

Universidad de Huelva

Departamento de Ciencias Integradas



Aplicaciones farmacológicas y alimentarias de la microalga extremófila *Coccomyxa onubensis*

Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:

Alberto Toimil García

Fecha de lectura: 28 de julio de 2021

Bajo la dirección del doctor:

Francisco Navarro Roldán

Huelva, 2021





Tesis Doctoral

**APLICACIONES
FARMACOLÓGICAS Y
ALIMENTARIAS DE LA
MICROALGA EXTREMÓFILA
*Coccomyxa onubensis***

Programa de doctorado
CIENCIAS DE LA SALUD

Alberto Toimil García

Universidad de Huelva
Departamento de Ciencias Integradas



**Universidad
de Huelva**

Programa de Doctorado

Ciencias de la Salud

Tesis Doctoral

APLICACIONES FARMACOLÓGICAS Y ALIMENTARIAS DE LA
MICROALGA EXTREMÓFILA *COCCOMYXA ONUBENSIS*

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Alberto Toimil García

Bajo la dirección del doctor:

Francisco Navarro Roldán

Huelva, 2021

Al Dr. Paco Navarro, por haber confiado en mí.
A mis padres, por haberme inculcado el amor por la biología.
A Caro, por todo.

ABREVIATURAS	XXI
RESUMEN	XXIII
ABSTRACT	XXIV
1. INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
Las algas	
1. 1. Descripción, clasificación y generalidades de las algas	1
1. 2. Relevancia biológica de las algas	4
1. 3. Algas y microalgas	6
1. 4. Empleo de las algas como fuente de recursos para el hombre	7
1. 5. Microalgas como fuente de nutraceuticos	13
1. 6. Río Tinto, un entorno controvertido	18
1. 7. Usos actuales de las microalgas	20
1. 7.1. Medioambiental	20
1. 7.2. Fuente de biocombustible	21
1. 7.3. Alimentación animal y acuicultura	22
1. 7.4. Cosméticos	23
1. 7.5. Antibióticos y antivirales	23
1. 7.6. Antitumorales	24
1. 7.7. Analgésica y antiinflamatoria	25

1. 7.8. Otras actividades farmacológicas	25
1. 7.9. Alimentación humana	26
1. 8. Relevancia de los compuestos antioxidantes en la alimentación humana	27
1. 9. Relevancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación humana	28
2. ANTECEDENTES	37
<hr/>	
3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	43
<hr/>	
4. MATERIAL Y MÉTODOS	47
<hr/>	
4. 1. Actividad antimicrobiana de la microalga <i>Coccomyxa onubensis</i>	47
4. 1.1. Aislamiento de las microalgas y condiciones de cultivo	47
4. 1.2. Preparación del extracto crudo	50
4. 1.3. Preparación de los extractos bioactivos	50
4. 1.4. Solventes empleados como agentes extractantes	51
4. 1.5. Preparación de los discos para el antibiograma (Método de difusión en disco)	52
4. 1.6. Determinación de la actividad antimicrobiana	54
4. 1.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	56
4. 1.8. Análisis de los extractos por HPLC	57
4. 1.9. Análisis de los extractos por cromatografía de gases (GC-FID)	58
4. 1.10. Análisis estadístico	58

4. 2. <i>Coccomyxa onubensis</i> como fuente alimentaria segura para los animales	58
4. 2.1. Producción de biomasa de <i>Coccomyxa onubensis</i>	58
4. 2.2. Análisis bioquímico de la biomasa de <i>Coccomyxa onubensis</i>	61
4. 2.3. Preparación de la dieta experimental enriquecida en microalga	62
4. 2.4. Manejo animal	65
4. 2.5. Análisis hematológico y bioquímico	66
4. 2.6. Análisis histopatológico	67
4. 2.7. Análisis estadístico	68
4. 3. Efectos antihiper glucémicos y antihiperlipidémicos de <i>C. onubensis</i>	68
4. 3.1. Producción de biomasa de la microalga	68
4. 3.2. Preparación de la dieta experimental	68
4. 3.3. Manejo animal	69
4. 3.4. Análisis hematológico y bioquímico	71
4. 3.5. Extracción de órganos	72
4. 3.6. Determinación de lípidos encefálicos	72
4. 3.7. Reactivos	73
4. 3.8. Análisis estadístico	73
4. 4. Análisis de las propiedades nutraceuticas de la microalga relacionadas con su potencial antioxidante	74
4. 4.1. Determinación de la capacidad antioxidante total	74
4. 4.2. Determinación de polifenoles totales	74

4. 4.3. Determinación de polifenoles flavonoides	75
4. 4.4. Determinación de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables)	75
4. 4.5. Determinación de los carotenoides totales	76
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
<hr/>	
5. 1. Actividad antimicrobiana de la microalga <i>Coccomyxa onubensis</i>	87
5. 1.1. Análisis químico de los extractos de <i>Coccomyxa onubensis</i> con actividad antimicrobiana	81
5. 1.2. Mecanismos de acción relacionados con la actividad antimicrobiana	91
5. 2. <i>Coccomyxa onubensis</i> como fuente alimentaria segura para los animales	97
5. 2.1. Efectos de la biomasa de <i>Coccomyxa onubensis</i> en el peso de las ratas	97
5. 2.2. Estudio histopatológico del hígado y riñón	91
5. 2.3. Parámetros hematológicos y séricos de las ratas alimentadas con <i>C. onubensis</i>	102
5. 2.3.1. Hematología	102
5. 2.3.2. Bioquímica sanguínea	107
5. 2.3.2.1. Efecto de <i>C. onubensis</i> sobre los diferentes órganos	109
5.2.3.3. Perfil lipídico	116
5. 3. Efectos antihiper glucémicos y antihiperlipidémicos de <i>Coccomyxa onubensis</i>	122
5. 3.1. Efectos de la biomasa de <i>Coccomyxa onubensis</i> en el peso corporal de las ratas	122

5. 3.2. Parámetros hematológicos y séricos de ratas alimentadas con dieta hipercolesterolémica	125
5. 3.2.1. Hematología	125
5. 3.2.2. Bioquímica sanguínea	131
5. 3.2.2.1 Efecto de <i>C. onubensis</i> sobre los diferentes órganos en ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica	133
5. 3.2.2.2. Efecto de <i>C. onubensis</i> sobre el nivel de glucosa en suero de las ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica	137
5. 3.2.2.3. Factores proinflamatorios en ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica	138
5. 3.2.2.4. Efecto de <i>C. onubensis</i> sobre el perfil lipídico en el suero de las ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica	139
5. 3.2.2.5. Efecto de <i>C. onubensis</i> sobre el contenido de ácidos grasos del tejido cerebral de las ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica	141
5. 4. Valoración de la microalga <i>Coccomyxa onubensis</i> como nutraceutico	149
5. 4.1. Determinación de la capacidad antioxidante de <i>Coccomyxa onubensis</i>	149
5. 4.2. Determinación de los polifenoles totales	153
5. 4.3. Determinación de polifenoles flavonoides	157
5. 4.4. Determinación de taninos hidrolizables	159
5. 4.5. Determinación de los carotenoides totales	162

6. LABOR FUTURA	167
7. CONCLUSIONES	171
8. RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS	177
8. 1. LIBROS, REVISTAS Y ARTÍCULOS CIENTÍFICOS	177
8. 2. REFERENCIAS DE FIGURAS Y TABLAS	213
8. 2.1) Referencias de figuras	213
8. 2.2) Referencias de tablas	213
8. 3. PÁGINAS WEB	215
9. RELACIÓN DE PUBLICACIONES RESULTADO DE ESTA TESIS	217

Figura 1. Género <i>Acetabularia</i>	3
Figura 2. Género <i>Fucus</i>	7
Figura 3. Buzo recolectando espagueti de mar	9
Figura 4. Fotobiorreactores utilizados en el cultivo de microalgas	10
Figura 5. Productos a base de microalgas comercializados	16
Figura 6. Localización geográfica del río Tinto	18
Figura 7. Cauce alto del río Tinto	19
Figura 8. Vista de la microalga <i>Coccomyxa onubensis</i> bajo contraste de fases	39
Figura 9. Morfología del alga <i>Coccomyxa onubensis</i>	39
Figura 10. <i>Coccomyxa onubensis</i> creciendo en una placa de Petri en medio de cultivo solidificado con agar	48

Figura 11. <i>Coccomyxa onubensis</i> creciendo en un medio de cultivo líquido	48
Figura 12. Esquema de la preparación del extracto crudo y de los extractos bioactivos	51
Figura 13. Preparación de los discos de antibiograma	53
Figura 14. Ejemplo de antibiograma en el que se puede ver el halo de lisis	54
Figura 15. Siembra por agotamiento en placas de Petri para partir de un cultivo puro de cada microorganismo	55
Figura 16. Cultivo de <i>Coccomyxa onubensis</i> en bolsa de biomasa	59
Figura 17. Biomasa de <i>Coccomyxa onubensis</i> recogida por centrifugación industrial	60
Figura 18. Biomasa de <i>Coccomyxa onubensis</i> secada y transformada en polvo de grano inferior a 100 μm	60
Figura 19. Pellets durante el proceso de secado	64
Figura 20. Rata variedad Long Evans	65

Figura 21. Halos de lisis en placas de Petri de los diferentes organismos patógenos sembrados en césped	81
Figura 22. Diámetro medio del halo de lisis por extractante aplicado a cada organismo patógeno estudiado	82
Figura 23. Estructura de la pared celular de bacterias Gram (+) y Gram (-)	85
Figura 24. Cromatografía de gases obtenida de <i>Coccomyxa onubensis</i> usando hexano como extractante	88
Figura 25. HPLC obtenida de <i>Coccomyxa onubensis</i> usando metanol como extractante.	91
Figura 26. Ganancia de peso de las ratas durante el experimento	95
Figura 27. Eficiencia de las diferentes dietas.	97
Figura 28. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina de hígado y riñón de las ratas	101
Figura 29. Valores de glóbulos rojos en las ratas para las diferentes dietas	103
Figura 30. Concentración de hemoglobina en las para tras las diferentes dietas	104

Figura 31. Valores de hematocrito (en %) en las ratas para las diferentes dietas	105
Figura 32. Valores de leucocitos en las ratas para las diferentes dietas	106
Figura 33. Valores de linfocitos en las ratas para las diferentes dietas	106
Figura 34. Valores de GOT (U/L) en las ratas para las diferentes dietas	110
Figura 35. Valores de GTP (U/L) en las ratas para las diferentes dietas	110
Figura 36. Valores de fosfatasa alcalina (U/L) en las ratas para las diferentes dietas	112
Figura 37. Valores de amilasa (U/L) en las ratas para las diferentes dietas	114
Figura 38. Valores de lipasa (U/L) en las ratas para las diferentes dietas	114
Figura 39. Valores de creatinina (mg/dL) en las ratas para las diferentes dietas	116
Figura 40. Perfil lipídico en ratas alimentadas con suplemento de biomasa de <i>C. onubensis</i>	119

Figura 41. Ganancia de peso de los diferentes grupos durante el tiempo de estudio.	122
Figura 42. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> o atorvastatina en el recuento celular de hematíes y leucocitos sobre una dieta hipercolesterolémica comparado con una dieta control	127
Figura 43. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> o atorvastatina en la fórmula leucitaria sobre la fórmula leucocitaria respecto de una dieta hipercolesterolémica y comparado con una dieta control	128
Figura 44. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> o atorvastatina sobre el hematocrito respecto de una dieta hipercolesterolémica y comparado con una dieta control	129
Figura 45. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> o atorvastatina sobre el VCM respecto de una dieta hipercolesterolémica y comparado con una dieta control	130
Figura 46. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> o atorvastatina sobre los niveles de hemoglobina respecto de una dieta hipercolesterolémica y comparado con una dieta control	130
Figura 47. Aspecto macroscópico de los hígados de las ratas alimentadas con Dieta 1 y Dieta 2	134

Figura 48. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> o atorvastatina en sobre los niveles de fosfatasa alcalina y transaminasas respecto de una dieta hipercolesterolémica en ratas en comparación con una dieta control	134
Figura 49. Visión macroscópica interna de los roedores correspondientes a la Dieta 1 (control)	135
Figura 50. Visión macroscópica interna de los roedores correspondientes a la Dieta 2 (hipercolesterolémica)	135
Figura 51. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> o atorvastatina en los niveles de creatinina respecto de una dieta hipercolesterolémica en ratas en comparación con una dieta control	136
Figura 52. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> o atorvastatina en el funcionamiento del páncreas respecto de una dieta hipercolesterolémica y comparado con una dieta control	137
Figura 53. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> o atorvastatina en los niveles de glucosa y PC-R en sangre respecto de una dieta hipercolesterolémica	139
Figura 54. Efecto de la biomasa de <i>C. onubensis</i> y atorvastatina en el perfil lipídico del plasma de las ratas	141
Figura 55. Perfil de ácidos grasos en el telencéfalo como resultado de las diferentes dietas	144

Figura 56. Perfil de ácidos grasos en el mesencéfalo como resultado de las diferentes dietas	145
Figura 57. Perfil de ácidos grasos en el cerebelo como resultado de las diferentes dietas	145
Figura 58. Perfil de ácidos grasos en la médula como resultado de las diferentes dietas	146
Figura 59. Recta de calibrado de actividad antioxidante por el método del DPPH	151
Figura 60. Recta de calibrado para la medida de polifenoles totales	155
Figura 61. Recta de calibrado para el cálculo del contenido en flavonoides totales	158
Figura 62. Recta de calibrado para el cálculo del contenido en taninos hidrolizables	161

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas microbianas: Microorganismos frente a la alimentación convencional.	11
Tabla 2. Aminoácidos esenciales: Microorganismos frente a la alimentación convencional	12
Tabla 3. Comparación de la composición bioquímica de fuentes nutricionales convencionales y algunas microalgas comestibles marinas y de agua dulce.	17
Tabla 4. Composición de un litro de medio K9	49
Tabla 5. Solventes empleados como agentes extractantes ordenados de menor a mayor polaridad	52
Tabla 6. Composición por gramo de las diferentes dietas usadas	63
Tabla 7. Relación de la microalga en polvo en la dieta de las ratas y su equivalencia en humanos	64
Tabla 8. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Coccomyxa onubensis</i>	86
Tabla 9. Actividad antibacteriana de diferentes microalgas	89

Tabla 10. Composición química de la biomasa seca de <i>C. onubensis</i>	87
Tabla 11. Parámetros zoométricos de las ratas control y las ratas alimentadas con <i>Coccomyxa. onubensis</i>	98
Tabla 12. Parámetros hematológicos de las ratas alimentadas con dieta control o con dietas suplementadas con <i>C. onubensis</i>	107
Tabla 13. Parámetros bioquímicos de las ratas alimentadas con dieta control o con dietas suplementadas con <i>C. onubensis</i>	108
Tabla 14. Diferentes lipoproteínas presentes en el plasma sanguíneo de las ratas	117
Tabla 15. Parámetros zoométricos para las ratas alimentadas con las diferentes dietas	125
Tabla 16. Parámetros hematológicos de las ratas alimentadas con las diferentes dietas	126
Tabla 17. Parámetros bioquímicos de las ratas alimentadas con las diferentes dietas	132
Tabla 18. Perfil de ácidos grasos en diferentes fracciones del encéfalo como resultado de las diferentes dietas	143

Tabla 19. Valores de absorbancia para la recta de calibrado y 4 mg de peso fresco de la microalga	152
Tabla 20. Valores de DPPH para diferentes frutas	153
Tabla 21. Comparación de valores de polifenoles totales para diferentes frutas y <i>Coccomyxa onubensis</i>	156
Tabla 22. Comparación de valores de polifenoles totales para diferentes hortalizas y <i>Coccomyxa onubensis</i>	156
Tabla 23. Contenido en flavonoides en diferentes alimentos	159
Tabla 24. Contenido en carotenoides en diferentes alimentos consumidos en España	163

ABREVIATURAS

- ATP – Adenosín trifosfato
- BSR – Bacterias sulfato reductorias
- DHA – Ácido docohexaenoico
- EPA – Ácido eicosapentaenoico
- ERO – Especie reactiva del oxígeno
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- FAME – Ésteres metílicos de ácidos grasos
- FPI – Franja Pirítica Ibérica
- HDL – High density lipids
- ICD – Inflamación celular degenerativa
- LDL – Low density lipoproteins
- MOD – Materia orgánica disuelta
- MOP – Materia orgánica particulada
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- PSII – FOTOSISTEMA II
- UFC – Unidad formadora de colonia
- VLDL – Very low density lipids
- VCM – Volumen corpuscular medio

Las microalgas se consideran unas interesantes fuentes naturales de moléculas de alto valor añadido, muchas de las cuales presentan actividad biológica con aplicaciones en salud humana, actuando, por ejemplo, como antiinflamatorios, antitumorales y antibióticos. En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la capacidad antimicrobiana de algunos extractos obtenidos a partir de la microalga *Coccomyxa onubensis* (*C. onubensis*), un microorganismo extremófilo aislado de drenajes ácidos procedentes de la zona minera del río Tinto (Huelva, España). También, hemos estudiado la composición de la biomasa de esta microalga, encontrándose que es rica en proteínas, lípidos, hidratos de carbono, antioxidantes y vitaminas, por lo que se ha sugerido su utilización como alimento para animales.

Nuestros resultados muestran por primera vez que una microalga acidófila es capaz de producir compuestos con actividad antibacteriana y que la biosíntesis de este tipo de compuestos se puede llevar a cabo en condiciones de pH muy bajo y en un entorno altamente oxidativo, bajo las cuales, la vida apenas es posible.

En cuanto a su aplicación, como suplemento nutricional, todos los resultados obtenidos apoyan la idea de que la biomasa de *C. onubensis* puede ser un suplemento seguro en la dieta y que presenta las propiedades nutricionales adecuadas de los alimentos funcionales, destacando su contenido en compuestos antioxidantes como polifenoles, flavonoides, taninos y carotenoides, y en ácidos grasos poliinsaturados. En este sentido, hemos podido comprobar experimentalmente en ratas Long Evans, que la adición de *C. onubensis* en polvo (al 6.25% en peso) a una dieta alta en grasas, tiene un efecto protector del riesgo cardiovascular. Por lo tanto, la biomasa de *C. onubensis* puede ser apta tanto directamente, como alimento funcional para animales, o como fuente natural de compuestos nutraceuticos y farmacológicos.

Microalgae are considered interesting natural sources of high value added molecules, many of which exhibit biological activity with applications in human health, working for instance as anti-inflammatory, anti-tumoral and antibiotic. In this Doctoral Thesis, the antimicrobial capacity of some extracts obtained from the microalgae *Coccomyxa onubensis* (*C. onubensis*), an extremophilic microorganism isolated on the basis of acid drains of the Rio Tinto's mining area (Huelva, Spain) have been evaluated. Likewise, the biomass of this microalgae has also been studied by our research group, being found to be rich in proteins, lipids, carbohydrates, antioxidants and vitamins, so it has been suggested the possibility of its use as food for animals.

Our obtained results show for the first time that an acidophilic microalga is able to produce compounds with antibacterial activity and that the biosynthesis of such compounds can be carried out under very low pH conditions and in a highly oxidative environment, under which, the life is barely possible.

Regarding its application, as a nutritional supplement, all the results obtained support the idea that the biomass of *C. onubensis* can be a safe supplement in the diet and that it has the adequate nutritional properties of functional foods, highlighting its content in antioxidants compounds such as polyphenols, flavonoids, tannins and carotenoids, and in polyunsaturated fatty acids. In this sense, we have been able to experimentally verify in Long Evans rats, that the addition of *C. onubensis* powder (6.25% by weight) to a high-fat diet has a protective effect on cardiovascular risk. Therefore, *C. onubensis* biomass may be suitable both directly, as a functional feed for animals, or as a natural source of nutraceutical and pharmacological compounds.

1. INTRODUCCIÓN



Universidad
de Huelva

1. INTRODUCCIÓN

Las algas

1.1. Descripción, clasificación y generalidades de las algas

Denominamos alga (Algae L. 1751) a un organismo con capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica y obtener el carbono orgánico con la energía de la luz solar, diferente de una embriofita o planta terrestre. Esta definición es tan ambigua debido a que las algas no son un grupo taxonómico (un taxón), es decir, no son un grupo monofilético, ya que el término "algas" no existe en Taxonomía, sino que se interpretan en la actualidad como un conjunto muy diverso de organismos caracterizados por su nivel de organización protofítico o talofítico y la presencia de clorofila (al menos clorofila a) y otros pigmentos fotosintéticos que les proporcionan un mayor o menor grado de autotrofia respecto al carbono. Por tanto, las algas representan más bien un grupo funcional ecológico.

Desde el punto de vista biológico se pueden definir como organismos eucariotas, protistas, generalmente acuáticos y fotosintéticos, con plastos provistos de clorofila a y otros pigmentos auxiliares, que se reproducen mediante esporas y gametos producidos en esporocistos y gametocistos generalmente sencillos. No obstante, cabe aclarar que algunas algas también pueden sobrevivir en medios terrestres, soportando en fase de latencia largos periodos de sequedad, y otras son capaces de sobrevivir de forma heterótrofa en presencia de una fuente adecuada de carbono, manteniendo o perdiendo completamente los plastos (ej. Euglena); hay grupos de protistas que incluyen tanto géneros provistos de plastos, como otros géneros casi idénticos pero sin ellos, por lo que aparecen indistintamente en clasificaciones botánicas y zoológicas.

1. Introducción

En consecuencia, las algas pueden habitar ambientes acuáticos (planctónicas, suspendidas en la columna de agua, o bentónicas, asociadas a un sustrato), aunque también es posible encontrarlas, aunque con menos frecuencia, en el aire, en el suelo o en los hielos, por lo que su distribución es cosmopolita. El hecho de que las algas compartan el ambiente acuático explica la convergencia evolutiva de los diferentes grupos, ya que se encuentran sujetas a las mismas presiones de selección.

Las Carales y las Fucales presentan gametangios de estructura compleja (carácter típico de las plantas terrestres), pero la estructura de sus talos es propia de las algas y no de las plantas terrestres. Las Cianofitas, aunque son algas desde el punto de vista ecológico, no se incluyen entre las algas como grupo sistemático artificial, ya que sus diferencias ultraestructurales, bioquímicas y genéticas con las algas son importantes.

Se conocen entre 22.500 y 33.000 especies agrupadas en 12 a 15 clases (o divisiones según diferentes autores), que forman varias líneas filogenéticas, la mayoría de ellas más directamente relacionadas con otros protistas o con los hongos que con las plantas propiamente dichas. Entre ellas pueden presentarse desde formas unicelulares hasta formas pluricelulares de organización parenquimatosa.

La más pequeña se encuentra entre las algas eucariotas: *Micromonas pusilla* (Clorofita) que mide 1 x 1,5 micras (dentro del rango de tamaño de las bacterias) y la más grande: *Macrocystis pyrifera* (Feofita) mide unos 60 m, 40 millones de veces más grande.

Llama la atención el caso particular del género *Acetabularia*, formado por algas verdes unicelulares gigantes (de 0,5 a 10 cm de largo), marinas, con una forma característica de paraguas (Figura 1),

que resultaron de gran ayuda en el S.XIX para estudiar el núcleo celular.

Algunas especies marinas son invasoras y están causando graves daños en el medio natural y también en acuicultura, como *Asparagopsis armata* (alga roja) en todo el litoral peninsular y *A. taxiformis* en el Mediterráneo. *Caulerpa taxifolia* y *C. racemosa* (algas verdes) en el Mediterráneo y *Rugulopteryx okamurae* (alga parda), muy agresiva en la zona del estrecho de Gibraltar desde 2006.

Se han encontrado fósiles de presuntas algas eucariotas unicelulares de hace 1.500 millones de años, y de algas macroscópicas marinas de hace 600 millones de años.

Las algas producen aproximadamente 2/3 de la materia orgánica de la Biosfera (de 70 a 150x 10⁹ TM). (Romero-Zarco, 2018; Adl et al, 2005)

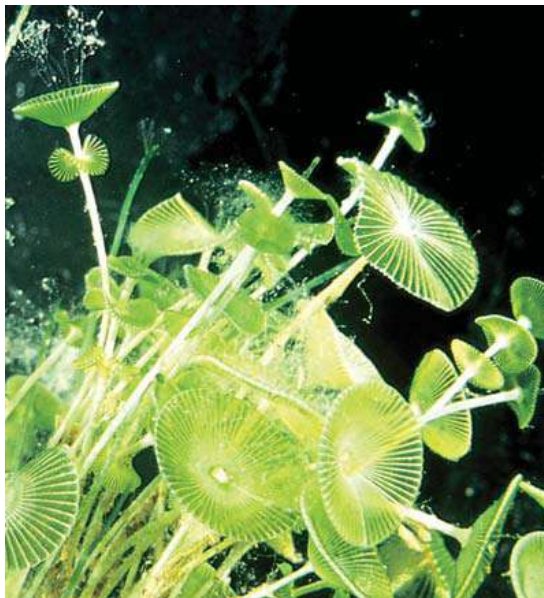


Figura 1. Género *Acetabularia* (traducción literal de su nombre, “copa de vinagre”) consta de una sola célula, por lo que ha sido un organismo modelo para investigar la función del núcleo. La *Acetabularia* es pequeña para ser un alga pero gigantesca para ser una célula. Consiste en un anillo de fijación o rizoide, un largo tallo cilíndrico y una umbela en forma de copa. (Solomon, 2013)

1. Introducción

1.2. Relevancia biológica de las algas

La aparición del oxígeno libre en la atmósfera terrestre se debió a las cianobacterias (antiguamente conocidas como algas verdeazuladas), lo que alteró profundamente el curso de la evolución al facilitar el desarrollo de la respiración aeróbica y la vida multicelular compleja. Hasta ese momento ya existían otros organismos con la capacidad de realizar la fotosíntesis, es decir, de producir materia orgánica mediante el uso de la luz solar, pero solo las cianobacterias poseían la maquinaria específica que permitía generar oxígeno, lo que se conoce como fotosíntesis oxigénica, y que surgió hace 3.200 millones de años, existiendo evidencia fósil (estromatolitos) de la presencia de cianobacterias productoras de oxígeno a tasas comparables a las actuales desde hace, al menos, 2.700 millones de años.

Su diversificación, especialmente a nivel citológico, está estrechamente relacionada con el origen y evolución de la célula eucariota, es decir, con los procesos mediante los cuales las células primitivas (sencillas y sin orgánulos) se transformaron en células complejas dotadas de núcleo, mitocondrias, cloroplastos, etc. Las propuestas que mejor explican el origen de las células eucariotas (y de las algas eucariotas) se basan en la Teoría de la Endosimbiosis Seriada, desarrollada formalmente por Lynn Margulis en los años 70 (Margulis et al., 1979).

La endosimbiosis ha sido una fuerza determinante y recurrente en el origen de varios grupos de algas. La ultraestructura de los plastos (p. ej. las membranas) y la combinación de pigmentos que presentan indican que no todos los grupos de algas se originaron a partir de los mismos precursores ni en el mismo momento, pero sí se consideran el origen de la vida vegetal de la Tierra.

Para construir la Sistemática de las algas, como la del resto de los eucariotas, se emplean criterios citológicos, morfológicos, anatómicos, reproductivos, ecológicos y moleculares. Éste último aspecto ha alcanzado un gran desarrollo en las últimas décadas, ya que la comparación y análisis de secuencias de ADN permite construir árboles filogenéticos que reflejen las relaciones de parentesco entre los grupos, es decir, permite definir grupos monofiléticos sobre los que se puede trazar la evolución de los caracteres morfológicos y estructurales.

Las clasificaciones más recientes dividen los eucariotas en cinco grandes supergrupos o linajes. Como ya se ha indicado, las algas concuerdan en sus caracteres morfológicos y anatómicos por estar básicamente adaptadas al mismo medio (acuático) pero son grupos filogenéticamente heterogéneos (Falkowski et al., 2004).

Además de su papel como responsables de la aparición de una atmósfera oxigénica en la Tierra, de ser en la actualidad la principal fuente de producción de oxígeno del planeta, realizando cerca del 50% de la fotosíntesis global, de capturar alrededor el 40 % del dióxido de carbono emitido por los humanos y de fomentar el control del efecto invernadero y la lluvia ácida. (Field et al., 1998; Wang et al., 2008; Kumar et al., 2010; Zeng et al., 2011) también desempeñan un importante papel como organismos autótrofos y tienen un enorme impacto en la cadena trófica, ya que son los responsables principales de la captación de la energía lumínica en los ecosistemas acuáticos y de la productividad primaria que genera la materia orgánica disponible para los consumidores.

1. Introducción

1.3. Algas y microalgas

Dependiendo de si su tamaño es mayor o menor de 200 micras, las algas pueden clasificarse en macroalgas o microalgas respectivamente. Es una clasificación muy artificial, ya que salvo su tamaño, nada más agrupa a los integrantes de este género, salvo ser fotosintéticos y eucariotas, quedando, por lo tanto, las cianobacterias fuera de la clasificación de las microalgas, que dejaron de considerarse auténticas algas al ser clasificadas dentro del reino procariota.

Las macroalgas poseen un alto valor en los ecosistemas litorales mundiales. Este valor no se basa solamente en sus funciones medioambientales de aseguramiento de estos ecosistemas marinos, sino que representa a su vez una fuente de riqueza natural para las poblaciones rurales pesqueras y, en general, para toda la industria transformadora de productos derivados de este amplio grupo de especies, como agares, alginatos, carrageninas, dietética, productos farmacológicos o para alimentación (Figura 2).

El desarrollo de la explotación de las macroalgas a nivel mundial está creciendo en los últimos años a un ritmo muy elevado, de más del 20% anual, y numerosos países están potenciando su explotación y cultivo. En España existe una larga tradición de explotación de este recurso natural. Explotación que, al igual que en el resto de países europeos, está aumentando progresivamente.



Figura 2. Las especies de *Fucus* son muy utilizadas con fines biotecnológicos como materias primas para la obtención de sustancias antioxidantes y en tratamientos anti-obesidad. (Cremades et al., 2016).

Las microalgas (grupo formado por más de 40.000 especies) se caracterizan fundamentalmente por ser altamente eficientes en la fijación de CO₂ y utilizar la energía solar para producir biomasa, incluso mejor que las plantas, lo que las convierte en unas pequeñas biofactorías de gran interés como productor primario de recursos naturales para el hombre.

1. 4. Empleo de las algas como fuente de recursos para el hombre

La primera documentación del cultivo intencionado de un alga se remonta a 1640 en Japón. Se trata del alga “Nori”, término japonés usado para referirse a variedades comestibles de alga marina de las diversas especies de alga roja *Porphyra*, con la que generalmente se enrolla el sushi. Aproximadamente en el mismo periodo, se inició la recolección de diversas especies de *Gracilaria* para obtener un

1. Introducción

producto similar al agar (Pulz y Gross, 2004). En el mundo occidental, el aprovechamiento industrial de las algas y microalgas se inició en el siglo XVIII para extraer de ellas sosa, yodo y otros compuestos químicos. En este momento comenzaron los intentos para poder cultivar las algas pardas *Laminaria*, *Macrocystis* y *Fucus* en áreas específicas destinadas a dicho fin.

A partir de 1940, como consecuencia de la II Guerra Mundial, la utilización de las microalgas como alimento vivo en acuicultura comenzó a adquirir cada vez más importancia. Los científicos alemanes comenzaron a cultivar microalgas de forma masiva con el objeto de obtener lípidos y proteínas. En estos años, el estudio de las algas y su uso comercial se desarrolló de forma muy rápida, comenzando en Alemania y extendiéndose luego a los Estados Unidos, Israel, Japón e Italia, con el fin de utilizar la biomasa de algas para producir proteínas y grasas para la nutrición humana (Figura 3) (Forján et al., 2014). A partir de estas fechas comienza a reconocerse a la biomasa de algas como un suplemento alimentario de gran calidad que podría utilizarse en la nutrición humana, dados los datos estadísticos que reflejaban el aumento de la población mundial y las predicciones realizadas por expertos sobre el insuficiente suplemento de proteínas en el futuro (Spolaore et al., 2006). Posteriormente comenzaron a realizarse estudios basados en la utilización de microalgas para otros fines, como en el tratamiento de aguas residuales y en su examen sistemático para la obtención de sustancias biológicamente activas (Borowitzka, 1995).



Figura 3. Buzo de la empresa gallega “Porto-Muiños” recolectando espagueti de mar (*Himantalia elongata*). (revistaalimentaria.es)

Hay tres razones principales que explican el gran interés de las microalgas como ingrediente alimentario y como pequeñas fábricas productoras de moléculas de alto valor añadido. En primer lugar, las microalgas son organismos autótrofos, de manera que sólo se requiere para su crecimiento una fuente natural de dióxido de carbono (CO_2), la luz solar como fuente de energía y pequeñas cantidades de N, P, S y otros micronutrientes. En segundo lugar, debido a su menor complejidad biológica, estructural y metabólica, las microalgas tienen una mayor tasa de crecimiento con respecto a las plantas. Por último, es posible controlar la producción y acumulación de compuestos bioactivos en las microalgas a través de la manipulación de las condiciones de cultivo (Plaza et al., 2009). Estas razones, junto con la enorme diversidad de este grupo biológico y el extraordinario desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, han motivado el gran interés de la comunidad científica por la biotecnología microalgal y su aplicación en sectores médicos y farmacéuticos (Figura 4) (Spolaore et al., 2006; Pulz y Gross, 2004).

1. Introducción

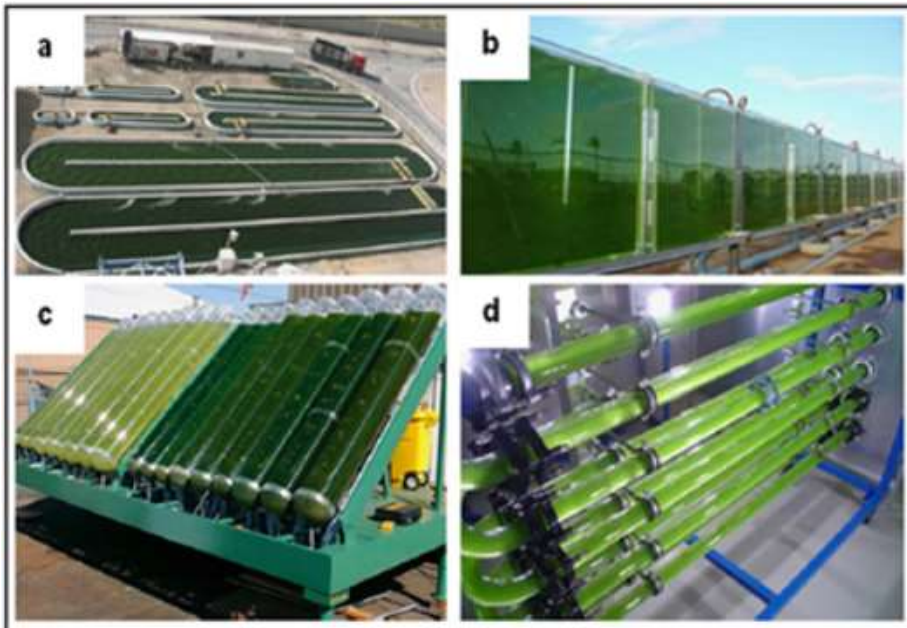


Figura 4. Fotobiorreactores utilizados en el cultivo de microalgas: (a) estanque abierto, (b) placa delgada, (c) tubular inclinado y (d) continuo horizontal (Bitog et al., 2009)

No es sorprendente que la mayoría de los complementos alimenticios, terapéuticos y derivados de productos naturales se obtengan principalmente de organismos terrestres (plantas, animales y microorganismos) a pesar de que las aguas superficiales contienen, con diferencia, la mayor biodiversidad del planeta. La gran mayoría de los organismos que viven en los mares, océanos y entornos acuáticos terrestres todavía permanecen inexplorados. El estudio de algunos de estos microorganismos con fines farmacéuticos ha demostrado que son fuente de precursores químicos, de nuevos reactivos y de compuestos bioactivos con aplicación médica (Blom y Pernthaler, 2009)

Por su composición química, las microalgas son capaces de mejorar, desde el punto de vista nutricional, numerosos preparados alimenticios y ejercer efectos beneficiosos sobre la salud de hombres y animales. El alto contenido en proteína de determinadas especies de microalgas es una de las principales razones para considerarlas como

una fuente proteica no convencional. La tabla 1 muestra una comparación en la composición general de diversos alimentos humanos con diferentes microalgas, pudiéndose equiparar nutricionalmente a la carne, pescado y huevos.

Tabla 1. Proteínas microbianas: Microorganismos frente a la alimentación convencional.

Organismo/ Alimento	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Ácidos Nucleicos
Bacterias	47-86	2-36	1-39	1-36
Cianobacterias	36-65	8-20	2-13	3-8
Algas verdes	46-60	2-7	1-76	3-6
Hongos	13-61	25-69	1-30	5-13
Huevo	49	3	45	-
Carne	57	2	37	1
Pescado	55	-	37	-
Leche	27	38	30	-
Maíz	10	85	4	-
Trigo	14	84	2	-
Soja	47	41	7	-
Espinaca	12	5	0,3	0,6

Los valores se corresponden con el% de peso seco. (Vega et al., 1983)

Las microalgas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos, por lo que pueden proveer de aquellos que resultan esenciales a humanos y animales (Guil-Guerrero et al., 2004). Los carbohidratos de microalgas pueden encontrarse en forma de almidón, glucosa, azúcares y otros polisacáridos y, por su alta digestibilidad, no presentan inconvenientes para que la biomasa forme parte de comidas y alimentos (Becker, 2004). Respecto a los lípidos, la

1. Introducción

cantidad puede variar entre el 1 y el 70%, aunque en algunas especies puede llegar al 90% de peso seco bajo ciertas condiciones (Metting, 1996) y contener altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados ω_3 (omega 3) y ω_6 (omega 6), cuya cantidad y proporción relativa se determina por factores nutricionales y medioambientales, entre los que se encuentra la limitación de nitrógeno (Borowitzka, 1988; Tzovenis et al., 2003)

En cuanto a la calidad de las proteínas que contienen, las microalgas presentan una calidad parecida, incluso superior, a los alimentos convencionales, como puede observarse en la tabla 2, que muestra una comparativa entre el contenido en aminoácidos esenciales de diversos microorganismos y el de algunos alimentos convencionales.

