharides extracted from *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis*, and *Gelidium corneum* collected in the Atlantic coast of Tarifa (Cadiz, Spain). The proliferation of murine cell line RAW 264 decreased with increasing concentration of polysaccharides of the three algal species. The highest both antioxidant (25.69 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ DW) and immunomodulatory activities were observed in the sulfated polysaccharides of *L. ochroleuca* compared to that of *P. umbilicalis* and *G. corneum*. Sulfated polysaccharides of *L. ochroleuca* presented high potential anticancer activity in cell lines of human colon cancer HTC-116 ($\text{IC}_{50} = 0.44 \text{ mg mL}^{-1}$), human malignant melanoma G-361 ($\text{IC}_{50} = 5.42 \text{ mg mL}^{-1}$), breast adenocarcinoma human MCF-7 ($\text{IC}_{50} = 8.32 \text{ mg mL}^{-1}$), and human leukemia U-937 ($\text{IC}_{50} = 3.72 \text{ mg mL}^{-1}$). It is concluded that metabolites of *L. ochroleuca* can offer significant advantages for the pharmaceutical industry, particularly when macrophage activation is required.

ANEXO I.b. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. (S.F.Gray) Nägeli

Virginia Casas-Arrojo, Juan Decara, María de los Ángeles Arrojo-Agudo, Claudia Pérez-Manríquez and Roberto T. Abdala-Díaz.

Casas-Arrojo V, Decara J, Arrojo-Agudo M de los Á, et al (2021) Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Nägeli. *Biomolecules* 11:1–22.

<https://doi.org/10.3390/biom11040488>

Abstract:

Porphyridium cruentum is a unicellular microalga that can synthesize and secrete to the culture medium-high amounts of polysaccharides. In this study, the immunomodulatory, cytotoxic effect and antioxidant activity of the sulfated polysaccharides (PcSPs) were determinate. The PcSPs were precipitated with 2% Cetylpyridinium bromide hydrate and ethanol and purified by dialysis. The extract was lyophilized for its characterization by Fourier transform-Infrared (FT-IR) spectroscopy and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). The antioxidant activity of PcSPs were examined with assay 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and compared with that of the biomass, observing significant differences between the results obtained from the PcSPs and biomass. To determine their ability to induce cytokine production Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and interleukina-6 (IL-6), the immunomodulatory activity of the PcSPs has been evaluated. In the mouse macrophage cell line (RAW 264.7), PcSPs are potent inducers of IL-6 cytokines but mainly of TNF- α . The cytotoxic capacity of PcSPs was measured by the MTT colorimetric assay in colorectal carcinoma (HTC-116), human leukemia (U-937 and HL-60), breast cancer (MCF-7), lung cancer (NCI-H460) and human gingival fibroblasts (HGF-1) cell lines. The IC₅₀ value of 2311.20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1676.74 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1089.63 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5498.14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 2861.49 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively in the tumor lines and 5022.55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in gingival fibroblasts were obtained. Our study suggested that PcSPs from *P. cruentum* have a moderate immunomodulatory and cytotoxic effect. The results obtained indicate that the polysaccharides from *P. cruentum* are potent inducers of IL-6 cytokines and, most importantly, of TNF- α . PcSPs showed no evidence of antigenic activity or hypersensitivity when administered intraperitoneally in mice. Furthermore, the in vivo study revealed an improvement of local inflammatory response against stress in the peritoneum. These findings suggest that the PcSPs from *P. cruentum* might have potential as a valuable ingredient in nutraceutical products.

**ANEXO I.c. Adaptation of autotrophic to heterotrophic culture
of *Porphyridium purpureum* (Bory) K.M. Drew & R.Ross: characterization
of biomass and production of exopolysaccharides.**

Geovanna Parra-Riofrío, Virginia Casas-Arrojo, Roberto Pino-Selles, Jorge García-Márquez,
Roberto Teófilo Abdala-Díaz and Eduardo Uribe-Tapia.

Parra-Riofrío G, Casas-Arrojo V, Pino-Selles R, et al (2021) Adaptation of autotrophic to heterotrophic culture of *Porphyridium purpureum* (Bory) K.M. Drew & R.Ross: characterization of biomass and production of exopolysaccharides. J Appl Phycol 33:3603–3615.

<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02566-1>

Abstract

Microalgae are successfully adapted to different environments where they metabolize inorganic and, in some cases, organic compounds. The modification of culture conditions can induce the synthesis of exopolysaccharides with potential health benefits. This study aims to adapt the autotrophic culture of the red alga *Porphyridium purpureum* to a heterotrophic culture in order to compare the biochemical composition of biomass and the production of exopolysaccharides (EPS). The adaptation of autotrophic to heterotrophic culture was carried out by progressively reducing the photoperiod and adding glucose. EPS extraction and purification were carried out. EPS were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. The antioxidant capacity of both biomasses was analyzed by the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) method and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Results for both biomass and EPS showed significant differences in biochemical composition and antioxidant activity under the two growing conditions. Furthermore, the heterotrophic EPS (HT-EPS) seems to favor the accumulation of glucuronic acid. Our results are the first adaptation from autotrophic to heterotrophic culture of *P. purpureum*. These trophic variations show that *P. purpureum* can adapt to heterotrophic culture and present interesting differences in its biochemical composition, being an alternative in the increase of metabolites, mainly carbon compounds, of interest to the industry.

**ANEXO I.d. Immunomodulatory, antioxidant and anticancer capacity of
polysaccharides from *Euglena gracilis* G.A. Klebs**

Casas Arrojo V., Arrojo Agudo M.A., Cárdenas García C., Carrillo P., Pérez Manríquez C. and
Abdala Díaz R.T.

Casas-Arrojo V, Arrojo Agudo M de los Á, Cárdenas García C, et al (2022) Antioxidant, Immunomodulatory and Potential Anticancer Capacity of Polysaccharides (Glucans) from *Euglena gracilis* G.A. Klebs. Pharmaceuticals 15:.

<https://doi.org/10.3390/ph15111379>

Abstract:

The present study was carried out to determine the bioactivity of polysaccharides extracted from *Euglena gracilis* (EgPs). These were characterized by FT-IR and GC-MS. Cytotoxicity analyses (MTT) were performed on healthy human gingival fibroblast cell lines (HGF-1), obtaining an IC_{50} of $228.66 \mu\text{g mL}^{-1}$, and cell lines with anticancer activity for colon cancer (HCT-116), breast cancer (MCF-7), human leukemia (U-937, HL-60) and lung cancer (NCI-H460), showing that EgPs have anticancer activity, mainly in HTC-116 cells ($IC_{50}=26.1 \mu\text{g mL}^{-1}$). The immunological assay determined the immunomodulatory capacity of polysaccharides for the production of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in murine macrophages (RAW 264.7) and TNF- α in human monocytes (THP-1). It was observed that the EgPs had a stimulating capacity in the synthesis of these interleukins. The antioxidant capacity of polysaccharides and their biomass were analyzed using the ABTS method ($18.30 \pm 0.14\%$ and $5.40 \pm 0.56\%$, respectively, and the DPPH method for biomass ($17.79 \pm 0.57\%$). We quantitatively profiled HGF-1 proteins by liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis, coupled with 2-plex tandem mass tag labelling, in normal cells. In total, 1346 proteins were identified and quantified with high confidence, of which five were considered to be overexpressed. The data is available through ProteomeXchange, under identifier PXD029076

ANEXOS II: Otros artículos publicados

**ANEXO II.a. Estudio de la actividad antioxidante y antitumoral del
propóleo. Study on the antioxidant and antitumoral activity of propolis.**

del Río del Rosal Elisa, Casas Arrojo Virginia, Gómez Turpín Eva M., Gil Gómez José, Abdala
Díaz Roberto and Figueroa Félix L.

Del Río Del Rosal E, Casas Arrojo V, Gómez Turpín EM, et al (2017) Study on the antioxidant and antitumoral activity of propolis. *Ars Pharm* 58:75–81.

<https://doi.org/10.4321/S2340-98942017000200005>

Abstract

Introduction: Propolis is the substance that protects the hive, a resin of complex and viscous composition bees use in the repair and protection of the hive. The material from which propolis arises are the resins, shoots and petioles of the leaves of different plants, so it has a very complex chemical composition that varies depending on the flora of the bees collection. It offers an antimicrobial, anti-inflammatory capacity related to its antioxidant, immunomodulatory power, among others.

Aims: In this work, antioxidant and antitumoral activities of different propolis collected from different areas of the province of Malaga, comparing them with one from the Bohemian region to the south of the Czech Republic are studied.

Material and methods: Antioxidant activity was determined according to the ABTS+/S2 O8 K2 method. In addition, the quantity of total proteins from the nitrogen content and subsequently the cytotoxicity and antitumoral activity of the propolis of Puerto de la Torre, north of Malaga, are measured according to the 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide method.

Results: It was observed that propolis has high antioxidant activity, although it has a lower amount of proteins. Propolis has high toxicity and higher antitumoral activity against colon cancer than leukemia.

Discussion: With all these data, it can be concluded that propolis offers different activities of interest, for the food and cosmetic industry, among which the high antioxidant and antitumoral capacity.

**ANEXO II.b. UV photoprotection, cytotoxicity and immunology capacity of
red algae extracts.**

Félix Álvarez-Gómez, Nathalie Korbee, Virginia Casas-Arrojo, Roberto T. Abdala-Díaz and
Félix L. Figueroa

Álvarez-Gómez F, Korbee N, Casas-Arrojo V, et al (2019) UV photoprotection, cytotoxicity and immunology capacity of red algae extracts. *Molecules* 24:1–16.

<https://doi.org/10.3390/molecules24020341>

Abstract:

This study was designed to evaluate the potential use of algal extracts in cosmeceuticals, including factors related to biosecurity. The aqueous crude extracts of *Hydropuntia cornea* and *Gracilariopsis longissima* showed a good photoprotective capacity (Sun Protection Factor, SPF) due to, among other reasons, the presence of five types of mycosporine-like amino acids (MAAs) detected by high pressure liquid chromatography-photodiode array detector (HPLC-PDA) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) (Palythine, Asterina-330, Shinorine, Porphyra-334, and Palythinol). The toxicity of the extracts was evaluated by the MTT assay, which is based on the metabolic reduction of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyl tetrazolium bromide] by the action of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase. This assay was carried out in vitro in three cell lines: one related to the immune system (murine macrophages of the immune system: RAW264.7) and two human cell lines related to the skin (gingival fibroblasts: HGF, and immortalized human keratinocytes: HaCaT). Both extracts showed no cytotoxic activity in both types of human cells, whereas they showed cytotoxicity in murine tumor cells of the immune system (macrophages: RAW264.7). On the other hand, the immunological activity in the murine macrophage RAW264.7 was studied at a concentration lower than $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ and lower than the EC_{50} , and evaluated by the production of pro-inflammatory compounds through an immunosorbent assay linked to enzymes such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) or anti-inflammatory/proinflammatory enzymes such as interleukin-6 (IL-6). Both algae extracts induced the biosynthesis of TNF- α and IL-6. The production of TNF- α was much higher than that observed in the control (at a concentration of the aqueous extract higher than $5 \mu\text{g mL}^{-1}$). These results support the theory that the extracts of *H. cornea* and *G. longissima* actively induce the production of cytokines. In summary, the extracts of these species did not show cytotoxicity in human cells, and they present with immunomodulatory and photoprotection capacity.

ANEXO II.c. *In vitro* evaluation of the antitumoral and antiangiogenic effects of extracts from *Spondias mombin*. L. Leaves

Cristina Rey-Blanes, Yalina Pérez-Portero, Humberto J. Morris-Quevedo, Virginia Casas, Roberto Abdala, Ana R. Quesada, Beatriz Martínez-Poveda and Miguel Ángel Medina.

Rey-Blanes C, Pérez-Portero Y, Morris-Quevedo HJ, et al (2020) In vitro evaluation of the antitumoral and antiangiogenic effects of extracts from *Spondias mombin* L. leaves. *Biomed Pharmacother* 131:1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110716>

Abstract:

The traditional ethnobotanic and pharmacologic use of *Spondias mombin* L. samples includes a wide range of applications. In the present study, new antiangiogenic and antitumor effects of two types of extracts from *Spondias mombin* L. leaves have been demonstrated by using a number of in vitro assays in both endothelial and human cancer and non cancer cells.

**ANEXO II.d. Antioxidant and cytotoxic effects on tumor cells of
exopolysaccharides from *Tetraselmis suecica* (Kylin) butcher grown under
autotrophic and heterotrophic conditions.**

Geovanna Parra-Riofrío, Jorge García-Márquez, Virginia Casas-Arrojo, Eduardo Uribe-Tapia
and Roberto Teófilo Abdala-Díaz.

Parra-Riofrío G, García-Márquez J, Casas-Arrojo V, et al (2020) Antioxidant and cytotoxic effects on tumor cells of exopolysaccharides from *Tetraselmis suecica* (Kylin) butcher grown under autotrophic and heterotrophic conditions. *Mar Drugs* 18:1–23.