Tabla 2. Aminoácidos esenciales: Microorganismos frente a la alimentación convencional

Organismo/Alimento	Lys	Thr	Met/Cys	Trp	Ile	Leu	Val	Phe
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7,7	4,8	1,7	1,0	4,6	7,0	5,3	4,1
<i>Candida lipolitica</i>	7,8	5,4	2,5	1,3	5,3	7,8	5,8	4,8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	5,7	5,1	2,3	1,5	3,8	8,4	5,7	5,1
<i>Spirulina maxima</i>	4,6	4,6	1,8	1,4	6,0	8,0	6,5	5,0
Bacterias fotosintéticas	5,8	2,9-4,4	3,0	-	4,2	7,4-7,9	6,5-7,0	4,3-4,6
Huevo	6,4	5,0	5,5	1,6	6,6	8,8	7,4	5,8
Trigo	2,8	2,9	4,0	1,1	3,3	6,7	4,4	4,5
Soja	6,3	3,9	1,3	1,4	5,4	7,7	5,2	4,3

Los valores se corresponden con el% del total de aminoácidos (Vega et al., 1983)

Las microalgas también representan una fuente variada de vitaminas, como A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico (Becker, 2004), aunque la concentración en la que se encuentran presenta variaciones en función de los factores medioambientales, los tratamientos de recolección y el método de

secado de las células. Por otro lado, las microalgas también son ricas en pigmentos clorofílicos (del 0,5% al 1% en peso seco), en carotenoides y en ficobiliproteínas (Spolaore et al., 2006; Pulz y Gross, 2004).

1. 5. Microalgas como fuente de nutraceuticos

Tener una alimentación adecuada es una preocupación cada día más extendida en todos los países europeos (Torres y Francés, 2007). La salud humana está relacionada directamente con el estilo de vida, en el que una dieta equilibrada juega un papel fundamental. Los consumidores están cambiando sus expectativas sobre los alimentos, por lo que la salud y la seguridad son cada vez más importantes en la elección de los alimentos (Layman, 2014). Así comienzan a emerger los alimentos funcionales, constituyendo por tanto, la respuesta a mejorar la salud y reducir el riesgo a contraer enfermedades.

Para este propósito, el alimento suele enriquecerse en componentes biológicamente activos, como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra dietética, antioxidantes, etc., que mejoran las funciones gastrointestinales, la ingesta de antioxidantes y el metabolismo de los macronutrientes o micronutrientes (Gómez-Ariza et al., 2010). Entre dichos componentes se encuentran los llamados nutraceuticos, que se pueden definir como un suplemento dietético, presentado en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), de una sustancia natural bioactiva concentrada, presente usualmente en los alimentos y que, tomada en dosis superior a la existente en dichos alimentos, tendría un efecto favorable sobre la salud, mayor que el que podría tener el alimento normal por sí solo. Por tanto, se diferencian claramente de los medicamentos, ya que estos suelen ser productos de síntesis y no tienen, en su mayoría, un origen biológico natural. Por otra parte, los nutraceuticos son componentes de los alimentos o partes del mismo que no sólo pueden

1. Introducción

curar sino también prevenir ciertas enfermedades, aportando un beneficio añadido para la salud, por ejemplo un beneficio médico, inclusive para la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades (Sloan, 2000).

Un nutraceutico se puede administrar como tal en forma concentrada o ser adicionado a un alimento natural para incrementar en él las propiedades funcionales (Gómez-Ariza et al., 2010). Así, el término nutraceutico se aplica a productos que van desde nutrientes aislados, suplementos dietéticos y extractos de plantas o microalgas, hasta dietas específicas y alimentos procesados como cereales, sopas y preparados bebibles.

Entre todas las propiedades de los nuevos alimentos y alimentos funcionales, ha aumentado dramáticamente el interés general por los antioxidantes en el uso de la alimentación. Por un lado, sirven para evitar la generación de los productos de la oxidación lipídica en los alimentos, que pueden tener serios efectos citotóxicos para los consumidores y, por otro lado, también parecen jugar un papel importante en relación con la salud (Urala y Lähteenmäki, 2007) y, en particular, para frenar el envejecimiento celular. Oxidantes producidos por los productos del metabolismo normal y por los agentes exógenos al organismo, causan daños extensos en el ADN, las proteínas y los lípidos. Este daño (el mismo que el producido por la radiación no ionizante) contribuye de manera importante al envejecimiento y a las enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, el deterioro del sistema inmunológico, disfunción cerebral y cataratas (Ames et al., 1993; Devasagayam et al., 2004). Se sabe que en los procesos metabólicos que tienen lugar en el cuerpo humano, se producen continuamente de forma natural especies oxidantes que constituirían una seria amenaza para la salud de no ser por las defensas naturales contra ellas que existen a nivel celular. Estas

defensas, que se basan en sistemas enzimáticos (catalasas, peroxidasas, superóxidodismutasa principalmente), minimizan los efectos tóxicos de los radicales libres pero van perdiendo efectividad con la edad de las personas, de ahí la necesidad (a partir de cierta edad) de recibir un suplemento dietético con las propiedades descritas, por lo que el consumo de niveles adecuados de antioxidantes desde la edad adulta podría ser útil para lograr un envejecimiento saludable, especialmente en casos de envejecimiento prematuro (Alvarado et al., 2006).

Se han propuesto diversos alimentos de nueva generación de carácter nutracéutico, que ayudan a reducir el riesgo de afecciones cardíacas (huevos enriquecidos con ácidos grasos esenciales ω_3 y margarinas con fitoesteroles) y los episodios de espina bífida (cereales con ácido fólico) o facilitar la digestión (leche y yogures fermentados con cultivos prebióticos). Pero el mayor esfuerzo se ha hecho, quizás, en la preparación de alimentos de origen vegetal, como son las microalgas, que reduzcan la probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas, en particular el cáncer, por la presencia de compuestos biológicamente activos (fitoquímicos) (Plaza et al., 2009).

Microalgas como *Chlorella* spp., *Dunaliella* spp., *Scenedesmus* spp., *Nannochloropsis* spp., *Tetraselmis* spp., *Spirulina* spp. y *Aphanizomenon flos-aquae* se han utilizado como alimentos ricos en nutrientes y fuentes de nutrientes para alimentos funcionales (Gantar y Svircev, 2008; Bishop y Zubeck, 2012; Yaakob et al., 2014). El uso de microalgas para la alimentación animal y la acuicultura resulta de particular interés (Vaquero et al., 2014). Si bien se han obtenido microalgas comestibles de especies marinas o mesófilas de agua dulce (Figura 5), hasta el momento no se ha intentado introducir la producción a gran escala de microalgas extremófilas para usarlas como fuente de alimentos, probablemente debido a las bajas tasas de crecimiento y a la baja productividad de la biomasa. Sin embargo,

1. Introducción

estudios recientes han demostrado que la microalga acidófila *Coccomyxa onubensis* aislada del río Tinto por el equipo de investigación del Dr. Carlos Vilchez de la Universidad de Huelva puede cultivarse fototróficamente a pH 2.5 en medio mineral mínimo, alcanzando así una tasa de crecimiento moderada (Buono et al., 2014).



Figura 5. Algunos productos a base de microalgas que se comercializan en la actualidad como suplemento alimentario. Cápsulas de *Chlorella* spp. (su principal productor a nivel mundial es China y se le atribuyen las propiedades de eliminar toxinas y metales pesados), *Dunaliella salina* (con alto contenido en betacaroteno y Vitamina A) y *Spirulina* spp. (posee un coctel de vitaminas y minerales, principalmente vitamina A, E, D, B1, B2, B3, B6, B12, hierro, zinc, ácido fólico y ácidos esenciales). Además, es una buena fuente de proteína (70%) y de clorofila. Foto: Francisco Navarro.

Por otro lado, existen posibles inconvenientes asociados con el uso de la biomasa completa de microalgas como fuente directa de alimento para las personas y los animales, debido principalmente a su alto contenido de ácidos nucleicos (Tabla 3) y a su posible contaminación por metales o contaminantes ambientales presentes de forma habitual en el medio ambiente, lo que suscita preocupaciones con respecto a la posible toxicidad y los efectos a largo plazo en la salud humana (Bishop y Zubeck, 2012). Sin embargo, este inconveniente desaparece tomando de la biomasa sólo sus

componentes de valor, de forma que el uso futuro de esta biomasa de microalgas en la industria alimentaria será empleado como fuente de nutraceuticos para alimentos funcionales, en lugar del consumo directo de dicha biomasa.

Si comparamos la composición bioquímica de las microalgas con los alimentos tradicionales sería posible que pudieran aumentar el contenido nutricional de estos alimentos e incluso afectar positivamente a la salud humana y animal. Esto se debe a su particular composición nutricional. La Tabla 3 presenta una comparación entre la composición general de las fuentes de nutrientes para los humanos y varias especies de microalgas comestibles (Borowitzka, 1995).

Tabla 3. Comparación de la composición bioquímica de fuentes nutricionales convencionales y algunas microalgas comestibles marinas y de agua dulce.

Alimentos / Especies	Composición bioquímica		
	Proteínas (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos (%)
Levadura de panadería	39	1	38
Carne	43	34	1
Leche	26	28	38
Arroz	8	2	77
Soja	37	20	30
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	15	27
<i>Dunaliella salina</i>	39-61	14-20	14-18
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	4-9	8-14
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	9-14	40-57

Pulz y Gross, 2014

En este río no hay peces ni anfibios pero, sin embargo, en sus aguas viven pequeños microorganismos que se han sabido adaptar a ese ambiente extremo y que en su conjunto se les denomina “organismos extremófilos”. Expertos de la NASA han comprobado que este río contiene centenares de miles de bacterias, hongos, algas y protozoos que logran desarrollarse en un ambiente hostil desde hace 500.000 años (Amils et al., 2014).

Estas condiciones tan extremas han sido provocadas por la actividad de unas bacterias capaces de obtener energía a partir del sustrato de pirita que abunda en el subsuelo de dicho río. A estas bacterias se les denomina genéricamente quimiolitotrofos (capaces de crecer en medios estrictamente minerales y en ausencia de luz, que obtienen la energía por oxidación de compuestos inorgánicos químicamente reducidos) y concretamente lo que hacen para vivir es oxidar dicho mineral de pirita, constituido por sulfuro de hierro, generando, entre otros elementos, ácido sulfúrico y óxido férrico, que aportan al río Tinto sus propiedades de color y acidez tan características (González-Toril et al., 2004)



Figura 7. Cauce alto del río Tinto. Fotografía: Francisco Navarro

1. Introducción

Junto a las bacterias (organismos procariotas) también tienen una relevancia importante las microalgas (organismos eucariotas), que representan aproximadamente un 60% de la biomasa del río (Forján et al., 2014). Entre ellas cabe destacar las diatomeas, euglenofitas, clorofitas unicelulares y algas rojas unicelulares (Amaral-Zettler et al., 2002). A lo largo de esos miles de años estos microorganismos extremófilos han desarrollado mecanismos biológicos de adaptación para hacer frente a las altas concentraciones de metales disueltos en el agua y proteger su metabolismo y estructuras celulares, y han sido estos mecanismos los que han dado lugar a la síntesis de multitud de biomoléculas de interés comercial.

La primera referencia escrita del empleo de microalgas para la alimentación humana data de hace más de 2000 años en China, cuyos pobladores usaron *Nostoc* para sobrevivir durante periodos de hambruna (Spolaore et al., 2006). Además de *Nostoc*, otras especies comestibles, como las cianobacterias *Spirulina* y *Aphanizomenon*, se usaron como alimento durante muchos siglos en Asia, África y México (Jensen, 2001; Olaizola, 2003). En 1521, Bernal Díaz del Castillo, expedicionario español que participó en la conquista de México, describe la preparación de un légamo de *Spirulina*, que los indios nativos ingerían en su dieta.

1. 7. Usos actuales de las microalgas

1. 7.1. Medioambiental

La rehabilitación de espacios naturales contaminados gracias a la acción de organismos, en este caso microscópicos, es conocida como biorremediación.

Las microalgas pueden ser usadas en la biorremediación de metales pesados en medios con altas concentraciones de cobre o zinc o en medios con presencia de metales que producen efectos tóxicos

en la célula, como el mercurio, el cadmio o el plomo (Rai et al., 2004), de ahí la importancia de poder eliminarlos del medio ambiente.

Existen estudios en este campo que se han centrado en evaluar el potencial de las microalgas para la eliminación de nitrógeno y fósforo, y en algunos casos, de metales (Pittman et al., 2011), sobre todo en aguas residuales, principalmente en las aguas residuales urbanas y de ganadería.

La utilidad de las microalgas para este uso se debe a que no requieren de un aporte de carbono para fijar el nitrógeno y el fósforo y que el resultado son aguas abundantes en oxígeno (Becker, 2004)

La forma más común de tratar las aguas residuales con microalgas es a través de las lagunas de oxidación. Son estanques de menos de medio metro de profundidad donde se vierten las aguas que necesitan ser tratadas y a las que se somete a una importante aireación para facilitar su crecimiento. Conjuntamente con las microalgas participan bacterias, las cuales tienen el papel de descomponedoras de la materia orgánica presente en el agua, proporcionando a las microalgas la fuente de carbono, nitrógeno y fósforo que necesitan para crecer. (García et al., 2000; Abeliovich, 2004)

Como ejemplos de especies de microalgas usadas en biorremediación encontramos que *Scenedesmus acutus*, *Chlamydomonas ulvaensis* y *Chlorella pyrenoidosa* tienen capacidad para degradar que provienen del petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Semple et al., 1999).

1. 7.2. Fuente de biocombustible

Podríamos definir los biocombustibles como combustibles líquidos que han sido producidos partiendo de materia orgánica cosechada. Entre ellos se encontrarían el biodiesel, bioetanol, hidrógeno, hidrocarburos de cadena larga y biogás (Scott et al., 2010).

1. Introducción

El biodiesel proviene de grasas vegetales, especialmente de soja y palma, grasas animales y aceite usado de cocina (Spolaore et al., 2006), mientras que el bioetanol se obtiene de materia rica en hidratos de carbono, como la caña de azúcar o el almidón de cereales.

El problema, entre otros, de la producción de biocombustibles que provienen de especies vegetales es el uso de grandes superficies de terreno para su cultivo, que agrava la deforestación mundial y la pérdida de biodiversidad, mientras que las microalgas presentan ventajas para ser empleadas como productoras al requerir mucho menos espacio para una misma producción, ya que presentan una mayor productividad frente al resto de especies vegetales y, además, son independientes de las condiciones ambientales estacionales, necesitan menos cantidad de agua, no precisan herbicidas o pesticidas (Rodolfi et al., 2009), no ocupan terreno aprovechable para cultivo destinado a la alimentación, los nutrientes requeridos pueden ser aportados por aguas residuales (como se ha descrito anteriormente) y producen adicionalmente compuestos de alto valor comercial.

1. 7.3. Alimentación animal y acuicultura

Las microalgas sin procesar han sido también utilizadas como aditivo para piensos en la cría comercial de muchos animales acuáticos, por ejemplo la cría de larvas y juveniles de moluscos de importancia comercial, las larvas de langostinos peneidos, crustáceos y peces tanto de agua dulce como marina (Mata et al., 2010). Los principales grupos de consumidores de microalgas son los moluscos filtradores, como almejas y ostras, el zooplancton que forma parte de algunas de las cadenas alimentarias en la acuicultura (Borowitzka, 1996; Abalde et al., 1995) y larvas, juveniles tempranos de abalones, camarones peneideos y de peces que poseen un tracto digestivo inmaduro al momento de eclosionar (Stottrup y Mcevoy, 2003).

En muchos casos, es el contenido y la proporción de los ácidos grasos poliinsaturados aportados por las microalgas lo que las hace tan importantes para el crecimiento y desarrollo de alevines de pescados, crustáceos y moluscos (Sukenik et al., 1993). Como ventaja adicional, esto supone el enriquecimiento de los pescados producidos en acuicultura en ácidos grasos ω 3, añadiendo valor nutricional al producto final.

En ciertos casos de larvas de peces y crustáceos, las microalgas podrían ser totalmente reemplazadas por alimentos microencapsulados u otros, pero a diferencia de estos animales, los moluscos filtradores dependen sólo de microalgas, por lo que su desarrollo está muy afectado por la calidad de éstas (Laing y Millican, 1986), por el tamaño de la célula (Yúfera y Lubián, 1990) y la biomasa producida.

1. 7.4. Cosméticos

Entre los productos derivados de microalgas que encontramos hoy en día en el mercado encontramos Dermalgae®, extracto bioactivo compuesto por cinco microalgas (*Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Tetraselmis chuii*) con capacidad antioxidante, antiinflamatoria, hidratante, angiogénica, regenerativa, promotor del colágeno y regulador de la apoptosis celular. Estas capacidades han demostrado mejorar la dermatitis seborreica, psoriasis, dermatitis atópica, la piel intolerante y la rosácea (enfermedad crónica de la piel facial).

1. 7.5. Antibióticos y antivirales

El uso inadecuado y extendido de los antibióticos ha hecho aparecer cepas de bacterias con una gran resistencia a ellos, por lo

1. Introducción

que la actividad farmacéutica trata de hallar organismos con nuevos compuestos con capacidad antimicrobiana.

Así, por ejemplo, los ácidos grasos insaturados de cadena larga con más de diez átomos de carbono poseen dicha capacidad (Asthana et al., 2009).

La diatomea de agua salada *Navicula directa* produce un polisacárido sulfurado denominado *Naviculan*, que posee actividad antiviral al inhibir la replicación del material genético del virus del herpes simplex en los primeros estadios (Sing et al., 2005). Este tipo de polisacáridos también son producidos por *Porphyridium* y se ha comprobado su efecto contra el *Herpes simplex* y *Varicella zoster* (Huheihe et al., 2002)

1. 7.6. Antitumorales

La actividad antitumoral de las microalgas es conocida desde hace tiempo. Se ha observado esta actividad en *Chlorella* contra tumores hepáticos, inhibiendo su proliferación y estimulando la apoptosis celular (Azamai et al., 2009). Los carotenoides presentes en esta especie también parecen tener esta actividad, además de ser antioxidantes y antiescleróticos, que evitan la calcificación del interior de los vasos (Cha et al., 2008).

Las microalgas son ricas en otros compuestos que juegan también un papel importante como antitumorales; son los ácidos grasos poliinsaturados, concretamente los ω 3 (eicosapentaenoico y docosahexaenoico) y los ω 6 (araquidónico y linolénico), que presentan esta actividad de forma selectiva (Das y Madhavi, 2011). Su actividad consiste en promover la apoptosis al regular distintos mecanismos vinculados con la muerte celular (Ge et al., 2009)

1. 7.7. Analgésica y antiinflamatoria

La respuesta inflamatoria está determinada por la producción de óxido nítrico, prostaglandina E2 y citoquinas, como la interleukina IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estos productos, por tanto, son los que se miden para poder observar la actividad antiinflamatoria del compuesto a estudiar (Larsen y Henson, 1983; Lawrence et al., 2002).

Se comprobó que *Dunaliella salina* inhibía la producción excesiva de los compuestos anteriormente nombrados por el carotenoide *all-trans*- β -caroteno (Bai et al., 2005).

1. 7.8. Otras actividades farmacológicas

Las microalgas tienen un creciente interés comercial para su uso en seres humanos basado en el potencial biológico y en el valor terapéutico de sus moléculas a partir de sus componentes celulares. Existen hallazgos, en ensayos con animales, que sugieren que el consumo de la microalga *Isochrysis galbana* podría ser beneficioso para ratas con diabetes mellitus tipo I, promueve la pérdida de peso corporal en animales sanos y ayuda a mantener el peso en animales diabéticos (Nuño, et al 2013).

Diferentes pigmentos como el licopeno (carotenoide) o la luteína (xantofila) reducen la tensión arterial y, por tanto, la probabilidad de sufrir accidentes cardiovasculares (Hu et al., 2008; Hozawa et al., 2009). También se ha descrito esta propiedad en péptidos provenientes de *Chlorella vulgaris* y *Spirulina platensis* (Suetsuna y Chen, 2001)

Por su parte, la fucoxantina es un tipo de carotenoide que se extrae de algas marinas, en concreto, es el pigmento que le da color a las algas marrones y que destaca por sus propiedades para reducir la grasa corporal, desempeñando una función antiobesidad (Zhang et al., 2015).

1. Introducción

1. 7.9. Alimentación humana

Aunque a lo largo de este trabajo trataremos el posible uso alimentario de la microalga objeto de estudio, no queremos dejar de destacar la importancia del empleo de las microalgas como fuente de alimentación en humanos.

Partimos de que la dieta equilibrada es aquella manera de alimentarse que aporta alimentos variados en cantidades adaptadas a nuestros requerimientos y condiciones personales (Torres y Pinilla, 2007).

Desde hace tiempo ha habido una transformación en los patrones de alimentación de nuestro país (Valera, 1995). Ha aumentado el consumo de carne y sus derivados por encima del nivel recomendado y ha disminuido el de cereales y derivados, verduras y hortalizas, frutas y leguminosas, que se encuentra por debajo de los niveles deseados para una buena salud. Como consecuencia de estos desequilibrios en la dieta es muy frecuente la aparición de una serie de problemas sanitarios asociados a una mala alimentación (García-Brenes, 2010)

En los últimos años están apareciendo alimentos nuevos, conocidos como alimentos funcionales, a los que se les hace alegaciones de salud del tipo “*disminuye el nivel de colesterol*” o “*disminuye el riesgo de padecer cáncer de colon*”, etc. En Europa, la legislación exige estudios muy rigurosos para permitir este tipo de alegaciones, de forma que un alimento sólo se puede considerar funcional si se demuestra que, además de tener un efecto nutricional adecuado, afecta de forma beneficiosa a una o varias funciones del organismo, de modo que contribuya a mejorar la salud y el bienestar o a reducir el riesgo de padecer enfermedades (Luengo, 2007).

Los alimentos funcionales constituyen, por tanto, la respuesta a mejorar la salud y reducir el riesgo a contraer las enfermedades antes descritas.

1. 8. Relevancia de los compuestos antioxidantes en la alimentación humana

Además de todas las propiedades funcionales descritas anteriormente, como antibiótica, antitumoral, analgésica y antiinflamatoria, también ha aumentado extraordinariamente el interés general por los antioxidantes de uso alimentario ya que también parecen desempeñar un importante papel en relación con la salud (Urala y Lahteenmaki, 2007).

Los antioxidantes son moléculas capaces de neutralizar radicales libres por medio de la donación de un electrón. Se ha demostrado que los antioxidantes, en pequeñas cantidades, pueden prevenir o retardar la oxidación de componentes celulares oxidables como los lípidos, proteínas, material genético, etc. (Chipault, 1962).

Por un lado sirven para evitar la generación de los productos de la oxidación lipídica en los alimentos, que pueden tener serios efectos citotóxicos para los consumidores y, por otro, se sabe que en los procesos metabólicos que tienen lugar en el cuerpo humano se producen continuamente, de forma natural, especies oxidantes que constituirían una seria amenaza para la salud de no ser por las defensas naturales a nivel celular contra ellas. Estas defensas, que en una primera fase consiste en neutralizar los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno (EROs) por medio de moléculas antioxidantes y que en una segunda fase (habiendo sido rebasada la primera), se basan en sistemas enzimáticos (catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasa principalmente), minimizan los efectos tóxicos de los radicales libres pero van perdiendo efectividad con la edad de las personas (Langseth, 1995; Navarro, 1998), de ahí la necesidad de recibir un suplemento dietético con las propiedades descritas, a partir de cierta edad.

Las microalgas, debido a su vida fototrófica, están expuestas a estrés por oxígeno y radiaciones, como la luz ultravioleta. Como

1. Introducción

resultado, han desarrollado numerosos sistemas antioxidantes frente a radicales libres y EROs, que promueven una acumulación de complejos antioxidantes altamente efectivos en la neutralización de especies oxidantes. Entre las moléculas más significativas procedentes de microalgas con capacidad antioxidante cabe citar el β -caroteno (carotenoides), la astaxantina, la zeaxantina (xantofilas) y la vitamina E. Su capacidad antioxidante suscita creciente interés en la terapia de enfermedades relacionadas con la oxidación, como la degeneración macular o diversos tipos de inflamación, así como en la prevención de ciertos desarrollos tumorales (de piel, de mama y de colon entre otros), lo que confiere a estas moléculas alto valor como aditivos alimentarios como ya se ha expuesto anteriormente (Gómez-Ariza et al., 2010).

La capacidad antioxidante se ve afectada por la especie de microalga y principalmente por las condiciones de procesado que puedan sufrir hasta su consumo. Además, la determinación de la capacidad antioxidante se ve altamente afectada por el método de análisis, tanto por la etapa de preparación de las muestras y extracción de los antioxidantes, como por el fundamento de la técnica. Por ello, se suele utilizar más de un método a la hora de evaluar la capacidad antioxidante de un alimento o de un compuesto (Frankel y Meyer, 2000)

1.9. Relevancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación humana

Otro de los productos de interés para la salud humana serían los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las microalgas, especialmente los ω 3, cuya producción puede ser además potenciada al manipular la composición química del medio donde se cultive o las condiciones físicas. El depósito de almidón o lípidos puede ser inducido por diversos factores que provoquen estrés celular, como la

radiación UV (Singh et al., 2002), la falta de nutrientes (Otero et al., 1997) o la temperatura (de Castro y García, 2005), pero los ácidos grasos poliinsaturados también pueden ser producidos en mayor cantidad mediante técnicas de ingeniería genética (Schuhmann et al., 2012).

Los ácidos grasos poliinsaturados forman parte de los fosfolípidos que constituyen la membrana celular y juegan un papel esencial en multitud de procesos, como las propiedades de dicha membrana, el metabolismo celular, el sistema inmune y los mecanismos relacionados con la temperatura corporal (Gil y Valivety, 1997), y además constituyen las dos terceras partes de los ácidos grasos de membrana de los fotorreceptores de la retina (Hoffman, 2000).

Estos ácidos grasos favorecen el correcto funcionamiento y desarrollo del organismo. Ya desde la gestación, el ácido araquidónico (AA) y el docosahexaenoico (DHA) son movilizados de la madre al feto, transportados selectivamente por la placenta. Esto es de gran importancia sobre todo al final de la gestación, ya que durante el tercer trimestre el desarrollo del tejido cerebral es mayor. Es por ello que las mujeres gestantes deben ingerir los niveles adecuados de ácidos grasos ω 3. (Connor, 1996)

También durante el crecimiento, el correcto aporte de DHA favorece la capacidad visual, lo que se relaciona con la mejor habilidad cognitiva para integrar información, advirtiéndose en estos niños un mayor coeficiente intelectual (Connor et al., 1996) y corrigen problemas de la retina y el cerebro así como diversos aspectos relacionados con el aprendizaje, la memoria, la función de la retina o la ansiedad mejoran con el consumo de ω 3 (Hoffman, 2000). Por otra parte, los ω 3 son precursores de hormonas como las prostaglandinas y los tromboxanos, permitiendo que se transmitan correctamente los impulsos en el sistema nervioso central (Simopoulos, 1999) y un

1. Introducción

consumo indebido de DHA da como resultado un menor número de ondas lentas de sueño, que son las indicadores de maduración y desarrollo del sistema nervioso central y concretamente del cerebro (Connor, 1996).

Pero el gran papel que juegan los $\omega 3$ en la prevención de enfermedades es, sin duda, en las relacionadas con las enfermedades cardiovasculares. Elevados niveles de colesterol y de triglicéridos en sangre son factores que aumentan el riesgo de padecer un accidente cardiovascular (Martínez-González, 2006). Para combatirlo, ha aumentado la prescripción de fármacos hipolipidemiantes en la última década, concretamente las estatinas, que son inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa. Estos fármacos reducen las concentraciones de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la sangre. Estas concentraciones de colesterol y triglicéridos están estrechamente relacionadas con los síndromes coronarios agudos. Aun así, la capacidad cardioprotectora puede deberse también a la combinación de efectos pleitrópicos (Martínez-González y Badimon, 2007).

Tradicionalmente, el aporte de los ácidos grasos $\omega 3$ proviene del pescado y de los frutos secos, como las nueces. Se ha demostrado cómo el consumo habitual en la dieta humana de estos alimentos aporta una defensa adicional frente al desarrollo de diversas patologías cardiovasculares.

Uno de los primeros casos en los que se observó esta relación fue en los años 70, cuando se descubrió que los esquimales que habitaban Groenlandia, a pesar de tener una dieta muy rica en grasas, gozaban de una tasa de incidencia en enfermedades coronarias muy baja (Bang et al., 1976). Más adelante se comprobó la correlación negativa entre una alta concentración de ácido graso $\omega 3$ eicosapentaenoico (EPA), que provenía de la dieta rica en pescado,

con la baja incidencia de cardiopatía isquémica en la población (Bang et al., 1980)

La aterosclerosis puede ser desencadenada por problemas en la función endotelial y causar enfermedad isquémica coronaria, enfermedad vascular periférica, cerebrovascular y muerte súbita por causas isquémicas (Badimón y Martínez-González, 2002; Badimón y Martínez-González, 2006). Los ω 3 mejoran esta disfunción por su capacidad para modificar las membranas celulares y fomentar la síntesis de óxido nítrico (NO) por el endotelio (Okuda et al., 1997)

En varones, el consumo de pescado azul más de una vez por semana disminuyó la tasa de enfermedad coronaria frente a aquellos que lo consumían poco (Kromhout et al., 1985). También disminuyó el riesgo de muerte súbita cardíaca (Albert et al., 1998) y la mortalidad en aquellos que tomaban pescado o aceite de pescado y que habían tenido previamente un infarto agudo de miocardio (Burr et al., 1989). La reducción de la mortalidad en este estudio de forma relativamente rápida, a los dos años, hizo pensar en la capacidad antiarrítmica o antitrombótica antes que en un efecto contra la aterosclerosis, puesto que en esta última la mejoría se observaría en un plazo más largo.

Un estudio realizado en mujeres también comprobó que el riesgo de muerte por enfermedad coronaria era menor en aquellas que consumían ácidos grasos ω 3 en mayor cantidad. Las mujeres diabéticas de este grupo de estudio, personas de mayor riesgo a padecer este tipo de enfermedades, también obtuvieron estos mismos resultados positivos (Hu et al., 2002).

Por tanto, el consumo de estos ácidos grasos, tanto en hombres como en mujeres, proporciona una defensa frente a las enfermedades isquémicas. Por cada 20 g/día de consumo de pescado azul se reduce el riesgo relativo de muerte por cardiopatía isquémica un 7% (He et al., 2004).

1. Introducción

Tras las evidencias expuestas del efecto positivo de los ácidos grasos ω 3, los mecanismos por los cuales causan esta protección cardiovascular son los efectos antiarrítmicos, los efectos sobre el perfil lipídico, sobre la hemostasia, la trombosis y la fibrinólisis, la mejora de la función endotelial y la actividad antiinflamatoria, siendo posiblemente los mecanismos antiarrítmicos los que provocan un mayor beneficio clínico (Marchioli et al., 2002; Kang y Leaf, 1996), y parece ser que está relacionado con la capacidad de los ω 3 para la estabilización eléctrica de los miocitos, actuando sobre los canales iónicos de la membrana celular (Leaf, 2001; Xiao et al., 1997).

El perfil lipídico es dependiente del tipo y la cantidad de ácidos grasos que se consuman. Así, una dosis baja de ácidos grasos ω 3, de 1 g/día, reduce la concentración de triglicéridos un 4.6% sin que cambien las concentraciones de colesterol total y LDL (Marchioli et al., 2002), mientras que una dosis mayor (4 g/día) reduce los triglicéridos entre un 25 y un 30% (Harris, 1997).

Por otra parte, los ω 3 disminuyen la agregabilidad plaquetaria y modulan la trombosis pero de forma independiente a la capacidad de modificar el perfil lipídico. Estos ácidos grasos reducen ciertos eicosanoides que favorecen la agregación, la vasoconstricción y la inflamación (Abeywardena y Charnock, 1995), aumentan las concentraciones de antitrombina III y promueven la hipocoagulabilidad por la reducción de las concentraciones de fibrinógeno y factor V (Vanschoonbeek et al., 2004) e incrementan la actividad fibrinolítica (Mehta et al., 1988). Está probado, además, que la inflamación disminuye, encontrando menor cantidad de macrófagos y cubiertas fibrosas más gruesas (Thies et al., 2003).

Los ácidos grasos poliinsaturados también tienen interés por sus efectos positivos sobre diabetes mellitus tipo 2, cáncer, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades relacionadas con el riñón, enfermedades de la piel

como la psoriasis o la artritis reumatoide (Simopoulos et al., 1991; Simopoulos, 1999; Connor, 1999; Harbige, 1998).

Por todo ello, la American Heart Association indica que el consumo de estos ácidos grasos asociados a una estatina disminuye los episodios coronarios graves (Cleland et al., 2006) por lo que este organismo recomienda que aquellas personas que padezcan una cardiopatía isquémica consuman 1g/día de EPA + DHA, y, al menos, el consumo de pescado dos veces por semana en aquellas personas que no padezcan esta enfermedad.

Es por ello que, observando el gran número de referencias que señalan la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados ω 3 en la dieta y las recomendaciones en cuanto a su consumo, la cantidad de estos ácidos grasos debe aumentar en la dieta habitual para mejorar la calidad de vida, por lo que se propone suplementar una dieta equilibrada y saludable con microalgas como futura fuente alternativa y sostenible para poder cubrir las necesidades humanas de ω 3.

1. Introducción

2. ANTECEDENTES



Universidad
de Huelva

2. ANTECEDENTES

Aún en tiempos de crisis, los alimentos y bebidas funcionales no han detenido su crecimiento y, según un estudio de la Global Industry Analysts de 2019, facturan más de 100.000 millones de euros al año, siendo el mercado americano, con un 40%, el líder en producción y en consumo de estos productos pertenecientes a un segmento que se identifica con las sociedades más avanzadas. En Europa, la oferta de alimentos funcionales crece a un ritmo del 16% anual, donde representa un mercado al alza que mueve alrededor de 25.000 millones de euros de los que el 29% corresponde a Reino Unido, el 22% a Francia, el 16% a Alemania, y el 11% a España y a Holanda, correspondiendo a España una facturación anual de 3.500 millones de euros según el Ministerio de Economía. (Mercasa, 2018, Global Industry Analysts, Inc., 2019).

Se estima que en pocos años el mercado de los alimentos funcionales supondrá más del 20% de la facturación total de alimentos a nivel mundial (Gouveia et al., 2010, Fuentes-Berrio et al., 2015).

Debido al alto contenido en compuestos biológicos beneficiosos para la salud humana y animal que poseen las microalgas, entre los que figuran los lípidos, polisacáridos, antioxidantes, vitaminas, minerales y biomoléculas con actividades farmacéuticas, han aparecido en el mercado multitud de “nuevos alimentos” o nuevos productos de consumo, supuestamente enriquecidos con estos principios activos procedentes de la biomasa de las microalgas como, por ejemplo, cereales para el desayuno, productos para untar, panes, galletas, brownies, barritas energéticas, mayonesas, postres gelificados, pastas, emulsiones, helados y bebidas (Becker, 2007). Se estima que en pocos años el mercado de los alimentos funcionales supondrá un 20% de la facturación total de alimentos a nivel mundial (Gouveia et al., 2010).

Dentro del ámbito biosanitario se ha encontrado que varios polihidroxiesteroides procedentes de microalgas exhiben actividades citotóxicas y anticancerígenas (de Jesús Raposo et al., 2015). Los polisacáridos de algas pertenecen a una gran familia de compuestos químicos muy diversos, algunos de los cuales se ha descrito que estimulan el sistema inmunitario humano y/o tienen posibles aplicaciones biomédicas (Martínez y Rojo, 2011). Por lo tanto, no cabe dudar sobre el alto valor potencial de la biomasa de microalgas como una posible fuente de nutraceuticos para alimentos funcionales dirigidos a prevenir e incluso paliar ciertas enfermedades.

Actualmente ya hay algunas microalgas que son comercializadas para su uso gastronómico, pero no son objeto de investigación y, por lo que conocemos, sus cualidades nutraceuticas no son especialmente extraordinarias, ya que están al nivel de algunas frutas y verduras ordinarias. Hoy se comercializan apenas una decena del millón y medio aproximado de microalgas existentes en el planeta (fundamentalmente como biomasa para principios activos), de ahí el interés en la posible incorporación de la *Coccomyxa onubensis*.

En este sentido, en el presente trabajo hemos abordado la posibilidad de utilizar una microalga acidófila (*Coccomyxa onubensis*) procedente del río Tinto, la cual ha sido aislada por el grupo de investigación del Dr. Carlos Vílchez, de la Universidad de Huelva, como fuente de sustancias bioactivas de interés para la salud. Se aisló en un medio sólido y se caracterizó por técnicas de microscopía óptica y electrónica, y por estudios moleculares. Se trata de una microalga unicelular elipsoide de unas 3 μm de longitud y con pared celular (Figuras 8 y 9).



Figura 8. Vista de la microalga *Coccomyxa onubensis* bajo contraste de fases (100x) (Romero, 2015). Figura 9. Morfología del alga *Coccomyxa onubensis*. (Fuentes et al., 2016).

Ocupando la mitad de todo el citoplasma se encuentra un único cloroplasto. En el citoplasma también aparecen gotas de lípidos, gránulos de almidón, plastoglóbulos (ricos en pigmentos, sobre todo carotenoides) (Forján et al. 2014) y depósitos electrodensos que concuerdan con depósitos de metales (Figura 9).

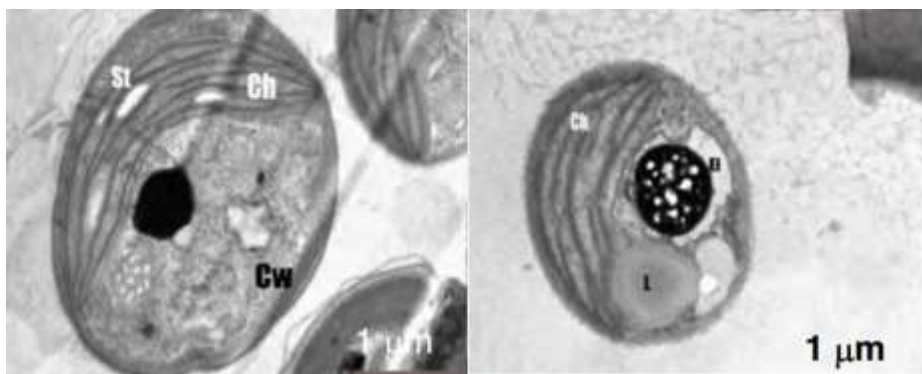


Figura 9. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de *Coccomyxa onubensis* sp. donde se aprecian los depósitos electrodensos. St. Starch grains (gránulos de almidón), Ch. Chloroplast (cloroplasto), CW. Cell Wall (pared celular) (Fuentes et al., 2016)

Esta microalga se identificó como perteneciente al género *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) mediante la secuenciación de su ARNr 18S usando la base de datos GenBank (Ruiz-Domínguez et al., 2015; Bermejo et al., 2018; Vaquero et al., 2012; Fuentes et al., 2016)

3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN



Universidad
de Huelva

3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de esta Tesis doctoral se ha basado en la consecución de los siguientes objetivos:

1. Comprobar la posible actividad antimicrobiana de nuestra especie de estudio, *Coccomyxa onubensis*, frente a patógenos humanos.