<https://doi.org/10.3390/md18110534>

Abstract:

Marine microalgae produce extracellular metabolites such as exopolysaccharides (EPS) with potentially beneficial biological applications to human health, especially antioxidant and antitumor properties, which can be increased with changes in crop trophic conditions. This study aimed to develop the autotrophic and heterotrophic culture of *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher in order to increase EPS production and to characterize its antioxidant activity and cytotoxic effects on tumor cells. The adaptation of autotrophic to heterotrophic culture was carried out by progressively reducing the photoperiod and adding glucose. EPS extraction and purification were performed. EPS were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry. The antioxidant capacity of EPS was analyzed by the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) method, and the antitumor capacity was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, showing high activity on human leukemia, breast and lung cancer cell lines. Although total EPS showed no cytotoxicity, acidic EPS showed cytotoxicity over the gingival fibroblasts cell line. Heterotrophic culture has advantages over autotrophic, such as increasing EPS yield, higher antioxidant capacity of the EPS and, to the best of our knowledge, this is the first probe that *T. suecica* EPS have cytotoxic effects on tumor cells; therefore, they could offer greater advantages as possible natural nutraceuticals for the pharmaceutical industry.

ANEXO II.e. Evaluation of cytotoxic effect against tumour cells of the acidic polysaccharides of the fungus *Nothophellinus andinopatagonicus*.

Albornoz Verónica, Casas-Arrojo Virginia, Figueroa Fabián, Hernández Víctor, Pérez Claudia, Rajchenberg Mario, Smith Carlos, Becerra José, Cabrera-Pardo Jaime, Campos Víctor and Abdala-Díaz Roberto.

Albornoz V, Casas-Arrojo V, Figueroa F, et al (2022) Evaluation of cytotoxic effect against tumour cells of the acidic polysaccharides of the fungus *Nothophellinus andinopatagonicus*. J Chil Chem Soc 67:5418–5424

<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072022000105418>

Abstract:

Fungal polysaccharides possess an important bioactive potential, including antioxidant and anticarcinogenic activity. The aim of this work was to determine the antioxidant activity and cytotoxicity against tumour and non-tumour cell lines acidic polysaccharides (NAAPs) of the fungus *Nothophellinus andinopatagonicus*. The effect of NAAPs on tumour cells lines was evaluated by MTT assay and flow cytometry. The analyses determined that glucose was the most abundant monomer and IR spectrum showed the typical peaks of β -glucans in the NAAPs. The cell viability assays revealed significant activity of NAAPs against HL-60, HCT-116 and MCF-7 tumour cell lines ($IC_{50} = 767,16 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1256 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $4241,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively); but a much lower cytotoxicity against the non-tumour cell line HGF-1 (outside the range of the highest concentration tested ($>10 \text{ mg mL}^{-1}$)). NAAPs affected the cell cycle of HL-60 tumour cells, increasing the percentage of cells in the sub G1 phase and reducing it in the S/G2/M phases. Moreover, low concentrations of NAAPs also showed an effective cytotoxic activity against tumour cell lines while the non-tumour cell line was unaffected, maintaining a viability close to 100%. The antioxidant activity of the highest NAAPs concentration tested was 6.24% and 4.63%, for DPPH and ABTS method, respectively.

**ANEXO II.f. Sulfated polysaccharide extracted from the green algae
Codium bernabei: physicochemical characterization and antioxidant,
anticoagulant and antitumor activity.**

Fabián A. Figueroa, Roberto T. Abdala-Díaz, Claudia Pérez, Virginia Casas-Arrojo, Aleksandra Nestic, Cecilia Tapia, Carla Durán, Oscar Valdés, Carolina Parra, Gastón Bravo-Arrepol, Luis Soto, José Becerra and Gustavo Cabrera-Barjas.

Figueroa FA, Abdala-Díaz RT, Pérez C, et al (2022) Sulfated Polysaccharide Extracted from the Green Algae *Codium bernabei*: Physicochemical Characterization and Antioxidant, Anticoagulant and Antitumor Activity. Mar Drugs 20:1–18.

<https://doi.org/10.3390/md20070458>

Abstract:

Codium bernabei is a green alga that grows on Chilean coasts. The composition of its structural polysaccharides is still unknown. Hence, the aim of this work is to isolate and characterize the hot water extracted polysaccharide fractions. For this purpose, the water extracts were further precipitated in alcohol (TPs) and acid media (APs), respectively. Both fractions were characterized using different physicochemical techniques such as GC-MS, GPC, FTIR, TGA, and SEM. It is confirmed that the extracted fractions are mainly made of sulfated galactan unit, with a degree of sulfation of 19.3% (TPs) and 17.4% (ATs) and a protein content of 3.5% in APs and 15.6% in TPs. Other neutral sugars such as xylose, glucose, galactose, fucose, mannose, and arabinose were found in a molar ratio (0.05:0.6:1.0:0.02:0.14:0.11) for TPs and (0.05:0.31:1.0:0.03:0.1:0.13) for ATs. The molecular weight of the polysaccharide samples was lower than 20 kDa. Both polysaccharides were thermally stable (Tonset > 190 °C) and showed antioxidant activity according to the ABTS•+ and DPPH tests, where TPs fractions had higher scavenging activity (35%) compared to the APs fractions. The PT and APTTS assays were used to measure the anticoagulant activity of the polysaccharide fractions. In general, the PT activity of the TPs and APs was not different from normal plasma values. The exception was the TPs treatment at 1000 µg mL⁻¹ concentration. The APTTS test revealed that clotting time for both polysaccharides was prolonged regarding normal values at 1000 µg mL⁻¹. Finally, the antitumor test in colorectal carcinoma (HTC-116) cell line, breast cancer (MCF-7) and human leukemia (HL-60) cell lines showed the cytotoxic effect of TPs and APs. Those results suggest the potential biotechnological application of sulfate galactan polysaccharides isolated from a Chilean marine resource.

**ANEXO II.g. Brazilian beach-cast seaweeds: antioxidant, photoprotection
and cytotoxicity properties.**

Talissa Barroco Harb, Julia Vega, José Bonomi-Baruf, Virginia Casas, Roberto Abdala-Díaz,
Félix L. Figueroa and Fungyi Chow

Harb TB, Vega J, Bonomi-Barufi J, et al (2022) Brazilian Beach-Cast Seaweeds: Antioxidant, Photoprotection and Cytotoxicity Properties. Waste and Biomass Valorization.

<https://doi.org/10.1007/s12649-022-01999-0>

Abstract:

The potential of seaweed extracts in cosmetic applications have increased with novel development and market. Beneficial biological properties include the ability to struggle aging and anticancer agents. This research aimed to evaluate antioxidant, photoprotective and cytotoxic properties of extracts from beach-cast seaweed species from the Brazilian coast in order to propose an appropriate use of this sustainable resource. Analysis of antioxidant capacity, UV/VIS absorption, quantification of UV photoprotectors, total content of C, N and S, development of cosmetic creams and evaluation of the cytotoxicity activity against tumoral cells lines were performed. The highest antioxidant capacity was found in extracts of brown seaweeds, followed by red seaweeds, with the lowest activity detected in the green seaweed. Same pattern was observed for phenolic compounds. The extracts did not show cytotoxicity activity against healthy human cells. Other forms of extraction and incorporation of the extract into the base creams should be evaluated, the isolation and purification of substances could increase the efficiency of the photoprotective capacity. The species were highly promising and proved to be natural sources of antioxidants and substances with cytotoxicity activity against tumoral cells; therefore, they could be exploited as functional ingredients with specific applications for different types of industries. The application of seaweed extracts in combination with other natural ingredients can help in the design of new cosmetics against the negative effects of UV radiation, in addition to having the great advantage of not presenting toxicity to health or the environment because they are biodegradable

**ANEXO II.h. *In vitro* cytotoxic capacity against tumor cell lines and
antioxidant activity of acidic polysaccharides isolated from the Andean
Patagonian fungus *Phylloporia boldo***

Verónica Albornoz, Virginia Casas-Arrojo, Fabián Figueroa, Cristian Riquelme, Víctor
Hernández, Mario Rajchenberg, Carlos T Smith, Víctor L Campos, Roberto T Abdala-Díaz, José
Becerra, Claudia Pérez, Jaime R Cabrera-Pardo

Albornoz V, Casas-Arrojo V, Figueroa F, et al (2022) In vitro cytotoxic capacity against tumor cell lines and antioxidant activity of acidic polysaccharides isolated from the Andean Patagonian fungus *Phylloporia boldo*. Nat Prod Res 0:1–6.

<https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2158331>

Abstract:

Fungal polysaccharides possess a broad biological activity, including cytotoxic and antioxidant activities. This work aimed to evaluate the cytotoxic and antioxidant activity of the acidic polysaccharides of *Phylloporia boldo* strain (named PBAP40). Cytotoxic activity of polysaccharide was evaluated determining the viability of three tumor cell lines by MTT assay. The effect of acidic polysaccharide on the cell cycle of HL-60 cell line was evaluated by flow cytometry, and the antioxidant activity was determined by DPPH and ABTS assays. PBAP40 showed cytotoxic effects in tumor cell lines. Results suggest that *P. boldo* acidic polysaccharides arrested tumor cells in the cell cycle Sub G1 phase. The acidic polysaccharides of PBAP40 strain were not cytotoxic for the non-tumor cell line. PBAP40 also showed excellent antioxidant activity. The FT-IR analysis of the acidic polysaccharides indicated the presence of glucans bearing a- and b- type glycosidic bonds

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutracéuticos.*

ANEXO III: Metodología

ANEXOS III: Metodología

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS ELEMENTAL (DETERMINACIÓN DE C, N, H, S, O)

La técnica de combustión total empleada en el analizador elemental está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro, en atmósfera controlada, a una temperatura de hasta 1150°C (C, H, N, S), y pirolisis a 1350°C (O) para descomposición del O como CO y oxidación a CO₂. Los diferentes productos de combustión resultantes, CO₂, H₂O, SO₂ y N₂, son posteriormente cuantificados mediante detector selectivo de absorción IR (C, H, S) y sensor de termopropiedad diferencial TCD (N).

Material y reactivos

- Muestra.
- Cápsulas de plata y/o estaño.

Equipamiento

- Balanza de precisión.
- Analizador Elemental (LECO CHNS-932) + módulo de O.

Procedimiento

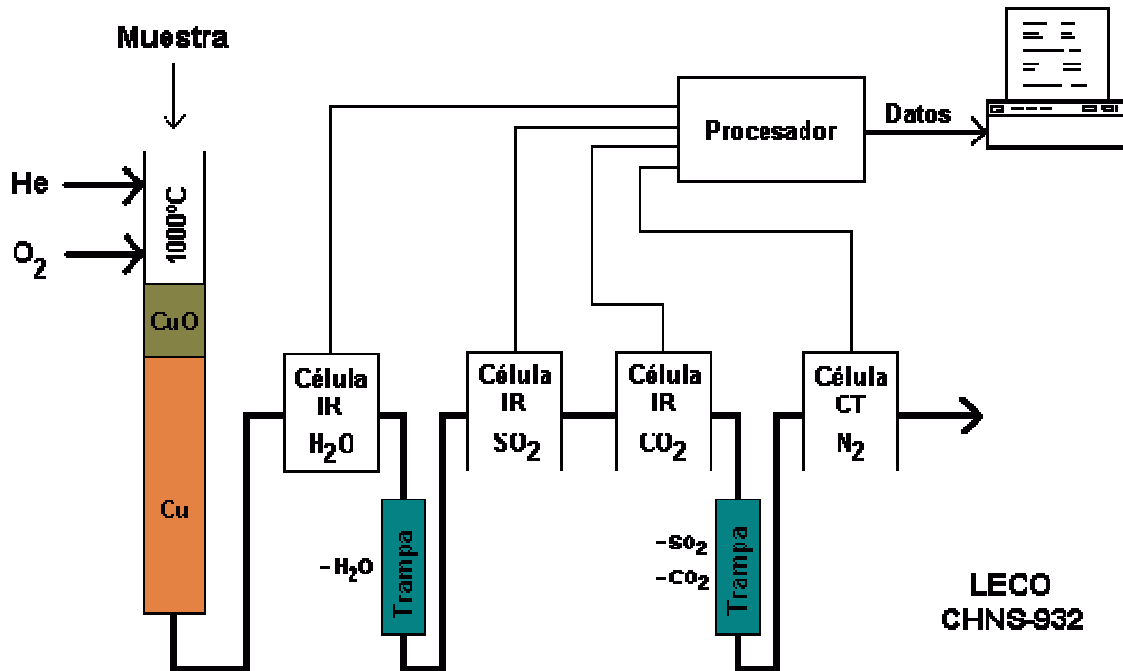
1. Pesar aproximadamente 2 mg de muestra.
2. Encapsular la cantidad de muestra pesada en la cápsula de estaño para el análisis de CHN) o de plata para el análisis de CNHS. (Estas cápsulas son muy susceptible a la temperatura y no interfiere a la combustión).
3. Introducir en el Analizador Elemental Leco Truspec Micro CHNS + módulo de O.