La capacidad antimicrobiana ha sido probada en algunas microalgas, sin embargo, nunca se ha descrito anteriormente dicha actividad en microalgas extremófilas. Esta tesis pretende analizar sus posibles aplicaciones biosanitarias, probando su eficacia frente a la proliferación de patógenos hospitalarios de elevada prevalencia (Gram positivas, Gram negativas y en la levadura *Candida albicans*).

2. Realizar ensayos de bioseguridad de la microalga *Coccomyxa onubensis*.

Dada su composición nutricional se pretende estudiar la posibilidad de ser empleada como suplemento alimenticio seguro para animales mediante la elaboración de dietas modificadas a diferentes concentraciones para su ensayo en roedores y realizar posteriormente el estudio de los efectos de la ingesta sobre la bioquímica sanguínea y el estudio histopatológico de diferentes órganos diana del animal.

3. Comprobar el efecto antihiper glucémico y antihiperlipidémico de dicha microalga.

Habiendo observado estas propiedades inesperadas tras concluir el objetivo nº2, se pretende comprobar a continuación estos efectos protectores frente a una dieta hipercolesterolémica y observar si los resultados son comparables a la atorvastina, el medicamento más usado para este fin en humanos.

3. Objetivos y Justificación

4. MATERIAL Y MÉTODOS



Universidad
de Huelva

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4. 1. Actividad antimicrobiana de la microalga *Coccomyxa onubensis*

4. 1.1. Aislamiento de las microalgas y condiciones de cultivo

a) La microalga acidófila *Coccomyxa onubensis* SAG 2510, usada en esta tesis, fue aislada de las aguas ácidas del río Tinto, el cual discurre parcialmente a través del área minera del Norte de la provincia de Huelva, y posteriormente depositada en la colección de microalgas en Göttingen, Alemania, con el número SAG NA2016.002. Concretamente, el área de muestreo se encuentra en las coordenadas 37.585115° de latitud y -6.550754° de longitud. Como se ha comentado anteriormente, en este río el rango de pH varía entre 1.7 y 3.1 durante todo el año, además de contener altas concentraciones de metales pesados incluyendo hierro, cobre y aluminio. El cultivo puro de esta microalga se obtuvo mediante siembra en placa de agar. Las colonias aisladas fueron posteriormente transferidas desde las placas de agar a medio líquido. El medio de cultivo utilizado tanto para el aislamiento en placas (Figura 10) como para el crecimiento en medio líquido (Figura 11) estuvo basado en el medio K9 descrito por Silverman y Lundgren en 1959, a un pH de 2.5.

4. Material y Métodos



Figura 10. *Coccomyxa onubensis* creciendo en una placa de Petri en medio de cultivo solidificado con agar (Foto: Francisco Navarro)



Figura 11. *Coccomyxa onubensis* creciendo en un medio de cultivo líquido (Foto: Francisco Navarro)

Para preparar las placas de agar, 300 ml de agar al 7% y 700 ml de medio K9 modificado fueron autoclavados por separado y mezclados antes de su uso. Una vez se determinaron los parámetros para un crecimiento óptimo, un nuevo medio K9 fue preparado usando, entre otros, solución de trazas Hutner (Hutner et al., 1950). La composición por litro de este medio se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de un litro de medio K9

Componente	Cantidad
K_2SO_4	3.95 g
KCl	0.1 g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.5 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.41 g
KNO_3	2.29 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01 g
Solución Trazas Hutner	5 ml
Solución Trazas Hutner (composición por litro)	
H_3B_3	2.28 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4.40 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.02 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1.00 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.32 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.32 g
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \cdot 4H_2O$	0.22 g

Tras la preparación de dicho medio de cultivo se le ajustó el pH a 2.5 con H_2SO_4 . El cultivo se hizo crecer en reactores de 5 L a 25 °C, con aireación constante y un contenido en CO_2 del 5% (v/v) e iluminados ininterrumpidamente con lámparas fluorescentes (Philips TL-D 30W/54-765 1SL; Philips Ibérica, SAU, Madrid, Spain) que

4. Material y Métodos

suministraron $165 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a la superficie de los matraces (Navarro et al., 2017).

4. 1.2. Preparación del extracto crudo

Se obtuvo la fracción cruda de la microalga a partir de 15 g de peso fresco del cultivo en fase de crecimiento exponencial por triplicado. Estas muestras fueron homogeneizadas en tampón fosfato 0.2 M, a pH 8, conteniendo 250 mM de sacarosa, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 2mM PMSF y 5 mM DTT. La mezcla se homogeneizó mediante tres ciclos de 30 segundos a 21.500 rpm en una microbatidora Ultra-Turrax T-25 (IKA-Weke, Staufen, Germany) a 4 °C en una cámara fría. El homogeneizado fue centrifugado a 600 g durante 15 minutos a 4 °C para descartar los fragmentos no solubles y núcleos, y el sobrenadante (extracto crudo de la microalga) fue almacenado a -80 °C hasta su uso.

4. 1.3. Preparación de los extractos bioactivos

1 g del extracto crudo se mantuvo bajo agitación constante a 4°C en una cámara fría durante toda la noche en 30 mL de cada agente extractante. Después, la muestra fue centrifugada a 9.200 g durante 10 minutos a 4 °C, y el pellet fue resuspendido de nuevo en otros 30 mL. Este procedimiento se repitió dos veces más hasta tener un sobrenadante total de aproximadamente 90 ml. Todo este sobrenadante fue secado en hielo bajo una corriente de N_2 hasta obtener los extractos bioactivos, que fueron almacenados a -80 °C hasta su uso (Figura 12).

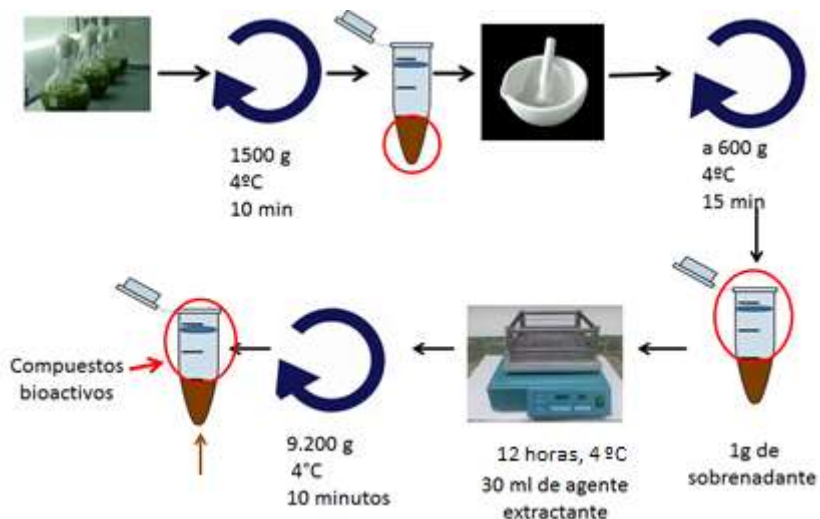


Figura 12. Esquema de la preparación del extracto crudo y de los extractos bioactivos.

4. 1.4. Solventes empleados como agentes extractantes

Todos los solventes usados como extractantes tenían la calidad para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC grade) de J.T.Baker (Deventer, The Netherlands), y el resto de los reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

En la tabla 5 se observan los diferentes agentes extractantes empleados, ordenados de menor a mayor polaridad.

4. Material y Métodos

Tabla 5. Solventes empleados como agentes extractantes ordenados de menor a mayor polaridad

Extractantes
Hexano
Dietiléter
Cloroformo
Diclorometano
Acetato de etilo
Metanol:Diclorometano
Acetona
Etanol
Metanol
Agua

4. 1.5. Preparación de los discos para el antibiograma (Método de difusión en disco)

El método de difusión en disco de papel fue realizado según el método descrito por Bauer en 1966. (Figura 13). Los discos estériles de 6 mm de diámetro (Filter Lab, Barcelona, Spain) se impregnaron con 25 µl de cada extracto (0.3 g de la fracción bioactiva de *Coccomyxa onubensis*) reconstituido en DMSO (tras la evaporación a 37 °C de cada agente extractante empleado). Los discos así cargados se colocaron sobre las placas de Petri que habían sido anteriormente sembradas individualmente y por triplicado con cada uno de los microorganismos citados en el punto 6. Como control negativo de la actividad antimicrobiana de los extractos se usaron discos cargados con 25 µL de DMSO y como control positivo se usaron discos

comerciales de Becton Dickinson (Heidelberg, Germany) cargados con amoxicilina-ácido clavulánico. Todos los discos se secaron en estufa durante 24 horas a 37 °C y, pasado este tiempo, se usaron inmediatamente. Las placas con los cultivos de bacterias fueron incubadas a 37°C ± 0.1°C durante 24 horas y las placas con el cultivo de levadura se incubaron a 28°C ± 0.1°C también durante 48 horas.

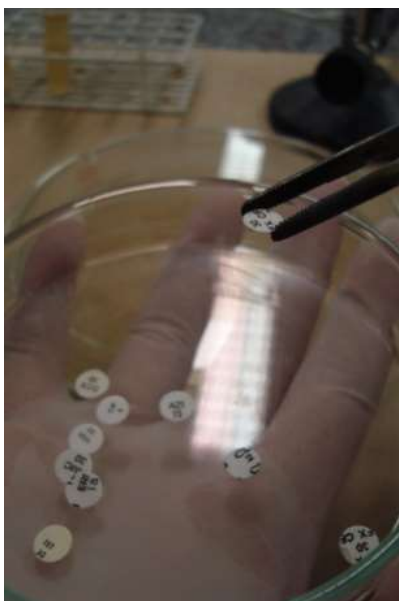


Figura 13. Preparación de los discos de antibiograma estériles de 6 mm de diámetro (Foto: Francisco Navarro)

La capacidad antimicrobiana de los extractos del alga frente a los diferentes microorganismos fue determinada mediante la medida del diámetro del halo de lisis alrededor de cada disco (Figura 14). Estos diámetros fueron medidos usando el software ImageJ v.1.45s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

4. Material y Métodos

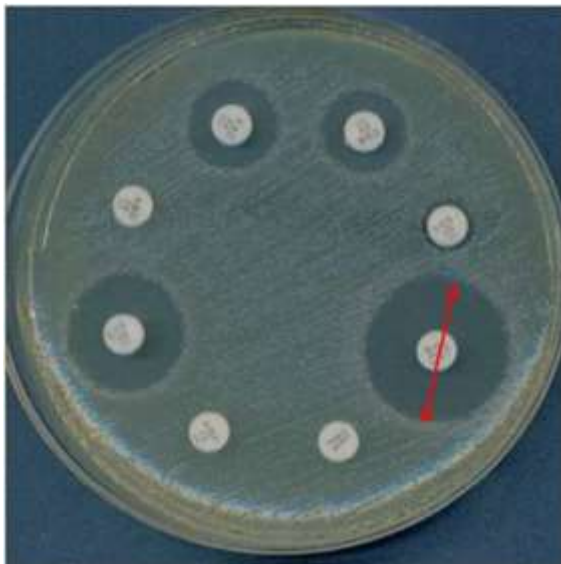


Figura 14. Ejemplo de antibiograma en el que se puede ver el halo de lisis que forma el disco cargado al inhibir el crecimiento del microorganismo (flecha roja).

4. 1.6. Determinación de la actividad antimicrobiana

Para testar la capacidad antibiótica de los diferentes extractos provenientes de las microalgas se usaron siete cepas de bacterias patógenas, cinco Gram (-) y dos Gram (+). Las cepas Gram (-) fueron *Pseudomonas aeruginosa* Schroeter (ATCC 27853), *Escherichia coli* S (β -lactamasa sensible, ATCC 25922), *Escherichia coli* ESBL (β -lactamasa resistente, ATCC BAA-2471), *Salmonella entérica* subsp. *Enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff (ATCC 19430) y *Proteus mirabilis* Hauser (ATCC 29906), mientras que las cepas Gram (+) fueron *Staphylococcus aureus* Rosenbach (ATCC 29213) y *Staphylococcus aureus* MB (metecilina resistente, ATCC BAA-2422). Además, se usó una cepa de levadura (*Candida albicans* Robin (ATCC 10231)).

Tanto las bacterias patógenas como la levadura fueron proporcionadas por el Departamento de Microbiología del Hospital Juan Ramón Jiménez (Huelva, España). Estos microorganismos se mantuvieron congelados en un medio adecuado de glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Antes de ser usadas se comprobó la ausencia de contaminación microbiana (cultivo puro).

Todas las bacterias se cultivaron en medio nutritivo (caldo de lactosa) y fueron incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h para que alcanzaran una densidad de 10^7 UFC/mL. *Candida albicans* se hizo crecer en un caldo Sabouraud-Dextrosa incubando toda la noche a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para alcanzar la misma densidad que las cepas anteriores. Posteriormente, todos los microorganismos fueron sembrados por difusión en placas de Petri con agar Mueller-Hinton (Figura 15) usado en los ensayos de antibióticos con discos de difusión.



Figura 15. Siembra por agotamiento en placas de Petri para partir de un cultivo puro de cada microorganismo (Foto: Francisco Navarro)

4. Material y Métodos

4. 1.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI es la concentración más baja de agentes antimicrobianos que consigue inhibir completamente el crecimiento visible de un microorganismo tras su incubación en el medio de cultivo. Para su determinación, las pruebas se llevaron a cabo en microplacas de titulación estándar de 96 micropocillos, realizando diluciones seriadas, según lo descrito por las guías del *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI 2012). Los inóculos de las cepas bacterianas se prepararon previamente a partir de caldo de cultivo Mueller-Hinton creciendo a 37 °C durante 48 horas; en el caso de *Candida albicans*, ésta se hizo crecer en un medio Sabouraud-Dextrosa a 25 °C. Todos estos inóculos fueron preparados ajustando la turbidez del cultivo a 0.5 con agua destilada estéril, de acuerdo con la escala MacFarland (Chapin y Lauderdale, 2003). Las placas de 96 micropocillos se prepararon de acuerdo con Santoyo y col. (2009), dispensando en cada uno 165 µL de medio de cultivo, 5 µL del inóculo y 30 µL de los diferentes extractos. El volumen final de cada pocillo fue de 200 µL, conteniendo 5×10^4 UFC de cada uno de los microorganismos probados y 15% (v/v) de DMSO como control.

El gradiente de concentración de los extractos usados en la determinación de la CMI fue obtenido mediante una doble disolución de DMSO puro añadida a los 200 µL. Los controles negativos se prepararon agregando a la primera mezcla de ensayo 30 µL de DMSO puro sin extracto, que no afectó el crecimiento de los microorganismos probados.

Una disolución de amoxicilina estéril (10 mg mL^{-1}) fue usada como control positivo de referencia para determinar la sensibilidad de las especies microbianas usadas. En todos los casos, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 16-20 horas. Con la idea de

prevenir que se secan por evaporación (dado el pequeño volumen de los pocillos), cada microplaca fue cubierta con una lámina plástica adhesiva estéril. La CMI de cada extracto fue determinada mediante la inspección visual sobre transiluminador microbiológico del fondo de los pocillos, siendo indicador de crecimiento bacteriano la presencia de turbidez o de un pellet. Un valor de CMI bajo correspondería a una actividad antimicrobiana más eficiente.

4. 1.8. Análisis de los extractos por HPLC

La separación y el análisis cromatográfico de los pigmentos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta presión en un HPLC equipado con un detector UV-Vis (Young, 1997) usando una columna RP-18 Hipersil Gold Thermo Scientific (250 x 4 mm, 5 μ m) y una tasa de flujo de 1 ml min⁻¹. Como fase móvil se usó etil-acetato (solvente A) y acetonitrilo:agua 9:1 v/v (solvente B) y el programa de gradiente aplicado fue 0–10 min, 0–50% A; 10-15 min, 60 % A; 15-20 min 65 % A; 20-22', 76 % A; 22-25 min, 100 % A; 25-30 min, 0 % A. La detección de pigmentos fue llevada a cabo a 450 nm y su identificación y cuantificación se obtuvo al inyectar cantidades conocidas estándares de pigmento. La Clorofila a y el β -caroteno fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) mientras que el resto de estándares se obtuvieron del Water Quality Institute VKI (Horsholm, Denmark).

4. Material y Métodos

4. 1.9. Análisis de los extractos por cromatografía de gases (GC-FID)

Los ácidos grasos intracelulares fueron analizados usando el método de cromatografía de gases (GC-FID). El *carrier* fue helio y el ácido N-pentadecaenoico etil éter fue usado como estándar. El análisis GC-FID fue realizado en un detector de ionización de llama junto con un cromatógrafo de gases AGILENT 7890 A, equipado con una columna capilar de sílice fundido Omegawax TM 320 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m de grosor de película). La identificación de los componentes individuales se realizó mediante la comparación de sus índices de retención relativa a una mezcla C4-C24 *n*-alquenos (SupelcoTM 37 Component FAME mix 100 mg Neat).

4. 1.10. Análisis estadístico

Los resultados mostrados se corresponden con la media \pm D.E. de tres medidas paralelas. Un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) se llevó a cabo usando los datos obtenidos en cada uno de los extractos. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando *p* fue inferior a 0.05.

4. 2. *Coccomyxa onubensis* como fuente alimentaria segura para los animales

4. 2.1. Producción de biomasa de *Coccomyxa onubensis*

La microalga fue producida en bolsas transparentes de 400 L de 60 cm de diámetro y 2.1 m de altura. Estas bolsas se mantuvieron en interior a una temperatura de 20°C con medio de cultivo K9 (cuya

composición se describe en la tabla 4) ajustado a pH 2.5 y con un aporte de aire enriquecido con CO₂ (5% v/v) a través de difusores colocados en el fondo de las bolsas (Figura 16). Los cultivos fueron iluminados con luz blanca fluorescente a 200 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Figura 16. Cultivo de *Coccomyxa onubensis* en bolsa de biomasa (Foto: Francisco Navarro)

Las células fueron recogidas por centrifugación de flujo continuo a 8.400 rpm usando una centrífuga industrial (GEA Westfalia Separator modelo KA-6, Oelde, Germany). El pellet obtenido se lavó dos veces con agua desionizada y fue recuperado mediante centrifugación (Figura 17)

4. Material y Métodos



Figura 17. Biomasa de *Coccomyxa onubensis* recogida por centrifugación industrial (Foto: Francisco Navarro)

La biomasa fue secada en una estufa con ventilación forzada (JP Selecta DRY-BIG 2002972, Barcelona, Spain) y convertida en polvo de grano inferior a 100 μm (Figura 18) usando un molturador de disco vibratorio (Retsch GmbH RS100, Haan, Germany).



Figura 18. Biomasa de *Coccomyxa onubensis* secada y transformada en polvo de grano inferior a 100 μm (Foto: Francisco Navarro)

El polvo obtenido se empaquetó al vacío y posteriormente se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4. 2.2. Análisis bioquímico de la biomasa de *Coccomyxa onubensis*

Los componentes principales de la biomasa de nuestra microalga fueron analizados por la Unidad de Servicios Centrales de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla, Spain). Para determinar la composición de los ácidos grasos presentes en la biomasa se llevó a cabo la transesterificación de glicéridos de ácidos grasos extraídos mediante el siguiente procedimiento. La mezcla estándar de reacción, que contenía glicéridos, metanol y ácido sulfúrico concentrado (5% v/v), fue calentada a 70 °C durante 3 horas y posteriormente enfriada y tratada con hexano y agua. La mezcla fue separada por centrifugación (1.500 g durante 10 minutos) en dos fases, cuya capa lipídica superior (hexano) se lavó con agua destilada hasta que el agua de lavado tuvo un pH neutro.

El análisis de la composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) de esta capa de hexano fue llevado a cabo usando una unidad de cromatografía de gases 7890A (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA), equipada con un detector de ionización de llama. Las muestras, de 1 µl, fueron inyectadas en una columna capilar de sílice fundido OMEGAWax (de 30 m, 0,32 mm d.i. y 0,25 µm de grosor) en la cual la velocidad de flujo del gas portador, helio, fue constante a 1,5 mL·min⁻¹ y se usó una relación de Split de 20:1 con un periodo de carencia de solvente de 1,5 minutos. La temperatura del inyector fue de 100 °C y la temperatura del detector se mantuvo constante a 200 °C. La temperatura del horno se incrementó de 80 a 140 °C a un ritmo de 5°C/minuto y posteriormente se incrementó hasta los 170 °C a un ritmo de 4 °C/minuto y se mantuvo a esa temperatura

4. Material y Métodos

durante 2 minutos más. Pasado este tiempo se volvió a incrementar, esta vez hasta los 190 °C a un ritmo de 1 °C/minuto y se mantuvo de nuevo durante 2 minutos. Finalmente, el horno se calentó a 200 °C.

Los FAME fueron identificados comparando sus tiempos de retención con aquellos provenientes de una mezcla estándar comercial (FAMEs MIX C4-C24 SUPELCO Analytical, Bellefonte, PA, USA). Las concentraciones en la solución de hexano inyectado de dichos ácidos grasos fueron cuantificadas comparando las áreas de los picos con las de aquellos obtenidos de estándares de concentraciones conocidas.

La composición de ácidos grasos fue calculada como el porcentaje del total de ácidos grasos en el volumen de hexano.

4. 2.3. Preparación de la dieta experimental enriquecida en microalga.

Las dietas experimentales usadas en este trabajo se han realizado a partir pellets para roedores de Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, IN, USA), los cuales se han triturado hasta polvo usando una trituradora de mandíbula (Retsch GmbH BB200) y posteriormente un molino de disco vibratorio hasta alcanzar un tamaño de grano inferior a 100 µm.

Se prepararon cuatro dietas diferentes: La Dieta 1 supuso el control y se realizó usando exclusivamente el polvo de comida estándar obtenido anteriormente; la Dieta 2 estuvo compuesta por 996 mg de la dieta estándar mezclada con 4 mg de polvo de microalga; la Dieta 3 estuvo compuesta por 987.5 mg de dieta estándar mezclada con 12.5 mg de polvo de microalga; por último, la Dieta 4 se realizó mezclando 937 mg de preparado estándar con 62.5 mg polvo de microalga. (Tabla 6)

Tabla 6. Composición por gramo de las diferentes dietas usadas

Dieta	Alimentación estándar (mg)	Microalga en polvo (mg)	% respecto al peso total
1	1000	0	0
2	996	4	0.4
3	987.5	12.5	1.25
4	937	62.5	6.25

En todos los casos, el polvo de cada dieta se mezcló homogéneamente, reconstituyéndolo con agua destilada en una amasadora industrial (Fimar AM1, Rimini, Italy). Una vez obtenida la masa, se formaron de nuevo pellets a partir de ésta con una extrusora (Fimar MPF4, Italy).

Los pellets reconstituidos de las cuatro dietas se secaron en una estufa con ventilación forzada para así obtener el mismo grado de humedad que los pellets estándar originales. Una vez secos, los pellets se almacenaron a 4 °C y al vacío hasta su uso (Figura 19).

4. Material y Métodos



Figura 19. Pellets durante el proceso de secado (Foto: Francisco Navarro)

De acuerdo con las equivalencias mostradas en la Tabla 7, la cantidad de microalga usada en estas dietas experimentales son comparables a un consumo humano de 20.4 a 255 g/día de polvo de microalga. Estas proporciones suelen ser suficientes para permitirnos obtener información sobre su toxicidad.

Tabla 7. Relación de la microalga en polvo en la dieta de las ratas y su equivalencia en humanos

Dieta	Cantidad de alga en la dieta de ratas (%)	Consumo de alga por ratas (mg/día)	Equivalencia de consumo de algas en un humano de 68 Kg (g/día)
1	0	0	0
2	0.4	60	20.4
3	1.25	187.5	63.8
4	6	750	255

Estos cálculos fueron realizados para una rata de tamaño medio (200g) con un consumo de alimento de 15g/día (Kushak et al., 2000)

4. 2.4. Manejo animal

Los experimentos fueron realizados con 24 ratas macho variedad Long Evans (Figura 20) de 4 semanas de edad y de un peso inicial de entre 130 y 140 g, obtenidas del Laboratorio Charles River (St. Germain-Nuelles, France).



Figura 20. Rata variedad Long Evans (Foto: Charles River Laboratories)

Los animales fueron manipulados de acuerdo con la Directiva 8609/CEE del Consejo de la Comunidad Europea y la Legislación Española (R.D. 53/2013). Los protocolos usados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Huelva.

Antes de comenzar con los experimentos, los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de seis ratas cada uno, con peso medio similar, y se les permitió aclimatarse durante 5 días con acceso libre a la comida (Dieta 1) y agua, todo bajo condiciones controladas de temperatura (22.0 ± 1.3 °C) y un fotoperiodo de 12 horas. A los animales se les proveyó de elementos de enriquecimiento ambiental a lo largo de todo el tiempo.

4. Material y Métodos

Tras este periodo de aclimatación, las ratas de cada grupo por separado fueron alimentadas con una de las dietas antes descritas (Dieta 1, Dieta 2, Dieta 3 y Dieta 4) por un total de 45 días.

Las ratas fueron pesadas cada dos días y, concluido el experimento, se efectuó un análisis hematológico, bioquímico e histopatológico de todas ellas.

4. 2.5. Análisis hematológico y bioquímico

Previamente a su sacrificio, se hizo ayunar a las ratas durante 8 horas y posteriormente se anestesiaron con isoflurano inhalado. Tras la punción cardíaca, la sangre fue recogida del ventrículo izquierdo en un tubo de cristal BD Vacutainer K3 EDTA (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) y procesada inmediatamente de acuerdo con las instrucciones para estudios hematológicos que proporciona el fabricante.

El análisis hematológico fue llevado a cabo en un analizador hematológico automático Sysmex XT-4000i (Sysmex America, Inc., Lincolnshire, IL, USA). Para el estudio de la morfología del eritrocito se prepararon frotis de sangre siguiendo el procedimiento de Bain (Bain et al., 2006), que fueron teñidos con el kit de tinción Hematocor® (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) y examinados bajo un microscopio Nikon Eclipse E400 microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Las muestras de suero sanguíneo para las determinaciones bioquímicas fueron recogidas en tubos de 2 mL con gel separador y sistema de succión Advanced BD Vacutainer SST II. En cuanto fueron recolectadas, las muestras de sangre se enfriaron en un frigorífico y fueron protegidas de la luz durante 60 minutos para permitir la

retracción del coágulo; el suero se obtuvo posteriormente por centrifugación a 1.500 g a 4 °C durante 15 minutos.

A partir de estas muestras de suero se midieron diferentes parámetros y actividades. La determinación de los parámetros bioquímicos se llevó a cabo en un analizador hematológico automático Sysmex XT-4000i (Sysmex America, Inc.), las diferentes actividades enzimáticas se determinaron en un analizador modular Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) siguiendo las instrucciones del fabricante. El colesterol total y las concentraciones de triglicéridos también fueron determinados enzimáticamente en el analizador modular Cobas 8000, también de acuerdo con las instrucciones del fabricante, así como en el análisis de las fracciones HDL y VLDL.

4. 2.6. Análisis histopatológico

Para el análisis de los diferentes tejidos, el hígado y el riñón fueron extraídos de los animales de ensayo de cada uno de los grupos, pesados, lavados con una solución 0.9% (w/v) de NaCl, troceados y fijados en un tampón neutro de formaldehído al 4%. Tras este proceso se realizó una deshidratación por inmersión en alcoholes de gradación ascendente durante 51 horas, seguido de xileno durante 1 hora y finalmente se incluyeron en parafina.

Las secciones (de 4 mm de grosor) de hígado y riñón se obtuvieron con un microtomo rotativo de precisión Leica Leitz 1512 (Leitz, Wetzlar, Germany) y fueron teñidas con hematoxilina y eosina para su examen histológico posterior.

Las secciones montadas en portaobjetos se observaron al microscopio óptico (Nikon Eclipse E400 microscope) para evaluar la integridad y anomalías del tejido y toma de fotografías.

4. Material y Métodos

4. 2.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se empleó el paquete de análisis estadístico SPSS versión 19. Los datos de los cuatro grupos dietéticos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal Wallis. Las diferencias fueron aceptadas como significativas para valores de $p < 0.05$.

4. 3. Efectos antihiper glucémicos y antihiperlipidémicos de *Coccomyxa onubensis*

4. 3.1. Producción de biomasa de la microalga

Se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para el estudio de la microalga como fuente alimentaria segura para los animales, apartado 4. 2.1.

4. 3.2. Preparación de la dieta experimental

Las dietas experimentales utilizadas en este trabajo se procesaron tal como se ha descrito en el apartado 4. 2.3.

Mediante el empleo del polvo de alimento convencional como base de la dieta, se procedió a la fabricación de cada una de las dietas empleadas para el estudio, para lo cual se mezclaron los siguientes componentes para cada uno de los casos:

a) Dieta 1 (control): Compuesta únicamente por pellets convencionales procesados en forma de polvo de 100 μm (14% de proteínas), tal como se indicó en el apartado 4. 2.3.

b) Dieta 2 (hipercolesterolémica): Compuesta por pellets convencionales procesados en forma de polvo de 100 μm suplementados con un 2% (p/p) de colesterol libre, un 0,5% (p/p) de ácido cólico y un 10% (p/p) de manteca de cerdo purificada.

c) Dieta 3 (hipercolesterolémica + *Coccomyxa onubensis*): Con la misma composición que la Dieta 2 a que se le añadió un 6,25% (p/p) de la microalga de estudio como suplemento. Concretamente se compuso mezclando 62,5 mg de polvo seco de microalgas más 937,5 mg de la dieta 2 en polvo.

d) Dieta 4 (hipercolesterolémica + atorvastatina): Con la misma composición que la Dieta 2 a la que se le añadieron 10 mg/kg de peso corporal/día de atorvastatina empleando la dosis general utilizada para el tratamiento de la hipercolesterolemia en humanos.

En todos los casos, las dietas en polvo producidas se mezclaron homogéneamente, se reconstituyeron con agua destilada en una amasadora (Fimar AM1, Rimini, Italia), y luego se convirtieron en pellets nuevamente con una extrusora (Fimar MPF4).

Las cuatro dietas, reconstituidas en forma de pellets, se secaron en una estufa a 40°C con circulación asistida por ventilador (JP Selecta DRY-BIG 2002972, Barcelona 08630, España) hasta obtener el mismo grado de humedad que la dieta estándar original de roedores. Los pellets secos se almacenaron a -20°C al vacío hasta su uso.

4. 3.3. Manejo animal

Los experimentos se realizaron en ratas macho variedad Long Evans de 4 semanas de edad (n = 24) con un peso de 145 - 160 g, obtenidas de Charles River Laboratories (Francia). Los animales

4. Material y Métodos

fueron manipulados de acuerdo con la Directiva 8609 / CEE del Consejo de la Comunidad Europea y la Legislación Española (R.D.53 / 2013) y los protocolos utilizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Huelva (España).

Se permitió que los animales se aclimataran durante 5 días con libre acceso a alimentación (Dieta 1) y a agua en condiciones controladas de temperatura (22.0 ± 1.3 ° C) y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h antes del inicio de los experimentos. A continuación se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de 6 ratas cada uno, con pesos medios similares, y se alojaron dos animales por jaula, provistos de elementos de enriquecimiento animal que, además, se emplean para evitar el sobrecrecimiento de los incisivos propio de la cautividad. Cada grupo se alimentó con una de las cuatro dietas descritas.

Los animales fueron pesados cada dos días siguiendo las instrucciones de pesos de dieta especificados en el protocolo, para lo cual se empleó una balanza de precisión (Sartorius BP 4100S, Goettingen 37079, Alemania).

Tras un período de 108 días de alimentación modificada, los animales se anestesiaron con isoflurano inhalado y se exanguinaron mediante punción intracardiaca. Seguidamente, todos los órganos de estudio fueron lavados con solución de NaCl 0,9%, pesados con balanza de precisión (CB Cobos Precision 1908, Hospitalet de Llobregat 08902, Barcelona, España) etiquetados, transferidos a hielo seco y posteriormente almacenados a -80 °C para su posterior empleo. Cabe destacar que, para el estudio del tejido encefálico, el cerebro junto con el cerebelo, una vez congelados en nitrógeno líquido, fueron remitidos al Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Sevilla.

Conjuntamente, se procedió a la extracción de muestras sanguíneas para llevar a cabo análisis bioquímicos y hematológicos.

4. 3.4. Análisis hematológico y bioquímico

Las ratas ayunaron durante las 12 horas previas y se anestesiaron con isoflurano inhalado antes del sacrificio. Tras una punción cardíaca, se recogió sangre del ventrículo izquierdo en un tubo de EDTA K3 de 2 ml (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) y se procesó inmediatamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante para estudios hematológicos, llevando a cabo 10 inversiones completas en los tubos. Para la separación del plasma y los glóbulos rojos, se centrifugaron a 1.300 g 10 min a 4 °C en una Eppendorf Centrifuge 5702, San Sebastián de los Reyes 28703, Madrid.

El análisis hematológico se realizó en un analizador de hematología automatizado Sysmex XT-4000i (Sysmex America Inc., Lincolnshire, Illinois, EE. UU.).

Las muestras para las determinaciones de bioquímica en suero se recogieron en tubos de 3 ml con separador de gel y sistema de succión Advanced BD Vacutainer SST II. Las muestras de sangre se enfriaron primero en un frigorífico durante 60 minutos para permitir la retracción del coágulo y se protegieron posteriormente de la luz, obteniéndose el suero después de la centrifugación a 1.500 x g durante 15 minutos a 4 °C.

Las actividades enzimáticas, el colesterol total (CT) y los triglicéridos se determinaron en un analizador modular Cobas 8000 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El mismo instrumento también se utilizó para analizar

4. Material y Métodos

los contenidos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de lipoproteínas de baja densidad (colesterol LDL) siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso.

4. 3.5. Extracción de órganos

Los diferentes órganos (hígado, bazo, epidídimo, riñones, corazón y encéfalo) se extrajeron para medir y ponderar los cuatro grupos de dieta empleada. Después de la exanguinación, los órganos de los animales de los diferentes grupos se extrajeron cuidadosamente, se lavaron con una solución fría de NaCl al 0.9% (p / v) y se pesaron en una balanza CB Cobos Precision 1908, Hospitalet de Llobregat 08902, Barcelona.

Cada encéfalo se seccionó en cuatro partes (telencéfalo, mesencéfalo, tronco encefálico más cerebelo, y médula espinal) usando escalpelo y un estereomicroscopio Nikon SMZ1000 (Nikon Instruments Inc. NY, EE. UU.). Cada parte se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

4. 3.6. Determinación de lípidos encefálicos

Los lípidos totales fueron analizados en los servicios centrales del Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla). La extracción lipídica de las diferentes partes del encéfalo se realizó siguiendo el método de Folch (Folch et al., 1957) con modificaciones, utilizando butil-hidroxil-tolueno (BHT) como antioxidante. Para el análisis de los ácidos grasos, los lípidos se transmetilaron usando metóxido de sodio en metanol (0,5%); y los ésteres metílicos de los

ácidos grasos resultantes se analizaron por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo de gases modelo 5890 Serie II (Hewlett-Packard, Avondale, PA) equipado con un detector de ionización de llama y una columna de sílice capilar BPX70 SGE Analytical Science (Trajan, Victoria, Australia) de 10 m de longitud, 0,1 mm de diámetro interno y un revestimiento interior de 0,2 μm como se describió anteriormente (Perona et al. 2000).

4. 3.7. Reactivos

La atorvastatina de calcio empleada para la elaboración de la dieta 4 modificada fue adquirida de Sandoz Farmacéutica S.A. (Aravaca, Madrid, España). El colesterol y el ácido cólico (pureza del 98%) se obtuvieron de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). La grasa de cerdo purificada fue adquirida de Campofrío S.A. (Madrid, España). El resto de los compuestos químicos se adquirieron de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania)

4. 3.8. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de análisis estadístico SPSS versión 19. Los datos de los cuatro grupos de dieta se analizaron mediante una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis). Para comparar entre dos variables se utilizó la U de Mann-Whitney. Las diferencias fueron aceptadas como significativas para valores de $p < 0.05$.

En el caso de la determinación de lípidos, las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante ANOVA unidireccional seguido del test post-hoc de Tukey.

4. Material y Métodos

4. 4. Análisis de las propiedades nutraceuticas de la microalga relacionadas con su potencial antioxidante

4. 4.1. Determinación de la capacidad antioxidante total

Para analizar la capacidad antioxidante inicial de nuestra muestra se empleó el método descrito por Brand-Williams et al. (1995), basado en la captación de radicales libres, adaptado para nuestro material a microvolúmenes. El método se basa en la reducción del radical DPPH por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza empleando disoluciones patrón de Trólox (análogo a la vitamina E).

La cantidad de muestra que se utilizó para determinar la cantidad de DPPH fue de 4 mg de peso fresco. La absorbancia se midió a 515 nm, frente a un blanco de metanol, exactamente a los 30 minutos de la adicción de DPPH.

Todas las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV/Vis Thermo scientific. Helios Gamma. Inglaterra.

4. 4.2. Determinación de Polifenoles totales

Los fenoles totales se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Georgé et al. (2005). Los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo de Folin-Cicalteu (mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico), lo que da una coloración azul,

la cual es medida en el espectrofotómetro, permitiendo cuantificar los polifenoles presentes en nuestra muestra (Bordeu y Scarpa, 2000).

Para la recta de calibrado se utilizó una solución estándar de ácido gálico (50 mg/l), se tomaron volúmenes de 0 μL a 200 μL en intervalos de 20 μL y se completó el volumen de cada uno a 1600 μL con agua destilada. La cantidad de microalga que se utilizó para determinar la cantidad de polifenoles totales fue de 4 mg de peso fresco. Las muestras se analizaron a una longitud de onda de 725 nm frente a un blanco de metanol.

4. 4.3. Determinación de polifenoles flavonoides

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante el ensayo de Liu et al. (2002). Utilizamos una solución estándar de catequina (1 g/l) de la cual se tomaron volúmenes de 0 μL a 500 μL en intervalos de 100 μL .

La cantidad de muestra que se utilizó para determinar la cantidad de flavonoides fue de 1 mg de peso fresco de microalga. El valor de la absorbancia fue medido a 510 nm.

4. 4.4. Determinación de polifenoles no flavonoides (taninos hidrolizables)

El contenido de polifenoles no flavonoides se determinó mediante el ensayo descrito por Mueller-Harvey en 2001. El método se basa en la oxidación de los taninos con yodato potásico. Los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) son convertidos en metil galato (componente estructural común) vía metanolisis. El metil

4. Material y Métodos

galato reacciona con el yodato en medio ácido dando un cromóforo de color rojo con un máximo de absorbancia a 525 nm.

Para la curva patrón, utilizamos una solución estándar de metilgalato metanolizada de la cual se tomaron volúmenes de 0 a 100 µl en intervalos de 20 µl. Adicionamos para un grupo agua y para otro HCl. A partir de la diferencia de los valores de absorbancia a 525 nm entre ambos grupos, se construye la recta de calibrado de los taninos hidrolizables.