Expresión de los resultados

El resultado de cada elemento (C, H, N, S, O) viene expresado en % con respecto al peso de la muestra.

Notas

- El software que controla el analizador es el TruMac de Leco.
- Esquema del funcionamiento del Analizador Elemental LECO CHNS-932.



Los detectores de cada uno de los elementos son independientes entre sí, siendo de IR (Infrarrojo) de estado sólido no dispersivo (C, H y S) y de termoconductividad diferencial (TCD) para N.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNAS (Factor de Lourenço).

Una vez obtenido el porcentaje total de N por el análisis elemental. Se determina el contenido en proteínas multiplicando este valor por el factor de Lourenço (N-Prot) en estado estacionario, que varía según el tipo de alga. Es por ello que hay que ver este factor N-Prot en los siguientes artículos Lourenço et al. 2002 (Lourenço et al. 2002), para macroalgas y Lourenço et al. 2004 (Lourenço et al. 2004), en el caso de microalgas.

Referencias:

Lourenço SO, Barbarino E, De-paula JC, et al (2002) Amino acid composition , protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol Res* 50:233–241

Lourenço SO, Barbarino E, Lavín PL, et al (2004) Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *Eur J Phycol* 39:17–32. <https://doi.org/10.1080/0967026032000157156>

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES (Dubois et al. 1965) (Dubois et al. 1956)

Mediante este ensayo se cuantifican las hexosas, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y derivados metilados que tienen un grupo reductor libre o potencialmente libre. El método no mide glucosaminas y galactosaminas, pero incluyen pentosas y metil-pentosas (Kochert, 1978) (Kochert 1978).

Material y reactivos

- Muestra liofilizada y en polvo.
- H₂SO₄ 96%.
- Fenol saturado.
- H₂O destilada
- Tubos de cristal con tapón de rosca.
- Puntas para pipeta.
- Papel de aluminio.
- Pipeta Pasteur de vidrio
- Cubetas de cuarzo.

Equipamiento

- Vortex.
- Termo-baño.
- Centrífuga.
- Micropipeta monocal.
- Campana de extracción.
- Espectrofotómetro que lea a 485nm

Preparación de los reactivos

- H₂SO₄ 1M: añadir 5,6 mL de H₂SO₄ 96% y enrasar a 100ml de H₂O destilada
- Fenol 5%: añadir 5 mL de fenol saturado y enrasar hasta 100 mL con agua destilada.

Procedimiento

1. Pesar 5 mg de biomasa liofilizada.
2. Agregar 1 mL de H₂SO₄ 1M.
3. Homogeneizar la muestra (Vortex).
4. Agregar otros 4 mL de H₂SO₄ 1M.
5. Colocar los tubos en un termo-baño a 100°C durante 1 h.
6. Retirar los tubos del baño y dejar enfriar a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 min a 15°C.
8. Separar el sobrenadante con una pipeta Pasteur de vidrio y con cuidado de no resuspender el pellet.
9. Coger 1 mL del sobrenadante y pasar a otro tubo (si es necesario diluir)
10. Agregar 1 mL de fenol al 5% y dejar reposar 40 min.
11. Agregar lentamente 5 mL de H₂SO₄ concentrado (96%) en la campana de extracción y dejar enfriar a temperatura ambiente.
12. Medir absorbancia a 485 nm en cubetas de cuarzo. Calibrar el espectrofotómetro con un blanco que se prepara de la misma manera, pero con 1 mL de H₂SO₄ 1 M.

Expresión de los resultados

Los resultados son expresados en %, usando la siguiente ecuación:

$$((\mu\text{g/ml}) * Fd * Ve * 100) / (1000 * Ps)$$

donde, $\mu\text{g/mL}$ es la concentración de la muestra obtenida al sustituir el valor de la absorbancia a 485, de la muestra, en la recta patrón, Fd es el factor de dilución realizado en caso necesario, Ve el volumen de la muestra (5 mL) y Ps el peso seco pesado de la muestra.

Recta patrón

Para la recta patrón se utilizarán distintas concentraciones de glucosa. Se partirá de una solución stock de 10 mg de glucosa en 100 mL de H₂O destilada.

$\mu\text{g/mL}$	0	5	10	20	40	60	80	100
$\mu\text{L Stock}$	0	50	100	200	400	600	800	1000

$\mu\text{L H}_2\text{Od}$	1000	950	900	800	600	400	200	0
--	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

Se medirá a 485nm la mezcla formada por cada uno de las diferentes concentraciones de patrones realizados junto con 1mL de fenol al 5% y 5 mL H₂SO₄ concentrado.

Notas

- Utilizar siempre material de vidrio.
- Siempre echar el ácido en el agua. Nunca agua en ácido.
- Se realiza el blanco a la vez que el resto de las muestras (1 mL de H₂SO₄ 1 M, 1 mL de fenol al 5% y 5 mL H₂SO₄ concentrado).

Referencias

- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Biochem* 28:350–356.
<https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Kochert AG (1978) Carbohydrate determination by the phenol–sulfuric acid method. Cambridge Univ. Press, Cambridge

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN LÍPIDOS (Folch et al 1957).

El método utilizado para la extracción de lípidos totales es el descrito por Folch et al., (1957) (Folch et al. 1957), haciendo uso de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v) conteniendo 0,01% de BHT. Una vez evaporado el solvente con una corriente de nitrógeno, los lípidos se pesan y se almacenan en atmósfera de nitrógeno y se disuelven en cloroformo para evitar su oxidación.

Material y reactivos

- Cloroformo.
- Metanol.
- Triclorometano.
- KCl.
- Butil-hidroxi-tolueno (BHT).
- Sodio sulfato anhidro.
- H₂O destilada.
- Hielo.
- Mortero.
- Espátula o cucharilla.
- Tubos de ensayo.
- Embudos de cristal.
- Filtros de papel (uno por muestra).
- Vaso de precipitado para metre hielo dentro (Usar el ultraturrax)
- Pipetas Pasteur de vidrio y tetinas.
- Puntas para pipeta.
- 6 viales de vidrio por muestra y otro más para limpieza del ultraturrax.
- Tapón de rosca con disco de goma.

Equipamiento

- Balanza precisión de 4 órdenes de magnitud.
- Micropipeta monocanal.
- Ultraturrax.

- Sistema de evaporación.
- Centrífuga.
- Campana de extracción.

Preparación de los reactivos

- Cloroformo-metanol (2:1) (C:M): se mezcla 584 mL de Cloroformo con 292 mL de Metanol.
- Cloroformo-metanol (2:1) con 0.01% BHT: se realiza otra solución C:M (2:1) y se añaden 100 mg de BHT.
- KCl 0,88%: se añade 88 g de KCl a 1000 mL de agua destilada.

Procedimiento

1. Se pesa en tubo de vidrio y se rotula con pegatina y lápiz porque se trabaja con disolventes orgánicos la muestra por triplicado, (aproximadamente 200 mg, si hubiera poca muestra el mínimo que puede pesarse es de 50 mg) en un tubo A, y se le añaden 5ml de C:M (2:1) con 0.01% BHT.
2. Homogenizamos en ultraturrax durante 5 minutos (poner el tubo en hielo para que la muestra no se caliente y evitar que se oxide), después se enjuaga con 5ml de C:M sin que la punta de la pipeta toque el ultraturrax y poniendo debajo el tubo en el que hemos homogeneizado la muestra para recoger los restos que hayan quedado adheridos al vástago.
(Después de cada cambio de muestra limpiar el vástago con 5ml de C:M que se añaden a otro tubo (a partir de ahora siempre usamos el mismo tubo para limpiar el ultraturrax).
3. Añadir a cada tubo 2 ml de KCl 0.88%. El ultraturrax se limpia tras su uso con papel empapado en C:M y se seca después.
4. Centrifugar durante 5 min a 2000 rpm se separa en dos fases (en la parte superior quedan la sal + metanol y en la inferior lípidos + cloroformo). Da igual la temperatura a la que se centrifugue.
5. Desechar la fase superior a residuos
6. Filtrar la fase inferior en un tubo B previamente pesado. Se pesa también el soporte donde se apoyan los tubos en la balanza (vaso de plástico de muestra). Se

- pesa el soporte una vez para cada muestra y se anotan los 4 decimales de la balanza.
7. Filtrar las muestras haciendo uso de embudos de cristal y haciendo filtros con papel de filtro común de laboratorio. Añadir al filtro una puntita de sodio sulfato anhidro y empapar el filtro con triclorometano antes de pasar la muestra para que no queden retenidos los lípidos. Limpiar el filtro con una pipetada de triclorometano. Desechar el filtro y conservar el tubo con el filtrado.
 8. Meter a -20°C al menos 20 min y eliminar la capa de sal que se forma con pipeta de vidrio.
 9. Evaporar a sequedad con N_2^* .
 10. Cerrar bien los tubos para que no se pierda la atmósfera de N_2 de su interior pues se oxidarían los lípidos.
 11. Pesar los tubos (usar el mismo vaso que en pesarlos vacíos).*
 12. Tras esto, se podrá meter en congelación a -20°C , por si se quiere realizar el ensayo de transesterificación y metilación para la determinación de los ácidos grasos de la muestra.

Expresión de los resultados

El resultado se da como % lípidos en la muestra. Para ello se usa la siguiente ecuación:

$$\% \text{ lípidos} = \text{g lípidos/g muestra} * 100$$

Notas

- *Estos pasos se irán realizando repetidamente hasta que no haya variación en del último de los 4 dígitos en las pesadas.
- BHT 0,01% se usa para evitar o relentizar la oxidación de los lípidos en su extracción.
- Triclorometano se usa para recoger los lípidos.
- KCl 0,88% separa las dos fases.
- Sulfato de sodio anhidro retira la humedad tras la filtración.

Referencias

*Estudio de los polisacáridos de algas con actividad antioxidante,
inmunomoduladora y citotóxica sobre las líneas celulares tumorales humanas.
Posible fuente de compuestos nutraceuticos.*

ANEXO III: Metodología

Folch J, Less M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226:497–509

DETERMINACIÓN DE COMPUESTO INORGÁNICOS (Ismail 2017) (Ismail 2017).

Los materiales orgánicos se incineran a temperaturas elevadas (550°C) en un horno de mufla y la materia inorgánica (cenizas) permanece. El contenido de ceniza se mide por peso de materia inorgánica remanente.

Material y reactivos

- Muestra.
- HCl.

Equipamiento

- Crisoles.
- horno de mufla.
- Desecador.
- Balanza analítica.

Preparación de los reactivos

- HCl 0,2 N se mezcla 5,15 mL de HCl con 994,8mL de H₂O destilada.

Procedimiento

1. Los crisoles serán prelavados con 0,2 N HCl, calentado en un horno de mufla a 550°C durante 24 h y almacenado en un desecador antes de su uso.
2. Retirar los crisoles sin cenizas del desecador y registrar peso y número de crisol.
3. Pesar con precisión aproximadamente 2 g de muestra seca o liofilizada en el crisol. Este dato se ha de registrar. Esto se hará por triplicado para cada una de las muestras.
4. Colocar los crisoles en la mufla a 550°C durante 24 h.
5. Apagar el horno de mufla y dejar enfriar (puede tomar algunas horas).
6. Retirar los crisoles del horno de mufla y colócalo en un desecador para que se enfríe.

7. Regresar al día siguiente para pesar los crisoles con las cenizas y registrar dicho dato.

Expresión de los resultados

Los resultados se darán en %, usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = [(Peso \text{ crisol} + \text{ muestra tras 24 en mufla} - Peso \text{ crisol vacío}) / Peso \text{ muestra}] * 100$$

Notas

Los crisoles serán rotulados con lápiz, nunca con rotulador pues con el calor se borra la tinta.

Referencias

Ismail BP (2017) Ash content determination. In: Food Analysis Laboratory Manual, Food Science Text Series, 5th edn. Springer International, Minnesota, pp 117–119

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS (Folin and Ciocalteu 1927) (Folin and Ciocalteu 1927)

Este es un método fotocolor-imétrico usado para cuantificar la cantidad de fenoles totales en las muestras.

Material y reactivos

- H₂O destilada.
- Muestra.
- Reactivo Folin.
- Na₂CO₃.
- Solvente que se quiera usar para realizar los extractos.
- Polivinil-pirrolidona (PVPP).
- Nevera.
- Puntas para pipeta.
- Eppendorf.
- Falcon de 15 mL.
- Cubetas de plástico.

Equipamiento

- Nevera.
- Centrífuga.
- Micropipeta monocal.
- Espectofotómetro para lectura a 760 nm.
- Vortex o ultraturrax.

Preparación de los reactivos

- Na₂CO₃ al 20%: se añade 4 gr de Na₂CO₃ a 20 mL de agua destilada.