La cantidad de muestra que se utilizó para determinar los taninos hidrolizables fue de 30 mg de microalga en peso fresco.

4. 4.5. Determinación de los carotenoides totales

Los carotenoides se determinaron mediante el método descrito por Britton en 1985 con varias modificaciones. Se pesó 0,1 g de la microalga y se homogeneizó con 1 ml de acetona al 90%. Se dejó reposar durante 24 horas a 4 ° C. Luego se centrifugó a 1.500 g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se diluyó hasta un volumen final de 5 ml con acetona fría al 90%. La absorbancia se midió a 480 nm y 750 nm.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Universidad
de Huelva

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. 1. Actividad antimicrobiana de la microalga *Coccomyxa onubensis*

Los solventes descritos en el apartado 4. 1.4 de materiales y métodos (hexano, dietiléter, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, metanol:diclorometano, acetona, etanol, metanol y agua) fueron empleados para extraer las moléculas bioactivas presentes en la microalga estudiada. Con estos extractos, se cargaron los discos de antibiograma en idéntica proporción en todos los casos, y finalmente se empleó la medida de los halos de lisis obtenidos para evaluar la efectividad de dichos extractos como agente antimicrobiano. Este método es el empleado habitualmente en la mayoría de estudios en los que se informa de la actividad antimicrobiana a partir de extractos procedentes de vegetales, consistentes en ensayos de difusión en agar con discos de antibiograma cargados del extracto procedente del agente antimicrobiano en estudio para evaluar la inhibición del crecimiento de las bacterias (Bauer et al. 1966).

El resultado esperado en estos ensayos es que el diámetro de las zonas de inhibición cambie según el tipo de compuestos bioactivos contenidos en los extractos y según las características de las cepas microbianas, las cuales presentarán más o menos sensibilidad a dichos compuestos.

Como control empleamos los discos de antibiograma cargados con antibióticos de referencia, amoxicilina y ácido clavulánico. En primer lugar por ser antibióticos de uso más frecuente en la práctica clínica y en consecuencia los más utilizados por la población. En segundo lugar porque de este modo podemos establecer comparaciones de efectividad con el resto de los discos de antibiograma y en tercer lugar, porque es una forma de descartar que los microorganismos mueran por la influencia de otros agentes como

5. Resultados y Discusión

pueden ser la luz, el medio de soporte en el que se encuentran las bacterias patógenas o cualquier otro factor que pueda enmascarar los resultados.

La interacción entre cada agente extractante y la inhibición del crecimiento bacteriano se descartó incubando cada una de las cepas bacterianas estudiadas con los discos de antibiograma cargados exclusivamente con los agentes extractantes, siguiendo el mismo procedimiento que se llevó a cabo en la preparación de discos de antibiograma con los extractos bioactivos de la microalga y observándose que, tras su procesado, los discos de antibiograma no presentaron capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano.

Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 21, con determinados extractos bioactivos obtenidos a partir de la biomasa de *Coccomyxa onubensis*, se formaron halos de lisis perfectamente cuantificables.



Figura 21. Halos de lisis en placas de Petri de los diferentes organismos patógenos sembrados en césped. Pueden observarse en cada uno de los discos de antibiograma (círculos oscuros) cómo se rodea, o no, de un "halo" (flecha roja) según la mayor o menor efectividad del extracto. La numeración indicada en los discos tiene el siguiente significado: 1) Extracto sin efecto (agua), 2) Efecto producido por los extractos, 3) Efecto positivo de los antibióticos comerciales. Los discos de antibiograma ocupan la misma posición en todos los casos estudiados.

Así, podemos comprobar que el extracto bioactivo obtenido a partir de *Coccomyxa onubensis* con hexano o cloroformo como agentes extractantes posee una fuerte actividad antimicrobiana, con halos mayores de 14.0 mm. En este contexto, los resultados obtenidos (Figura 22) con el extracto de hexano frente a *Proteus mirabilis* (16.6 ± 1.6 mm), *Salmonella enterica* (16.2 ± 0.8 mm), el extracto de cloroformo frente a *E. coli* S (17.2 ± 1.4 mm), *Salmonella enterica* (16.0 ± 0.9 mm), y *Proteus mirabilis* (15.9 ± 0.4 mm), y el extracto de diclorometano frente a *Salmonella enterica* (15.8 ± 0.4 mm) fueron

5. Resultados y Discusión

comparables a aquellos obtenidos con antibióticos comerciales de amoxicilina con ácido clavulánico, que formaron halos de alrededor de 16.0 mm.

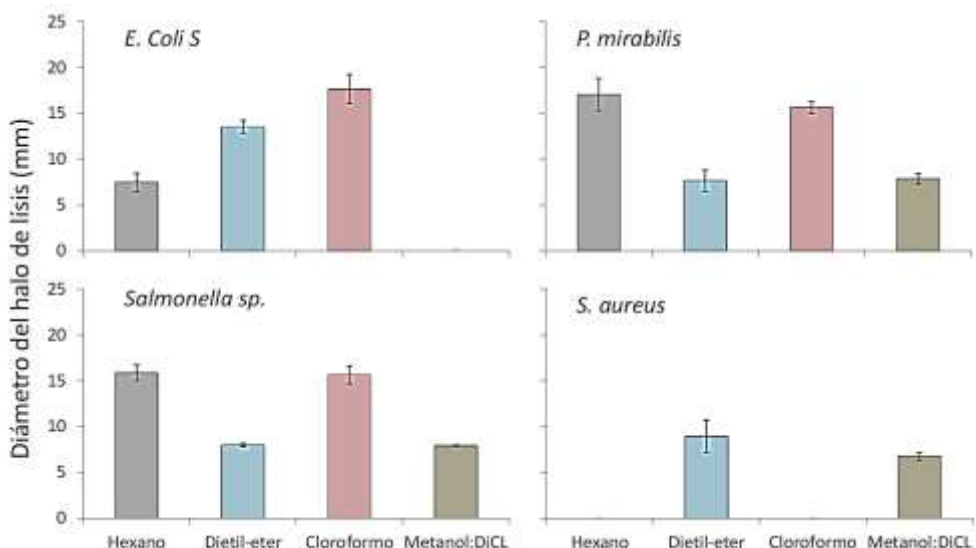


Figura 22. Diámetro medio del halo de lisis (\pm desviación estándar) por extractante aplicado a cada organismo patógeno estudiado.

Sin embargo, la actividad antimicrobiana de los extractos no fue tan alta frente a bacterias Gram (+), lo cual concuerda con los resultados obtenidos con otras microalgas (Blom y Pernthaler, 2009). Además, los extractos de *Coccomyxa onubensis* provenientes de solventes polares, como la acetona, etanol, metanol y agua, carecen de actividad antimicrobiana significativa contra los mencionados patógenos (Tabla 8).

Finalmente, se comprobó si el medio de cultivo donde habían crecido las microalgas podía tener algún efecto antimicrobiano, tal como se ha descrito para algunos tipos de microorganismos que, por

ejemplo, secretan ionóforos al medio, como la gramicidina A o la valinomicina (Paniagua et al., 2007) y que son potentes antibacterianos.

Para ello, el medio de cultivo usado para el crecimiento de la microalga fue concentrado y cargado en discos de antibiograma para analizar su posible actividad antimicrobiana, obteniendo resultados negativos.

Una vez seleccionados aquellos extractos de la microalga que presentaron actividad antimicrobiana mediante los discos de antibiograma, se procedió a determinar su CMI (Concentración Mínima Inhibitoria), es decir, conocer la concentración más baja en $\mu\text{g/mL}$ de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana. De esta forma pudimos comprobar que los valores obtenidos de CMI para el extracto de cloroformo frente a *E. coli* S (305 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y *P. mirabilis* (153 $\mu\text{g mL}^{-1}$), y para el extracto de hexano frente *P. mirabilis* (106 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabla 8) fueron similares a los valores de CMI de los extractos de metanol de *Spirulina platensis*, que mostraron unos valores de CMI de 128 y 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *Staphylococcus aureus* y *E. coli* respectivamente (Kaushik and Chauhan, 2008). Además, sustancias bioactivas puras, como el ácido araquidónico, mostraron valores de CMI entre 1.9 y 7.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente a bacterias Gram (-), que son significativamente más bajas que los valores que presentó el extracto de microalgas (Amaro et al., 2011). Se ha descrito que el valor de CMI para los componentes bioactivos puros presentaron actividad antimicrobiana de relevancia cuando la CMI se encuentra en un rango de entre 0.1 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que cuando tiene valores por encima de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no llegan a alcanzar un nivel significativo (Ellof, 2004). En nuestro caso, los extractos diluidos (diluciones seriadas en micropocillos) de la

5. Resultados y Discusión

microalga presentaron valores de CMI mayores de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, indicando la presencia de componentes bioactivos en la mezcla.

En este estudio se observa una mayor efectividad de los extractos obtenidos frente a bacterias del grupo Gram (-) como *E. coli*, *Salmonella sp* y *Proteus mirabilis*, por lo que cabría suponer que el mecanismo de acción de los agentes bioactivos obtenidos dependa de la composición de la pared de la bacteria. En este sentido, las bacterias Gram (-) presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano (Figura 23b), mientras que las bacterias Gram (+) presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa (Figura 23a). Por este motivo (y generalizando) un antibiótico de amplio espectro suele ser más efectivo frente a un mayor número de bacterias Gram (+) (Cué Brugueras y Morejón García, 1998), mientras que los antibióticos específicos, como podría ser el caso de los obtenidos a partir de *Coccomyxa onubensis*, presentan una mayor efectividad contra los microorganismos Gram (-).

En este trabajo describimos por primera vez la actividad antimicrobiana en una microalga acidófila, *Coccomyxa onubensis*. A diferencia de las microalgas de ambientes no extremos, la importante actividad de los extractos de *Coccomyxa onubensis* contra microbios patógenos humanos, sugiere que esta microalga podría ser empleada como fuente de nuevos antibióticos naturales.

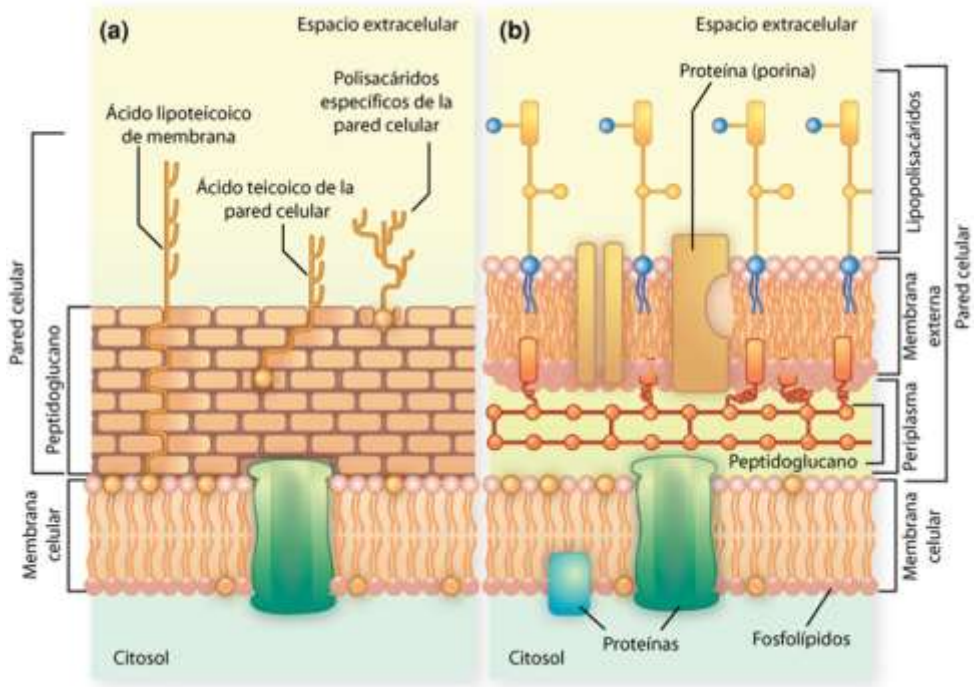


Figura 23. Estructura de la pared celular de bacterias Gram (+) (a) y Gram (-) (b) (García Martos et al., 1997)

5. Resultados y Discusión

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Coccomyxa onubensis*

Microorganismos	Diámetro de la zona de inhibición (mm) ^a										Antibióticos comerciales
	Extractos (25 µl/disco)										
	Hex	DEth	Clf	Dich	EtAcet	Met:Dich	Acet	Et	Met	Agua	
	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>Pseudomonas areuginosa</i>	s.e.i	s.e.i	s.e.i	7.4 ± 0.1	7.1 ± 0.1	s.e.i	7.3 ± 0.3	s.e.i	7.6 ± 0.6	s.e.i	s.e.i
<i>Escherichia coli S</i>	+	++	+++	++	+	-	+	-	++	-	++
	7.2 ± 0.9	13.8 ± 0.4	17.2 ± 1.4	11 ± 0.2	6.8 ± 0.3	s.e.i	7.1 ± 0.1	s.e.i	11.2 ± 0.2	s.e.i	9.9 ± 0.5
<i>Escherichia coli ESBL</i>	+	++	-	+	+	-	++	-	+	-	-
	7.1 ± 0.8	8.6 ± 0.1	n.i.e.	7.9 ± 0.6	7.4 ± 0.3	s.e.i	10.4 ± 0.5	s.e.i	6.8 ± 0.4	s.e.i	s.e.i
<i>Salmonella sp.</i>	+++	++	+++	+++	++	++	+	-	++	-	+++
	16.2 ± 0.8	8.1 ± 0.1	16.0 ± 0.9	15.8 ± 0.3	8.7 ± 0.1	8.0 ± 0.1	7.7 ± 0.2	s.e.i	8.4 ± 0.4	s.e.i	15.1 ± 0.3
<i>Proteus mirabilis</i>	+++	+	+++	+	+	+	++	-	+	-	+++
	16.6 ± 1.6	7.4 ± 0.7	15.9 ± 0.4	7.7 ± 0.5	7.8 ± 0.3	7.7 ± 0.5	8.8 ± 0.4	s.e.i	7.5 ± 0.3	s.e.i	16.6 ± 0.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	++	-	-	+	+	++	-	++	-	+++
	s.e.i	9.5 ± 1.1	s.e.i	s.e.i	7.5 ± 0.2	6.7 ± 0.4	8.0 ± 0.9	s.e.i	8.3 ± 1.0	s.e.i	16.7 ± 0.5
<i>Staphylococcus aureus MB</i>	++	++	+	-	+	-	+	-	++	-	+++
	12.0 ± 0.5	13.3 ± 0.6	7.8 ± 0.1	s.e.i	7.2 ± 0.2	s.e.i	7.5 ± 0.8	s.e.i	8.9 ± 0.7	s.e.i	16.1 ± 0.5
<i>Candida albicans</i>	++	+	-	+	++	-	++	-	++	-	---
	13.6 ± 0.2	7.1 ± 0.1	s.e.i	7.2 ± 0.2	8.0 ± 0.1	s.e.i	13.7 ± 0.1	s.e.i	10.5 ± 0.5	s.e.i	---

^aZona de inhibición, incluyendo el diámetro de los discos de papel (6 mm). Los valores representan la media de los triplicados (± error estándar de la media). Hex, hexano; DEth, dietil éter; Clf, cloroformo; Dich, diclorometano; EtAcet, etil acetato; Met:Dich; metanol-diclorometano 1:1; Acet, acetona; Et, etanol; Met, metanol; Fos, fosfomicina; Amox, amoxicilina clavulanato; Ciprofx, ciprofloxacina; Cefot, cefotaxima. Símbolos: - sin efecto inhibitorio (s.e.i.); +, diámetro 6 – 7.9 mm; ++, diámetro 8 – 13.9 mm; +++, diámetro >14 mm. Fuente: Abdel-Raouf et al. (2011).

5. 1.1. Análisis químico de los extractos de *Coccomyxa onubensis* con actividad antimicrobiana

Puesto que habíamos encontrado una buena actividad antimicrobiana en los extractos obtenidos con solventes apolares, éstos fueron analizados para determinar su contenido en ácidos grasos. La Figura 24 muestra la cromatografía de gases obtenida a partir del extracto bioactivo obtenido con hexano como agente extractante, donde se observa cómo los ácidos grasos más abundantes en dicho extracto son el palmítico (C16:0), oléico (C18:1), linoléico (C18:2) y linolénico (C18:3), los cuales se encuentran libres o combinados en glicéridos. Cabe pensar que estos ácidos grasos pueden ser responsables de la actividad antimicrobiana antes descrita, como se ha comprobado para otras microalgas (Tabla 9). Así por ejemplo, el ácido linolénico fue identificado como agente antimicrobiano en los extractos de *Spirulina* (Kaushik y Chauhan, 2008). En el caso de *Phaeodactylum tricornutum*, los ácidos grasos responsables de la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+) y Gram (-) fue el ácido eicosapentaenoico (Desbois et al. 2009). Además, otros componentes con propiedades antimicrobianas son indol, acetogeninas, fenoles e hidrocarburos halogenados volátiles (Sing et al., 2005).

Por lo tanto, aunque los compuestos activos responsables de la actividad antimicrobiana aún no han sido identificados, actualmente se está evaluando el posible papel de los acilglicéridos en las actividades antimicrobianas de *Coccomyxa onubensis*. Por lo tanto, se deben realizar más estudios sobre el aislamiento y la identificación de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana observada en *Coccomyxa onubensis* para evaluar sus posibles aplicaciones farmacéuticas y la viabilidad de la producción. Nuestra experiencia con esta microalga sugiere el potencial de los

5. Resultados y Discusión

microorganismos acidófilos como posible fuente de nuevos compuestos de interés para la salud humana.

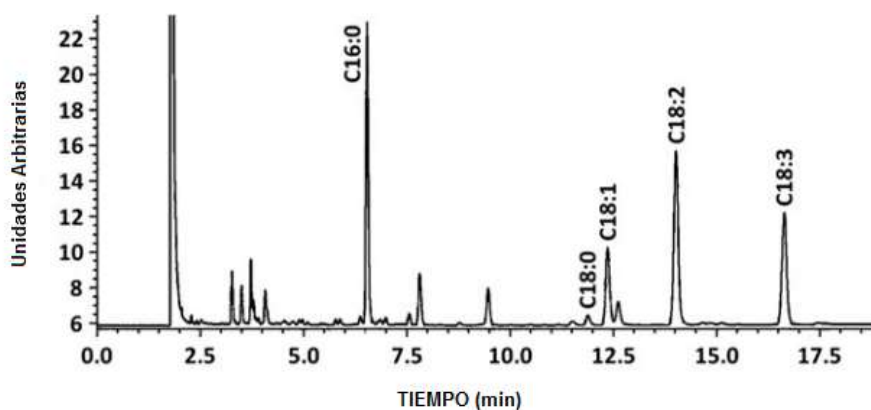


Figura 24. Cromatografía de gases obtenida de *Coccomyxa onubensis* usando hexano como extractante. Ácidos grasos: C16:0, ácido palmítico; C18:1, ácido oleico; C18:2, ácido linoléico; C18:3, ácido linolénico.

Por otro lado, Molnar y col. encontraron que una molécula relacionada con la luteína, la transluteoxantina, mostraba una potente actividad frente a *Helicobacter pylori*, comparable con el metronidazol, el compuesto antimicrobiano usado en el tratamiento sobre esta bacteria. Sin embargo, en nuestro caso, el análisis cuantitativo de los extractos por HPLC extraídos con metanol de *C. onubensis*, que carecieron de actividad antimicrobiana (Tabla 8), revela un elevado contenido en luteína y β -caroteno, que representó aproximadamente el 70% del total de carotenoides en la microalga (Figura 25), por lo que en este caso, dichos compuestos no serían responsables de la bioactividad encontrada en *Coccomyxa*.

Tabla 9. Actividad antibacteriana de diferentes microalgas

Microorganismo	Principios bioactivos	Referencia
Microalgas eucariotas		
<i>Chaetoceros muelleri</i>	Ácidos grasos	Mendiola et al.(2007)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Extracto de metanol	Ghasemi et al. (2007)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Extracto de metanol	Ghasemi et al. (2007)
<i>Chlorococcum sp.</i>	Ácido α -Linolénico	Bhadury y Wright (2004)
<i>Dunaliella salina</i>	Extracto de metanol	Pane et al. (2015)
<i>Euglena viridis</i>	Extractos orgánicos	Das et al. (2005)
<i>Gloeocapsa sp.</i>	Exopolisacáridos	Najdenski et al.(2013)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ácidos grasos (cc)	Rodríguez-Meizoso et al. (2010)
<i>Isochrysis galbana</i>	Extractos orgánicos	Lazarus y Bhimba (2008)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	EPA (Extracto de gelatina para cargar nanofibras)	Desbois et al. (2009) Kwak et al.(2014)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Exopolisacáridos sulfatados	de Jesús Raposo et al. (2014)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Extracto de metanol	Pane et al. (2015)
<i>Scenedesmus sp.</i>	Nanopartículas de plata Extracto crudo	Jena et al. (2014) Aremu et al. (2014)
<i>Skeletonemacostatum</i>	Ácidos grasos	Naviner et al. (1999)

5. Resultados y Discusión

Cianobacterias

<i>Anabaena aequalis</i>	Quercetina	Abdel-Raouf et al.(2011)
<i>Chroococcus disperses</i>	Extracto de metanol	Ghasemi et al.(2007)
<i>Nostoc CCC537</i>	Ácidos grasos	Asthana et al.(2009)
<i>Oscillatoria latevirens</i>	Extracto de etanol	Madhumathi et al.(2011)
<i>Oscillatoria redekeiHUB051</i>	Ácidos grasos	Mundt et al. (2003)
<i>Phormidium corium</i>	Extracto de acetona	Madhumathi et al.(2011)
<i>Spirulina platensis</i>	Extracto de metanol (ág) Extracto de butanol	Kaushik y Chauhan (2008) Mallikarjun Gouda et al. (2015)
<i>Synechocystis sp.</i>	Ácidos grasos Exopolisacáridos	Plaza et al. (2010) Najdenski et al.(2013)
<i>Trichodesmium erythraeum</i>	Extracto de hexano	Thillairajasekar et al.(2009)

EPA, ácido eicosapentaenoico; ág, ácidos grasos; cc, cadena corta. (Navarro et al, 2017)

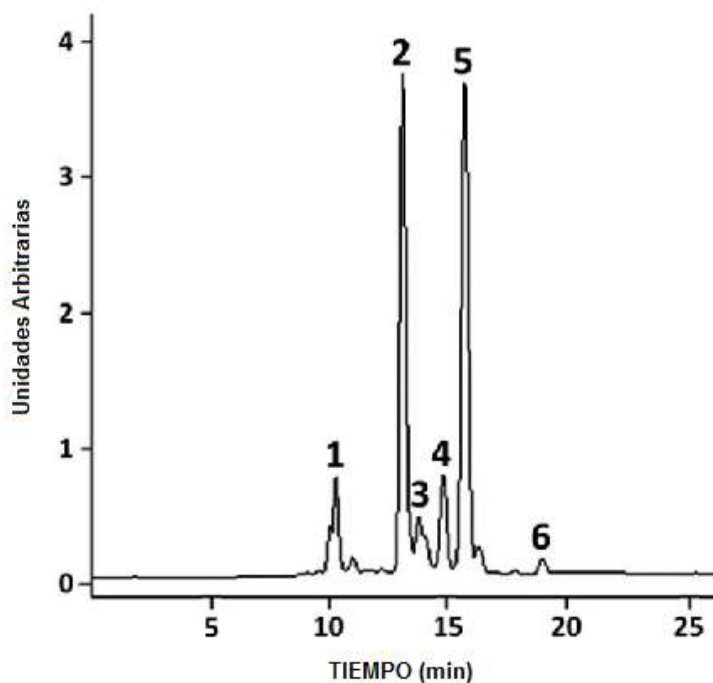


Figura 25. HPLC obtenida de *Coccomyxa onubensis* usando metanol como extractante. Pico 1, violaxantina (N.D. - no detectado); pico 2, luteína ($6.3 \mu\text{g mL}^{-1}$); pico 3, zeaxantina (N.D.); pico 4, clorofila b (N.D.); pico 5, clorofila a (N.D.); pico 6, β -caroteno

5. 1.2. Mecanismos de acción relacionados con la actividad antimicrobiana

En general, desde un punto de vista molecular, los productos antimicrobianos usados en la práctica clínica ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: 1) inhibiendo la síntesis de la pared celular, 2) alterando la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, 3) previniendo la síntesis de proteínas o 4) bloqueando la síntesis de ácidos nucleicos (Russell, 2002). El mecanismo a través del cual los ácidos grasos pueden ejercer su actividad bactericida no está totalmente dilucidado, pero sí pueden promover el daño de la membrana, resultando en la alteración

5. Resultados y Discusión

de la absorción de nutrientes y la inhibición de la respiración celular (Smith et al., 2010).

5. 2. *Coccomyxa onubensis* como fuente alimentaria segura para los animales

5. 2.1. Efectos de la biomasa de *Coccomyxa onubensis* en el peso de las ratas

La composición de la biomasa de *C. onubensis* está indicada en la Tabla 10. Desde el punto de vista nutricional, resulta de particular interés la elevada proporción de proteína (44.60% del peso seco) y el contenido en fibra dietética (15.73%), junto con un contenido moderado en hidratos de carbono (24.80%) y el moderado contenido de lípidos (5.40%) y ácidos nucleicos (4.8%).

Como ventaja nutricional adicional de esta biomasa se encuentran el contenido muy bajo en monosacáridos y disacáridos (0.1%) y el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (65 % del total del contenido en ácidos grasos).

Tabla 10. Composición química de la biomasa seca de *Coccomyxa onubensis*

Parámetro	Composición de la fracción (%)	Composición de la subfracción (%)
Proteínas	44.60	-
Hidratos de carbono	24.80	-
Azúcar soluble	-	4.11
Fibra dietética	15.73	-
Triglicéridos	5.40	-
Saturados	-	17.55
Monoinsaturados	-	17.45
Poliinsaturados	-	65
Ácidos nucleicos	4.8	-

El peso seco representa el 24.35% de la biomasa. Los parámetros fueron determinados como se indica en la sección Material y métodos

Esta composición sugiere que la microalga posee propiedades nutricionales que podrían ser más beneficiosas que otras microalgas usadas en alimentación animal, donde el contenido en proteínas va de 1 a 65%, los hidratos de carbono de 15 a 50% y las grasas de 3 a 48% (Bishop y Zubeck, 2012; Tibbetts et al., 2015).

La biomasa que proviene de *Chlorella vulgaris*, una de las especies de microalgas más ampliamente empleadas como suplemento alimenticio contiene un 28% de proteína, 49.2% de hidratos de carbono, 17.5% de lípidos y un 4.5% de ácidos nucleicos (Lardon et al., 2009). Como ya remarcamos, los lípidos que provienen de *C. onubensis* son de especial interés alimentario debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados como el ácido docohexaenoico (DHA) y el eicosapentaenoico (EPA), pero también

5. Resultados y Discusión

por la presencia de carotenoides, como la astaxantina y la luteína, y otros antioxidantes (Christaki et al., 2011).

La biomasa de *Coccomyxa onubensis* es especialmente rica en luteína y β -caroteno, los cuales poseen una alta actividad antioxidante y son consideradas muy convenientes como fuente de nutraceuticos (Vaquero et al., 2014). Los antioxidantes con componentes fenolicos y las vitaminas (precursor de vitamina A, vitamina E y vitaminas del grupo B) también son producidas por las microalgas y se acumulan en diferentes niveles dependiendo de las condiciones de cultivo (Bishop y Zubeck, 2012; Spolaore et al., 2006). Serían necesarios más estudios sobre las condiciones de cultivo para incrementar su contenido en dichos compuestos en la biomasa de *Coccomyxa onubensis* y por lo tanto para mejorar sus propiedades nutraceuticas.

Como ya se ha indicado, el contenido en ácidos nucleicos de *Coccomyxa onubensis* es del 4.8%, que está dentro de la media del contenido en ácidos nucleicos de la mayoría de microalgas, incluyendo aquellas que son usadas como alimento en humanos (Becker, 1994). Para hacerse una idea, el contenido en ácidos nucleicos de la carne de ternera y el hígado de ternera es de 1.5 y 2.2% respectivamente. Está generalmente considerado que el consumo diario máximo aceptable para adultos de ácidos nucleicos es de 4.0 g/día (Zepka et al., 2010).

Los cuatro grupos de ratas sufrieron una ganancia constante de peso semanal y concluyeron el estudio con un peso medio de 210 ± 8.08 g para los individuos de la Dieta 1 (Control) hasta los 205 ± 8.46 g que alcanzaron los individuos de la Dieta 4. La eficiencia de la dieta, es decir, la relación de alimento consumido (g) / peso ganado (g) estuvo en valores entre 5.04 ± 0.20 (Dieta 1) y 4.40 ± 0.11 (Dieta 4) (Tabla 11), que están dentro de los parámetros normales para la rata.

En general, el uso de microalgas en polvo como suplemento en las dietas usadas, ha sido bien tolerado por los individuos del estudio, como indica la similar ganancia de peso en los cuatro grupos de experimentación a lo largo del ensayo (Figura 26). En este contexto, y por el contrario, sí que ha sido observada una disminución del peso corporal de los animales cuyas dietas han sido suplementadas con otras microalgas como *Isochrysis galbana* y *Nannochloopsis oculata* (Nuño et al., 2013) y la microalga roja *Porphyridium sp.* (Dvir et al., 2000). En contraste, ratas alimentadas con dietas suplementadas con la cianobacteria *Aphanizomenon flos-aquae* mostraron un incremento de su peso corporal del 10% con respecto al grupo control (Kushak et al., 2000).

Durante el periodo del estudio, las ratas no mostraron ninguna alteración fisiológica ni de comportamiento.

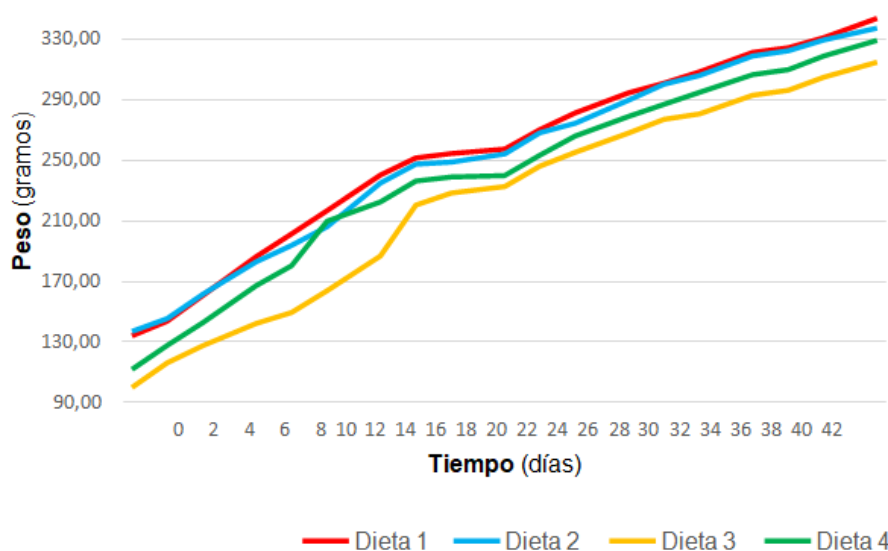


Figura 26. Ganancia de peso de las ratas mientras se las estuvo alimentando con las diferentes dietas. Los datos son el valor medio para cada grupo.

Desde un punto de vista energético, la acumulación de tejido graso como causante del aumento de peso es consecuencia del

5. Resultados y Discusión

exceso de energía consumida por los animales sobre los requerimientos de mantenimiento (Soller y Eitan, 1984). También se puede expresar a nivel celular como el momento en que la síntesis de macromoléculas supera a la degradación de las mismas. Para poder estimar si la dieta suministrada a los animales aporta un exceso de energía respecto a la que el organismo necesita para el mantenimiento del buen estado de sus tejidos, se calcula la eficiencia nutricional medida como el coeficiente entre los gramos de alimento consumidos y los gramos de peso ganados, de forma que si el cociente fuese negativo los nutrientes aportados no estarían satisfaciendo las necesidades del organismo y si es muy elevado, el incremento de peso se estaría produciendo por un acúmulo de tejidos grasos en lugar de músculo y hueso, con lo que la dieta tampoco sería adecuada (Webster, 1989).

En nuestro estudio se aprecia que para todos los grupos el cociente es positivo (Figura 27), indicando que la sustitución de la parte correspondiente al alimento convencional por la microalga no genera déficit nutricional en comparación con la Dieta 1 (Control).

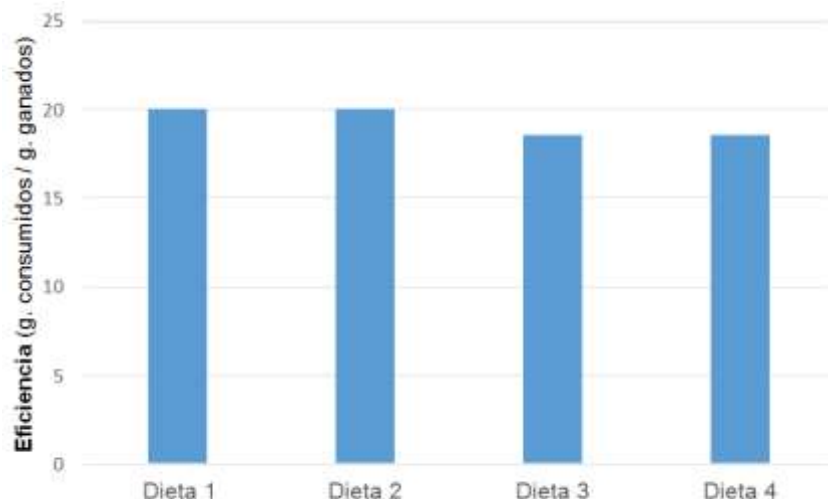


Figura 27. Eficiencia de las diferentes dietas. Los datos son el valor medio para cada grupo.

5. 2.2. Estudio histopatológico del hígado y riñón

Al final del experimento, cada rata fue sacrificada y su hígado y riñones fueron extraídos y estudiados. Los órganos recién extirpados presentaron un aspecto normal en cada uno de los grupos y los hígados pesaron una media de 10.48 ± 0.55 g y los riñones 2.13 ± 0.28 g (Tabla 11), dentro de lo normal para su edad y sexo. Los pesos relativos de estos órganos (g / 100 g del peso corporal) fueron similares estadísticamente para todos los grupos de ratas. Las proporciones más altas se dieron en la Dieta 1 y la Dieta 4, ambos con una relación de 3 g por cada 100 g de peso corporal de animal para el hígado y 0.60 g para el riñón (Tabla 11).

5. Resultados y Discusión

Tabla 11. Parámetros zoométricos de las ratas control y las ratas alimentadas con *Coccomyxa onubensis*

Parámetros zoométricos	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Peso inicial (g)	134±4.64	137±2.38	125±4.64	123±3.35
Peso final (g)	344±6.62	338±7.72	336±8.76	328±7.77
Ganancia de peso (g)	210±8.08	201±8.07	211±9.91	205±8.46
Consumo de alimento (g)	1058±43.38	1016±40.65	939.5±43.22	902±37.88
Eficiencia de alimentación	5.04±0.20	5.06±0.22	4.45±0.17	4.40±0.11
Peso del hígado (g)	10.48±0.55	9.68±0.36	9.78±0.24	9.85±0.64
Peso relativo(g/100g pc)	3.00	2.86	2.90	3.00
Peso del riñón (g)	2.13±0.28	2.04±0.35	1.97±0.42	2.01±0.38
Peso relativo(g/100g pc)	0.60	0.60	0.50	0.60

Cada valor está expresado como la media ± error estándar (n=6) en cada grupo. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el test Kruskal – Wallis.

No se observaron diferencias significativas para un valor de $p < 0.05$ entre las diferentes dietas. pc: peso corporal

Tanto la medida del grosor y la configuración de las trabéculas, la presencia de cambios regenerativos y la evaluación inicial de fibrosis en el hígado indicaron que no hubo alteraciones patológicas en ninguno de los cuatro grupos de estudio. (Figura 28a – d). Además, los parámetros celulares indicadores de degeneración y de deposición de sustancias como la inflamación celular degenerativa (ICD), o “balloning”, la presencia de colestasis y de macro y micro esteatosis vesicular, se encontraron dentro de los rangos normales en todos grupos. Todas las secciones estudiadas mostraron una arquitectura sana del hepatocito tanto en el parénquima como en la vena central, con grados similares de estenosis en los diferentes grupos de ratas. Se identificaron alteraciones llamativas en el patrón de cromatina de

los núcleos de los hepatocitos del grupo Dieta 4 (Figura 28d), destacado por una cromatina grumosa con tendencia al aclaramiento, con nucléolo prominente, a veces múltiple, que se traduce como una activación en la maquinaria nuclear intensa, aunque dichas alteraciones tienen carácter reversible y no afectan a la integridad celular ni a la salud de los animales.

De igual forma, los citoplasmas presentaron un incremento de la absorción de hematoxilina en algunas áreas pero sin síntomas de ICD. No se observa binucleación ni pleomorfismo nuclear. Existe incremento en el número de mitosis, congestión de sinusoides (a veces acompañado de las venas centrolobulillares), incremento de leucocitos mononucleares (agranulocitos) de los sinusoides y ocasionales eosinófilos polimorfonucleares (granulocitos). Las células de Kupffer son muy visibles.

Tampoco se encontró daño hepatocelular, como tejidos necróticos o apoptóticos. Los tipos celulares predominantes en el tejido y los niveles de inflamación también fueron normales. (Figura 28a y b).

Con respecto al tejido del riñón, la atención se concentró en el glomérulo, donde se estudió la posible presencia de esclerosis, infiltrados inflamatorios, trombos y/o depósitos. También se observaron el intersticio renal y los túbulos, en busca de la presencia de atrofia, infiltrados inflamatorios, necrosis y depósitos. Todas las secciones estudiadas en cada uno de los diferentes grupos de animales presentaban una histología normal, sin signos de degeneración (Figura 28e – h).

En las regiones corticales del riñón, donde se localiza la cápsula de Bowman y el espacio capsular, tampoco se observaron alteraciones histológicas y los podocitos se hallaban distribuidos de manera normal, independientemente de la dieta que las ratas recibieron. (Figura 28e y f). Los túbulos contorneados proximales y los

5. Resultados y Discusión

distales también mostraron una distribución normal de las células epiteliales. La mayoría de los túbulos en la médula (Figura 28g y h) presentaron una sección longitudinal y un epitelio de los túbulos colectores intactos. Se prestó especial atención a la estructura formada por los vasos capilares para identificar la posible presencia de vasculitis, trombos, hialinización o esclerosis, pero todas las secciones histológicas estudiadas presentaban unas características normales, indicando así la falta de toxicidad de las dietas que contienen *Coccomyxa onubensis* en polvo.

Relacionado con estas observaciones, se ha descrito una falta de toxicidad en gallinas ponedoras alimentadas con una dieta suplementada con biomasa de la microalga verde *Desmodesmus sp.* o la diatomea *Staurospira sp.* (Kushak et al., 2000). Por otra parte, el alto contenido en compuestos fenólicos presentes en la biomasa de *Spirulina platensis* parece ejercer un efecto hepatoprotector en ratas (Kepekçi et al., 2013).

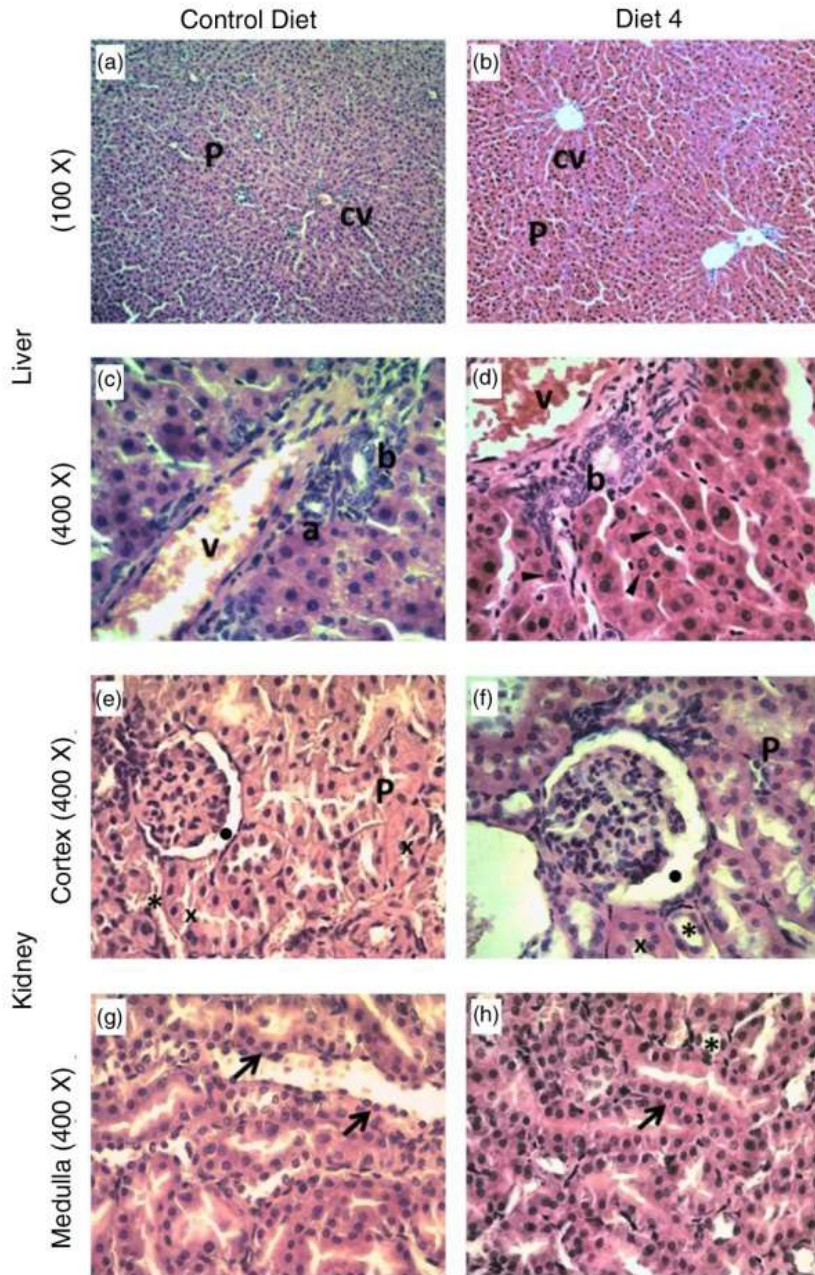


Figura 28. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina de hígado y riñón de ratas experimentales. Hígado: a, b. Arquitectura del hepatocito en parénquima (P) y vena central (cv). c, d. Mayor aumento de las secciones hepáticas donde en el espacio porta se puede observar: la vena portal normal (v), arteria (a), y conducto biliar (b) sin oclusiones. d. Las flechas muestran los núcleos de los hepatocitos. Riñón: e-h. Las secciones del córtex (punto negro) y túbulo contorneado proximal (x) y túbulo distal (asteriscos) se muestran en e, f, g, h: Médula. Sección longitudinal del epitelio del túbulo (flechas negras).

5. Resultados y Discusión

5. 2.3. Parámetros hematológicos y séricos de las ratas alimentadas con *C. onubensis*

En la tabla 12 se muestran los parámetros hematológicos de los cuatro grupos estudiados. No se identificaron diferencias significativas entre los grupos, y los perfiles sanguíneos fueron típicos de animales sanos. En cuanto a los parámetros bioquímicos, el contenido de proteína total en el plasma fue significativamente menor en los individuos que se alimentaron con la Dieta 3 y la Dieta 4, las cuales son las que presentan mayor contenido en la microalga.

5. 2.3.1. Hematología

La hematología comprende el estudio del paquete celular, el perfil o el estado sanguíneo, teniendo en cuenta el recuento de eritrocitos (y valor del hematocrito), el recuento de leucocitos, la determinación de hemoglobina, la fórmula leucocitaria (recuento diferencial de leucocitos) y la determinación de las plaquetas.

Se aprecia un incremento en el número de eritrocitos tras suministrar la microalga (Figura 29). Este incremento alcanza un máximo para el suplemento de la dieta con el 1.25% en peso del alga (Dieta 3 y 4), sin llegar a ocasionar una policitemia, ya que los valores máximos descritos para la rata macho adulta, pueden alcanzar los $9.20 \times 10^6/\mu\text{l}$.

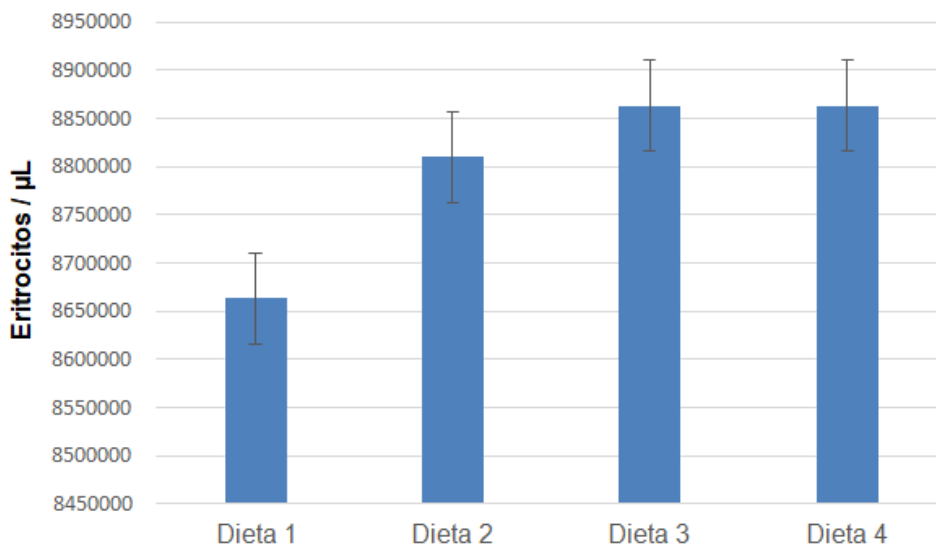


Figura 29. Valores de glóbulos rojos en las ratas tras las diferentes dietas.

Los valores de hemoglobina obtenidos se encuentran dentro del rango normal (14–20 g/dL), aunque se observa un aumento de ésta conforme se incrementa la concentración de *Coccomyxa onunbensis* en las dietas (Figura 30).

5. Resultados y Discusión

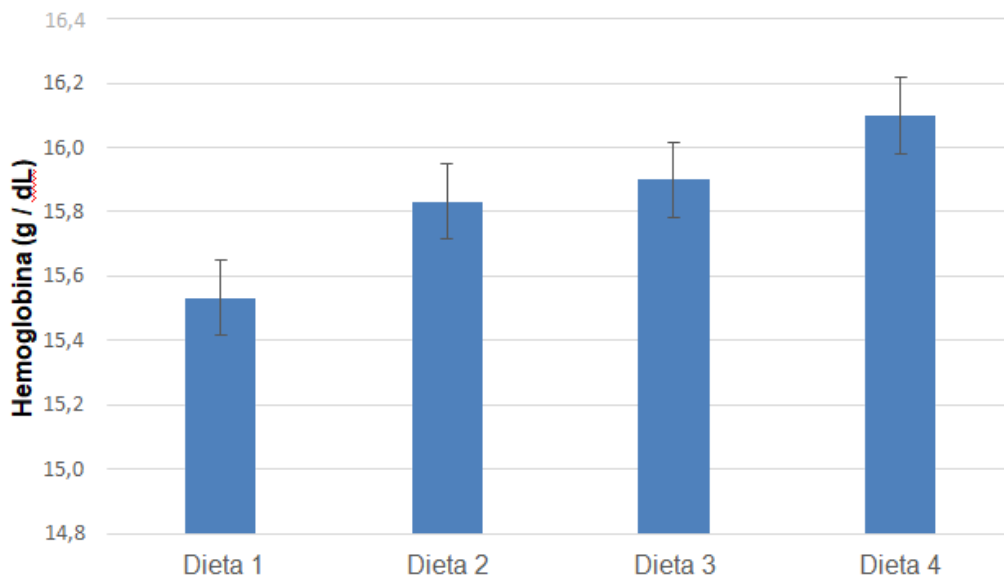


Figura 30. Concentración de hemoglobina en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6).

El valor del hematocrito constituye un índice indirecto de la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre además de ser un parámetro importante para detectar anemia o policitemia. Los valores de hematocrito obtenidos se encuentran dentro del intervalo normal (36 – 48%) aunque, al igual que en los casos anteriores, se observa un suave incremento a medida que se aumenta el porcentaje de *Coccomyxa onubensis* en la dieta (Figura 31).

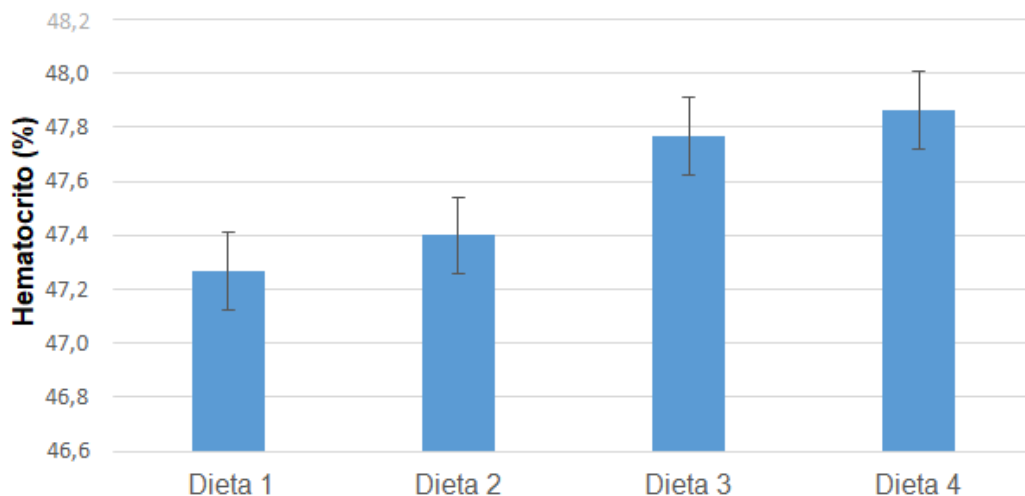


Figura 31. Valores de hematocrito (en %) en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6).

Un efecto similar es observado en la serie blanca (Figuras 32 y 33). Todos los valores observados se encuentran dentro de los rangos normales de leucocitos para una rata ($4,84 - 12,96 \times 10^3$ cél/ μ L), aunque se observa que la ingesta de *Coccomyxa onubensis* produce un ligero aumento, estadísticamente no significativo, de leucocitos a medida que aumenta la concentración de la misma.

5. Resultados y Discusión

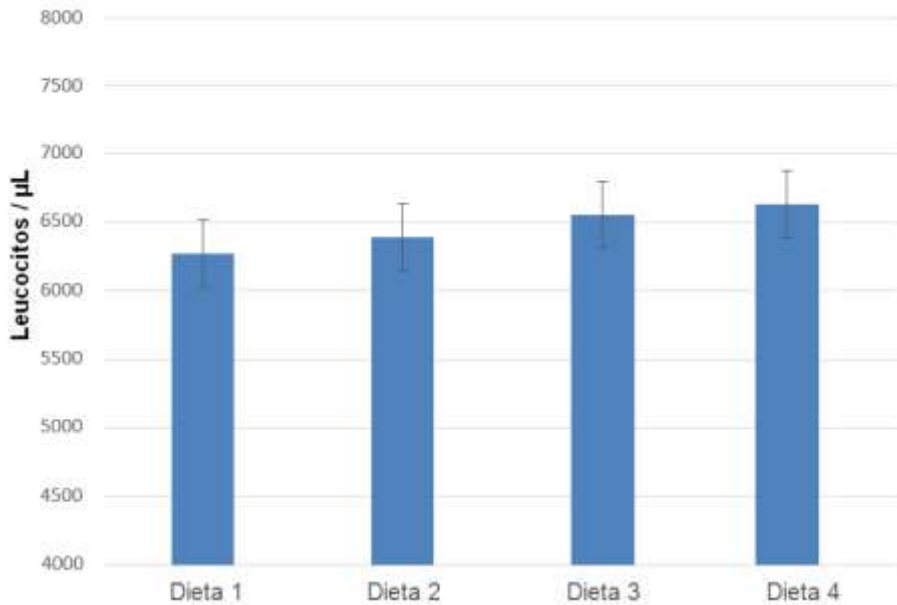


Figura 32. Valores de leucocitos en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6).

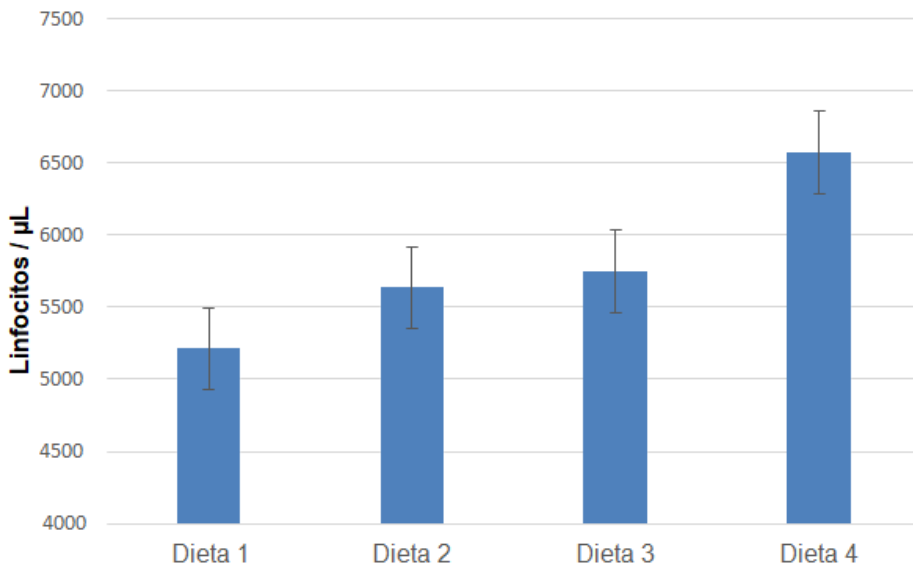


Figura 33. Valores de linfocitos en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6).

Tabla 12. Parámetros hematológicos de las ratas alimentadas con dieta control (Dieta 1) o con dietas suplementadas con *Coccomyxa onubensis* a concentraciones crecientes.

Parámetros	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Hemoglobina (g/dL)	14.58 ± 0.99	14.78 ± 1.1	15.88 ± 0.11	16.08 ± 0.05
Hematocrito (%)	44.43 ± 2.93	44.25 ± 3.12	47.38 ± 0.46	48.00 ± 0.36
Eritrocitos (cél.x10 ⁻⁶ /μL)	8.66 ± 0.60	8.24 ± 0.57	8.76 ± 0.13	8.61 ± 0.03
Leucocitos (cél.x10 ⁻³ /μL)	5.57 ± 0.89	5.35 ± 1.01	8.23 ± 1.89	6.65 ± 1.02
Linfocitos (%)	84.75 ± 1.89	90.00 ± 2.64	85.75 ± 2.06	89.75 ± 0.63
Plaquetas (cél.x10 ⁻³ /μL)	584.67 ± 18.46	618.33 ± 29.80	665.00 ± 10.13	779 ± 14.12

Los datos fueron obtenidos al final del experimento (45 días) tras 8 horas de ayuno. Cada valor está expresado como la media ± error estándar (n=6). Los resultados fueron analizados estadísticamente con el test Kruskal – Wallis.

No se observaron diferencias significativas para un valor de p<0.05 entre las diferentes dietas.

5. 2.3.2. Bioquímica sanguínea

La glucemia en ratas alimentadas con la Dieta 4 (115.50 mg/dL) fue superior que en el grupo control (70 mg/dL, Dieta 1) (Tabla 13). De todas formas, los valores nunca excedieron los 135 mg/dL, valor que es considerado el límite superior saludable en ratas sanas. Los hallazgos previos sobre la concentración de glucosa en plasma en animales alimentados con biomasa provenientes de microalgas han sido motivo de disputa. Por ejemplo, *I. galbana* induce un descenso en los valores de glucosa y colesterol plasmáticos, mientras que el

5. Resultados y Discusión

consumo de *N. oculata* no muestra un beneficio para ratas sanas y diabéticas (Nuño et al., 2013). El moderado efecto hiperglucemiante inducido por el consumo de *Coccomyxa onubensis* en nuestras ratas de estudio (Tabla 13) no tiene, aparentemente, consecuencias en el estado de salud del animal. Este efecto no puede ser atribuido directamente al consumo de la microalga porque los hidratos de carbono solubles presentes en su biomasa son escasos (Tabla 10).

Tabla 13. Parámetros bioquímicos de las ratas alimentadas con dieta control o con dietas suplementadas con *Coccomyxa onubensis*

Parámetros	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Proteína total (g/dL)	6.05±0.05	6.18±0.02	5.45±0.31 [#]	5.65±0.35 [#]
Albumina (g/dL)	4.40±0.11	4.48±0.11	4.23±0.25	4.28±0.23
Ca ²⁺ (mg/dL)	10.40±0.50	10.40±0.50	10.19±0.19	10.40±0.32
Na ⁺ (mEq/L)	145.00±0.82	146.00±1.78	144.25±1.65	147.00±0.91
K ⁺ (mEq/L)	4.43±0.19	4.43±0.19	5.26±0.69	4.22±0.38
Cl ⁻ (mEq/L)	90.13±1.07	98.13±1.07	99.15±0.65	99.88±1.62
Glucosa (mg/dL)	70.18±4.97	99.68±7.63	115.50±14.47	103.03±15.44
Creatinina (mg/dL)	0.32±0.02	0.32±0.02	0.32±0.02	0.27±0.03
Fe ²⁺ (µg/dL)	128.90±6.44	136.33±7.16	137.45±7.89	139.58±11.89
Ferritina (ng/mL)	185.30±5.52	177.93±2.81	174.38±9.97	152.70±25.70
Bilirrubina (mg/dL)	0.04±0.01	0.07±0.01	0.10±0.02	0.08±0.03

Los datos fueron obtenidos al final del experimento (45 días) tras 8 horas de ayuno. Cada valor está expresado como la media ± error estándar (n=6). Los resultados fueron analizados estadísticamente con el test Kruskal – Wallis.

La única diferencia significativa fue para la proteína total. *p<0.05 comparada con el grupo control. # p<0.05 comparado con los otros grupos. No se observaron diferencias significativas para p<0.05 para los diferentes parámetros.

5. 2.3.2.1. Efecto de *C. onubensis* sobre los diferentes órganos

Se llevó a cabo el estudio bioquímico del hígado mediante el análisis de las transaminasas, enzimas presentes dentro de los hepatocitos que, en el caso de existir daño hepático, son liberadas al torrente sanguíneo en grandes cantidades. Dichas transaminasas pueden liberarse tanto debido a procesos ligados a necrosis celular, como debidos al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, o cualquier alteración metabólica anómala.

La transaminasa glutámico oxalacética GOT (transaminasa glutamato-oxalacetato), también llamada AST (amino aspartato tranferasa), es una enzima con gran concentración en el corazón, en el hígado y en los músculos. Cuando hay una lesión de estos órganos, la enzima es liberada a la sangre y aparecen valores elevados. La transaminasa GPT (transaminasa glutámico pirúvica), o ALT (alanina aminotransferasa), es una enzima con gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, el corazón y los músculos. Cuando hay una lesión de estos órganos, la enzima es liberada a la sangre y aparece elevada en los análisis. Por tanto, al ser una transaminasa más específicamente hepática que la GOT, aparece más elevada en las enfermedades hepáticas.

En nuestro caso, se observa que la ingesta de *Coccomyxa onubensis* hace disminuir la cantidad de ambas transaminasas en la sangre (Figuras 34 y 35); es decir, que produce una disminución de la actividad de los órganos antes descritos ejerciendo un efecto hepatoprotector.

5. Resultados y Discusión

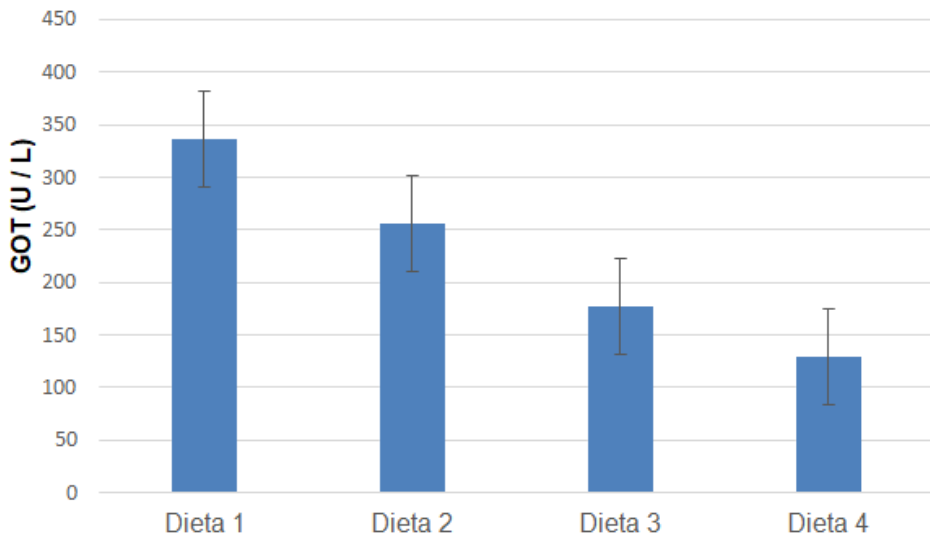


Figura 34. Valores de GOT (U/L) en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6).

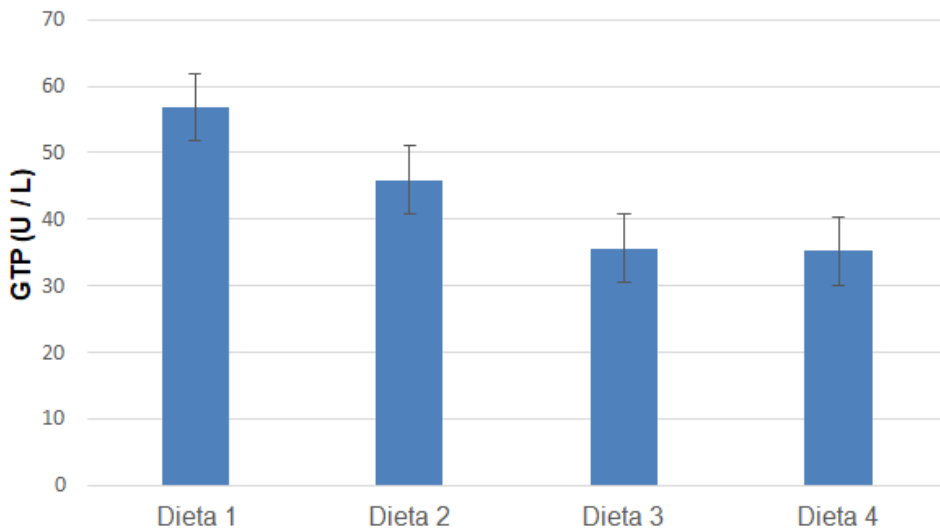


Figura 35. Valores de GTP (U/L) en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6).

Otra de las enzimas serológicas analizadas fue la fosfatasa alcalina, una fosfomonoesterasa ligada a la membrana celular, constituida por un grupo de isoenzimas que catalizan la liberación de fosfato de ésteres monofosfóricos a pH alcalino (Briozzo et al, 2008). Clínicamente es empleada como marcador de la colestasis (daño hepático celular que resulta en un flujo biliar disminuido o ausente) cuando se eleva su contenido en sangre. Sin embargo, cabe destacar que la fosfatasa alcalina puede estar presente en otros órganos, por lo que se requiere de pruebas suplementarias para evaluarla y confirmar así que su aumento proviene del sistema biliar o del hígado (Contreras, 2003 y Andrade, 2007). Por ejemplo, se encuentra en grandes cantidades en los osteoblastos, por lo que las elevaciones séricas de este enzima cuando se descarta el daño hepático apuntan hacia un incremento en la actividad osteoblástica propia del crecimiento óseo (Farreras, 2012).

En nuestro estudio, tras suplementar la dieta de las ratas con *Coccomyxa onubensis*, se observó una bajada de la actividad fosfatasa alcalina en la sangre (Figura 36), que se acentuó con la dosis administrada. Estos resultados corroboran los obtenidos para las transaminasas y el posible papel hepatoprotector de la microalga.

5. Resultados y Discusión

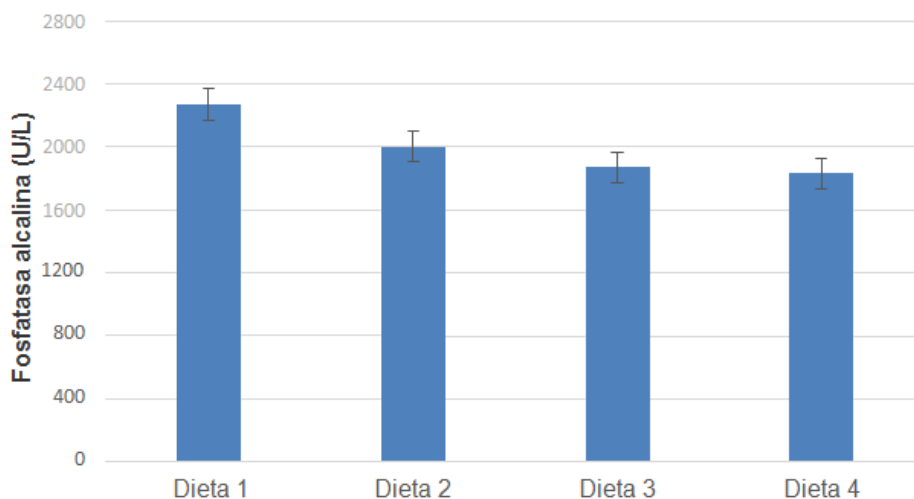


Figura 36. Valores de fosfatasa alcalina (U/L) en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6).

El páncreas es uno de los órganos encargados de la regulación de la síntesis de enzimas necesarias para la digestión, para lo cual secreta dos hormonas exocrinas en el duodeno (secretina y colecistoquinina, o CCK). Éstas son necesarias para el correcto funcionamiento del aparato gastrointestinal, favoreciendo la actividad digestiva y aportando el pH óptimo para la función de las mismas, por lo que los fallos en el páncreas inducidos por la alteración de la dieta podrían provocar problemas asociados al descenso en la tasa digestiva y disminución de la absorción de nutrientes.

Los analitos empleados son enzimas que se encargan de digerir los carbohidratos (amilasa) y las grasas (lipasa) de la dieta, descomponiéndolos, en el caso de la lipasa, en ácidos grasos que, posteriormente, serán incorporados al organismo. En el caso de denotarse problemas asociados a un mal funcionamiento pancreático

(por enfermedad o inflamación), estas enzimas serían liberadas a la sangre, aumentando los niveles de éstos en el perfil sérico.

Por medio del análisis bioquímico de la sangre se determinó el estado pancreático de las ratas, concretamente mediante la valoración de la amilasa total y la lipasa en sangre (Ameijeiras et al., 2007). El páncreas presenta dos funciones, una endocrina, responsable de secreción de hormonas, y una exocrina, encargada de la síntesis de enzimas, segregadas al duodeno, necesarias para la correcta actividad digestiva del aparato gastrointestinal y para alcanzar un pH óptimo para la función de las mismas.

La amilasa, producida en las glándulas salivares además de en el riñón, es una enzima que ayuda a digerir los carbohidratos. Cuando el páncreas está enfermo o inflamado se libera amilasa en la sangre.

La lipasa es secretada por el páncreas dentro del intestino delgado con la finalidad de digerir la grasa de la dieta, descomponiéndola en ácidos grasos.

Ambas enzimas disminuyeron con la ingesta de la microalga (Figuras 37 y 38), seguramente consecuencia de la reducción del porcentaje de grasa animal ingerida respecto de la dieta control, la cual ha sido sustituida por el alga en el resto de dietas.

5. Resultados y Discusión

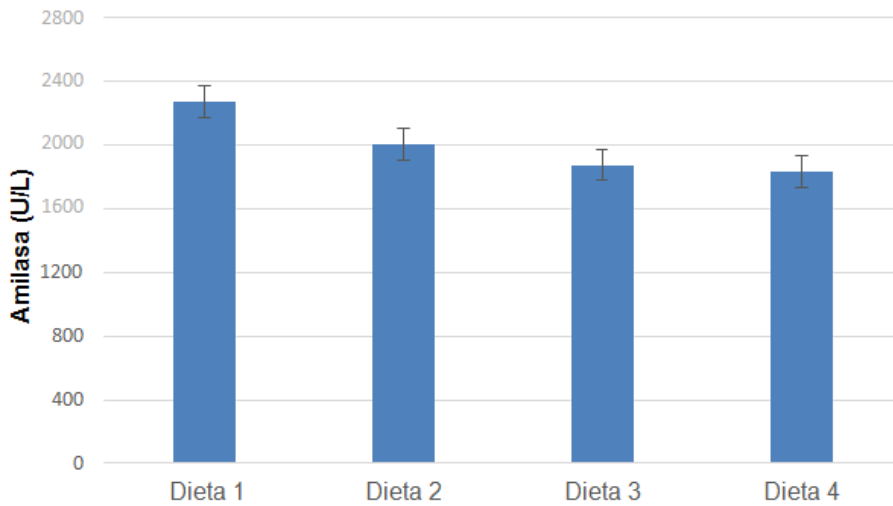


Figura 37. Valores de amilasa (U/L) en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6).

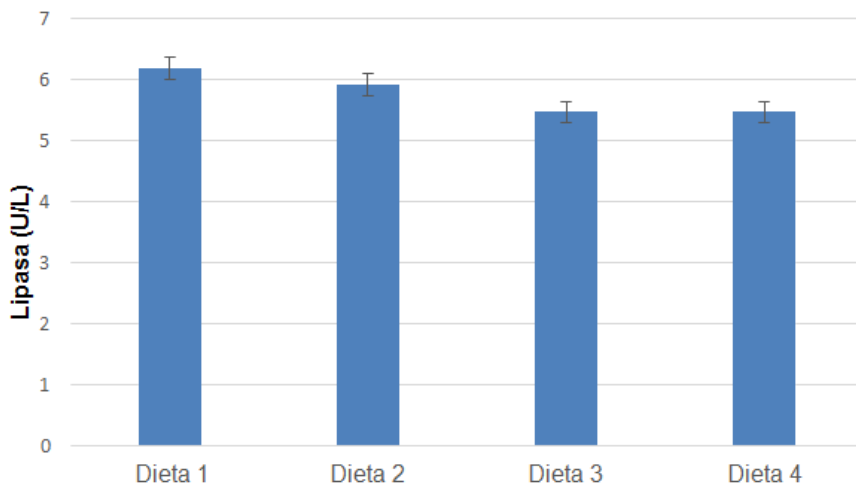


Figura 38. Valores de lipasa (U/L) en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6).

Finalmente, se valoró el estado metabólico del riñón mediante la medida de los valores de creatinina en el suero sanguíneo. La creatinina es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina (que se sintetiza en el hígado, el páncreas y los riñones, formado por los aminoácidos metionina, arginina y glicina, y se almacena en las células musculares como fosfocreatina para ser empleado como “combustible” celular) y que resulta como producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que habitualmente produce el cuerpo en una tasa muy constante (dependiendo de la masa muscular) y que normalmente filtran los riñones excretándose en la orina. En el caso de existir daño renal, se presentarían valores elevados de creatinina en el flujo sanguíneo debido a una disminución en la capacidad de filtración de los riñones.

El rango normal de creatinina para las ratas se encuentra entre 0,2-0,5 mg/dL, luego en nuestro ensayo todos los valores se encuentran dentro de la normalidad, aunque parece que a altas dosis de la microalga, se reduce ligeramente, aunque sin implicaciones fisiológicas (Figura 39).

5. Resultados y Discusión

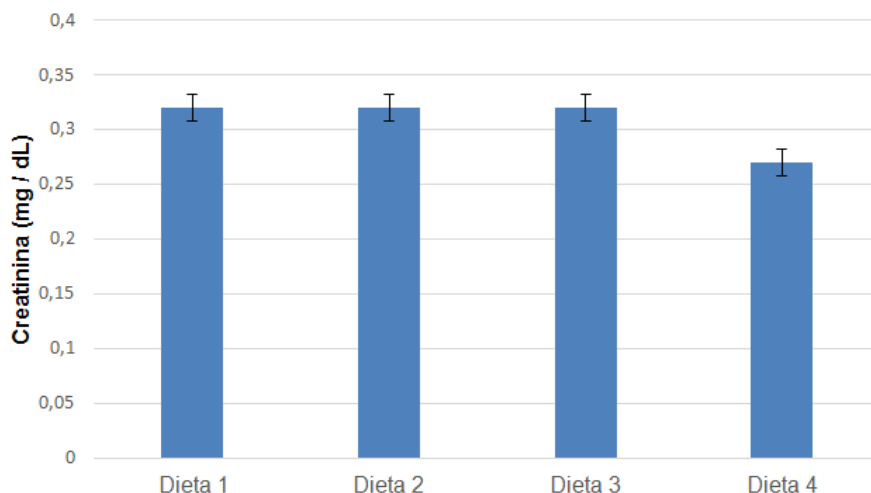


Figura 39. Valores de creatinina (mg/dL) en las ratas para las diferentes dietas. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado como la media \pm error estándar (n=6)

5. 2.3.3. Perfil lipídico

El estudio clínico del perfil lipídico es un procedimiento analítico básico en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades metabólicas.

El colesterol desempeña muchas funciones biológicas, como regular la fluidez de las membranas celulares y ser el precursor de ácidos biliares, hormonas esteroideas y de la vitamina D. Así mismo, el metabolismo del colesterol está relacionado con enfermedades cardiovasculares y con la aparición de cálculos biliares.

Debido al carácter hidrofóbico de estos compuestos, no se encuentran libres en el plasma sanguíneo sino que son transportados por proteínas. Existen diversas clases de lipoproteínas en base a su densidad, el lípido que transportan y las apoproteínas que conforman su estructura. En función de su densidad las lipoproteínas se clasifican como se indica en la Tabla 14.

Tabla 14. Diferentes lipoproteínas presentes en el plasma sanguíneo de las ratas.

Lipoproteína	Valor de referencia (mg/dL)	Lípido	Apoproteínas	Función
Quilomicrones	<0.95	TAG	B48 (A, C, E)	Transporte de TAG desde el intestino a tejidos periféricos
VLDL	0.95 – 1.006	TAG	B100 (A, C, E)	Transporte de TAG desde el hígado a tejidos periféricos
LDL	1.019 – 1.063	CHO	B100	Transporte de colesterol en plasma (desde el hígado a tejidos periféricos)
HDL	1.063 – 1.210	CHO	AI, AII (C, E)	Transporte del exceso de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado

TAG: triacilglicerolos.

Niveles altos de colesterol pueden aumentar la probabilidad de padecer diferentes enfermedades, como cardiopatías, accidentes cerebrovasculares y otros. El término médico para los niveles altos de colesterol en la sangre es hipercolesterolemia, o hiperlipidemia, que es debida a un trastorno lipídico, ya que no puede considerarse una patología sino un desajuste metabólico que puede ser secundario a muchas enfermedades y contribuir a muchas formas de enfermedad, especialmente cardiovasculares. El colesterol elevado en la sangre se debe al desequilibrio en los niveles de lipoproteínas detallados en la tabla anterior.

5. Resultados y Discusión

A diferencia de como ocurre con la glucemia, no existe un valor específico en el cual los niveles de colesterol sean anormales sino que los niveles de colesterol más altos llevan al riesgo creciente de enfermedad. Además, no basta con medir el colesterol total ya que es importante medir sus subfracciones antes de sacar una conclusión en cuanto a la causa del problema. (Durrington, 2003).

Las subfracciones son LDL (lipoproteínas de baja densidad), HDL (lipoproteínas de alta densidad) y VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad). En el pasado, los niveles de LDL y de VLDL se medían muy raramente debido a su alto costo, y no se discernía cuánto colesterol dentro del total estaba realmente originando un riesgo vascular. No obstante, los niveles de VLDL se reflejan en los niveles de triglicéridos (generalmente cerca del 45% de triglicéridos se componen de VLDL), lo que podría dar idea de la gravedad de la situación del paciente.

A pesar de presentar un contenido rico en lípidos (Tabla 10), las dietas suplementadas con *Coccomyxa onubensis* en polvo indujeron una importante disminución del contenido en triglicéridos en el plasma, que alcanzó el 50% en las ratas alimentadas con la Dieta 4 con respecto a las ratas alimentadas con la Dieta 1. Una disminución similar se observó para el colesterol VLDL, mientras que el colesterol total decreció alrededor de un 20%. Por el contrario, el colesterol HDL disminuyó un 25 % mientras que el contenido de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) aumentó un 30% (Figura 40).