Procedimiento

1. Pesar 20 mg de muestra previamente liofilizada o secada y pulverizada.

2. Añadir 1 mL del solvente a usar (H₂O destilada, Metanol 80%, ...) a los 20 mg de muestra en un falcon de 15 mL en caso de usar el ultraturrax.
3. Agitar con vortex o ultraturrax el extracto y dejar incubar en nevera y oscuridad durante 1 h.
4. *Tomar 700 µL de agua destilada y mezclar con 100 µL de extracto y 50 µL del reactivo Folin (en caso de algas pardas se añaden 50 µL de extracto, 700 µL de agua destilada, 50 µL del solvente y 50 µL del reactivo Folin). Agitar en vortex.
5. Adicionar 150 µL de Na₂CO₃ al 20%.
6. Incubar 2 h en oscuridad a 4 °C.
7. Leer a 760 nm en cubetas de plástico.

Expresión de los resultados

Se expresan los resultados como mg de fenoles por gr de peso seco de la muestra, usando la ecuación de la recta patrón, los datos de obtenidos de la absorbancia y el peso de la muestra. Hay que tener en cuenta si se ha hecho diluciones en cuyo caso habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Recta patrón

Para la recta patrón se utilizarán distintas concentraciones de fluoroglucinol (algas) o ácido gálico (plantas). Se partirá de una solución stock de 10 mg de fluorogluciol en 20 mL de H₂O destilada.

µg/mL	0	1	2	5	10	15	20	25
µL Stock	0	2	4	10	20	30	40	50
µL H ₂ O d	1000	998	996	990	980	970	960	950

De cada una de las diferentes concentraciones del patrón se toma 100 µL y se mezcla con 700 µL de agua destilada, 50 µL del solvente y 50 µL del reactivo Folin se agita en vortex y se añade 150 µL de Na₂CO₃ al 20%. Se sigue el mismo proceso que con las muestras. Finalmente se mide la absorbancia a 760nm, se representa concentración frente a absorbancia y se obtiene la recta patrón y la ecuación de la recta

Notas

- *En el caso de querer precipitar los florotaninos se ha de añadir una pequeña cantidad de PVPP al extracto antes de continuar con el protocolo, mezclar bien y dejarlo incubando 1 h en nevera y mezclar cada 10 min, Pasado este tiempo se centrifuga a 4000 rpm 10 min a 10-15 °C. Tomo el sobrenadante y se continúa con el protocolo.
- El blanco se hace de la misma manera sólo que hay que mezclar 700 µL de agua destilada y mezclar con 100 µL del solvente y 50 µL del reactivo Folin, se agita y se adiciona 150 µL de Na₂CO₃ al 20%.
- Na₂CO₃ actúa como catalizador de la reacción.

Referencias

Folin O, Ciocalteu V (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J Biol Chem 73:627–648

DETERMINACIÓN DE CLOROFILA *a* y CAROTENOIDES TOTALES

Se basa en un ensayo fotométrico donde se determina la cantidad de clorofila *a* y carotenoides totales (carotenos y xantofilas) en las muestras.

Material y reactivos

- Acetona.
- H₂O destilada.
- Muestras.
- Cubetas de plástico.
- Puntas para pipeta.

Equipamiento

- Nevera.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.
- Micropipeta monocanal.

Preparación de los reactivos

- Acetona 90%: se mezclan 10 mL de acetona con 90 mL de agua destilada

Procedimiento

1. Pesar 20 mg de peso seco de la muestra.
2. Añadir 1 mL de acetona y dejar incubar durante 24 h en oscuridad a 4°C.
3. Centrifugar a 2500xg durante 8 min a 4°C.
4. Medir a 664 nm para la clorofila *a* y a 480 nm para los carotenoides totales.

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como mg de pigmento por gr de peso seco de la muestra. Para ello se determinó cada pigmento según las siguientes ecuaciones:

- Para clorofila según la ecuación (Ritchie 2006) (Ritchie 2006)

$$\text{Clorofila } a = 11.4062 \times A_{664}$$

- Para los carotenoides totales de acuerdo con la ecuación (Strickland y Parsons 1972) (Strickland and Parsons 1972)

$$\text{Carotenoides totales} = A_{480} \times 4.0$$

Referencias

Ritchie RJ (2006) Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth Res* 89:27–41.
<https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>

Strickland JDH, Parsons TR (1972) A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada, 2nd ed. Ottawa

DETERMINACIÓN DE FICOBILIPROTEÍNAS.

Se basa en un ensayo fotométrico donde se determina la cantidad de ficobiliproteínas de las muestras. Estas se pueden extraer totalmente debido a los enlaces covalentes que se establecen entre los cromóforos y la fracción apoproteica del pigmento.

Material y reactivos

- H₂O destilada.
- H₂PO₄⁻ y HPO₄²⁻ (para el tampón fosfato (TP)).
- Muestras.
- Cubetas de plástico.
- Puntas para pipeta.
- Hielo.

Equipamiento

- Nevera.
- Centrífuga.
- Espectofotómetro.
- Micropipeta monocanal.
- pHmetro

Preparación de los reactivos

- Tampón fosfato 0,05 M a pH 6,5: se toma 4,26 gr de H₂PO₄⁻ y 2,71 gr de HPO₄²⁻ y se mezcla con 1L de H₂O destilada. Esta solución se lleva a pH de 6,5.

Procedimiento

1. Pesar 20 mg de biomasa.
2. Añadir 1 mL de tampón fosfato 0,05 M a pH 7 y dejar incubar durante 24 h en oscuridad a 4°C.
3. Centrifugar a 2500 xg durante 8 min a 4°C.
4. Medir a 565, 620 y 650 nm.

Expresión de los resultados

Los resultados se expresaron como mg de pigmento por gr de peso seco de la muestra. Para ello se determinó cada pigmento según las siguientes ecuaciones (Bermejo Román et al. 2002) (Bermejo Román et al. 2002):

- Ficocianina (FCC)

$$FCC = (A_{620} - 0.7A_{650}) / 7.38$$

- Aloficocianina (AFC)

$$AFC = (A_{650} - 0.19A_{620}) / 3.65$$

- Ficoeritrina (FCE)

$$FCE = (A_{565} - 2.8 (FCC) - 1.34 (AFC)) / 12.7$$

Nota

- El blanco se realiza con el solvente que en este caso es tampón fosfato 0,05 M a pH 7.
- Las muestras en todo momento han de estar en hielo.

Referencias

Bermejo Román R, Álvarez-Pez JM, Acién Fernández FG, Molina Grima E (2002)
Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. J
Biotechnol 93:73–85. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00385-6)

EXTRACCIÓN DE POLISACÁRIDOS

Es un proceso que, mediante ruptura de las paredes celulares con calor se extraen los polisacáridos y precipitación con la adición de etanol, para extraer polisacáridos totales o con cetavlon al 2%, para la extracción de los polisacáridos ácidos o sulfatados.

Material y reactivos

- Muestra.
- H₂O destilada.
- NaCl.
- Papel aluminio.
- Etanol puro / Cetavlon (Bromuro de N-cetilpiridinio).
- Polivinilpirrolidona (PVPP).
- Reactivo Folin-Ciocalteu.
- ClCa₂.
- Mosca.
- Vasos precipitados grandes.
- Embudo filtración.
- Caja corcho- hielo.
- Elenmeyer.
- Falcon de 50ml (esterilizados y no esterilizados).
- Falcon de 15ml.
- Cucharilla.
- Tripa de diálisis.
- Cordón y pinzas plástico.
- Puntas para pipeta.

Equipamiento

- Centrífuga
- Liofilizador.
- Congelador -20 y -80°.
- Batidora.

- Agitador con temperatura y magneto.
- Micropipeta monocanal.

Preparación de los reactivos

- Cetavlon al 2%: se añade 2 g de Cetavlon a 100 mL agua destilada.
- 4 M NaCl: pesar 116 g de NaCl y mezclar con 500 mL de agua destilada).
- 1 M NaCl pesar 29 g de NaCl y mezclar con 500 mL de agua destilada).
- ClCa_2 al 2%: añadir 2 g de ClCa_2 a 100 mL de agua destilada.

Procedimiento

1- Preparación de las muestras: (Según la muestra se hace un proceso u otro).

Macroalgas: Las algas se pulverizan con una trituradora doméstica y se homogenizan. Se pesan unos 100 g- 200 g de cada una. Se ponen en un matraz para su despigmentación.

Microalgas: Se centrifuga el medio con las micralgas a 5000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente recuperándose el pellet y se introduce en un matraz para su despigmentación.

En el caso de *Porphyridium*, que excreta los polisacáridos, tras la centrifugación nos quedamos con el sobrenadante y se descarta el pellet que podrá ser usado para otros ensayos. De aquí pasar directamente a la floculación de los polisacáridos con etanol absoluto (volumen 1:1) o cetavlon al 2% (10/15mLpor cada litro de cultivo centrifugado) según los polisacáridos a extraer.

2- Despigmentación y pre-extracción: Se realiza esto con el objetivo principal de remover lípidos, proteínas, pigmentos lipofílicos y fenoles. Para ello se agregan 1L o hasta cubrir bien las muestras de etanol absoluto, se dejan en reposo por 24 a 48 horas con agitación esporádica. La suspensión se centrifuga a 3000 rpm por 3 minutos y se colectara el residuo sólido algal. Se repite este paso hasta que la solución obtenida de etanol resulte incolora.

3- Extracción: Se realizaron 3 extracciones con 300 mL de agua destilada, llevando a punto de ebullición por 50-60 minutos con agitación constante.

4- Eliminación de polifenoles: Se verifica la presencia de fenoles a través del

ensayo Folin-Ciocalteu. Para eliminar estos compuestos se utiliza el reactivo polivinilpolipirrolidona (PVPP). Para lo cual se agregan 2 puntas de espátula a la solución resultante de la extracción anterior, se agita y se esperan 5 min, luego se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min eliminando los precipitados a la solución los cuales contienen los polifenoles.

- 5- Luego a través del mismo ensayo se corrobora la ausencia de los compuestos.
- 6- **Eliminación de alginato (para algas pardas o muestras con algitanos):** Se toma el sobrenadante una vez eliminado los fenoles y se agrega ClCa_2 al 2%, se esperan 3 min para que termine la reacción, se centrifuga la solución y se elimina el precipitado (que serían los alginatos).
- 7- **Precipitación de polisacáridos:** una vez eliminados los fenoles y algitanos, al sobrenadante se agrega etanol absoluto frío en la proporción 2:1 a la solución resultante del punto anterior (extraer polisacáridos totales) o Cetavlon al 2% (extraer polisacáridos ácidos o sulfatados) y se mantiene durante 30 minutos a 4°C con el objetivo de propiciar la precipitación de polisacáridos. Una vez pasado ese tiempo se centrifuga a 3000 rpm durante 5 min. (Se puede parar en este paso y meter los polisacáridos precipitados en un falcon con etanol hasta cubrirlo y se guardan en -20°C hasta continuar con el siguiente paso del protocolo).
- 8- **Purificación de polisacáridos:** Se toma el total del precipitado obtenido en el punto anterior y se disuelve con una solución salina 4 M de NaCl en agitación y temperatura. Una vez disuelto y esté a temperatura ambiente se añade un volumen equivalente 1:1 de etanol absoluto frío. El precipitado se introduce en la membrana de diálisis MEMBRA-CEL MD44 y esta a su vez se sumerge en una solución de 1 M de NaCl, siempre en agitación, durante 24 h (las sales del interior de la tripa de diálisis saldrán por un proceso de ósmosis hacia la solución en la que esta está sumergida).
- 9- **Recogida de los polisacáridos:** Se toma el contenido de la manga, que estará transparente, en un vaso de precipitado y de ahí a un falcon para centrifugar a 3000 rpm durante 5 min, para eliminar impurezas. El sobrenadante se hace precipitar con etanol absoluto frío en una relación de volumen 1:1 y se guarda a -20°C unos 30 min. Se vuelve a centrifugar a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente

para eliminar el etanol. Una vez centrifugado se retira el sobrenadante y se guarda el pellet, con de etanol absoluto hasta cubrir para evitar contaminación, a -80°C hasta su liofilización y posterior utilización.

10- Liofilización: tras al menos 4 horas en -80°C se elimina el etanol y se mete en el liofilizador en falcon cerrado con unos agujeros previamente hechos en el tapón del falcon. El volumen de la muestra a liofilizar ha de estar por debajo de la mitad del falcon para que no haya problemas en la liofilización. El tiempo de liofilización dependerá del liofilizador a usar y del volumen de la muestra a liofilizar.

11- Homogeneización: Los polisacáridos de una vez liofilizados se pulverizan con un mortero ágata y se homogeneiza bien. No meter nunca en frigorífico ni en congelador pues se hidrataría.

Notas

- Una vez liofilizado los polisacáridos **NO** meter nunca en frigorífico ni en congelador pues se hidrataría.
- El Cetavlon, es un tenso activo que hace precipitar los polisacáridos ácidos de los básicos.

PROTOCOLO DE DERIVATIZACIÓN DE MONOSACÁRIDOS (para la caracterización mediante GC-MS).

La caracterización de *polisacáridos* compuestos por cetosas, aldosas, anhidro azúcares, aminoazúcares y azúcares ácidos requiere un paso previo de liberación de éstos azúcares. Se usan ácidos de distinta naturaleza y posterior metanólisis. (**Hidrólisis ácida y metilación**). De esta forma se liberan los monosacáridos como methyl-glycosides y se esterifican los grupos carboxyl.

También se puede realizar mediante hidrólisis enzimática o hidrólisis asistida mediante microondas. Esta última acorta el tiempo de preparación.

Tras la hidrólisis, la derivatización se realiza en dos pasos:

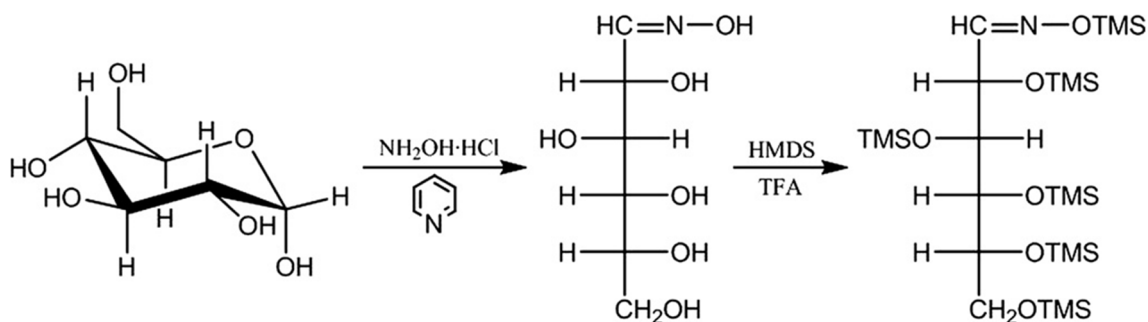
- 1- Transformación del centro anomérico para aumentar su volatilidad y disminuir el número de isómeros (se reducen los picos en el cromatograma).

Se realiza mediante **Reducción** ($\text{NaBH}_4/\text{NaBD}_4$ o $\text{NaBH}_4/\text{NaBD}_4$ en NH_4OH) o mediante **Oximación** (Hydroxylamine hydrochloride en pyridine).

Se aumenta la resolución y se obtienen bajos LOD, LOQ y RSD con respecto a un solo paso de derivatización.

- 2- **Derivatización con TMS:** *Agente derivatizante: TRi SIL (Tri-SiL HTP)*

Mediante TMS para formar trimethylsilyl oximes (TMSO).



Two-step oximation–silylation reaction (TMS: $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

Material y reactivos

- Vial de reacción (reacti-vial 3 mL, Thermofisher).
- Jeringa con filtro (PTFE membrane, 0,2 μm , 13mm diámetro).
- Vial de cromatografía.
- Vial de cromatografía con inserto.
- Puntas para pipetas.

- Puntas de pipetas.
- HCl 37%
- Metanol anhidro.
- Tri Sil HTP (HDMS:TMCS:Pyridine) Thermo Scientific.
- Hexano.

Equipamiento

- Balanza analítica.
- Corriente de N₂.
- Calentador.
- Evaporador-concentrador (Stuart Block Heater, SBH200D/3).
- Centrífuga.
- Equipo GC-MS (cromatógrafo de gases Trace GC).
- Micropipeta monocanal.

Preparación de los reactivos

- 3M HCl en metanol anhidro: añadir 250,53 ml de HCl 37% y enrasar hasta 1000 mL con metanol anhidro.

Procedimiento (Aplicable a azúcares neutros)

Se pesa en balanza analítica (Metler Toledo XS105DU) hasta 2 mg de muestra aproximadamente, en vial de reacción (reacti-vial 3 mL, ThermoFisher). Si hay suficiente muestra, se realizan 2 réplicas de cada muestra.

Hydrólisis ácida y metilación:

Mediante este procedimiento se obtienen entre 5 y 6 isómeros de cada monosacárido. Las muestras se tratan añadiendo 600 µL de 3 M HCl en metanol anhidro (Sigma Aldrich). Se calienta durante 24 h a 80°C. Seguidamente se evapora el disolvente en corriente de N₂ a 50°C en evaporador-concentrador (Stuart Block Heater, SBH200D/3). Con objeto de eliminar el exceso de ácido, el residuo se lava dos veces con metanol (200 µl) y se vuelve a secar con N₂.

Derivatización:

Agente derivatizante: Tri Sil HTP (HDMS:TMCS:Pyridine) Thermo Scientific.

La muestra seca se trata con 300 μ l de TRi Sil HTP, se cierra vial y se calienta a 80°C durante 1 h hasta disolverse. Dejar durante 5 min a temperatura ambiente. Se seca en corriente de N₂ y se reconstruye con 500 μ l de hexano. Seguidamente, se centrifugan (3900 rpm, 20°C, 15 min).

Pipetear el sobrenadante pasándolo a jeringa con filtro (PTFE membrane, 0,2 μ m, 13mm diámetro) y filtrar, pasando muestra a vial de cromatografía (son de 2 ml). Se seca otra vez en corriente de N₂ y se vuelve a reconstituir en 150 μ l de hexano, pasando la muestra a un vial de cromatografía con inserto, que se inyecta en el GC-MS.

(Merkle and Poppe 1994; Scotter et al. 2006; Soria et al. 2012; Becker et al. 2013).

Notas

- LOD: límites de detección.
- LOQ: Límite de cuantificación.
- RSD: Desviación estándar.
- Cuando se rompe el polisacárido (mediante la hidrólisis ácida HCL y añadiendo el agente metilante) se forma un carbono anomérico que tiende a ciclarse, formando ciclos (una pentosa o una hexosa). Dependiendo de cómo cicle puede dar lugar a diferentes configuraciones. Lo que se pretende es intentar que se mantenga abierto, por lo que se añade un metilo al carbono anomérico, y se sustituye un hidrógeno por un (-CH₃). Porque si se cierra aparecen isómeros y más picos, lo que dificultaría a la hora de identificar y cuantificar los compuestos. Una vez que se tiene el monosacárido transformado, se derivatiza para transformar el carbono por el sililo para hacerlo más volátil. El metilo se queda bloqueado y se sustituye el resto de OH⁻. Se quita el H⁺ y se une TMS, formándose una Trimethylsilyl Oxime (TMSO). Se pasa a este compuesto porque cada patrón de monosacárido de los 11 que están identificados en el laboratorio, va a sililar de una forma diferente a un determinado tiempo de retención y hace más fácil la identificación de cada uno en el cromatograma. Ya que se obtienen más picos por monosacáridos, que serían los isómeros mayoritarios.

- La identificación de monosacáridos se realizó mediante la comparación de tiempo de retención y espectros de masas de estándares de monosacáridos, previamente analizados en idénticas condiciones. (Glucosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa, ramnosa, ribosa, fucosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico).

Referencias

- Becker M, Zweckmair T, Forneck A, et al (2013) Evaluation of different derivatisation approaches for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of carbohydrates in complex matrices of biological and synthetic origin. *J Chromatogr A* 1281:115–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.053>
- Merkle RK, Poppe I (1994) Carbohydrate composition analysis of glycoconjugates by gas-liquid chromatography/mass spectrometry. *Methods Enzymol* 230:1–15. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)30003-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)30003-8)
- Scotter MJ, Castle L, Roberts DPT (2006) Estimation of sucrose esters (E473) in foods using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Addit Contam* 23:539–546. <https://doi.org/10.1080/02652030600631877>
- Soria AC., Brok M., Sanz ML., Martínez-Castro I (2012) Comprehensive sampling and sample preparation. *Analytical techniques for scientists*.

CARACTERIZACIÓN MEDIANTE FT-IR.

Se trata de una técnica para la caracterización de muestras basada en la interacción entre la materia y la radiación infrarrojo, la cual se sitúa en una longitud de onda entre 0,7 y 1000 μm . El registro del espectro vibracional se efectúa a temperatura ambiente en un rango espectral entre los 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} , utilizando una resolución espectral estándar de 4 cm^{-1} y un total de 64 acumulaciones por muestra.

Material y reactivos

- Muestra liofilizada.
- BrK.
- Mortero de ágata.
- Moldes de acero inoxidable.

Equipamiento

- Balanza analítica de precisión.
- Prensa al vacío de presión 5MPa.
- Espectrómetro FT-IR.

Procedimiento

1. Pesar 1 mg de muestra y 99 mg de BrK.
2. Pulverizar y homogeneizar ambos compuestos en un mortero de ágata alcanzando un tamaño de partícula de unos 300 μm .
3. Introducir estos compuestos en el molde de acero inoxidable endurecido.
4. Poner el molde en la prensa a una presión al vacío de 5 MPa durante unos minutos para crear una pastilla de unos 13 mm.
5. Retirar la pastilla del molde y pasarlo por el espectrofotómetro de FT-IR el cual hace un barrido de longitud de onda entre 0,7 y 1000 μm .
6. El blanco usado fue el aire.

Notas

Como resultado de este ensayo se obtiene un espectro con picos, correspondientes a los distintos enlaces que se encuentran en los compuestos de la muestra, que se han de identificar usando artículos que hagan referencia a esta técnica.

ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL ENSAYO ABTS.

El método ABTS, es un método espectrofotométrico que consiste en la decoloración del radical $ABTS^+$ (de color verde azulado). Se utiliza para determinar la capacidad antioxidante de sustancias puras o extractos de plantas, algas, hongos, tanto hidrosolubles como liposolubles.

Dicho radical se forma por la reacción entre **ABTS** (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y **persulfato potásico** ($K_2S_2O_8$).

El ABTS, es un compuesto que presenta gran estabilidad química, alta solubilidad en agua y un máximo de absorción en la banda del UVA a 342 nm. Cuando este compuesto se oxida, se transforma en un radical metaestable ($ABTS^+$) con un espectro de absorción característico y diferente al ABTS, presentando máximos de absorción en la región espectral del UV y visible a 413, 645, 727 y 811 nm (Fig.1).

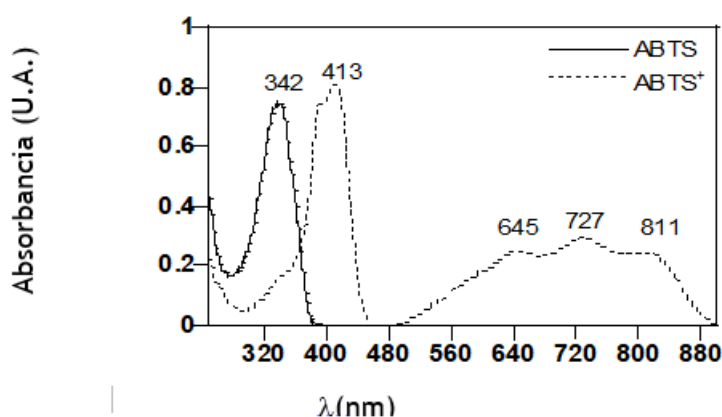


Figura 1. Espectros de absorción del ABTS y $ABTS^+$.

En el método $ABTS/S_2O_8K_2$, el radical $ABTS^+$ se genera previamente añadiendo persulfato potásico que actúa como oxidante (Re et al. 1999).

Material y reactivos

- Muestra liofilizada.
- $H_2PO_4^-$.
- HPO_4^{2-} .
- Agua destilada.
- Reactivo ABTS.
- Persulfato potásico.
- Falcon.

- Botella de cristal.
- Papel de aluminio.
- Cubetas de plástico.
- Puntas para pipetas.

Equipamiento

- Balanza analítica de precisión.
- Espectrofotómetro.
- Centrífuga.
- Nevera.
- Micropipeta monocanal.

Preparación de los reactivos

- Tampón fosfato 0,05 M a pH 6,5: se toma 4,26 gr de H_2PO_4^- y 2,71 gr de HPO_4^{2-} y se mezcla con 1 L de H_2O destilada. Esta solución se lleva a pH de 6,5.
- Preparación radical ABTS^+ : Añadimos 38.41 mg de ABTS (7 mM) a 10 mL de TP, agitamos y añadimos 6,62mg de Persulfato potásico (2,45 mM), volvemos a agitar y lo dejamos en oscuridad.

Procedimiento

1. Pesar 4 mg de alga previamente pulverizada y liofilizada, y añadir 1 mL tampón fosfato 0,05 M a pH 6,5 (TP) (de esta forma la concentración final de la muestra en la cubeta será de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En caso necesario se usará algún método abrasivo físico para romper la pared celular (ultraturrax, sonicador, ...).
2. Dejar en nevera a 4°C durante 24 h la solución.
3. Preparar la disolución stock acuosa en TP que contiene 7 mM de ABTS y 2,45 mM de persulfato potásico. Debe mantenerse en oscuridad y a temperatura ambiente durante al menos 12-16 horas para la completa formación del radical.
4. Centrifugar la mezcla (alga-TP) a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante será el extracto a medir.