Este fenómeno se corresponde con el denominado “efecto hipolipemiante”, que se debe a la administración de fármacos para reducir los niveles de lípidos en sangre, es decir, que la bajada de las fracciones no sigue el perfil de los efectos observados cuando se toma una dieta baja en grasas y rica en fibra, donde los niveles de HDL aumentan. Por lo tanto, cabe interpretar que la microalga produce

dicho efecto farmacológico, ya descrito en algunas especies vegetales como *Cymbopogon citratus* (Betancourt Morgado et al., 2014) y en la ingesta de Estatinas, Fibratos y Omega-3.

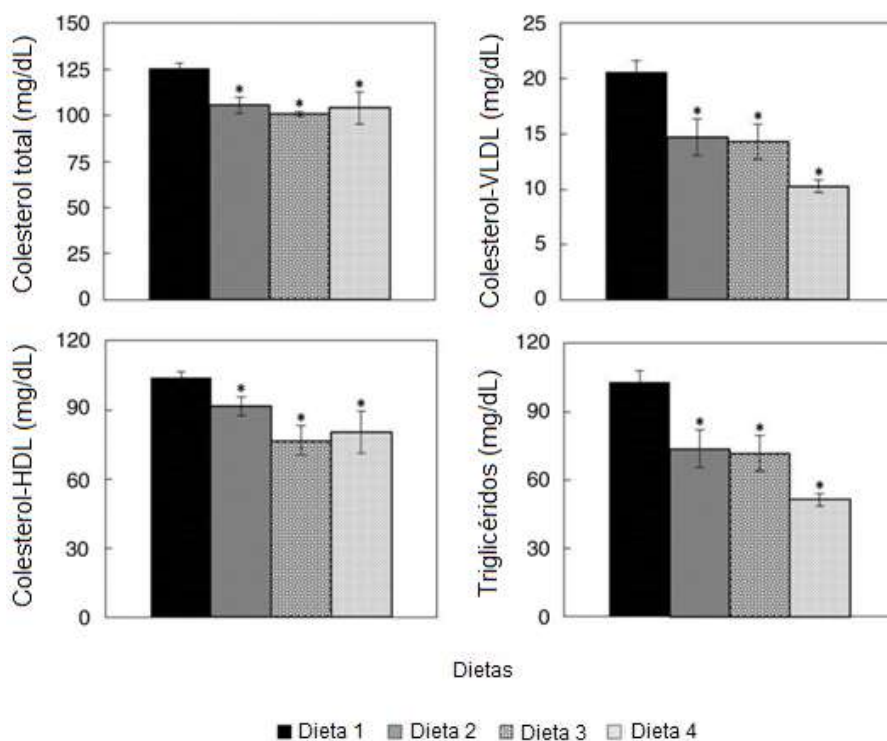


Figura 40. Perfil lipídico en ratas alimentadas con suplemento de biomasa de *C. onubensis*. Las condiciones experimentales se describen en Material y métodos. Cada valor está expresado con la media \pm error estándar ($n=6$). Los resultados fueron analizados estadísticamente con el test Kruskal – Wallis. * $p<0.05$ comparado con el grupo control. Ninguna de las dietas enriquecidas mostraron diferencias significativas entre ellas para un valor de $p<0.05$. HDL = lípidos de alta densidad. VLDL= lípidos de muy baja densidad.

Por otro lado, los niveles de parámetros como ferritina, bilirrubina y los de iones Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , y Fe^{2+} fueron similares en

5. Resultados y Discusión

todos los grupos de ratas, estando todos ellos dentro de los rangos normales (Tabla 13).

Por tanto, los estudios histológicos previamente descritos junto con los análisis hematológicos y bioquímicos, han demostrado que las dietas suplementadas con *Coccomyxa onubensis* en polvo no están asociadas a ningún efecto secundario no deseado ni a toxicidad. La microalga también ha mostrado tener una potente actividad hipolipemiante en las ratas, que sugiere que *C. onubensis* podría ser usada como fuente de nutraceuticos en alimentación o en aplicaciones farmacológicas. Es importante remarcar que, tanto en humanos como en roedores, el hígado es el órgano principal donde se produce una lipogénesis “*de novo*”, siendo la glucosa la fuente principal de carbono para este proceso (Bergen y Mersmann, 2005), el cual también ha sido descrito para una infusión de biomasa fermentada de algas (ProAlgaZyme), la cual induce una reducción significativa del peso y la grasa corporal, del colesterol total, del colesterol LDL y de los triglicéridos, mientras que aumenta los niveles de colesterol HDL. Esta infusión es bien tolerada por los animales y no se han observado efectos secundarios (Geamanu et al., 2013).

También cabe destacar los interesantes resultados obtenidos con *Chlorella pyrenoidosa*, microalga que ha demostrado prevenir la hiperlipidemia y la arterioesclerosis en ratas y hamsters alimentados de forma continua con una dieta rica en grasas (Cherng y Shih, 2005). Así mismo, un estudio realizado en gallinas demostró que suplementos, tanto del 5 como del 10%, de biomasa de *Porphyridium sp.* en la dieta fueron efectivos a la hora de bajar los niveles de colesterol, además de observarse una tendencia a la baja de los niveles de colesterol en los huevos de estos animales (Ginzberg et al., 2000).

En consecuencia a lo descrito en la bibliografía antes reseñada, el siguiente paso en nuestra investigación fue examinar si el

efecto hipolipemiente de *C. onubensis* se reproducía en ratas alimentadas con una dieta rica en colesterol y grasas saturadas, y poder estimar el alcance de su capacidad deslipemiente, ya que hasta ahora no conocemos si la actividad observada es debida a algún principio activo de la microalga o simplemente se debe a una mayor ingesta de fibra en las dietas de los roedores.

En este contexto y como hemos descrito en la introducción de esta tesis, es conocido cómo los ácidos grasos poliinsaturados reducen los niveles de colesterol LDL y HDL (Komprda et al., 2014). El contenido lipídico de *C. onubensis* es rico en ácidos grasos poliinsaturados (Tabla 10), y podría ser el responsable del perfil lipídico observado en las ratas del estudio, aunque no debemos descartar que la presencia de otros componentes también esté involucrada. Así, por ejemplo, nuestro estudio ha mostrado que la microalga acidófila *C. onubensis* presenta un buen contenido en fibra dietética, la cual ha podido ayudar a promover los resultados de hipocolesterolemia e hipotrigliceridemia en las ratas de estudio. Se ha demostrado que los polisacáridos y la fibra dietética están involucrados en el efecto hipolipidémico de *Porphyridium* (Dvir et al., 2000) y que el consumo de fibra dietética está asociada con cambios en el metabolismo lipídico (Spolaore et al., 2006). Además, se ha descrito que los polisacáridos solubles y la biomasa obtenida de la microalga roja *Porphyridium sp.* alteró la morfología intestinal y redujo el colesterol en ratas (Dvir et al., 2000).

En humanos también se han demostrado los efectos beneficiosos derivados de la presencia de polisacáridos procedentes de algas en la dieta (Mišurcová et al., 2012).

5. Resultados y Discusión

5. 3. Efectos antihiperglucémicos y antihiperlipidémicos de *Coccomyxa onubensis*

5. 3.1. Efectos de la biomasa de *Coccomyxa onubensis* en el peso corporal de las ratas

Ninguna de las dietas suministradas provocó la disminución en la ganancia de peso durante todo el experimento, de tal forma que las ratas de los cuatro grupos exhibieron un aumento de peso semanal constante (Figura 41), y al final del experimento mostraron un peso de:

- a) Dieta 1(control): 429.79 ± 17.13 g
- b) Dieta 2 (hipercolesterolémica): $458,24 \pm 17,80$ g
- c) Dieta 3 (hipercolesterolémica + *C. onubensis*): $463,01 \pm 18,80$ g
- d) Dieta 4 (hipercolesterolémica + atorvastatina): 433.73 ± 17.46 g

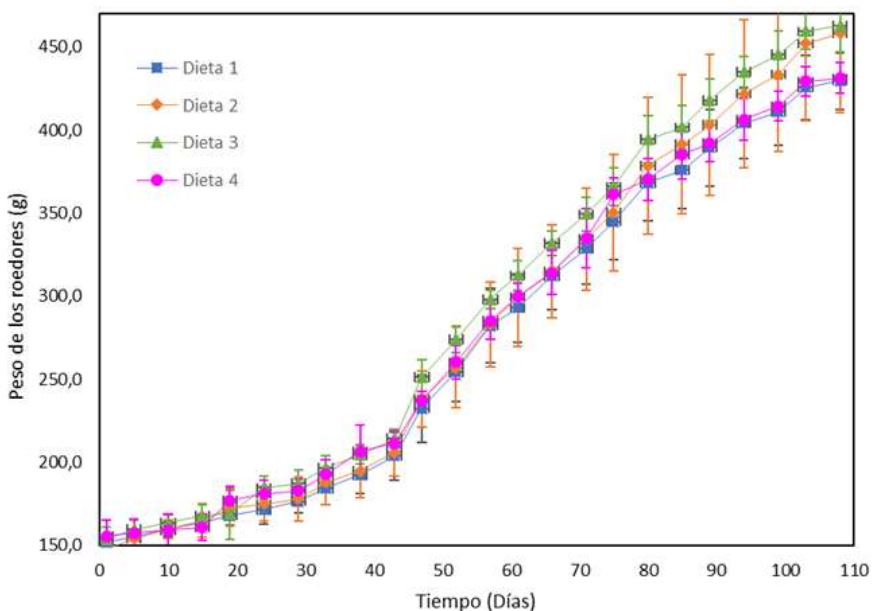


Figura 41. Ganancia de peso de los diferentes grupos durante el tiempo de estudio

El síndrome metabólico está relacionado con algunas enfermedades, como la diabetes, la aterosclerosis así como otros riesgos cardiovasculares en animales. Estas enfermedades pueden ser inducidas en animales de laboratorio al alimentarlos con una dieta hipercolesterolémica (Dvir et al., 2009; Li et al., 2018; Mayer et al., 2019), dieta rica en azúcares (Ryan et al., 2009; Kumar et al., 2015) o dieta que contengan ciertos fármacos (Nasirian et al., 2019), resultando en efectos hiperglucémicos e hiperlipidémicos para estos animales.

En nuestro estudio, las ratas no mostraron ninguna alteración fisiológica o conductual visible durante el periodo experimental salvo el mayor incremento de peso corporal propio de las dietas suministradas. La alimentación de animales de laboratorio con dietas hipercalóricas provoca un aumento de la ansiedad, una reducción de la locomoción (Kohsaka et al., 2007) y problemas de aprendizaje y retención de memoria (Winocur y Greengood, 2005; Freeman et al., 2014), consecuencias de los factores metabólicos y nutricionales alterados, aunque estos efectos se aprecian para ensayos de mayor duración que en el nuestro, por lo que en ninguno de los grupos se observó alguno de dichos efectos.

Es interesante mencionar que se han descrito ciertos beneficios para la salud derivados de la biomasa de *Nannochlorosis sp* en la dieta de ratas diabéticas (Nasirian et al., 2019) y de humanos (Werman et al. 2003), o de *Spirulina platensis*, que se considera generalmente segura para el consumo humano debido a la larga historia de su uso como fuente de alimento y por haber sido probado su uso seguro en estudios con animales (Deng y Chow, 2010); sin embargo, no hay estudios clínicos (en humanos) que prueben su seguridad (Nazih y Bard, 2018).

5. Resultados y Discusión

En nuestro estudio pudimos observar que, tras el tiempo del ensayo, el peso del hígado casi se duplicó en las ratas alimentadas con las dietas altas en grasas (25.18 ± 2.73 g) en comparación con los hígados de los animales que fueron alimentados con la dieta control (13.17 ± 0.91 g), y se observó un aumento significativo de peso en el bazo y el epidídimo, mientras que no se observaron cambios significativos en el peso en los riñones, corazón y cerebro de los animales (Tabla 15).

Tabla 15. Parámetros zoométricos para las ratas control (Dieta 1) o para las ratas alimentados con una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2), con una dieta hipercolesterolémica y suplementada con *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4).

Peso				
Animales/ Órganos (g)	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Día 1	151.9 ±1.30	150.5 ±7.5	153.7 ±6.8	155.5 ±8.9
Día 108	429.79 ±17.13	458.74 ±17.80	463.01 ±16.80	433.73 ±7.46
Hígado	13.17 ±0.91	25.18 ±2.73 ^a	26.41 ±1.50 ^a	22.65 ±1.03 ^a
Riñón	1.39 ±0.12	1.23 ±0.12	1.45 ±0.06	1.22 ±0.11
Epidídimo	1.81 ±0.50	2.54 ±0.40 ^a	2.22 ±0.86 ^a	1.86 ±0.23 ^a
Bazo	0.74 ±0.06	1.00 ±0.15 ^a	1.03 ±0.09 ^a	0.93 ±0.08 ^a
Corazón	1.19 ±0.06	1.27 ±0.07	1.27 ±0.07	1.17 ±0.09
Cerebro	2.04 ±0.09	2.11 ±0.05	2.03 ±0.08	2.07 ±0.06

Las ratas fueron alimentadas con las dietas indicadas durante 108 días, tras lo cual fueron sacrificadas y sus órganos estudiados. Cada valor está expresado como la media ± error estándar (n = 6) en todos los grupos. Los resultados fueron estadísticamente analizados con el test Kruskal-Wallis. Fueron observadas diferencias significativas (p <0.05) para el hígado, el bazo y el epidídimo en los diferentes grupos respecto al control (Dieta 1).

5. 3.2. Parámetros hematológicos y séricos de las ratas alimentadas con dieta hipercolesterolémica

5. 3.2.1. Hematología

5. Resultados y Discusión

El estudio de la hematología se basó en el recuento de eritrocitos (y valor hematocrítico), así como el recuento de leucocitos y la fórmula leucocitaria (recuento diferencial de leucocitos), y la determinación de hemoglobina. Los parámetros hematológicos medidos en las muestras de sangre extraídas de los roedores tales como la hemoglobina, el hematocrito, los eritrocitos, los linfocitos o las plaquetas, mostraron resultados similares y compatibles con animales sanos para todas las dietas expuestas (Tabla 16).

Tabla 16. Parámetros hematológicos de las ratas alimentadas con las diferentes dietas.

Parámetros	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Serie blanca	4,82 ± 0,71	4,73 ± 0,95	4,08 ± 0,85	5,07 ± 1,05
Serie roja	7,85 ± 0,14	8,40 ± 0,10	6,85 ± 0,94	8,05 ± 1,43
Hemoglobina	14,03 ± 0,55	13,88 ± 0,51	11,23 ± 1,06	13,18 ± 2,59
Hematocrito	44,13 ± 2,11	46,65 ± 1,71	36,68 ± 4,11	43,23 ± 8,38
VCM	56,18 ± 1,66	55,58 ± 1,50	53,73 ± 1,39	54,05 ± 1,35
Neutrófilos	0,37 ± 0,04	0,25 ± 0,09	0,40 ± 0,14	0,49 ± 0,15
Linfocitos	4,38 ± 0,67	4,35 ± 0,86	3,66 ± 0,58	4,23 ± 1,16
Monocitos	0,05 ± 0,03	0,10 ± 0,06	0,25 ± 0,26	0,30 ± 0,27
Eosinófilos	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,05 ± 0,06
Basófilos	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,09	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01

Los datos fueron obtenidos al final del experimento (108 días) tras 8 horas de ayuno. Cada valor está expresado como la media ± error estándar (n=6).
VCM: Volumen Corpúscular Medio

A pesar de no mostrar diferencias significativas, se puede observar que la suplementación de la dieta con *Coccomyxa onubensis* (Dieta 3) mostró una leve disminución, estadísticamente no significativa, de los niveles en hematíes, así como en los de leucocitos, con respecto a los niveles medidos del grupo control (Dieta 1) y de los grupos 2 y 4. No obstante, el recuento hematológico para todos los casos observados se mostró dentro de los rangos de normalidad sin presentar anemia o leucopenia tras la suplementación con microalga (Figura 42).

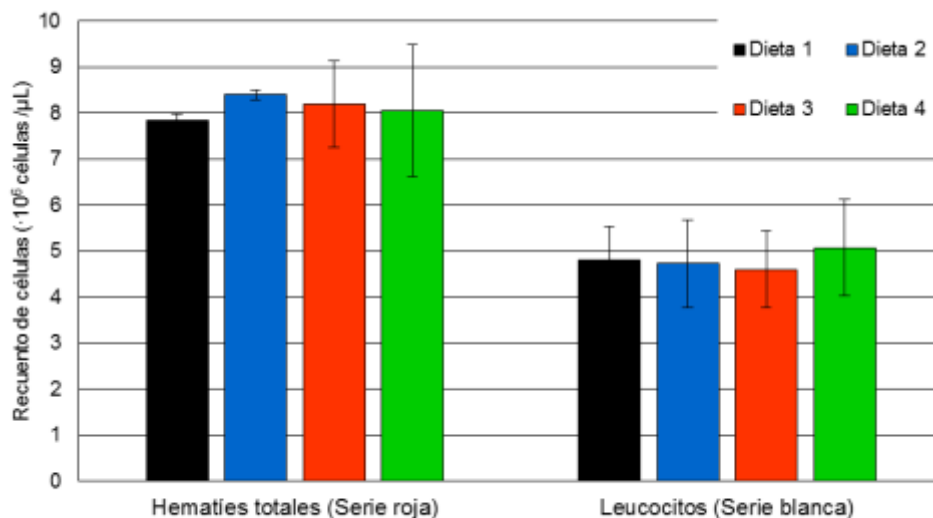


Figura 42. Efecto de la biomasa de *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4) sobre el recuento celular de hematíes y leucocitos respecto de una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2) y comparado con una dieta control (Dieta 1). Ningún resultado mostró cambios estadísticamente significativos frente a los valores de referencia del grupo control (Dieta 1) para $p < 0,05$.

Cuando se analizó la fórmula leucocitaria se observaron variaciones no significativas únicamente en el nivel de linfocitos, observándose un leve detrimento en los niveles de éstos para el caso

5. Resultados y Discusión

de la suplementación con *Coccomyxa onubensis*, sin inducir a linfocitopenia en este grupo, ya que los niveles se encuentran dentro de los parámetros normales (Figura 43).

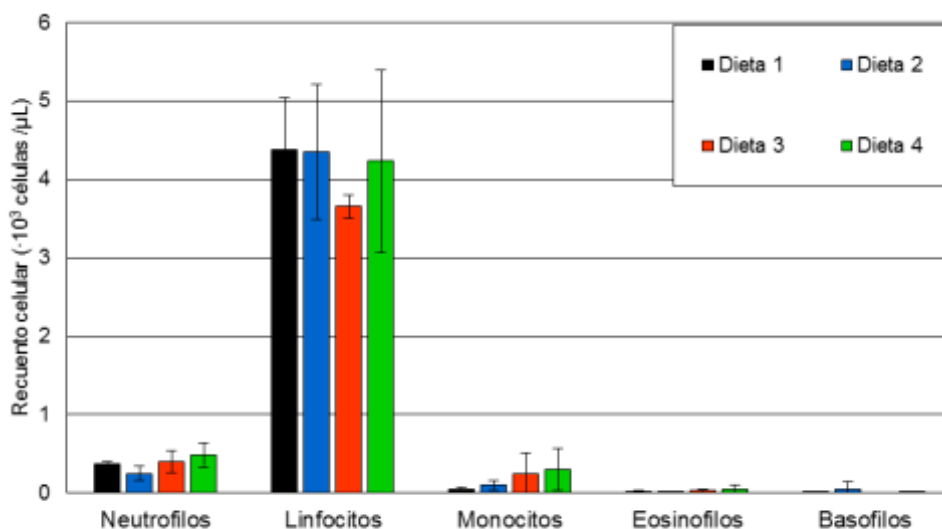


Figura 43. Efecto de la biomasa de *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4) sobre la fórmula leucocitaria respecto de una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2) y comparado con una dieta control (Dieta 1).

Ningún resultado mostró cambios significativos frente a los valores de referencia del grupo control (Dieta 1) para $p < 0,05$.

Seguidamente se analizó el hematocrito (niveles de eritrocitos presentes en 100 mL de sangre, representados como porcentaje en volumen para cada uno de los grupos). El hematocrito es un valor porcentual en el que, esencialmente, entra en acción el volumen de eritrocitos, siendo ínfima la contribución de los leucocitos y plaquetas. Este valor fue analizado debido a que se trata de un parámetro que varía con la especie y en función del número y tamaño de los eritrocitos y el volumen de plasma, por lo que, de forma indirecta, mide

la capacidad portante del tejido sanguíneo para transportar sangre, permitiendo detectar anemias o policitemias.

Los resultados obtenidos (Figura 44) mostraron una respuesta similar a la de los linfocitos, con una leve, pero no estadísticamente significativa, disminución del nivel hematocrítico para el grupo con la dieta suplementada con *Coccomyxa onubensis*, no obstante, sin mostrar ninguna patología.

En cuanto al tamaño medio de los eritrocitos, volumen corpuscular medio, (VCM) (Figura 45) y la concentración en hemoglobina (Figura 46), se repite la misma tendencia, siendo el valor mínimo medido el de la Dieta 3 (suplementada con microalga), no obstante, sin variaciones significativas.

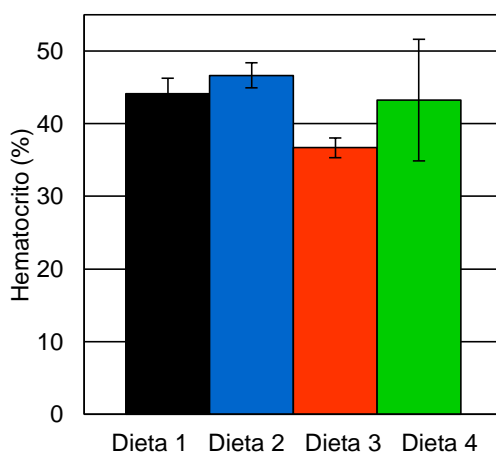


Figura 44. Efecto de la biomasa de *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4) sobre el hematocrito respecto de una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2) y comparado con una dieta control (Dieta 1).

Ningún resultado mostró cambios significativos frente a los valores de referencia del grupo control (Dieta 1) para $p < 0,05$.

5. Resultados y Discusión

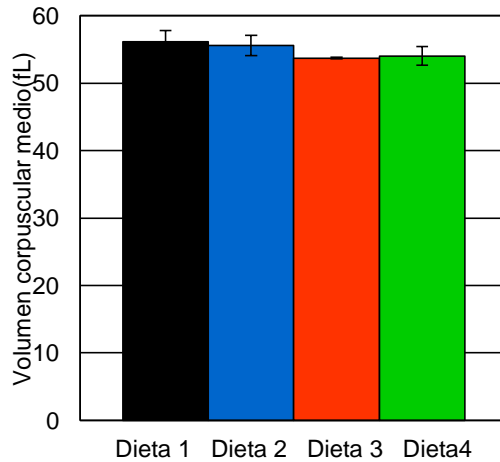


Figura 45. Efecto de la biomasa de *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4) sobre el VCM respecto de una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2) y comparado con una dieta control (Dieta 1).

Ningún resultado mostró cambios significativos frente a los valores de referencia del grupo control (Dieta 1) para $p < 0,05$.

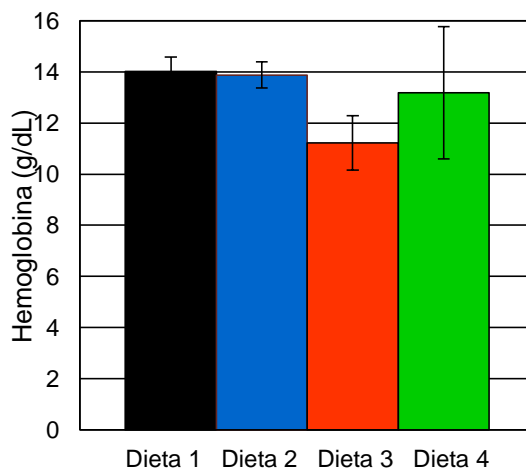


Figura 46. Efecto de la biomasa de *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4) sobre los niveles de hemoglobina respecto de una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2) y comparado con una dieta control (Dieta 1).

Ningún resultado mostró cambios significativos frente a los valores de referencia del grupo control (Dieta 1) para $p < 0,05$.

5. 3.2.2. Bioquímica sanguínea

El perfil bioquímico sérico de las ratas alimentadas con la dieta número 2 muestra parámetros hemodinámicos característicos de los animales con síndrome metabólico, es decir, glucosa alterada (97,4% más alta que el control) y colesterol total (60,15% más alto) por encima de lo normal (Tabla 17). En estos animales se eleva significativamente la cantidad de colesterol LDL, que fue 7.7 veces mayor que los animales de control. Tanto el efecto de la biomasa de *Coccomyxa onubensis* y de la atorvastatina en los niveles de glucosa, perfil lipídico y diferentes parámetros relacionados con la funcionalidad de diferentes órganos se expondrán en mayor detalle más adelante.

Los niveles de otros parámetros plasmáticos, como albúmina, creatinina, ferritina, bilirrubina y los iones Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- y Fe^{2+} fueron similares en los diferentes grupos de ratas, y dentro de los rangos normales para ratas sanas (Tabla 17).

5. Resultados y Discusión

Tabla 17. Parámetros bioquímicos de las ratas alimentadas con las diferentes dietas

Parámetros	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4
Na ⁺	141,75 ± 1,92	143,00 ± 1,58	143,00 ± 2,16	144,25 ± 1,79
K ⁺	5,24 ± 0,35	6,43 ± 0,79	6,88 ± 0,97	5,52 ± 0,44
Cl ⁻	98,75 ± 0,84	96,90 ± 0,94	98,23 ± 2,23	99,58 ± 0,53
Ca ²⁺	10,39 ± 0,23	11,92 ± 0,68	11,04 ± 1,10	11,07 ± 0,45
Hierro	191,63 ± 14,37	180,01 ± 13,22	194,40 ± 27,62	162,24 ± 10,27
Ferritina	97,43 ± 5,63	106,50 ± 7,58	102,50 ± 13,11	105,35 ± 5,09
Glucosa	250,03 ± 56,57	496,43 ± 33,00	311,37 ± 32,87	248,33 ± 37,42
Proteínas	6,31 ± 0,05	7,24 ± 0,16	7,03 ± 0,29	6,99 ± 0,14
Triglicéridos	36,33 ± 4,51	40,75 ± 7,79	37,23 ± 7,48	25,93 ± 4,53
Colesterol total	73,88 ± 3,11	129,43 ± 17,53	100,17 ± 10,64	100,55 ± 16,73
Colesterol LDL	11,90 ± 1,05	86,40 ± 19,43	63,57 ± 14,04	70,23 ± 24,38
Colesterol HDL	41,88 ± 3,07	48,33 ± 10,10	37,97 ± 5,92	33,98 ± 3,88
Lipoproteína a	0,35 ± 0,21	0,45 ± 0,29	0,80 ± 0,41	0,78 ± 0,27
GOT	73,98 ± 10,45	142,40 ± 25,27	171,83 ± 14,66	158,90 ± 34,32
GPT	24,83 ± 0,91	50,03 ± 10,58	53,43 ± 4,86	49,55 ± 16,30
L.D.	841,00 ± 203,55	1395,50 ± 73,55	1646,67 ± 304,43	1505,50 ± 223,26
Creatinina	0,43 ± 0,04	0,58 ± 0,03	0,54 ± 0,08	0,53 ± 0,07
Alp2s	125,25 ± 17,74	178,75 ± 19,50	217,67 ± 32,50	199,25 ± 35,39
Amilasa	2201,00 ± 115,22	3249,25 ± 121,91	3038,00 ± 38,27	2921,25 ± 113,74
Lipasa	4,43 ± 0,13	5,15 ± 0,17	4,80 ± 0,22	5,15 ± 0,38
Albúmina	4,53 ± 0,05	4,57 ± 0,17	4,25 ± 0,13	4,51 ± 0,08
Bilirrubina total	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01
PC reactiva	0,05 ± 0,02	0,23 ± 0,04	0,20 ± 0,4	0,25 ± 0,05

Los datos fueron obtenidos al final del experimento (108 días) tras 8 horas de ayuno. Cada valor está expresado como la media ± error estándar (n=6). GOT: Glutamato-oxaloacetato transaminasa. GPT: Glutamato-piruvato transaminasa. LD: Lactato deshidrogenasa. Alp2s: Fosfatasa alcalina. PC reactiva: Proteína C reactiva.

5. 3.2.2.1 Efecto de *C. onubensis* sobre los diferentes órganos en ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica

Puesto que ya se realizó un estudio histopatológico completo con anterioridad (apartado 5. 2.2) para estudiar si existía algún efecto perjudicial sobre el hígado como consecuencia de la ingesta de la microalga, en este caso nos hemos fijado directamente en el aspecto macroscópico mediante la observación de la presencia o ausencia de acumulaciones de grasa, a fin de comprobar la presencia de hígados grasos en aquellas dietas enriquecidas en grasas saturadas y colesterol.

Las ratas alimentadas con dieta hipercolesterolémica mostraron el hígado graso típico (Figura 47) con el aumento de su peso asociado que se ha comentado en el apartado 5. 3.1, mientras que la resistencia a la insulina y las mediciones de la grasa abdominal no están disponibles y se resolverán en estudios futuros.

La acumulación de grasa en el hígado de las ratas alimentadas con la Dieta 2 se observa en todo el órgano, en comparación con el hígado de la rata control (Dieta 1) (Figura 47).



Figura 47. Aspecto macroscópico de hígados de rata correspondientes a la Dieta 1 (izquierda) y Dieta 2 (derecha). Los animales fueron alimentados durante 180 días con las dietas indicadas y, tras su sacrificio, el hígado fue extraído tal y como es indicado en Material y Métodos.

5. Resultados y Discusión

Seguidamente se llevo a cabo el estudio bioquímico (Tabla 17) mediante el análisis de las transaminasas.

Como ya se vio en el apartado 5. 2.3.2.1, las transaminasas analizadas fueron la glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), presente en el corazón, en el hígado y en el músculo, y liberada cuando existe lesión de estos órganos, y la glutamato-piruvato transaminasa (GPT), presente en grandes concentraciones en el hígado, y en menor medida en los riñones, corazón y músculo.

Otro parámetro a tener en cuenta para valorar el estado hepático es la fosfatasa alcalina (ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa) (Tabla 17).

Las ratas alimentadas con la Dieta 2 (hipercolesterolémica) muestran un aumento significativo de la actividad fosfatasa alcalina (43%) frente a la rata Dieta 1 (control), así como un aumento del 93.5% de la glutamato-oxaloacetato transaminasa (actividad GOT) en comparación con el control (Figura 48); además, la glutamato-piruvato transaminasa (actividad GPT) aumentó un 102% en comparación con el control, lo cual es consistente con el daño severo producido en el hígado por este tipo de dietas.

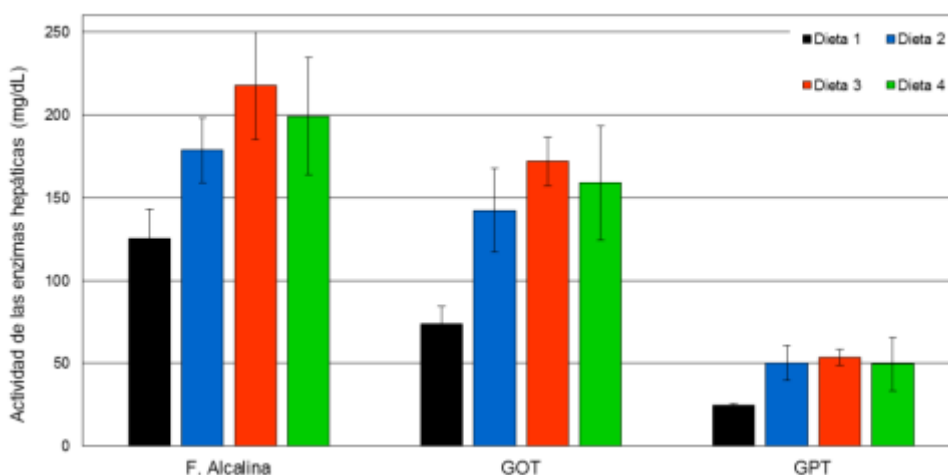


Figura 48. Efecto de la biomasa de *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4) sobre los niveles de fosfatasa alcalina y transaminasas respecto de una dieta hipercolesterolémica en ratas (Dieta 2) y comparado con la dieta control (Dieta 1). Los datos que se muestran son el promedio de individuos ($n=6$) de cada grupo de animales (\pm SD). El (*) indica que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas con respecto a los roedores del grupo control (Dieta 1), para valores de $p<0,05$. F. Alcalina: Fosfatasa alcalina. GOT: Glutamato-oxaloacetato transaminasa. GPT: Glutamato-piruvato transaminasa

La adición en la dieta hipercolesterolémica de *Coccomyxa onubensis* en polvo o atorvastatina no pudieron proteger el hígado contra la deposición de grasa (Figuras 49 y 50).



Figura 49. Visión macroscópica interna de los roedores correspondiente a la Dieta 1 (control), (izquierda) y Figura 50 correspondiente a la Dieta 2 (hipercolesterolémica), (derecha). Fotografías propias tomadas tras la exanguinación y previa extracción de los órganos de interés para el estudio a un individuo tomado al azar de su grupo. Las muestras tomadas para las Dietas 3 (rica en grasa + *C. onubensis*) y 4 (rica en grasa + atorvastatina) mostraron visiones macroscópicas similares a las de la Dieta 2 (hipercolesterolémica), sin diferencias apreciables.

5. Resultados y Discusión

El estado metabólico del riñón se valoró mediante la medida de los valores de creatinina en el suero sanguíneo extraído de los roedores objeto de estudio, tal y como se vio en el apartado 5. 2.3.2.1.

Los resultados obtenidos para el caso de las dietas hipercolesterolémicas mostraban valores que superaban el límite normal establecido, aunque próximos a éste. Así, se observaron aumentos no significativos de los niveles en el caso de las dietas 2, 3 y 4, observándose leves efectos protectores frente al daño renal en ambas dietas suplementadas respecto de la dieta 2 (Figura 51).

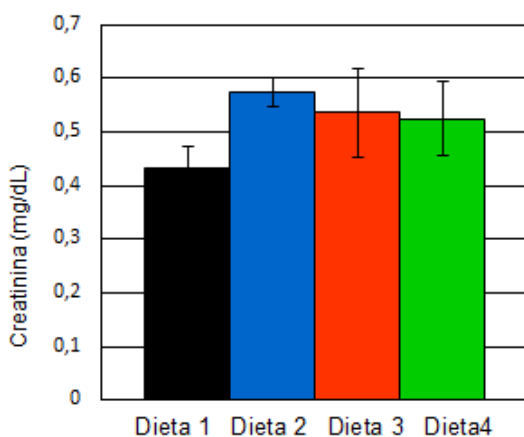


Figura 51. Efecto de la biomasa de *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4) en el funcionamiento del riñón respecto de una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2) y comparado con una dieta control (Dieta 1), mediante la medición de los niveles de creatinina en el suero sanguíneo.

Ningún resultado mostró cambios significativos frente a los valores de referencia del grupo control (Dieta 1) para un valor de $p < 0,05$.

Para proceder a la valoración del funcionamiento y estado del páncreas al finalizar el estudio se procedió al análisis de la amilasa y la lipasa total presente en el suero sanguíneo (Ameijeiras et al., 2007).

Tras el período de estudio se observaron aumentos en los niveles de ambas enzimas en sangre para las dietas hipercolesterolémicas, aunque sin mostrar diferencias significativas

para un valor de $p < 0,05$, observándose una leve protección frente al daño pancreático en las dietas suplementadas respecto de la Dieta 2 (Figura 52).

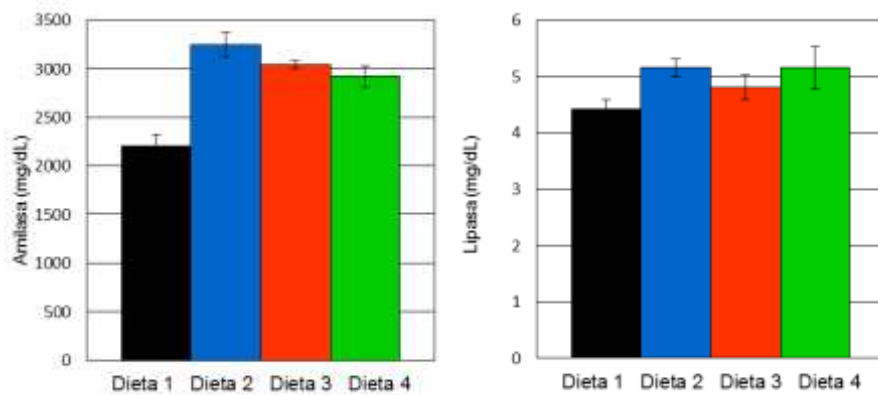


Figura 52. Efecto de la biomasa de *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4) en el funcionamiento del páncreas respecto de una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2) y comparado con una dieta control (Dieta 1). Izquierda, niveles séricos de amilasa en sangre, derecha, niveles séricos de lipasa en sangre.

Ningún resultado mostró cambios significativos frente a los valores de referencia del grupo control (Dieta 1) para un valor de $p < 0,05$.

5. 3.2.2.2. Efecto de *C. onubensis* sobre el nivel de glucosa en suero de las ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica

Las ratas alimentadas con la dieta 2 mostraron un nivel de glucosa que supone el doble en comparación con los animales alimentados con la dieta de control 1.

Esto se debe a que la dieta hipercolesterolémica induce obesidad en los animales, probablemente a través de una resistencia a la acción de la insulina, además de enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios. El estado glucémico de los animales alimentados con la dieta 1, 3 o 4 no mostró diferencias significativas entre ellos para $p < 0,05$.

5. Resultados y Discusión

Estos datos, por tanto, indican que el uso de *C. onubensis* en polvo como suplemento en la dieta de los animales tiene un efecto protector, similar al de la atorvastatina, contra el desarrollo hiperglucémico en ratas (Figura 53).

5. 3.2.2.3. Factores proinflamatorios en ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica

Como parte del estudio sobre los efectos de la microalga en las dietas hipercolesterolémicas se ha medido la PC-R (proteína C reactiva), proteína plasmática que circula por el torrente sanguíneo y que aumenta sus niveles en respuesta a la inflamación (Thompson et al., 1999), y que actúa como marcador inespecífico de la inflamación y el daño tisular. Pertenece a un grupo de proteínas llamadas "*reaccionantes de fase aguda*" que aumentan en respuesta a dicha inflamación. Su papel fisiológico consiste en unirse a la fosfocolina expresada en la superficie de las células dañadas o muertas y a algunos tipos de bacterias, con el fin de activar el sistema del complemento. Los niveles de reaccionantes de fase aguda responden a las proteínas inflamatorias denominadas citoquinas, las cuales son producidas por los glóbulos blancos durante una inflamación. La PC-R es sintetizada por el hígado en respuesta a factores liberadores y por los adipocitos (Pepys y Hirschfield, 2003).