5. Hacer una dilución del stock de ABTS⁺, realizado previamente, con el TP hasta obtener una absorbancia de esta entre 0,7 y 0,9 a la λ de 413 o 727 nm.
6. Realizar diluciones seriadas de la muestra para obtener la absorbancia a distintas concentraciones. Las diluciones se hacen a partir del extracto de alga antes de añadirle la dilución de ABTS⁺. Hacemos diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.
7. Añadir 950 μ L de la dilución de ABTS⁺ en una cubeta de plástico del espectrofotómetro.
8. Medir inmediatamente en el espectrofotómetro a 413 o 727 nm. Esta será la absorbancia inicial.
9. Añadir a los 950 μ L de la dilución de ABTS⁺ de la cubeta de plástico, 50 μ L del extracto de alga, mezclar bien y esperar 8 min, en oscuridad y a temperatura ambiente, hasta que la reacción se lleva a cabo y volver a medir la absorbancia. Esta será la absorbancia final.
10. El blanco será 1000 μ L de TP.

Expresión de los resultados

La actividad antioxidante se expresa en porcentaje (%AA) y se realiza con la siguiente fórmula:

$$AA\% = [(Abs\ inicial - Abs\ final)/(Abs\ inicial)] \cdot 100$$

La Abs inicial es la absorbancia en el tiempo 0, y la Abs final es la absorbancia tras los 8 min de reacción.

Notas

- El stock de ABTS⁺: una vez usado se almacenará en nevera liado en papel de aluminio pudiendo ser usado hasta una semana después de haberse realizado la solución.

Referencias

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26:1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL ENSAYO DPPH.

Es un método basado en la reducción del radical libre estable DPPH, según el método de Blois (1958) (Blois 1958).

El DPPH o 1,1-difenil-2-picrilhidracil es un radical libre estable aceptante de hidrógeno. Los compuestos antioxidantes presentes en los extractos de alga (AH) que pueden dar un hidrógeno reducirán el DPPH.



Las sustancias antioxidantes de los extractos de algas reaccionan con el DPPH y la reducción del reactivo es seguida midiendo la disminución de la absorbancia a 517nm.

Material y reactivos

- Muestra liofilizada.
- Metanol puro.
- Agua destilada.
- Reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).
- Falcon.
- Botella de cristal.
- Papel de aluminio.
- Cubetas de cristal o cuarzo.
- Puntas para pipetas.

Equipamiento

- Balanza analítica de precisión.
- Espectrofotómetro.
- Centrífuga.
- Nevera.
- Micropipeta monocanal.

Preparación de los reactivos

- Metanol 80%: coger un volumen de 100 mL de metanol puro y añadir 25 mL de agua destilada.
- DPPH a 1,27 mM: pesar 5 mg y añadir 10 mL de metanol al 80%.

Procedimiento

1. Pesar 2,4 mg de alga previamente pulverizada y liofilizada, y añadir 2 mL de metanol al 80% (de esta forma la concentración final de la muestra en la cubeta será de 200 $\mu\text{g/mL}$).
2. Dejar en nevera a 4°C durante 24 horas.
3. Preparar la disolución stock de DPPH a 1,27 mM. Conservar en nevera y siempre en oscuridad.
4. Centrifugar la mezcla algal con el metanol a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante será el extracto a medir.
5. Hacer una dilución del stock de DPPH, realizado previamente, con metanol al 80% hasta obtener una absorbancia de esta entre 0,7 y 0,9 a la λ a 517 nm.
6. nm.
7. Realizar diluciones seriadas de la muestra para obtener la absorbancia a distintas concentraciones. Las diluciones se hacen a partir del extracto de alga antes de añadirle la dilución de DPPH. Hacemos diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.
8. Coger 200 μL del extracto de alga y 1000 μL de la dilución de DPPH y añadirlo en la cubeta de cristal o cuarzo del espectrofotómetro.
9. Medir inmediatamente en el espectrofotómetro a 517 nm. Esta será la absorbancia inicial.
10. Esperar 30 min, en oscuridad y a temperatura ambiente, hasta que la reacción se lleva a cabo y volver a medir la absorbancia. Esta será la absorbancia final.
11. El blanco será 1200 μL de metanol al 80%.

Expresión de los resultados

La absorbancia se transforma en un porcentaje de inhibición frente a MeOH al 80 %. El porcentaje de la actividad antioxidante se calcula según la ecuación:

$$AA\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$$

Donde, A₀ es la absorbancia en el tiempo 0 min y A₁ es la absorbancia al final de la reacción (30 min) a 517 nm. Todas las determinaciones se han de realizar por triplicado (n = 3).

La capacidad antioxidante se expresa como % de actividad antioxidante.

Nota

- El stock de DPPH: una vez usado se almacenará en nevera liado en papel de aluminio pudiendo ser usado hasta unos días después de haberse realizado la solución.

Referencias

Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181:1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>

ENSAYO DE CONTAMINACIÓN POR LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS).

Es un método rápido que consiste en la detección de endotoxina en las muestras. Está basado en la tecnología cromogénica que proporciona resultados cuantitativos en 15 min y hace uso de reactivos LAL que se encuentran en los cartuchos. Los resultados se obtienen por una computadora mediante el software EndoScan-V™ (software de medición de endotoxinas)

Material y reactivos

- Kit de ensayo de lisado de amebocitos (LAL) de Limulus Endosafe®-PTS (Charles River Laboratories).
- Muestra.
- Agua destilada.

Equipamiento

- Incubadora.
- Computadora PTS™ con el software EndoScan-V™ incorporado.
- Mini-pipeta.

Procedimiento

1. Se cargan 25 μL de la solución de polisacárido ($50 \mu\text{g mL}^{-1} \text{dH}_2\text{O}$) en cada uno de los cuatro canales del cartucho.
2. El lector mezcla automáticamente la muestra con el reactivo LAL en dos canales y con el reactivo LAL y el control positivo en los otros dos (control).
3. Incubar unos minutos.
4. Medir con la computadora PTS™ (la densidad óptica de los cuatro canales y se compara con una curva estándar interna).

Notas

- El lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) procedentes del cangrejo herradura, (*Limulus*

polyphemus). En presencia de endotoxinas, el LAL se vuelve turbio y, bajo las condiciones adecuadas, forma un coágulo de gel sólido.

- La cantidad de endotoxina en la muestra se expresa como unidades de endotoxina (UE) mL⁻¹.
- La metodología LAL cinética cromogénica que mide la intensidad de color está relacionada directamente con la concentración de endotoxina de la muestra.

CULTIVO DE CÉLULAS

Esta metodología es para cultivar células obteniendo el número de células necesarias para realizar los diferentes ensayos. Los medios de cultivo y las técnicas de actuación en el cultivo de estas difieren de la línea celular con la que se trabaje. Es importante trabajar con máxima esterilidad para que no se produzcan cruzamientos entre líneas celulares o contaminación por bacterias, hongos.

Material y reactivos

- Línea celular a cultivar.
- Medio de cultivo según línea celular (DMEM, RPMI-1640, ...).
- Suero Bobino Fetal (FBS) inactivado (suplemento de proteínas al medio).
- L-Glutamina 200 mM (2% según la célula a usar).
- Estreptomicina- Penicilina 5.000 U/mL - 5.000 U/mL (antibiótico).
- Anfotericina B 250 µg/mL (antimicótico)
- Tripsina.
- Escraper.
- Flask 25 y 75 cm² o placas estériles.
- Falcon 15 mL estériles.
- Puntas de pipetas estériles.
- Pipetas graduadas de 10 mL y de 5 mL, estériles.
- Pipetas Pasteur de cristal, estériles (se usarán para aspirar).

Equipamiento

- Incubadora 37°C y 5% CO₂.
- Centrífuga.
- Nevera.
- Baño termostaticado.
- Cabina de flujo laminar.
- Micropipeta monocal.

Preparación de los reactivos

- Preparación del medio correspondiente según la línea celular a cultivar: de forma general añadir a 500 mL de medio 50 mL de FBS inactivado, 5 mL de Estreptomicina + Penicilina y 2'5mL de anfotericina (se trabajará en cabina de flujo laminar).
- Inactivar el FBS: una vez descongelado, se introduce en el baño a una temperatura entre 55-56°C durante 1 h.
- PBS: Se realiza un stock de 1 litro concentrado al 10x (NaCl → 87'6 gr, KCl → 4'6 gr, H₂PO₄Na → 2'034 gr y HPO₄Na₂ → 13'285 gr). De este stock se cogen 50 mL y se añaden 450 mL de agua destilada, se ajustará el pH a 7'4 -7'5 y se autoclava.

Procedimiento

1. Mirar en el microscopio las células, viendo si están en confluencia, si hay algún tipo de contaminación o si se han adherido bien o no (las células tardan unas 2- 4 horas en adherirse a la superficie del flask o placa usada, en el caso que al día siguiente de la descongelación no se hayan adherido habrá que descartar esas células al igual que si hay contaminación).
2. Si todo va bien y no está en confluencia el flask o la placa se realiza el cambio de medio:
 - Células adherentes: se aspira el medio y se añade 8-10 mL de PBS se mueve suavemente para levantar aquellas células que no se hayan adherido correctamente y se aspira, una vez hecho esto se le añade el medio de cultivo.
 - Células en suspensión: se recoge todo el contenido de la placa o flask en un falcon y se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con 1 mL de medio, seguidamente se vuelve a añadir en un flask o placa con más medio de cultivo.
3. Se mira de nuevo al microscopio y se introduce en la incubadora a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% CO₂.
4. Si está en confluencia (85-95% de confluencia) se procede a proceder a subcultivar:

- **Células adherentes:** se aspira con cuidado (con la pipeta Pasteur) el medio, siempre sin tocar la punta la superficie del flask o placa, se añade PBS y se aspirará (con una nueva punta). Se procede al levantamiento de las células para lo cual hay dos métodos:
 - **Escraper:** se añade un poco de medio, se pasa por toda la superficie donde están las células adheridas con un escraper para levantarlas, se recogerá todo con una pipeta serológica estéril y se introducirá en un falco, se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min, se aspira el sobrenadante y se resuspende el pellet con medio de cultivo y se divide en el número de flask o placas, al que previamente se le añadió medio cultivo, se rotularán las placas o los flask y se meterá en incubadora. (Se suelen hacer subcultivos 1:3)
 - **Tripsina:** se añade 600-1000 μL de tripsina, según el tamaño del flask, para romper los enlaces iónicos entre las células y que se despeguen, y se introduce 2 min en la incubadora para que esta actúe. Se añade unos ml de medio de cultivo al flask o la placa y se recoge todo en un flacon de 15ml. Se centrifuga 5 min a 1500 rpm, se aspira el sobrenadante y se añade unos ml de medio de cultivo para se resuspender el pellet, se realiza el subcultivo y se introducen nuevamente en la incubadora.
- **Células en suspensión:** se actúa de la misma manera del cambio de medio, sólo que a la hora de subcultivar se hace en 1:3.

Notas

- La tripsina es tóxica para las células pues es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos o proteínas de menor tamaño. Esta se inactiva con el FBS que se añade a los medios de cultivo.

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR MTT

Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la reducción del tetrazolio (MTT o Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), que es un compuesto hidrofílico de color amarillo, a formazán, un compuesto hidrofóbico de color azul que puede ser solubilizado mediante disolventes orgánicos y cuantificados espectrofotométricamente.

Este proceso es realizado por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas de forma que la viabilidad celular es proporcional a la densidad óptica del formazán producido.

Material y reactivos

- Placas Elisa de 96 pocillos estériles
- Compuesto a ensayar
- Suspensión celular.
- Medio de cultivo apropiado al tipo celular.
- Eppendorf.
- Azul de tripano o Tripan Blue.
- Cámara de Neubauer.
- MTT
- PBS estéril.
- Falcon de 15ml estéril/no estéril.
- Jeringa estéril de 5 ml.
- Filtro de jeringa estéril de 0,2 μm .
- Papel de aluminio.
- Puntas para pipeta (estériles/no estériles).
- Recipiente o depósito de reactivos para pipetas multicanal.
- Isopropanol
- HCl 35%
- Rotulador permanente.

Equipamiento

- Multipipeta o micropipeta multicanal
- Cabina de bioseguridad.
- Incubador de CO₂
- Espectrofotómetro de microplacas para lectura a 550 nm y 630 nm

Preparación de los reactivos

- Solución de MTT 5 mg/mL: Añadir 2,5 mg de MTT a 5 ml de PBS, agitar y esterilizar por filtración
- Isopropanol ácido (HCl 0,04N): Añadir 353 µL de HCl al 35% y enrasar hasta 100 mL de 2-propanol o isopropanol.

Procedimiento

1. Preparar la suspensión celular correspondiente. En función de la línea celular el número de células por pocillo será una u otra.
2. En una microplaca de 96 pocillos añadir por cuadruplicado:
 - a) Para el blanco:
 - 100 µL de medio
 - b) Para el control:
 - 50 µL de medio
 - 50 µL de suspensión
 - c) Para los tratamientos:
 - 50 µL de medio conteniendo una concentración conocida del compuesto a ensayar preparada mediante diluciones seriadas en el medio.
 - 50 µL de suspensión.
3. Incubar durante 72 h a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.
4. Añadir 10 µL de la solución de MTT a cada pocillo
5. Incubar durante 4 h.

6. Solubilizar los cristales de formazán con 150 μL de la solución de isopropanol ácido en cada pocillo.
7. Determinar la densidad óptica a 550 nm con referencia a 630 nm en un espectrofotómetro para microplacas.

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en % de supervivencia con respecto al control sin tratar. Se realiza también el cálculo de la IC_{50} , que es el cálculo de la concentración del compuesto a ensayar que produce la inhibición al 50% de supervivencia de la población celular.

ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico que se basa en el paso de una suspensión de partículas alineadas por delante de un haz láser focalizado. En nuestro caso es utilizada para estudiar cómo afecta un determinado compuesto a las diferentes fases del ciclo celular.

Material y reactivos

- Cultivos células de las líneas que se van a utilizar en el ensayo.
- Stock del compuesto bajo estudio y sus correspondientes diluciones.
- PBS con 1%FBS y HEPES 10 mM.
- PBS con RNAasa 100 µg/ml y yoduro de propidio (IP) 40 µg/ml (se prepara en el momento).
- EDTA.
- 2- Metoxiestradiol.
- Tripsina.
- Etanol frío.
- Congelador (-20°C)
- Placas de 6 pocillos.
- Eppendorf.
- Falco 15ml.

Equipamiento

- Incubadora.
- Centrífuga.
- Micropipetas monocanal.
- Citómetro.
- Baño con regulador de temperatura.

Preparación de los reactivos

- PBS con FBS 1% y HEPES 10 mM. Para 50 mL: se añaden 49 mL de PBS, 0,5 mL de FBS y 0,5 mL de HEPES.

- PBS con RNasa 100 µg/mL y IP 40 µg/ml. Para 8 mL (las cantidades varían según la concentración del stock): se mezcla 97,5 µL de un stock de RNasa 8,2 mg/mL, 320 µL de un stock de IP 1 mg/mL y 7582,5 µL de PBS y se filtra.

Procedimiento

1. Cultivar las células en placas de 6 pocillos. Incubar hasta que estén confluentes. En el caso de cultivos de células en suspensión, cultivarlas en botellas.
2. Añadir tratamientos y controles. El control negativo no lleva tratamiento y el control positivo lleva 2-metoxiestradiol 10 µM. Incubar 14-16 horas (el tiempo puede variar en función del tratamiento en cuestión; suele ser *overnight*, 24 e incluso 48 h, pero puede ser más o menos).
3. Recoger las células de los pocillos y ponerlas en tubos eppendorf. Se recogen en falcon de 15 mL los medios (las células en apoptosis – subG1 – pueden estar flotando); se lava con PBS y también se mete en el los tubos falcon; finalmente se despegan con tripsina y se recogen en medio de cultivo, que también añadimos a los tubos). (*Si las células no son adherentes, se recoge todo el pocillo y se pasa al siguiente paso). En el caso de ser células en suspensión, se recoge todo el contenido en un eppendorf de 2 mL.
4. Apartar 50 µL de cada eppendorf en tubos diferentes para contar las células que hay en cada pocillo (este paso no es necesario si el citómetro te permite poner un límite de X eventos, así sabrás que en todas tus muestras has pasado el mismo número de células y son comparables).
5. Centrifugar (5min, 1500rpm). Decantar sobrenadante y añadir 1mL de PBS con FBS y HEPES. Resuspender suavemente. (Pasar a eppendorf porque es más cómodo).
6. Volver a centrifugar (5 min, 1500 rpm). Decantar sobrenadante.
7. Añadir 100 µL de PBS con FBS y HEPES y resuspender suavemente.
8. En agitación suave, añadir 1mL de etanol frío gota a gota. Incubar 1 h a -20°C. Durante esta hora se cuentan las células/mL que hay en cada pocillo.
9. Centrifugar (5 min, 1500 rpm). Decantar sobrenadante y añadir 1 mL de PBS con FBS y HEPES. Resuspender suavemente.

10. Volver a centrifugar (5 min, 1500 rpm). Decantar sobrenadante y añadir 1 mL de PBS con FBS y HEPES. Resuspender suavemente.
11. Retirar el sobrenadante y añadir 500 μ L de la solución de PBS con RNasa e IP. Si el citómetro no permite poner X número de eventos, el volumen que se añade será en función del número de células que hayamos contado.
12. Añadir 100 μ L de EDTA a cada tubo.
13. Incubar 30 min en el baño a 37°C y realizar la medida en el citómetro.

Análisis de datos

- Representar un diagrama de puntos (dot plot) que enfrente la complejidad frente al tamaño. Delimitar la población deseada sobre este gráfico, de forma que solo se tengan en cuenta para en análisis de datos las células individuales, no los agregados ni los restos celulares y otras sustancias que puedan estar presentes.
- Leer las muestras en el citómetro hasta llegar a 20.000 eventos en P1. (Da igual que sean 20.000 u otro número, el caso es que tengan lo mismo).
- Representar un histograma que enfrente el número de eventos frente a la intensidad de señal, que será correspondiente a la cantidad de IP que hayan incorporado las células y, por tanto, a su contenido en ADN. Delimitar las fases del ciclo celular en función al contenido de ADN de estas poblaciones celulares; sub G₁ (<2n; DNA fragmentado, apoptóticas), G₀/G₁ (2n, interfase o no están en división activa), S (2-4 n, están en proceso de síntesis de DNA para duplicarlo) y G₂/M (4n, han duplicado su DNA, no podemos distinguir si están en fase G₂ o en mitosis).
- Añadir una tabla que recoja los parámetros de interés. Comparar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en las diferentes muestras respecto al control.

Nota

- El etanol frío fija las células y proporciona permeabilidad a las membranas para que penetre el IP y se una al ADN.
- El IP es cancerígeno por lo que hay que trabajar con guantes y con cuidado.
- EDTA: Es un agente quelante de Ca²⁺, es decir, secuestra el Ca²⁺ del medio, lo que hace que no se unan las células y por tanto evita la aglomeración celular.

- IP: es un agente intercalante que se une al ADN, lo tiñe. Tiene señal en el citómetro. Según la cantidad y localización del ADN nos indica que la célula está en una fase u otra del ciclo celular.

DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS THP-1 A MACRÓFAGOS

Es un proceso por el cual se da la diferenciación de monocitos humanos a macrófagos y por tanto secretan citoquinas que actúan en los procesos inflamatorios.

Material y reactivos

- Células THP-1.
- PMA (Forbol 12-ministrato 13-acetato)
- RPMI-1640 (medio de cultivo)
- FBS (Suero bobino fetal)
- Penicilin-strptomycin solution 100X
- Amphotericin B.
- Hielo.
- LPS (Lipopolisacárido).
- Placas Elisa de 96 pocillos estériles.
- Compuesto a ensayar
- Eppendorf.
- Puntas para pipetas.

Equipamiento

- Multipipeta o micropipeta multicanal.
- Micropipetas monocanal.
- Cabina de bioseguridad.
- Incubador de CO₂
- Congelador -80°C.

Preparación de los reactivos

- 10 ng/mL de PMA se hace un stock de mayor concentración para poder pesarlo así que, peso 1 mg y lo disuelvo en 1 mL de medio de cultivo. A partir de este hago diluciones hasta llegar a 0,01 µg/mL y de este ya tomo los 10 µL que añadiré al mL de la suspensión celular de 5×10^5 células.

Procedimiento

1. Sembrar THP-1 en placas 96-well (5×10^4 células/pocillo) en presencia de 10 ng/mL de PMA e incubar 48 h para diferenciarlas a macrófagos. Se prepara el volumen necesario para los pocillos que vayamos a usar; ej si necesitamos 10 pocillos, en cada pocillo ponemos 5×10^4 células en un volumen de 100 μ L, preparamos 1 mL que tenga 5×10^5 células y añadimos 10 μ L PMA. Repartimos 100 μ L por pocillo e incubar.
2. Pasado ese tiempo, comprobar que las células ya no están en suspensión si no pegadas. Las células se lavan con medio (si haces más de un lavado mejor) y se añade el tratamiento de polisacárido o control durante 24 h (depende de los tiempos a los que ese polisacárido en concreto haga efecto, puede ser a 16 h o menos). El control negativo es medio sin polisacárido y el positivo LPS 1 mg/mL (solo sirve como control interno, a la hora de mostrar los resultados no se han incluido).
3. Tras el tratamiento, poner la placa sobre una bandeja con hielo y pasar el medio a una placa nueva rotulando bien qué es cada cosa. Guardar en el -80°C hasta su uso como es la determinación de TNF- α mediante el Kit Human TNF alpha uncoated ELISA kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) u otro.

Notas

- THP-1 (Monocitos humanos, son células en suspensión).
- PMA este compuesto hace que se diferencie los monocitos a macrófagos pues toman características de macrófagos haciéndose adherentes y secretando citoquinas que actúan en la inflamación.
- THP-1 se cultivan en medio RPMI-1640 con 0,05 mM 2-mercaptoethanol (coger una alícuota con muy poca cantidad, para que no huela tanto al abrirlo en cultivos), 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin solution 100X y 0.5% amphotericin B y se incuban a 37°C y 5% CO_2 .

DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS (IL-6 y TNF- α).

En este ensayo se determina la cantidad de citoquinas (TNF- α e IL-6) secretadas por las células a usar (en este caso se usó RAW 264.7 y THP-1 diferenciadas previamente a macrófagos) al estar en contacto con polisacáridos de diferentes algas. De manera que se estudió la actividad inmunomoduladora de estos polisacáridos.

Material y reactivos

- Cultivo de la línea celular a usar en el ensayo.
- LPS
- PBS
- Medio de cultivo completo de la línea celular a usar.
- Tratamiento a ensayar
- Filtro estéril.
- Parafilm.
- Placas de 96 pocillos estériles y no estériles.
- Puntas para pipetas.
- Kit ELISA Ready-SET-Go de ratón TNF alfa (Affymetrix, eBioscience).
- Kit ELISA Ready-SET-Go de IL-6 de ratón (Affymetrix, eBioscience).

Equipamiento

- Cabina de bioseguridad.
- Incubador de CO₂.
- Congelador -80°C.
- Multipipeta o micropipeta multicanal
- Micropipetas monocanal.

Preparación de los reactivos

- LPS bacteriano (50 ng/mL): se toma 1mg de LPS y se disuelve en 1mL de PBS y se filtra con un filtro estéril 0'2 μ m. y se hacen alícuotas de 10 μ L que se conservan en el -20°C. Para obtener la concentración de 50 ng/mL, se hacen

diluciones con el medio de cultivo de la célula a usar hasta llegar a la concentración requerida.

Procedimiento

1. Conocer las IC₅₀ de los tratamientos a ensayar con las células a usar, pues se trabajará a concentraciones por debajo de la IC₅₀.
2. Cultivar las células a usar en el ensayo (RAW 264.7, TPH-1, ...) en presencia de diferentes concentraciones de tratamiento en microplacas de 96 en un volumen total de 100 µL. Se utilizó LPS bacteriano (50 ng/mL) como control positivo para la activación de macrófagos. Se obtuvieron medios acondicionados de células usadas, no tratadas y tratadas, durante 24 h.
3. Retirar el sobrenadante de la placa incubada con las células y pasarlo a otra placa de 96 pocillos no estéril manteniendo el mismo diseño (hasta aquí se trabaja en cabina de flujo laminar)
4. Envolver esta placa en parafilm y meter el -80°C hasta su uso.
5. A la placa con las células adheridas se le podrá realizar un MTT para comprobar que las concentraciones usadas de tratamiento no eran citotóxicas, (se añade 100 µL de medio de cultivo y 10 µL de MTT se incuba 4 h y tras este periodo se adiciona 150 µL de isopropanol ácido y se lee a 517 nm en el lector de placas).
6. Seguir las instrucciones del proveedor para cuantificar el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y la interleucina-6 (IL-6) mediante los kits ELISA Ready-SET-Go de ratón TNF alfa y ELISA Ready-SET-Go de IL-6 de ratón (Affymetrix, eBioscience).

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON MARCAJE ISOBÁRICO TANDEM MASS TAG (TMT).

Es un método de procesamiento y análisis de las muestras para el análisis de proteómica en el cual las muestras son marcadas con isótopos (TMT).

Este método es más robusto que el método LQF, además en este se identifican algunas menos proteínas, y es más caro.

Material y reactivos

- Flask o placas en las que se encuentran las células previamente cultivadas y tratadas. (En este estudio fueron HGF-1).
- Lysis Buffer (TEAB 100 mM 1% SDS).
- Tampón salino fosfato (PBS)
- DMEN (medio cultivo de las células HGF-1)
- Ácido bicinonínico (BCA).
- Reactivo de marcaje TMT126.
- Reactivo de marcaje TMT127.
- Bicarbonato de trietilamonio (TEAB).
- Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP).
- Yodoacetamida.
- Tripsina.
- Hidroxilamina.
- Agua MilliQ.
- Ácido fórmico (FA)
- Tubos cristal.
- Viales de inyección de nHPLC

Equipamiento

- Centrífuga.
- Incubadora.
- Congelador -20°C.
- Espectrofotómetro (Qubit).