La valoración clínica de la PC-R tiene especial relevancia como factor pronóstico en las complicaciones por pancreatitis biliar aguda grave (Al Mofleh IA., 2008) y en procesos relacionados con la obesidad.

En nuestro estudio, la PC-R se ha visto significativamente elevada en los animales obesos alimentados con las dietas 2, 3 y 4 pudiéndose observar que la dieta suplementada con la microalga mejora el perfil inflamatorio inducido por la dieta hipercolesterolémica, sin llegar a mostrar diferencias estadísticamente significativas a la

dosis empleada, pero a tener en cuenta para posteriores estudios en fase clínica.

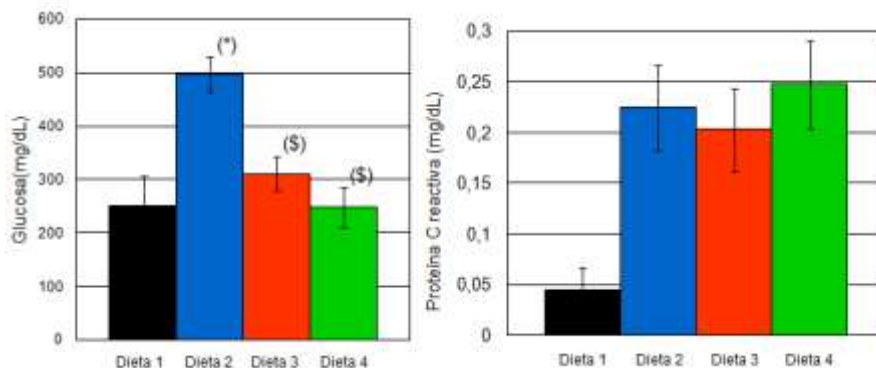


Figura 53 Efecto de la biomasa de *C. onubensis* o atorvastatina en los niveles de glucosa y PC-R en sangre respecto de una dieta hipercolesterolémica. Los datos muestran la media de los individuos ($n = 6$) en cada grupo de animales (\pm desviación estándar). El (*) indica diferencias significativas con $p < 0.05$ con respecto a las ratas del grupo control (Dieta 1). \$ indica diferencias significativas con $p < 0.05$ con respecto a las ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2). Otros detalles del ensayo están indicados en el apartado de Material y Métodos de esta sección.

5. 3.2.2.4. Efecto de *C. onubensis* sobre el perfil lipídico en el suero de las ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica

En la práctica clínica, el estudio del perfil lipídico se emplea como método analítico a fin de diagnosticar, pronosticar y llevar un seguimiento de las enfermedades metabólicas, en especial del síndrome metabólico.

Entre los compuestos a analizar para realizar el perfil lipídico destaca el colesterol que, como se comentó con anterioridad, es una biomolécula que desempeña múltiples funciones biológicas, destacando su papel a la hora de regular la fluidez de las membranas celulares, así como servir de precursor de ácidos biliares, hormonas esteroides o de la vitamina D.

5. Resultados y Discusión

Los niveles de triglicéridos circulantes en el suero no cambiaron significativamente en los grupos de ratas de la dieta 1, 2 y 3; sin embargo, la atorvastatina, pero no la biomasa de *C. onubensis*, tiene un importante efecto anti-hipertrigliceridémico con respecto al grupo control (Dieta 1) y a los animales alimentados con la dieta hipercolesterolémica (Dieta 2) (Figura 54A).

Pero por otra parte, los animales alimentados con la dieta 2 muestran un aumento significativo del colesterol total en suero con respecto al control. Las dietas suplementadas con la biomasa de *C. onubensis* en polvo y con atorvastatina protegen significativamente a los animales contra esta alteración, induciendo una disminución significativa en el contenido de colesterol total en suero, que alcanzó un 22,65% con respecto a los animales de la Dieta 2 (Figura 54B).

El nivel de colesterol LDL en el suero de los animales alimentados con una dieta hipercolesterolémica fue 7.7 veces mayor que los niveles del grupo control, lo que indica que las ratas transportan el colesterol principalmente a través de las lipoproteínas LDL. La adición de biomasa de *C. onubensis* (Dieta 3) o atorvastatina (Dieta 4) en la dieta de las ratas no protegió contra la tendencia mostrada por los animales alimentados con Dieta 2 (Figura 54C). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los nivel de colesterol HDL en ninguno de los cuatro grupos de animales al final del experimento (Figura 54D).

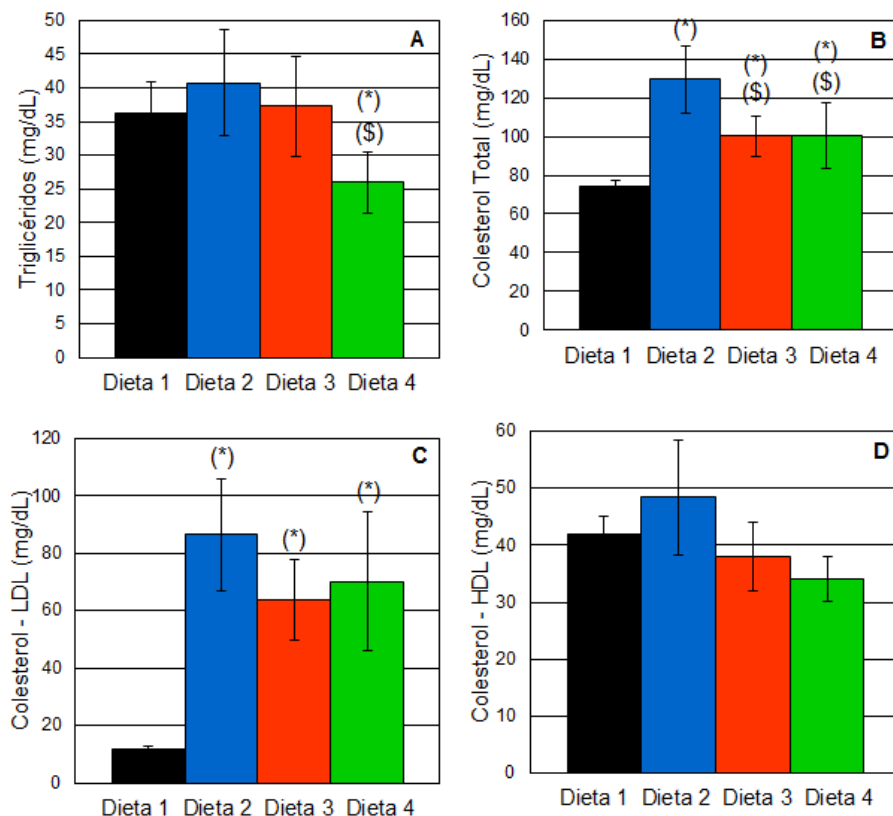


Figura 54. Efecto de la biomasa de *C. onubensis* o atorvastatina en el perfil lipídico del plasma de las ratas. Los datos muestran la media de los individuos ($n = 6$) en cada grupo de animales (\pm desviación estándar). (A) Los niveles de triglicéridos de los diferentes grupos animales. (B) Niveles de colesterol total. (C) Niveles de colesterol – LDL. (D) Niveles de colesterol – HDL. El (*) indica diferencias significativas para $p < 0.05$ con respecto a las ratas del grupo control (Dieta 1). \$ indica diferencias significativas con $p < 0.05$ con respecto a las ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica (Dieta 2). Otros detalles del ensayo están indicados en el apartado de Material y Métodos de esta sección.

5. 3.2.2.5. Efecto de *C. onubensis* sobre el contenido de ácidos grasos del tejido cerebral de las ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica

El cerebro es el órgano del cuerpo que requiere de más grasas para su correcto funcionamiento, constituyendo hasta el 60% de su peso seco. Éstas son las principales bases de la estructura de las

5. Resultados y Discusión

membranas de las células cerebrales, que además son empleadas como reguladores de la entrada y salida de moléculas e, incluso, son empleadas para los procesos de neurotransmisión, en forma de bandas de mielina que envuelven las fibras nerviosas.

Sin las grasas no es posible presentar un buen funcionamiento cerebral, ni, por consiguiente, en su justa proporción, la función que este ejerce como motor regulador del organismo.

Como ya vimos, existen diversos estudios que denotan que el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) del tipo Omega-3 ($\omega 3$) favorecen procesos de retención de información y la propia función cognitiva (Waitzberg y Garla, 2014), como es el caso del ácido docosahexaenoico (DHA) cuyo contenido cerebral puede ejercer efectos neuroprotectores (Valenzuela et al., 2014).

Esto hace que la variación de los ácidos grasos y, por consiguiente, del perfil lipídico cerebral pueda inducir diversas patologías no deseadas en los pacientes. Es por ello que, dado que la microalga *Coccomyxa onubensis* presenta importantes cantidades de PUFAs, podría resultar un buen suplemento alimentario a fin de proteger, e incluso revertir, los efectos ligados al desajuste de los niveles de estos ácidos grasos.

El análisis del perfil de ácidos grasos en los diferentes tejidos cerebrales de las ratas se muestra en la Tabla 18. La dieta hipercolesterolémica induce en el telencéfalo cerebral de la rata un aumento significativo en el contenido de ácidos palmítico y araquidónico (Figura 55).

Tabla 18. Perfil de ácidos grasos en diferentes fracciones del encéfalo como resultado de las diferentes dietas.

Fracción del Encéfalo	Ácido Palmítico	Ácido Oleico	Ácido Araquidónico	EPA	DHA
Cerebelo					
Dieta 1	18.58 ± 0.36	17.39 ± 0.54	8.24 ± 0.35	3.52 ± 0.53	14.54 ± 1.30
Dieta 2	18.02 ± 1.28	17.75 ± 1.51	8.30 ± 0.50	1.94 ± 0.24 ^a ↓	13.54 ± 1.85
Dieta 3	18.13 ± 1.00	17.69 ± 1.41	7.91 ± 0.42	2.15 ± 0.15 ^a ↓	14.91 ± 1.80
Dieta 4	19.00 ± 1.38	18.21 ± 0.80	8.27 ± 0.46	2.28 ± 0.48 ^a ↓	13.81 ± 1.29
Telencéfalo					
Dieta 1	20.19 ± 0.92	21.14 ± 0.53	11.43 ± 0.18	3.38 ± 0.01	16.08 ± 1.19
Dieta 2	21.80 ± 0.16 ^a ↑	21.26 ± 0.24	12.66 ± 0.05 ^a ↑	3.44 ± 0.39	13.66 ± 0.55 ^a ↓
Dieta 3	20.84 ± 0.06 ^b	21.07 ± 0.31	11.41 ± 0.11 ^b	3.49 ± 0.28	14.55 ± 0.18 ^a ↓
Dieta 4	20.35 ± 0.12 ^b	20.66 ± 1.17	11.36 ± 0.54 ^b	4.18 ± 0.57	14.49 ± 0.61 ^a ↓
Mesencéfalo					
Dieta 1	18.49 ± 0.40	21.30 ± 0.27	10.83 ± 0.10	3.29 ± 0.03	13.89 ± 1.02
Dieta 2	18.13 ± 0.37	19.77 ± 0.63 ^a ↓	10.31 ± 0.42	3.43 ± 0.14	12.59 ± 0.77 ^a ↓
Dieta 3	16.95 ± 0.79 ^a ↓	20.40 ± 0.32 ^b	9.37 ± 0.22 ^a ↓	3.33 ± 0.56	11.99 ± 0.54 ^a ↓
Dieta 4	17.86 ± 0.51	20.93 ± 0.13 ^b	10.54 ± 0.15	3.52 ± 0.25	11.83 ± 1.61 ^a ↓
Médula					
Dieta 1	14.31 ± 0.32	19.61 ± 0.27	7.89 ± 0.68	3.31 ± 0.10	9.31 ± 0.42
Dieta 2	14.83 ± 0.26	19.21 ± 0.18	7.49 ± 0.16	3.28 ± 0.36	7.77 ± 0.86 ^a ↓
Dieta 3	13.61 ± 0.05 ^a ↓	19.82 ± 0.05	6.92 ± 0.10	3.16 ± 0.32	7.79 ± 0.32 ^a ↓
Dieta 4	13.53 ± 0.40 ^a ↓	18.49 ± 0.47 ^a ↓	6.83 ± 0.42	3.37 ± 0.05	7.23 ± 0.18 ^a ↓

Unidades: Porcentaje de peso seco. (a) Diferencia significativa menor a 0.05 con respecto al control (Dieta 1). (b) Diferencia significativa menor a 0.05 con respecto a la dieta hipercolesterolémica (Dieta 2). Las flechas señalan un incremento o descenso estadísticamente significativo.

5. Resultados y Discusión

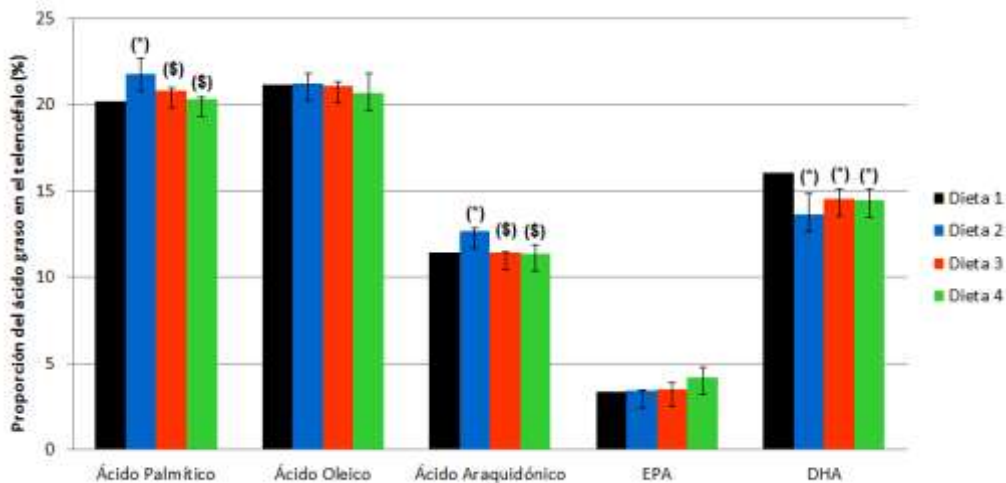


Figura 55. Perfil de ácidos grasos en el telencéfalo como resultado de las diferentes dietas. (*) Diferencia significativa < 0.05 con respecto al control (Dieta 1). (\$) Diferencia significativa < 0.05 con respecto a la dieta hipercolesterolémica (Dieta 2).

Estos cambios, con respecto a los animales de control (Dieta 1), parecen revertirse cuando se incluyen *Coccomyxa onubensis* o atorvastatina en la dieta. Además, la dieta hipercolesterolémica disminuye significativamente el contenido de EPA en el mesencéfalo y en el cerebelo (Figuras 56 y 57), mientras que el contenido de DHA disminuye en el telencéfalo, mesencéfalo y particularmente en la médula espinal de las ratas (Tabla 18, Figura 58) lo cual es perjudicial para la calidad y funcionalidad de las membranas celulares.

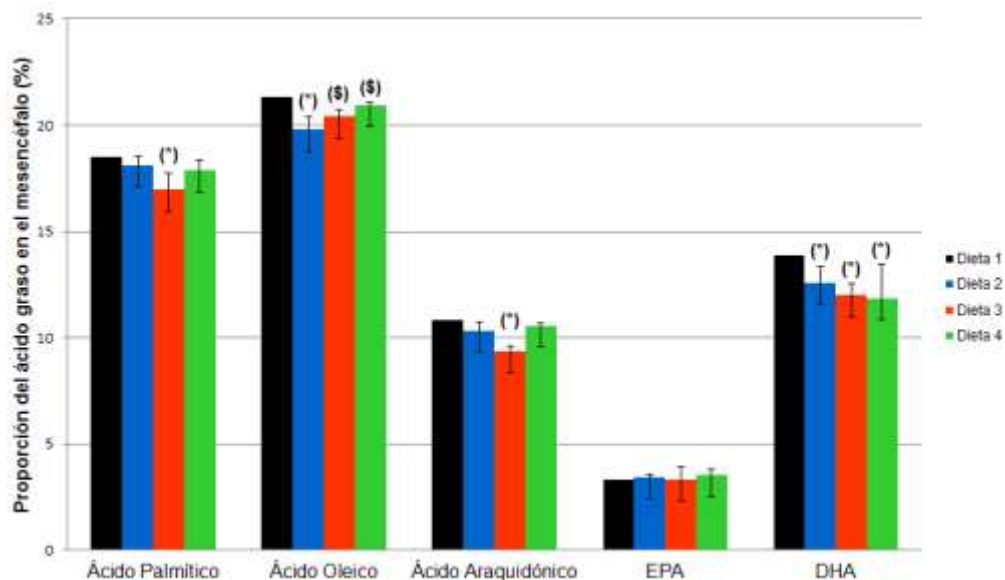


Figura 56. Perfil de ácidos grasos en el mesencéfalo como resultado de las diferentes dietas. (*) Diferencia significativa < 0.05 con respecto al control (Dieta 1). (\$) Diferencia significativa < 0.05 con respecto a la dieta hipercolesterolémica (Dieta 2).

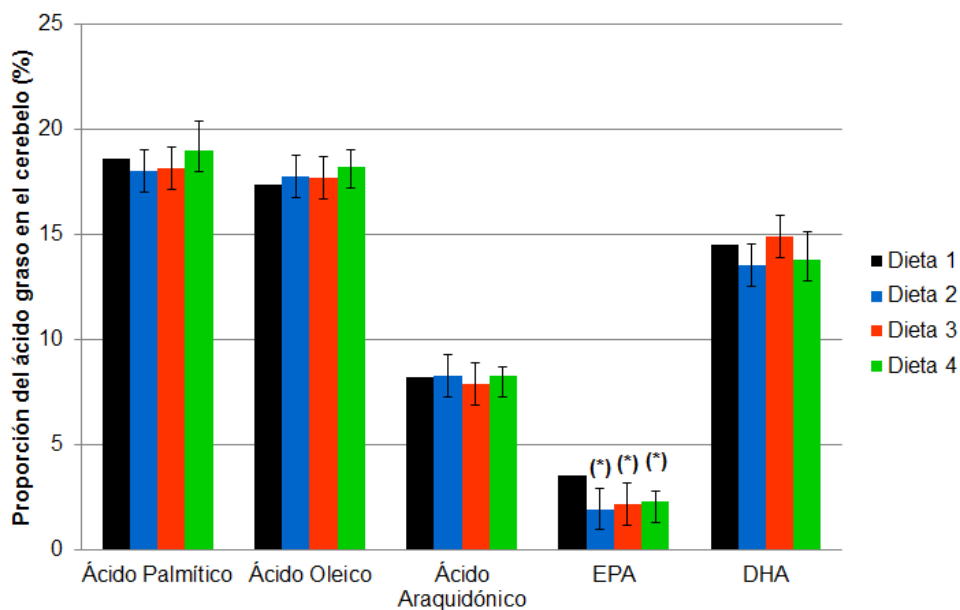


Figura 57. Perfil de ácidos grasos en el cerebelo como resultado de las diferentes dietas. (*) Diferencia significativa < 0.05 con respecto al control (Dieta 1).

5. Resultados y Discusión

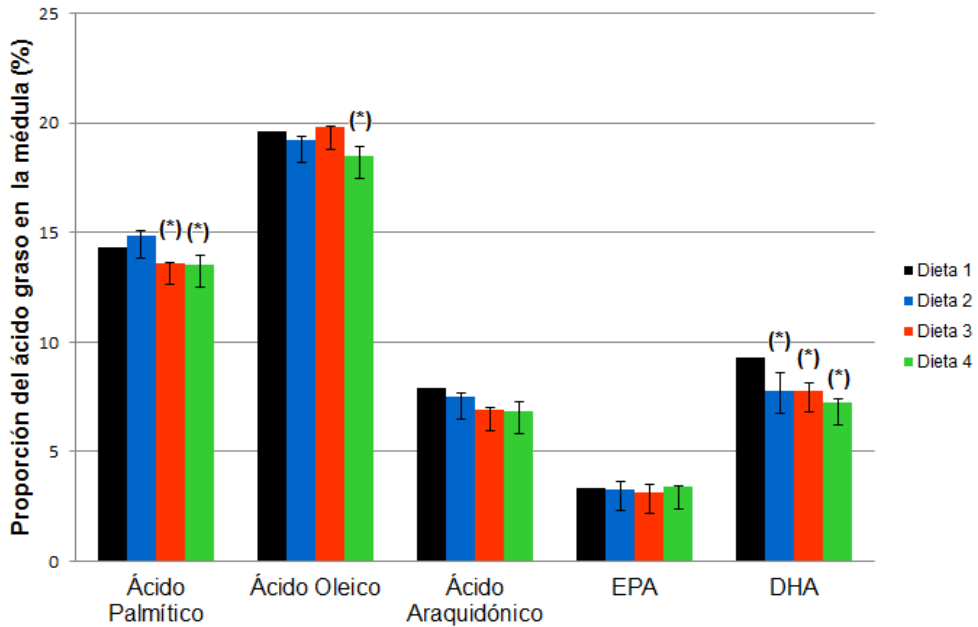


Figura 58. Perfil de ácidos grasos en la médula como resultado de las diferentes dietas. (*) Diferencia significativa < 0.05 con respecto al control (Dieta 1).

Estas tendencias no fueron evitadas por la presencia de la microalga en polvo o la atorvastatina en la dieta. Finalmente, la presencia de la microalga en polvo (Dieta 3) induce una disminución significativa del contenido de ácido palmítico en el mesencéfalo (Figura 56) y en la médula espinal (Figura 58), dando como resultado una protección significativa a los animales frente a las enfermedades relacionadas con procesos neuroinflamatorios.

Los ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ influyen en la neurotransmisión y en la formación de prostaglandinas respectivamente, ambos vitales en el mantenimiento de la función cerebral normal en los animales (Haag, 2003). Por lo tanto, es de interés estudiar el efecto de la dieta sobre el perfil de ácidos grasos en el tejido cerebral de las ratas. Los animales alimentados con una dieta hipercolesterolémica mostraron una disminución significativa en el contenido de EPA en el mesencéfalo y en el cerebelo y en el contenido de DHA en la médula espinal; sin embargo, no se observaron cambios significativos en ninguna otra parte del cerebro. En nuestro caso, ni *C. onubensis* en polvo ni la atorvastatina añadidos a la dieta pueden revertir esta tendencia. Estas observaciones podrían estar asociadas a las disfunciones cognitivas y emocionales observadas en ratas obesas (Kanoski y Davidson, 2011), debido a que una ingesta dietética adecuada de ácidos grasos poliinsaturados $\omega 3$ mejora las tareas de aprendizaje y comportamiento (Fedorova y Salem, 2006), y en humanos, el aumento en la dieta de $\omega 3$ y de ácidos grasos monoinsaturados se asocia con un mejor rendimiento cognitivo (Spencer et al., 2017).

El contenido de ácidos palmítico y araquidónico aumenta en el telencéfalo de ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica (Tabla 18), lo que puede estar asociado con afecciones proinflamatorias. En este contexto, es importante mencionar que la adición de ácido palmítico a la dieta reduce rápidamente la actividad locomotora del ratón (Moon et al., 2014), que también se observa en animales con síndrome metabólico. La presencia de las microalgas en polvo en la dieta induce una disminución en el contenido de ácido palmítico tanto en el mesencéfalo como en los tejidos de la médula espinal, lo que resulta en una protección significativa de los animales contra las enfermedades relacionadas con el cerebro.

5. Resultados y Discusión

El nivel de ácido oleico disminuye en el mesencéfalo de ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica y, dado que el ácido oleico protege los tejidos contra el estrés oxidativo, los animales pierden robustez contra estas enfermedades (Valentini et al., 2018).

Se observó una inducción del efecto protector de *C. onubensis* en las ratas del 6.25% (p/p de peso seco) de la dieta, que es menor o muy similar en comparación con el efecto descrito para otras microalgas como *Gelidium amansii* que inducía un 5% (p/p) (Liu et al., 2017); *Odontella aurita*, 12% (p/p) (Amine et al., 2019); y el 12% (p/p) de *Phaeodactylum tricornutum* (Mayer et al., 2019).

Por otra parte, se han abordado varios enfoques para identificar los compuestos bioactivos involucrados en los efectos protectores dependientes de microalgas frente a los efectos de la hiperglucemia e hiperlipidemia inducidas en roedores. El suministro a los animales de extractos etanólicos del 95% (Pan et al., 2018; Wan et al., 2019) o de agua caliente (Yang et al., 2017) resultaron tratamientos efectivos. Además, los ácidos grasos poliinsaturados de *S. platensis* proporcionan un efecto hipolipidémico y cambios en la flora intestinal de los animales al aumentar la abundancia de bacterias beneficiosas específicas, como *Prevotella* y productores de ácidos grasos de cadena corta (Li et al., 2018).

Algunas microalgas también tienen actividad antidiabética (Wan et al. 2019), y el aceite de pescado y los ácidos grasos ω 3 de microalgas como suplementos dietéticos de ratas también han demostrado un efecto curativo significativo contra los riesgos cardiovasculares inducidos por las dietas ricas en ácidos grasos saturados (Haimeur et al., 2016; Mayer et al., 2019). Los polisacáridos de algas también son agentes terapéuticos para la aterosclerosis (Patil et al., 2018). En este contexto, *C. onubensis* es un buen proveedor de luteína de ácidos grasos poliinsaturados y enzimas antioxidantes

(Bermejo et al., 2018) que posibilitaría a esta microalga el ser usada individual o sinérgicamente con otros compuestos como agente protector frente a enfermedades cardiovasculares (Kumar et al., 2015; Mayer et al., 2019; Wan et al., 2019).

Los complementos alimenticios obtenidos a partir de microalgas se están volviendo cada vez más populares debido a sus prometedoros efectos biológicos y a su contenido en prebióticos de alto valor nutricional; sin embargo, algunos productos de este tipo han generado controversias sobre su seguridad, ya que se han ingerido sin un adecuado estudio previo de bioseguridad y sin consultar a especialistas, provocando en algunos casos diarreas, náuseas, dolor abdominal y erupción cutánea (Rzymiski y Jaskiewicz, 2017). Sin embargo, nuestro estudio indica que el uso de *C. onubensis* en polvo es seguro y no perjudicial para los animales (Navarro et al, 2016), así como que también presenta algunas propiedades intrínsecas similares al tratamiento farmacológico con atorvastatina, mejorando tanto las condiciones de ratas con síndrome metabólico como el perfil de ácidos grasos del cerebro del animal.

5. 4. Valoración de la microalga *Coccomyxa onubensis* como nutraceútico

5. 4.1. Determinación de la capacidad antioxidante de *Coccomyxa onubensis*

Como se vio en la introducción, las microalgas son microorganismos que realizan la fotosíntesis oxigénica y en ese proceso se producen especies reactivas del oxígeno y radicales libres. Para su defensa, las microalgas producen compuestos antioxidantes para evitar los daños oxidativos (Madhavi y Salunkhe, 1995). En

5. Resultados y Discusión

algunas microalgas, la actividad antioxidante se atribuye al contenido de ácidos grasos insaturados (Mei et al. 2006), como el que posee *Coccomyxa onubensis*.

La capacidad antioxidante total de una muestra viene determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos, así como por el modo de acción concreto de cada uno de ellos; por ello es necesario combinar más de un método para evaluar de manera correcta la capacidad antioxidante de una muestra (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2006).

En este sentido, durante los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos basados en distintos aspectos, como la reducción de metales (FRAP), la capacidad de captación de radicales peroxilo (ORAC, TRAP), de radicales hidroxilo (ensayo de la deoxiribosa), método del DPPH, de radicales generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (ABTS, DPPH), en la cuantificación de productos generados durante la peroxidación lipídica (TBARs, oxidación de LDLs), etc. (Frankel y Meyer, 2000; Sánchez Moreno, 2002; Aruoma, 2003).

Para unificar criterios, todos los resultados de los distintos métodos se expresan en $\mu\text{mol Trólox}/100\text{g}$ de peso fresco del alimento, ya que si distintos métodos expresan sus resultados en equivalentes Trólox, los valores no serían comparables entre sí, al estar basados estos métodos en reacciones diferentes de los antioxidantes.

Por su parte, el método del DPPH, al estar basado en la determinación de parámetros cinéticos, se expresa en unidades diferentes, considerando los gramos de muestra necesarios para captar un gramo del radical libre (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto 2007).

En el presente estudio se ha evaluado la capacidad antioxidante de la microalga *Coccomyxa onubensis* mediante el método colorimétrico del DPPH, ya que se trata de un método sencillo, fiable y ampliamente utilizado para evaluación de la actividad antioxidante total, sin contar con las desventajas antes descritas.

La curva de calibración obtenida para la determinación de la capacidad antioxidante se presenta en la Figura 59.

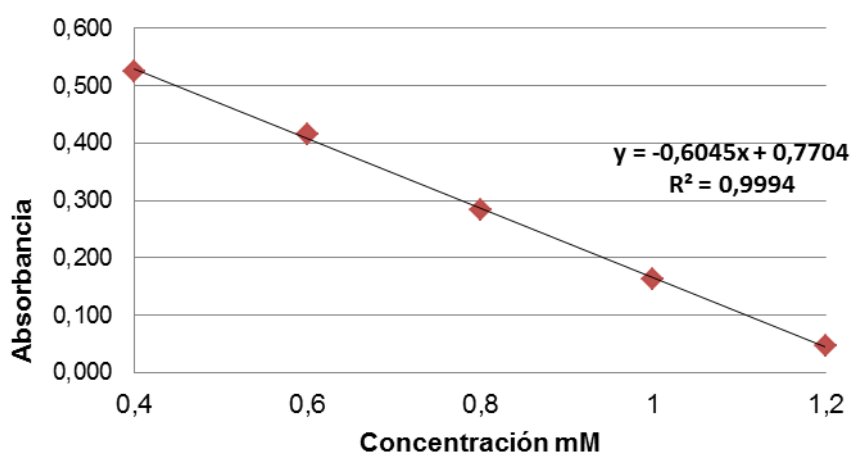


Figura 59. Recta de calibrado de actividad antioxidante por el método del DPPH.

Los resultados (Tabla 19) muestran los valores obtenidos en este análisis y han sido expresados como equivalentes de Trólox (mM) empleando en el ensayo 0.4 gramos de peso fresco de la microalga para no saturar la medida.

5. Resultados y Discusión

Tabla 19. Valores de absorbancia para la recta de calibrado y 4 mg de peso fresco de la microalga.

Concentración Trólox (mM)	Absorbancia a los 30 min		
	Abs 1	Abs 2	Abs media
0,4	0,551	0,499	0,525 ± 0,037
0,6	0,423	0,407	0,415 ± 0,011
0,8	0,297	0,272	0,285 ± 0,018
1	0,165	0,161	0,163 ± 0,003
1,2	0,046	0,047	0,047 ± 0,001
<i>C. onubensis</i> (4 mg)	0,68	0,684	0,682 ± 0,003

En nuestro caso, los valores obtenidos de la capacidad antioxidante han sido los equivalentes a 0,1462 mM de Trólox, es decir, $3,66 \pm 0,003$ μ moles de Trólox equivalente por gramo de muestra, que se corresponden con los descritos en frutas y verduras como el guanábana y la mora, y es superior al del maracuyá, cupuaçu (cacao blanco) y la piña (Tabla 20) (Kuskoski et al., 2005).

Tabla 20. Valores de DPPH para diferentes frutas. Las unidades están expresadas en μ moles de Trólox equivalente/g de muestra

DPPH (μ moles de Trólox equivalente/g de muestra)	
Muestras	30 min
Mora	4,3 \pm 0,2
Uva	7,0 \pm 0,3
Açaí	6,9 \pm 0,2
Guayaba	5,9 \pm 0,4
Fresa	9,2 \pm 0,01
Acerola	53,2 \pm 5,3
Piña	0,5 \pm 0,01
Mango	12,9 \pm 0,2
Guanábana	2,88 \pm 0,2
Cupuaçu (Cacao blanco)	0,73 \pm 0,2
Maracuyá	0,9 \pm 0,2

5. 4.2. Determinación de los polifenoles totales

Los compuestos polifenólicos varían ampliamente en estructura, desde los más simples (monómeros y oligómeros) hasta los polímeros complejos de peso molecular alto. Se dividen en dos grandes grupos: los flavonoides y los no flavonoides (taninos). Estos últimos incluyen a las moléculas más sencillas, como los ácidos fenólicos, con esqueletos químicos de seis carbonos (C_6), ligados o no con esqueletos de dos hasta cuatro carbonos ($C_6 - C_4$) (Vázquez-Flores et al, 2012). Los polifenoles flavonoides son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (o aromáticos), unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$) (Dai y Mumper, 2010).

5. Resultados y Discusión

Su papel en la naturaleza es el de antioxidantes activos y son muy abundantes, principalmente en tejidos vegetales (Kinsella et al., 1993). Los mecanismos de acción por los cuales los distintos polifenoles cumplen funciones antioxidantes pueden ser variados según sus propiedades particulares. Se localizan sobre las moléculas de LDL, provocando que el gasto de antioxidantes, como vitamina E y carotenoides, disminuyan, e incluso favorezcan la regeneración de vitamina E (Conner y Grisham, 1996). Las propiedades más relevantes en la salud humana son antirradicálicas, antimutagénicas, anticarcinogénicas, antimicrobianas y retardan la senescencia (Sohal y Weindruch, 1996).

Por tanto, los polifenoles presentan unas propiedades muy beneficiosas para la salud del ser humano y además pueden incluirse entre los componentes naturales de los alimentos con aplicaciones valiosas en la medicina tradicional, sobre todo para la salud cardiovascular.

La curva de calibración obtenida para la determinación de polifenoles totales se presenta en la Figura 60. Los resultados muestran los valores obtenidos en este análisis y han sido expresados como mg/L de ácido gálico. Para determinar la absorbancia en la microalga, el peso fresco de la muestra en el ensayo ha sido de 0,04mg.

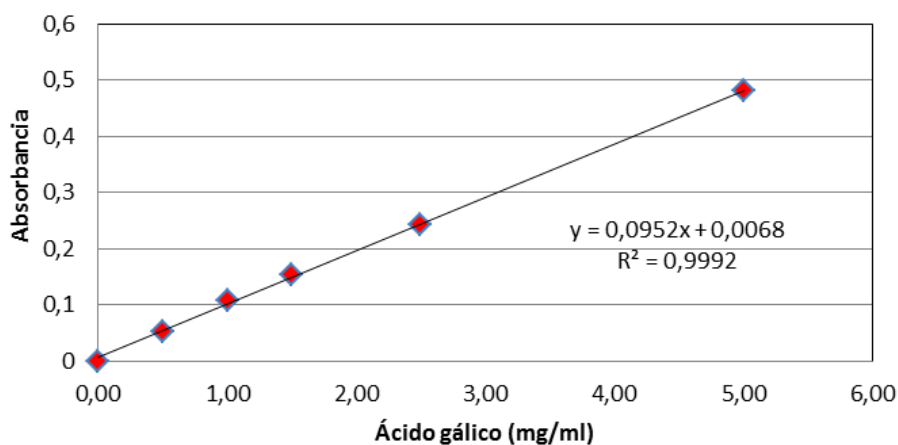


Figura 60. Recta de calibrado para la medida de polifenoles totales.

El valor promedio de polifenoles totales presentados como equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de peso fresco de biomasa de *Coccomyxa onubensis* ha sido de 1,672 mg/L de ácido gálico en 0,04mg de peso fresco, que corresponden a 167,20 mg equivalentes de ácido gálico por cada 100g de peso fresco.

Comparando los resultados obtenidos para la microalga con los presentes en diversas frutas y hortalizas, tenemos que el contenido en polifenoles totales en la microalga es superior al del melón, la naranja, la papaya, la piña, el mango, el brócoli, la coliflor y el tomate cherry (Instituto de nutrición y tecnología de alimentos, 2015). (Tablas 21 y 22)

5. Resultados y Discusión

Tabla 21. Comparación de valores de polifenoles totales para diferentes frutas y *Coccomyxa onubensis*

POLIFENOLES TOTALES	
Frutas	mg Ácido gálico / 100g peso fresco
Mora	671
Níspero	202
Nectarina	170
Naranja	152
Piña	127
Papaya	116
Mango	57
Melón	36
<i>Coccomyxa onubensis</i>	167.2

Tabla 22. Comparación de valores de polifenoles totales para diferentes hortalizas y *Coccomyxa onubensis*

POLIFENOLES TOTALES	
Hortalizas	mg Ácido gálico / 100g peso fresco
Haba	413
Rúcula	275
Espinaca	191
Brócoli	111
Tomate cherry	93
Coliflor	61
<i>Coccomyxa onubensis</i>	167.2

La inflamación está directamente involucrada en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y eventos clínicos como la rotura de la placa aterosclerótica (desencadenante del síndrome coronario agudo), la reestenosis arterial y la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica. Los compuestos fenólicos provenientes de vegetales reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, ya que tienen efectos antiinflamatorios significativos, como la inhibición de la expresión de genes de moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas, inhibición de la función plaquetaria, aumento de la liberación de óxido nítrico endotelial, supresión de la activación del músculo liso y otros efectos sobre factores proinflamatorios tales como endotelina y metaloproteinasas de matriz (Jiang y Dutsing, 2013).

5. 4.3. Determinación de polifenoles flavonoides

Flavonoides es el término genérico con el que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas que protegen a sus células de la fotooxidación por la luz UV.

En los alimentos encontramos flavonoides como sustancias que contribuyen al color de los mismos. Así, por ejemplo, las antocianinas dan color rojo, púrpura o malva a las frutas, hortalizas y al vino, las chalconas y auronas dan el color amarillo y las flavonas y flavonoles pueden dar color crema o amarillo pálido. Los flavonoides son también los responsables del cambio de color en las superficies cortadas de las frutas como resultado de la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos a quinonas. Este grupo de polifenoles contribuye además a la textura de las frutas. Así mismo, el amargor de algunos frutos es causado por la presencia de flavonoides y taninos (Brian y Camerón, 1992).

5. Resultados y Discusión

Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina como antimicrobianos, anticancerígenos y por disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, ya que su ingesta disminuye el colesterol y mejora la resistencia de los capilares y vasos sanguíneos, por lo que su presencia en un suplemento dietético o en un nutraceutico resulta de gran valor. Cuando son consumidos por el ser humano le protegen del daño oxidativo y de los metales tóxicos como el plomo y el mercurio (Graf et al. 2005).

Es por todo ello por lo que se ha analizado el contenido de flavonoides totales en la microalga *Coccomyxa onubensis*.

La curva de calibración obtenida para la determinación de flavonoides se presenta en la Figura 61. Los resultados muestran los valores obtenidos en este análisis y han sido expresados como mg/L de catequina. Para determinar su correspondencia en la microalga, el peso fresco de la muestra ha sido de 1mg de peso fresco.

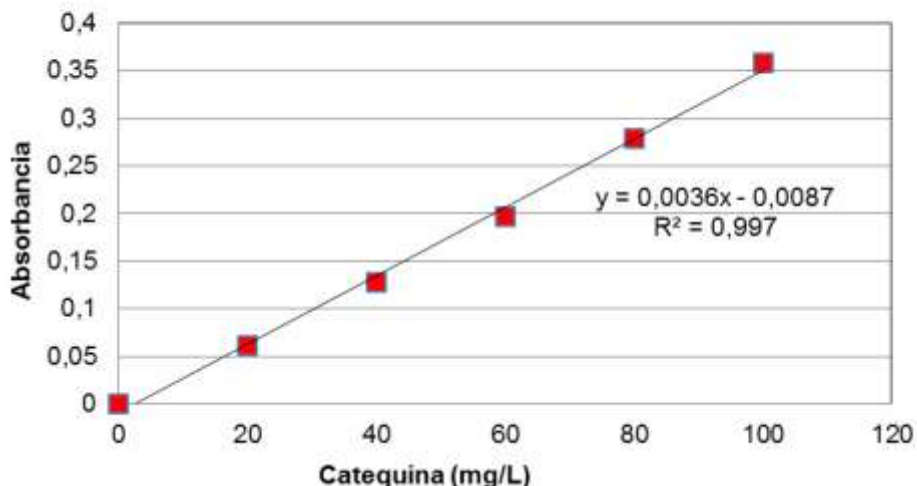


Figura 61. Recta de calibrado para el cálculo del contenido en flavonoides totales.

En nuestro estudio, el valor promedio de flavonoides totales presentes expresados como equivalentes de catequina por 100 gramos en nuestra muestra ha sido de $21,32 \pm 0,001$ mg equivalentes de catequina/100 g de peso fresco. Este valor es superior al de la manzana, uvas negras, nectarinas, ciruela y habas y es inferior al valor de las moras, arándanos y té verde como puede apreciarse en la Tabla 23 (US Departamento of Agriculture, 2007).

Tabla 23. Contenido en flavonoides en diferentes alimentos

Flavonoides	
Muestras	Flavonoides (mg de catequina / 100g)
Té verde	57,12
Arándano (<i>Vaccinium spp</i>)	37,24
Mora (<i>Rubus spp</i>)	37,06
Ciruela negra (<i>Prunus spp</i>)	17,55
Haba (<i>Vicia faba</i>)	14,29
Uva negra (<i>Vitis vinífera</i>)	10,14
Nectarina (<i>Prunus pérsica</i>)	7,98
Manzana (<i>Malus doméstica</i>)	7,40
Albaricoque (<i>Prunus armeniaca</i>)	4,79
<i>C. onubensis</i>	21,32

5. 4.4. Determinación de taninos hidrolizables

Los taninos son los polifenoles no flavonoides, sustancias con un alto peso molecular comprendido entre 500 a 3000 g/mol. Se consideran productos de excreción de muchas plantas, involucrados como mecanismos de defensa de las mismas frente a parásitos. Así mismo, son sustancias no nitrogenadas, de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona, poco solubles en éter y otorgan

5. Resultados y Discusión

el sabor astringente a los frutos (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009; Peña Rodríguez, 2014).

De entre los taninos hidrolizables, el más estudiado es la pentagalolil glucosa (PGG), al que se le reconoce cierta actividad anticancerígena, antidiabética y antioxidante en modelos experimentales *in vitro*. Respecto a la actividad anticancerígena *in vivo*, se ha probado que inhibe factores de crecimiento tumoral y vascular de cáncer de próstata y pulmón. No sólo impide el crecimiento de tumores, sino también disminuye su tamaño, impidiendo procesos de angiogénesis, crecimiento vascular muy común en metástasis (Zhang et al., 2009).

Sin embargo existe controversia respecto a la recomendación de ingerir taninos en la dieta habitual por su capacidad de unirse a las proteínas, concretamente se unen fuertemente a proteínas ricas en aminoácidos como prolina, glicina y ácido glutámico. Como ejemplo, precipitan aquellas proteínas presentes en la saliva (Soares et al., 2011), conduciendo a la sensación de astringencia de ciertos alimentos y bebidas de origen vegetal (Cala et al., 2011), como el vino, la cáscara de las manzanas, las uvas, y algunas nueces. Algunos autores mantienen que ésta astringencia es un aviso para evitar su consumo (Cheynier, 2005).

Por todo esto, los taninos pueden ser percibidos como compuestos polifenólicos cuyo consumo puede traer numerosos efectos beneficiosos pero cuyos posibles efectos negativos no deben ser pasados por alto a la hora de hacer recomendaciones para su consumo como parte de una dieta habitual. Sin embargo, hay que tener presente el elevado potencial antioxidante de estos compuestos que, en circunstancias adecuadas, puede conferir un efecto protector de la salud.

La curva de calibración obtenida para la determinación de taninos hidrolizables se presenta en la Figura 62. Los resultados muestran los valores obtenidos en este análisis. Para determinar la absorbancia en la microalga, el peso fresco de la muestra ha sido de 3 mg.

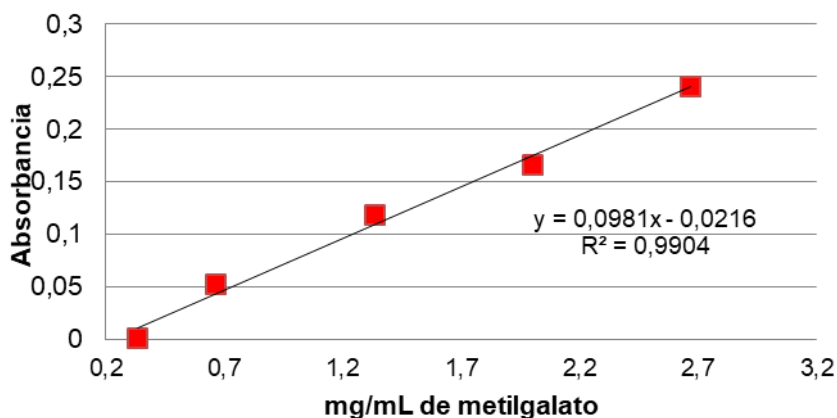


Figura 62. Recta de calibrado para el cálculo del contenido en taninos hidrolizables

El contenido en taninos hidrolizables de *Coccomyxa onubensis* ha sido de 450 mg de metil galato por cada 100 gramos de peso fresco. Según la bibliografía consultada, al suministrar entre 0,4 y 2,5 gramos de peso fresco diario de dicha microalga a una rata Longs Evans con un peso medio de 450 gramos, generaría resultados similares a los descritos por Zang y colaboradores en 2009, donde se describe que, a esa dosis diaria, no solo se inhibe el crecimiento tumoral y vascular para el cáncer de próstata y de pulmón en dichas ratas, sino que además también disminuye su tamaño.

5. Resultados y Discusión

5. 4.5. Determinación de los carotenoides totales

Los carotenoides son pigmentos liposolubles de origen vegetal que están presentes en el organismo humano a partir de la dieta. La principal actividad de estos compuestos en las plantas es la fotoprotección del sistema fotosintético y, en el organismo humano, destaca la actividad provitamínica A. Además, la ingesta de carotenoides fortalece el sistema inmunológico, disminuye el riesgo de enfermedades degenerativas como el cáncer, previene las enfermedades cardiovasculares, la degeneración muscular y la formación de cataratas (Bauernfeind, 1981).

En la dieta humana los carotenoides son aportados fundamentalmente por frutas y hortalizas y, en pequeña proporción, a partir de fuentes animales y a través de los aditivos alimentarios (colorantes). Por tanto, una elevada ingesta de frutas y hortalizas está claramente asociada con un menor riesgo de diversas enfermedades crónicas como las anteriormente mencionadas (Stahl y Sies, 2007).

Los resultados para la microalga *Coccomyxa onubensis* los hemos expresado como μg de β -caroteno equivalente por cada 100g de peso fresco, empleando el coeficiente de extinción molar de 2500 del β -caroteno y aplicando la fórmula de Strickland y Parsons (1972), modificada por Britton (1985):

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

Dónde:

A = Absorbancia de la muestra corregida (A480 - A750).

V = Volumen total del extracto (25 ml).

A_{1cm}^{1%} = Coeficiente de absortividad del β -caroteno (2500 100ml g - 1 cm⁻¹).

P_{mx} = Peso de muestra en gramos.

Tras realizar el ensayo descrito en material y métodos, observamos que *Coccomyxa onubensis* posee 146,2 μg de β -Caroteno por cada 100g de peso fresco. El resultado obtenido en la determinación de compuestos carotenoides para esta microalga muestra una concentración que supera las cantidades promedio encontradas en alimentos ricos en carotenoides como la ciruela amarilla, el melocotón, la mora, la naranja, la piña, el plátano y mucho más alta que las contenidas en algunos vegetales de consumo habitual como el calabacín y la col de Bruselas (Tabla 24) (Beltrán et al., 2012), haciendo de *Coccomyxa onubensis* una muy buena fuente de carotenoides como suplemento dietético.

Tabla 24. Contenido en carotenoides en diferentes alimentos consumidos en España

Carotenoides totales	
Muestras	Carotenoides (μg de βcaroteno / 100g peso fresco)
Judías verdes	166
Mango	152
Cebolleta	142
Ciruela amarilla	117
Mora	78
Col de Bruselas	77
Plátano	77
Melocotón	64
Piña	57
Naranja	48
Calabacín	23
<i>C. onubensis</i>	146

5. Resultados y Discusión

6. LABOR FUTURA



Universidad
de Huelva

6. LABOR FUTURA

A lo largo del presente trabajo hemos demostrado la seguridad alimentaria de *Coccomyxa onubensis* en animales modelo de investigación (fase preclínica) y la presencia de numerosos componentes presentes en su biomasa, tales como ácidos grasos poliinsaturados y compuestos antioxidantes, que tienen un importante papel protector tanto frente a diferentes enfermedades degenerativas, como enfermedades cardiovasculares, haciendo visible su potencial como nutraceutico y suplemento dietético.

Sin embargo, la labor de investigación en esta línea no concluye aquí. El equipo de investigación desea estudiar el posible efecto antioxidante de *Coccomyxa onubensis in vivo* por medio de la evaluación de las enzimas redox (ciclo de Halliwell-Asada) de los hígados de las ratas usadas en las experiencias anteriores, que fueron congelados en nitrógeno líquido en el instante de la extracción y almacenados a -80 °C. A la fecha de escritura de ésta Tesis, nuestro equipo investigador se encuentra a la espera de disponer de un espectrofotómetro UV/Vis con agitación y termoestabilización en cubeta para realizar estas mediciones con la precisión suficiente.

Paralelamente, la Unidad de Lípidos y Riesgo Vascular del Hospital Infanta Elena ha mostrado gran interés en los efectos hipolipemiantes e hipocolesterolémicos de *C. onubensis* y se han ofrecido para abordar un estudio colaborativo con la Universidad de Huelva en una fase clínica 1, es decir, con pacientes que presentan un riesgo cardiovascular y que no responden bien a los tratamientos con estatinas y/o fibratos por sí solos, de forma que estudiaríamos si dichos fármacos en coadyuvancia con la microalga, pudiesen disminuir el riesgo cardiovascular de dicho grupo de pacientes.

6. Labor Futura

Por último, y como se ha destacado en esta Tesis, *Coccomyxa onubensis* podría tener un efecto antitumoral, por lo que ésta sería otra de las posibles líneas de investigación que estaríamos en condiciones de abordar en el futuro mediante el empleo de cultivos celulares *in vitro*.

7. CONCLUSIONES



Universidad
de Huelva

7. CONCLUSIONES

7.1.- El extracto bioactivo obtenido a partir de la biomasa completa de *Coccomyxa onubensis* empleando como disolvente el hexano o el cloroformo tiene una fuerte actividad antimicrobiana, generando halos de lisis por difusión en placa superiores a 14,0 mm, comparables a los obtenidos con el antibiótico comercial Amoxicilina + Ácido clavulánico, que fueron de unos 16,0 mm.

7.2.- Dicho extracto bioactivo obtenido con cloroformo generó unos valores de CMI contra *E. coli* S de 305 µg/mL y de 153 µg/mL frente a *P. mirabilis*, siendo la CMI para el extracto obtenido con hexano contra *P. mirabilis* de 106 µg/mL. Estos valores son muy superiores a los obtenidos con sustancias bioactivas puras, como el ácido araquidónico, que produce valores de CMI entre 1,9 y 7,8 µg/mL frente a bacterias Gram negativas.

7.3.- Los extractos bioactivos de *C. onubensis* en disolventes polares, como acetona, etanol, metanol y agua, carecen de actividad antimicrobiana significativa contra los patógenos estudiados.

7.4.- La biomasa de *C. onubensis* es rica en proteínas (44,60% del peso seco) y fibra dietética (15,73%), y tiene un contenido moderado de hidratos de carbono (24,8%) y un bajo contenido de lípidos (5,4%) en los que los ácidos grasos poliinsaturados representan el 65% del total.

7.5.- La microalga administrada como suplemento a la dieta de animales modelo de laboratorio (*Rattus norvegicus* var. Long Evans) no generó diferencias significativas en sus tasas de crecimiento o las proporciones de eficiencia alimentaria. Los estudios histológicos de tejido hepático y renal revelaron órganos sanos, tanto en el control como en los animales alimentados con la microalga, a la vez que los

7. Conclusiones

parámetros plasmáticos, hematológicos y bioquímicos estuvieron dentro de rangos saludables para todos los animales. Por lo tanto, *C. onubensis* puede emplearse como fuente de alimento seguro para animales, sin efectos tóxicos colaterales.

7.6.- Los animales alimentados con una dieta enriquecida con *C. onubensis* mostraron una disminución estadísticamente significativa en los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos respecto al control. Dicha disminución llegó a ser de hasta el 50% para la dieta 4, que contenía el 6.25 % en peso de la comida diaria en microalga.

7.7.- *C. onubensis* administrada como suplemento al 6.25 % en la dieta de ratas hipercolesterolémicas, hipertriglicerolémicas e hiperglucémicas, las protegió significativamente contra los riesgos cardiovasculares al reducir sus niveles séricos de glucosa en un 38.47 %, de colesterol total un 22.65 % y de colesterol-LDL un 26,70 %. Estos efectos protectores de la microalga fueron comparables a los de administrar 10 mg/kg de peso corporal y día de atorvastatina.

7.8.- Administrar una dieta rica en grasas saturadas redujo los ácidos ω 3 eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) en el tejido cerebral de las ratas y simultáneamente aumentó los niveles de los ácidos palmítico y araquidónico (ω 6) en el telencéfalo, pero ni *C. onubensis* ni las estatinas consiguieron restringir estos cambios.

7.9.- La adición de las microalgas en la dieta de las ratas disminuyó el contenido de ácido palmítico y araquidónico en los tejidos del mesencéfalo y de la médula espinal de las ratas, lo que da como resultado una protección significativa de los animales frente a enfermedades relacionadas con la neuroinflamación.

7.10.- La microalga ha presentado, mediante ensayos *in vitro*, tener una capacidad antioxidante, un contenido en polifenoles totales, en

flavonoides y en carotenoides similar o incluso superior a las cantidades promedio encontradas en muchas frutas y verduras, haciendo de *Coccomyxa onubensis* una muy buena fuente de nutraceuticos como suplemento dietético.

7.11.- El contenido en taninos hidrolizables de *Coccomyxa onubensis* ha sido de 450 mg de metil galato por cada 100 gramos de peso fresco, cantidad que, según la bibliografía, no solo inhibiría el crecimiento tumoral y vascular en los cánceres de próstata y de pulmón en rata, sino que además también disminuiría el tamaño de los tumores en esos órganos.

7.12.- Todos los datos expuestos en ésta Tesis Doctoral sugieren en conjunto que la microalga extremófila *Coccomyxa onubensis* puede ser útil como alimento funcional, como complemento alimenticio y como nutraceutico.

7. Conclusiones

8. RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS



Universidad
de Huelva

8. RECURSOS BIBLIOGRÁFICOS

8. 1. LIBROS, REVISTAS Y ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Abalde, J., Cid, A., Fidalgo Paredes, P., Torres, E., and Herrero, C. (1995). *Microalgas: cultivo y aplicaciones. Monografía*, 26. Edición: A Coruña: Universidade, Servizo de Publicacións.

Abdel-Raouf, N., Ibraheem, I.B., Abdel-Tawab, S., and Naser, Y.A. (2011). Antimicrobial and antihyperlipidemic activities of isolated quercetin from *Anabaena aequalis* 1. *Journal of phycology*, 47(4), pp. 955-962.

Abeliovich, A. (2004). Water pollution and bioremediation by microalgae. En: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Editores: Amos Richmond, pp. 430-438.

Abeywardena, M.Y., and Charnock, J.S. (1995). Dietary lipid modification of myocardial eicosanoids following ischemia and reperfusion in the rat. *Lipids*, 30(12), pp. 1151-1156.

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R. and James, T. Y. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), pp. 399-451.

Adwan, K., and Abu-Hasan, N. (1998). Gentamicin resistance in clinical strains of *Enterobacteriaceae* associated with reduced gentamicin uptake. *Folia microbiologica*, 43(4), p. 438.

Ahmed, A.B.A., and Taha, R.M. (2011). Marine Phytochemical Compounds and Their Cosmeceutical Applications. *Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects*, Cap. 4, pp. 51-61.

8. Recursos Bibliográficos

Al Mofleh, I.A. (2008). Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World journal of gastroenterology: WJG*, 14(5), pp. 675-684.

Albert, C.M., Hennekens, C.H., O'Donnell, C.J., Ajani, U.A., Carey, V.J., Willett, W.C., and Manson, J.E. (1998). Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *Jama*, 279(1), pp. 23-28.

Alvarado, C., Álvarez, P., Puerto, M., Gausserès, N., Jiménez, L., and De la Fuente, M. (2006). Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition*, 22(7-8), pp. 767-777.

Amaral-Zettler L.A., Gómez F., Zettler E., Keenan B.G., Amils R., Sogin M.L. (2002). Microbiology: eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature*, 417(6885), pp. 137-137.

Ameijeiras, J.H., Crespo, M.T., and Valcarce, J.T. (2007). Lipasa y amilasa total y sus isoenzimas como marcadores de daño pancreático en pacientes tratados con fármacos antiepilépticos. *Farmacia Hospitalaria*, 31(5), pp. 303-306.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), pp. 7915-7922.

Amils, R., Fernández-Remolar, D., and The Ipbsl Team. (2014). Río Tinto: a geochemical and mineralogical terrestrial analogue of Mars. *Life*, 4(3), pp. 511-534.

Amin, S.A., Green, D.H., Hart, M.C., Küpper, F.C., Sunda, W.G., and Carrano, C.J. (2009). Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), pp. 17071-17076.

Amine, H., Benomar, Y., Haimeur, A., Messaouri, H., and Meskini, N. (2016). Odontella aurita-enriched diet prevents high fat diet-induced liver insulin resistance. *Journal of Endocrinology*, 228(1), pp. 1-12.

Andrade, R.J., Robles, M., Fernández-Castañer, A., López-Ortega, S., López-Vega, M.C., and Lucena, M.I. (2007). Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: a challenge for gastroenterologists. *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(3), pp. 329-340.

Aremu, A.O., Masondo, N.A., Stirk, W.A., Ördög, V., and Van Staden, J. (2014). Influence of culture age on the phytochemical content and pharmacological activities of five *Scenedesmus* strains. *Journal of applied phycology*, 26(1), pp. 407-415.

Asthana, R.K., Tripathi, M.K., Srivastava, A., Singh, A.P., Singh, S.P., Nath, G., and Srivastava, B.S. (2009). Isolation and identification of a new antibacterial entity from the Antarctic cyanobacterium *Nostoc* CCC 537. *Journal of applied phycology*, 21(1), pp. 81-88.

Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, pp. 9-20.

Azamai, E.S.M., Sulaiman, S., Habib, S.H. M., Looi, M.L., Das, S., Hamid, N.A.A., and Yusof, Y.A.M. (2009). *Chlorella vulgaris* triggers apoptosis in hepatocarcinogenesis-induced rats. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10(1), pp. 14-21.

Badimón, L., and Martínez-González, J. (2002). Endothelium and vascular protection: an update. *Revista española de cardiología*, 55(1), pp. 17-26.

8. Recursos Bibliográficos

Badimón, L., and Martínez-González, J. (2006). Disfunción endotelial. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(1), pp. 21A-30A.

Bai, S.K., Lee, S.J., Na, H.J., Ha, K.S., Han, J.A., Lee, H., and Kim, Y.M. (2005). β -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation. *Experimental and molecular medicine*, 37(4), pp. 323-334.

Bain, B. J. (2017). Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. En: *Dacie and Lewis Practical Haematology*, 20^a ed. Cap. 4, pp. 50.-60.

Bang, H.O., Dyerberg, J., and Hjörne, N. (1976). The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Medica Scandinavica*, 200(1-6), pp. 69-73.

Bang, H.O., Dyerberg, J., and Sinclair, H.M. (1980). The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *The American journal of clinical nutrition*, 33(12), pp. 2657-2661.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), pp. 493-496.

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

Becker E.W. (2004). Large scale cultivation. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. En Cambridge: Cambridge University press.

Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), pp. 207-210.

Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., and Olmedilla Alonso, B. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A: utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutrición hospitalaria*, 27(4), pp. 1334-1343.

Bergen, W.G., and Mersmann, H.J. (2005). Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *The Journal of nutrition*, 135(11), pp. 2499-2502.

Bermejo, E., Ruiz-Domínguez, M.C., Cuaresma, M., Vaquero, I., Ramos-Merchante, A., Vega, J.M., and Garbayo, I. (2018). Production of lutein, and polyunsaturated fatty acids by the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis* under abiotic stress by salt or ultraviolet light. *Journal of bioscience and bioengineering*, 125(6), pp. 669-675.

Betancourt Morgado, E., González Madariaga, Y., Bermúdez Toledo, D., Escobar Román, R., Alonso Cáceres, B., and Blanco Machado, F. (2014). Evaluación del potencial hipolipemiante de dos plantas medicinales en un modelo de hiperlipidemia crónica. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(3), pp. 133-143.

Bhadury, P., and Wright, P.C. (2004). Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta*, 219(4), pp. 561-578.

Bhagavathy, S., Sumathi, P., and Bell, I.J.S. (2011). Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), pp. S1-S7.

Bhateja, P., Mathur, T., Pandya, M., Fatma, T., and Rattan, A. (2006). Activity of blue green microalgae extracts against in vitro generated

8. Recursos Bibliográficos

Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin. *Fitoterapia*, 77(3), pp. 233-235.

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

Blom, J.F., and Pernthaler, J. (2009). Antibiotic effects of three strains of chrysophytes (*Ochromonas*, *Poterioochromonas*) on freshwater bacterial isolates. *FEMS microbiology ecology*, 71(2), pp. 281-290.

Bordeu, E., and Scarpa, J. (2000). *Análisis Químico del vino*. Santiago: Ediciones Universidad Católica de Chile.

Borowitzka, M.A. (1988). *Fats, oils and hydrocarbons*. En: Borowitzka M.A. and Borowitzka L.J. Eds. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 257-287

Borowitzka, M.A. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of applied phycology*, 7(1), pp. 3-15.

Borowitzka, M.A. (1996). Closed algal photobioreactors: design considerations for large-scale systems. *Journal of Marine Biotechnology*, 4(4), pp. 185-191.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), pp. 25-30.

Brian, A., and Cameron, G. (1992). *Ciencia de los alimentos, nutrición y salud*. México. Editorial Limusa.

Briozzo, G., Perego, M.D.C., and Moirón, M.D.C. (2008). Fosfatasa Alcalina: valores de referencia en la paciente embarazada. *Bioquímica y patología clínica*, 72(1), p. 32.

Britton, G. (1985). General carotenoid methods. En *Methods in Enzymology*, Cap. 5(vol. 111). Academic Press inc., pp. 113-149.

Buono, S., Langellotti, A.L., Martello, A., Rinna, F., and Fogliano, V. (2014). Functional ingredients from microalgae. *Food and function*, 5(8), pp. 1669-1685.

Burr, M.L., Gilbert, J.F., Holliday, R.A., Elwood, P.C., Fehily, A.M., Rogers, S., and Deadman, N.M. (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *The Lancet*, 334(8666), pp. 757-761.

Cala, O., Fabre, S., Pinaud, N., Dufourc, E.J., Fouquet, E., Laguerre, M., and Pianet, I. (2011). Towards a molecular interpretation of astringency: synthesis, 3D structure, colloidal state, and human saliva protein recognition of procyanidins. *Planta medica*, 77(11), pp. 1116-1122.

Cardozo, K.H., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., and Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 146(1-2), pp. 60-78.

Cha, K.H., Koo, S.Y., and Lee, D.U. (2008). Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), pp. 10521-10526.

8. Recursos Bibliográficos

Cherng, J.Y., and Shih, M.F. (2005). Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. *Life sciences*, 76(26), pp. 3001-3013.

Cherrington, C.A., Hinton, M., Mead, G.C., and Chopra, I. (1991). Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Advances in microbial physiology*, 32, pp. 87-108.

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

Chipault, J.R. (1962). *Antioxidants for use in foods*. En: Chipault, J.R. *Autoxidation and antioxidants*, Cap. 2, pp. 477-542. Nueva York, N.Y.: Ed. John Wiley and Sons Inc.

Christaki, E., Florou-Paneri, P., and Bonos, E. (2011). Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International journal of food sciences and nutrition*, 62(8), pp. 794-799.

Cleland, J.G., Freemantle, N., Coletta, A.P., and Clark, A.L. (2006). Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REVIVE-II, SURVIVE, and PROACTIVE. *European journal of heart failure*, 8(1), pp. 105-110.

Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S., Chavez, F.P., and Steinberg, P. (1996). A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, 383(6600), pp. 495-501.

Contreras, J., Poniachik, J., Planzer, M., Lazarte, R., Smok, G., Oksenberg, D., and Brahm, J. (2003). Drug induced liver disease: clinical and pathological patterns in 33 cases. *Revista medica de Chile*, 131(10), pp. 1128-1134.

Colla, L.M., Bertolin, T.E., and Costa, J.A.V. (2004). Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59(1-2), 55-59.

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

Connor, W.E. (1996). Omega-3 essential fatty acids in infant neurological development. *Backgrounder*, 1(1), pp. 1-6.

Connor, W.E. (1999). α -Linolenic acid in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(5), pp. 827-828.

Connor, W.E., Lowensohn, R., and Hatcher, L. (1996). Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids*, 31(1), pp. S183-S187.

Cué Brugueras, M., and Morejón García, M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), pp. 347-361.

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

Das, U.N., and Madhavi, N. (2011). Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells in vitro. *Lipids in health and disease*, 10(1), p. 159.

de Castro Araújo, S., and Garcia, V.M.T. (2005). Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. *Aquaculture*, 246(1-4), pp. 405-412.

8. Recursos Bibliográficos

de Jesus Raposo, M.F., de Morais, A.M.M.B., and de Morais, R.M.S.C. (2014). Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life sciences*, 101(1-2), pp. 56-63.

de Jesus Raposo, M.F., de Morais, A.M.B., and de Morais, R.M.S.C. (2015). Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine drugs*, 13(5), pp. 2967-3028.

de Mule, M.C., Decaire G.Z. and Decano M.S. (1996). Bioactive substances from *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *International Journal of Experimental Botany*, 58, pp. 93-96.

Deng, R., and Chow, T.J. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular therapeutics*, 28(4), pp. e33-e45.

Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A., and Smith, V.J. (2009). A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology*, 11(1), pp. 45-52.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., and Lele, R.D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, 52, pp. 794-804.

Di Mario, F., Cavallaro, L.G., and Scarpignato, C. (2006). Rescue therapies for the management of *Helicobacter pylori* infection. *Digestive diseases*, 24(1-2), pp. 113-130.

Durrington, P. (2003). Dyslipidaemia. *The Lancet*, 362(9385), pp. 717-731.

Dvir, I., Chayoth, R., Sod-Moriah, U., Shany, S., Nyska, A., Stark, A. H., and Arad, S.M. (2000). Soluble polysaccharide and biomass of red microalga *Porphyridium* sp. alter intestinal morphology and reduce serum cholesterol in rats. *British journal of Nutrition*, 84(4), pp. 469-476.

Dvir, I., Stark, A.H., Chayoth, R., Madar, Z., and Arad, S.M. (2009). Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals produced from the red microalga *Porphyridium* sp. in rats. *Nutrients*, 1(2), pp. 156-167.

Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., and Taylor, F.J.R. (2004). The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science*, 305(5682), pp. 354-360.

Farreras, R., Rozman, C., and Cardellach, F. (2012). *Medicina Interna*. 17^a edición. Madrid: Editorial Elsevier.

Fedorova, I., and Salem Jr, N. (2006). Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 75(4-5), pp. 271-289.

Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., and Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281(5374), pp. 237-240.

Folch, J., Lees, M., and Stanley, G.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), pp. 497-509.

Forján, E.; Vílchez Lobato, C.; Vega Piqueres, J.M. (2014). *Bioteconología de Microalgas*. Huelva: Ed. Cepssa.

Frankel, E.N., and Meyer, A.S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological

8. Recursos Bibliográficos

antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), pp. 1925-1941.

Freeman, L.R., Haley-Zitlin, V., Rosenberger, D.S., and Granholm, A.C. (2014). Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: a review of proposed mechanisms. *Nutritional neuroscience*, 17(6), pp. 241-251.

Fuentes, J.L., Huss, V.A., Montero, Z., Torronteras, R., Cuaresma, M., Garbayo, I., and Vílchez, C. (2016). Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga *Coccomyxa onubensis* sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of applied phycology*, 28(6), pp. 3269-3279.

Fuentes-Berrio, L., Acevedo-Correa, D., Gelvez- Ordoñez, V.M. (2015). Functional foods: impact and challenges for development and welfare society colombian. *Biotechnology in the Agricultural and Agroindustrial Sector*, 13 (2), pp. 140-149.

Gantar, M., and Svirčev, Z. (2008). Microalgae and cyanobacteria: food for thought. *Journal of Phycology*, 44(2), pp. 260-268.

Garbayo, I., Torronteras, R., Forján, E., Cuaresma, M., Casal, C., Mogedas, B., and Fuentes, R. (2012). Identification and physiological aspects of a novel carotenoid-enriched, metal-resistant microalga isolated from an acidic river in Huelva (Spain). *Journal of phycology*, 48(3), pp. 607-614.

García, J., Mujeriego, R., and Hernandez-Marine, M. (2000). High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. *Journal of Applied Phycology*, 12, pp. 331-339.

García-Brenes, M.D. (2010). Alimentación y salud, una relación conflictiva. El caso de España. *Salud pública de México*, 52(5), pp. 455-460.

García Martos, P., Fernández del Barrio, M.T., and Paredes Salido, F. (1997). *Microbiología Clínica Práctica*. 3ª edición. Madrid: Díaz de Santos S.A. Ediciones.

Ge, H., Kong, X., Shi, L., Hou, L., Liu, Z., and Li, P. (2009). Gamma-linolenic acid induces apoptosis and lipid peroxidation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. *Cell biology international*, 33(3), pp. 402-410.

Geamanu, A., Goja, A., Saadat, N., Khosla, P., and Gupta, S.V. (2013). ProAlgaZyme subfraction improves the lipoprotein profile of hypercholesterolemic hamsters, while inhibiting production of betaine, carnitine, and choline metabolites. *Nutrition and metabolism*, 10(1), p. 55.

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., and Amiot, M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53(5), pp. 1370-1373.

Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A., Shokravi, S., and Morowvat, M.H. (2007). Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from paddy fields of Iran: characterization of antimicrobial activity of *Chroococcus dispersus*. *Journal of Biological Sciences*, 7(6), pp. 904-910.

Gill, I., and Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends in biotechnology*, 15(10), pp. 401-409.

8. Recursos Bibliográficos

Ginzberg, A., Cohen, M., Sod-Moriah, U.A., Shany, S., Rosenshtrauch, A., and Arad, S.M. (2000). Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium* sp. have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), pp. 325-330.

Global Industry Analysts, Inc. (2019) *Antimicrobial, antibacterial and antioxidative properties coupled with rising consumer preference for natural and healthy alternatives to sugar drive global consumption of honey.*

Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T., Gomez-Jacinto, V., Garbayo, I., Vilchez, C (2010). Microalgae, new paths to functional foods. *I Jornadas del Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario.* Córdoba, 26-28 septiembre 2010. Córdoba: Ed. Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, pp. 77-80.

González-Toril, E., Rodríguez, N., Gómez, F., Amils, R., Aguilera, A., and Remolar, D.F. (2004). Extremofilia Astrobiológica: El caso del río Tinto. *Boletín informativo de la SEA*, (12), pp. 19-26.

Gouveia, L., Marques, A.E., Sousa, J.M., Moura, P., and Bandarra, N.M. (2010). Microalgae—source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Science and Technology Bulletin Functional Foods*, 7(2), pp. 21-37.

Graf, B.A., Milbury, P.E., and Blumberg, J.B. (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of medicinal food*, 8(3), pp. 281-290.

Gross, E. (1999). Allelopathy in benthic and littoral areas: case studies on allelochemicals from benthic cyanobacteria and submersed macrophytes. *Principles and Practices in Plant Ecology*, pp. 179-199.

Grossart, H.P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2005). Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 7(6), pp. 860-873.

Guil-Guerrero, J.L., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J.C., Campra-Madrid, P., and Reboloso-Fuentes, M. (2004). *Functional properties of the biomass of three microalgal species*. *Journal of food engineering*, 65(4), pp. 511-517.

Haag, M. (2003). Essential fatty acids and the brain. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 48(3), pp. 195-203.

Haimeur, A., Mimouni, V., Ulmann, L., Martineau, A.S., Messaouri, H., Pineau-Vincent, F., and Meskini, N. (2016). Fish oil and microalga omega-3 as dietary supplements: a comparative study on cardiovascular risk factors in high-fat fed rats. *Lipids*, 51(9), pp. 1037-1049.

Harbige, L.S. (1998). Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 57(4), pp. 555-562.

Harris, W.S. (1997). n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *The American journal of clinical nutrition*, 65(5), pp. 1645S-1654S.

He, K., Song, Y., Daviglius, M.L., Liu, K., Van Horn, L., Dyer, A.R., and Greenland, P. (2004). Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation*, 109(22), pp. 2705-2711.

Henrikson, R. (1989). *Earth food spirulina*. En Laguna Beach, CA: Ronore Enterprises, Inc.

8. Recursos Bibliográficos

Hoffman, D.R., Birch, E.E., Birch, D.G., Uauy, R., Castañeda, Y.S., Lapus, M.G., and Wheaton, D.H. (2000). Impact of early dietary intake and blood lipid composition of long-chain polyunsaturated fatty acids on later visual development. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 31(5), pp. 540-553.

Hozawa, A., Jacobs Jr, D.R., Steffes, M.W., Gross, M.D., Steffen, L.M., and Lee, D.H. (2009). Circulating carotenoid concentrations and incident hypertension: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Journal of hypertension*, 27(2), pp. 237-242.

Hu, F.B., Bronner, L., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rexrode, K.M., Albert, C.M., and Manson, J.E. (2002). Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *Jama*, 287(14), pp. 1815-1821.

Hu, M.Y., Li, Y.L., Jiang, C.H., Liu, Z.Q., Qu, S.L., and Huang, Y.M. (2008). Comparison of lycopene and fluvastatin effects on atherosclerosis induced by a high-fat diet in rabbits. *Nutrition*, 24(10), pp. 1030-1038.

Huheihel, M., Ishanu, V., Tal, J., and Arad, S.M. (2002). Activity of Porphyridium sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 50(2-3), pp. 189-200.

Hutner, S.H., Provasoli, L., Schatz, A., and Haskins, C.P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 94(2), pp. 152-170.

Jena, J., Pradhan, N., Nayak, R.R., Dash, B.P., Sukla, L.B., Panda, P.K., and Mishra, B.K. (2014). Microalga *Scenedesmus* sp.: a potential

low-cost green machine for silver nanoparticle synthesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(4), pp. 522-533.

Jensen, G.S. (2001). Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. *Journal of American Nutraceutical Association.*, 3, pp. 24-30.

Jiang, F., and Disting, G.J. (2003). Natural phenolic compounds as cardiovascular therapeutics: potential role of their antiinflammatory effects. *Current vascular pharmacology*, 1(2), pp. 135-156.

Jin, E.S., Lee, C.G., and Polle, J.E. (2006). Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): biosynthesis, regulation, and biotechnology. *Journal of microbiology and biotechnology*, 16(6), pp. 821-831.

Kanafani, Z.A., and Corey, G.R. (2007). Daptomycin: a rapidly bactericidal lipopeptide for the treatment of Gram-positive infections. *Expert review of anti-infective therapy*, 5(2), pp. 177-184.

Kang, J.X., and Leaf, A. (1996). Antiarrhythmic effects of polyunsaturated fatty acids: recent studies. *Circulation*, 94(7), pp. 1774-1780.

Kanoski, S.E., and Davidson, T.L. (2011). Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology and behavior*, 103(1), pp. 59-68.

Kasting, J.F., and Siefert, J.L. (2002). Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science*, 296(5570), pp. 1066-1068.

Kaushik, P., and Chauhan, A. (2008). In vitro antibacterial activity of laboratory grown culture of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Microbiology*, 48(3), pp. 348-352.

8. Recursos Bibliográficos

Kepekçi, R.A., Polat, S., Çelik, A., Bayat, N., and Saygideger, S.D. (2013). Protective effect of *Spirulina platensis* enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl₄. *Food chemistry*, 141(3), pp. 1972-1979.

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

Kohsaka, A., Laposky, A.D., Ramsey, K.M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., and Bass, J. (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell metabolism*, 6(5), pp. 414-421.

Komprda, T., Zornikova, G., Knoll, A., Vykoukalova, Z., Rozikova, V., Skultety, O., and Krobot, R. (2014). Effect of dietary eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on expression of rat liver genes controlling cholesterol homeostasis and on plasma cholesterol level. *Czech Journal of Animal Science*, 59(9), pp. 391-398.

Kossah, R., Zhang, H., and Chen, W. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of Chinese sumac (*Rhus typhina* L.) fruit extract. *Food Control*, 22(1), pp. 128-132.

Kromhout, D., Bosschieter, E.B., and Coulander, C.D.L. (1985). The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *New England journal of medicine*, 312(19), pp. 1205-1209.

Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., and Van Langenhove, H. (2010). Enhanced CO₂ fixation and biofuel

production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in biotechnology*, 28(7), pp. 371-380.

Kumar, S., Magnusson, M., Ward, L., Paul, N., and Brown, L. (2015). A green algae mixture of *Scenedesmus* and *Schroederiella* attenuates obesity-linked metabolic syndrome in rats. *Nutrients*, 7(4), pp. 2771-2787.

Kushak, R.I., Drapeau, C., Van Cott, E.M., and Winter