- Concentrador de vacío para evaporar (SpeedVac).
- Sonicador / Baño ultrasónico.
- Vortex.
- nHPLC

Procedimiento

A- Preparación de células para el análisis proteómico:

1. Cultivar en placas las células HGF-1 en DMEM sin FBS y la concentración más alta de muestra que no produzca efecto citotóxico en las células (nuestro caso con 320 µg/mL de polisacáridos de *Euglena gracilis*).
2. Incubar las placas durante 24 horas.

B- Preparación del extracto de proteínas:

1. Lavar las células tres veces con PBS sobre una superficie con hielo para retirar el medio de cultivo.
2. Lisar las células con Lysis Buffer (TEAB 100 mM 1% SDS) añadiendo cinco veces el volumen del pellet (p.e., 100 µL de buffer para 20 µL de pellet celular).
3. Centrifugar a 16.000 g, 10 min, 4°C, y recuperar los sobrenadantes en tubos nuevos.
4. Determinar la concentración de proteínas mediante un ensayo de BCA (ácido bicinconínico) y normalizar todas las muestras a la misma concentración (1 µg /µL).
5. Transferir 100 µg de muestra para cada condición (100 µg para el marcaje con TMT126 y 100 µg para el marcaje con TMT127) a tubos nuevos y ajustar a un volumen final de 100 µL con TEAB 100mM.

C- Reducción de la muestra:

1. Añadir 5 µl de TCEP 200 mM.
2. Incubar a 55°C durante 1 hora.

D- Alquilación de la muestra:

1. Añadir 5 µL de yodoacetamida 375 mM.

2. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz.

E- Precipitación de las proteínas:

1. Añadir 6 volúmenes (unos 600 μ L) de acetona pre-enfriada (-20°C) e incubar al menos durante 4 horas hasta toda la noche a -20°C .
2. Centrifugar a $8.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C , decantar la acetona y dejar que se seque el pellet durante 2-3 min.

F- Digestión de las proteínas:

1. Resuspender el pellet en 100 μ l de TEAB 50 mM (pH 8,5).
2. Añadir 2,5 μ L de tripsina (1ug/ μ L) (Pierce trypsin protease, MS grade) e incubar durante toda la noche a 37°C .

G- Marcaje de los péptidos con TMT duplex (Thermo Fisher Scientific):

1. Reconstituir los reactivos de marcaje según el protocolo suministrado por el fabricante.
2. Añadir 41 mL de reactivo de marcaje TMT a cada tubo de 100 μ L de muestra.
3. Incubar la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Añadir 8 μ L de hidroxilamina al 5% e incubar durante 15 min.
5. Cuantificar con Qbit.
6. Combinar cada par de muestras de diferente condición experimental en cantidades iguales en un mismo tubo.
7. Evaporar en SpeedVac, 30-60 min aproximadamente.
8. Reconstituir con 50 μ L de agua MilliQ 0,1% FA.
9. Sonicar en baño durante 10 min, dar un vortex y centrifugar a máxima velocidad durante 5 min.
10. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a los viales de inyección de nHPLC.

Nota

- El **Qubit** es un espectrofotómetro que utiliza fluorocromos específicos para medir ácidos nucleicos y proteínas.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS PROTEÓMICO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS SIN MARCAJE (Digestión asistida por gel) (Label free quantification - LFQ)

Es un método en el cual se procesa y analiza las muestras realizándose el análisis proteómico. En este caso no se marcan las muestras con isótopos.

Material y reactivos

- Flask o placas en las que se encuentran las células previamente cultivadas y tratadas. (En este estudio fueron HGF-1).
- RIPA buffer (Sigma) suplementado con 0,2 U/ μ L de nucleasa (Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis).
- Tampón salino fosfato (PBS)
- DMEN (medio cultivo de las células HGF-1)
- Clean-Up Kit.
- Agua milliQ
- Ácido bicinconínico (BCA).
- Solución de monómero de acrilamida al 40%.
- Persulfato de amonio al 10%
- Tetrametiletilendiamina (TEMED).
- Bicarbonato amónico 25 mM.
- Acetonitrilo (ACN).
- Ditiotreitól (DTT) 10 mM / bicarbonato amónico 50 mM.
- Iodoacetamida 55 mM / bicarbonato amónico 50 mM
- Tripsina.
- Hidroxilamina.
- Ácido fórmico (FA).
- Agua MilliQ.
- Hielo
- Tubos cristal.
- Espátula.
- Viales de inyección de nHPLC

Equipamiento

- Centrífuga.
- Incubadora.
- Congelador -80°C.
- Termoblock.
- Concentrador de vacío para evaporar (SpeedVac).
- Sonicador / Baño ultrasónico.
- Vortex.
- NanoDrop (espectrofotómetro de microvolumen).
- nHPLC

Procedimiento

A- Preparación de células para el análisis proteómico:

1. Cultivar en placas las células HGF-1 en DMEM sin FBS y la concentración más alta de muestra que no produzca efecto citotóxico en las células (nuestro caso con 320 µg/mL de polisacáridos de *Durvillaea antarctica*).
2. Incubar las placas durante 24 horas.

B- Extracción y purificación de las proteínas.

1. Lavar concienzudamente las monocapas celulares de las placas de cultivo procedentes de los diferentes ensayos con PBS sobre una superficie con hielo.
2. Congelar las placas de cultivo a -80°C para su posterior procesamiento (en caso de no continuar seguidamente).
3. Solubilizar cada placa de cultivo con 500 µL de RIPA buffer (Sigma) suplementado con 0,2 U/µL de nucleasa (Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis) y pasar a tubos.
4. Sonicar 5 min en un baño con hielo.
5. Centrifugar a 14.000 g, 4°C, durante 5 min y recuperar los sobrenadantes.
6. Purificar mediante un procedimiento de precipitación de proteínas (Clean-Up Kit; GE Healthcare, München, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.
7. Disolver los precipitados de proteína resultantes en 100 µL de agua milliQ.

8. Sonicar en un baño de ultrasonidos durante 5 min y centrifugar a 14.000 g durante 5 min, transfiriéndose los sobrenadantes a tubos limpios.
9. Determinación de la concentración de proteínas mediante ensayo colorimétrico BCA (basado en el ácido bicinconínico) y normalización de todos los tubos a una misma concentración (1 µg/ul).

C- Preparación del gel:

1. Mezclar 45 µL de muestra con 14 µL de solución de monómero de acrilamida al 40% en tubos de cristal.
2. Añadir rápidamente 2,5 µL de persulfato de amonio al 10% y 1 µL de TEMED.
3. Dejar polimerizar completamente durante 20 min.
4. Sacar cada gel del tubo con una espátula y cortarlo en cubos de 1-2 mm.
5. Añadir 200 µL de agua MilliQ. Dejar 15 min a temperatura ambiente (RT) y retirar líquido.
6. Añadir 100 µL de bicarbonato amónico 25 mM 20 min, RT y retirar líquido.
7. Añadir 100 µL de bicarbonato amónico 25 mM 50% acetonitrilo (ACN) 20 min, RT y retirar líquido. Repetir dos veces.

D- Reducción de la muestra:

1. Añadir 100 µL de bicarbonato amónico 50 mM 20 min, RT y retirar líquido.
2. Añadir 100 µL de ACN 5 min, RT y retirar líquido.
3. Dejar evaporar al aire durante 5 min.
4. Añadir 100 µL de DTT 10 mM / bicarbonato amónico 50 mM.
5. Incubar durante 30 min, 56°C (*Termoblock*) y retirar líquido.

E- Alquilación de la muestra:

1. Añadir 100 µL de ACN 5 min, RT y retirar líquido.
2. Añadir 100 µL de Iodoacetamida 55 mM / bicarbonato amónico 50 mM.
3. Incubar 20 min, RT, en oscuridad, y retirar líquido.

F- Digestión enzimática *in gel*:

1. Añadir 100 µL de ACN 5 min, RT y retirar líquido.

2. Dejar evaporar al aire durante 5 min.
3. Añadir 50 μL de tripsina (10 $\text{pg}/\mu\text{L}$ en bicarbonato amónico 100 mM) (Thermo Scientific™ Pierce™ Trypsin Protease).
4. Incubar 18 horas a 37°C.

G- Extracción de los péptidos:

1. Recuperar sobrenadante en un tubo aparte (tubo 1) y añadir 50 μL de ACN / 0,1% ácido fórmico (FA) al tubo original que contiene el gel (tubo 2).
2. Incubar el tubo 2 durante 30 min RT.
3. Hacer una centrifugación breve con el tubo 2 y recuperar el sobrenadante para añadirlo al del tubo 1. Desechar el tubo 2.
4. Evaporar en *SpeedVac*, 30-60 min aproximadamente.
5. Añadir 50 μL de agua MilliQ 0,1% FA.
6. Sonicar en baño durante 10 min.
7. Dar un *vortex*.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 min.
9. Recuperar el sobrenadante en un tubo aparte y cuantificar con *NanoDrop*.
10. Normalizar todas las muestras a la misma concentración y pasarlas a los viales de inyección del nHPLC.

Notas

- **TEMED** se utiliza con persulfato amónico (APS) para catalizar la polimerización de acrilamida al preparar geles para electroforesis.
- **DTT** (Ditiotreitol; reactivo de Cleland) se utiliza para estabilizar enzimas y otras proteínas con grupos de sulfhidrilos libres.
- La **tripsina** es una enzima peptidasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos.

ENSAYO DE ESTUDIO *IN-VIVO* SOBRE RATONES MACHOS BALB/C.

Es un ensayo *in-vivo* usado para determinar la actividad antigénica en ratones al administrarse intraperitonealmente el compuesto a ensayar, en nuestro caso polisacáridos extraídos del alga *Porphyridium cruentum*.

El estudio animal se llevó a cabo el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga, el cual cuenta con todas las instalaciones y material para la correcta realización de los procedimientos pertinentes.

Material y reactivos

- Ratones machos Balb/C de 4 a 5 semanas con un peso 24 y 26 gr.
- Compuesto a ensayar.
- LPS.
- PBS o Solución salina (NaCl 0,9%).
- Jeringas y agujas estériles.
- Bisturí estéril.
- Portaobjetos.
- Cámara de Neubauer.
- Falcon de 15 mL estériles.

Equipamiento

- Jaulas para los ratones.
- Microscopio.
- Centrífuga.

Procedimiento

1. Los animales se alojaron en jaulas apropiadas para un máximo de seis individuos mantenidos con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h en una habitación bajo control de temperatura/humedad con acceso a agua y alimentos.
2. Para el tratamiento se pesó 1g del polisacárido liofilizado y se disolvió en 100 mL de una solución salina de NaCl al 0,9% (VEH).

3. Para la inmunoestimulación se pesó 1g LPS y se disolvió en 100mL de una solución VEH.
4. Tanto el tratamiento como el LPS, se administraron intraperitonealmente (ip) en una dosis de 10 mg Kg⁻¹ de peso corporal en un volumen de 1 mL kg⁻¹ de peso corporal, mientras que el grupo control recibió la solución VEH.
5. La administración del tratamiento a ensayar, LPS y el VEH se realizó en tres dosis únicas: los días 1, 7 y 14 desde el inicio del estudio. Los animales se sacrificaron finalmente el día 21.
6. La diferenciación de los tipos de leucocitos se realizó por medio de la obtención de una gota de sangre mediante un pequeño corte en la cola de cada animal. La gota se extendió sobre un portaobjetos de vidrio a lo largo del borde con un segundo portaobjetos, dejando secar al aire y tiñéndola posteriormente con la técnica de May-Grunewald-Giemsa. El número absoluto de cada tipo de leucocito se realizó mediante por conteo visual en microscopio con objetivo de 100x. Finalmente, se calcularon los porcentajes de los distintos tipos de leucocitos, promediando cada tipo presentes en seis campos visuales.
7. La extracción y recuento de macrófagos peritoneales se realizó inmediatamente al sacrificio de los animales por dislocación cervical. Para ello se extrajeron los macrófagos mediante inyección de 5mL de PBS en la cavidad abdominal, recuperando posteriormente el mismo volumen. Las células extraídas se sedimentaron por centrifugación durante 5 min a 1500 rpm y se suspendieron en 1 mL de PBS. Finalmente, se contó microscópicamente el número total de macrófagos y se calculó su concentración utilizando una cámara de Neubauer.

Notas

- Los procedimientos experimentales con animales se llevaron a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones en la Directiva 2010/63/UE de las Comunidades Europeas y en la legislación española (Real Decreto 53/2013, BOE 34/11370–11421, 2013) que regula el cuidado y uso de animales de laboratorio y hacer todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados.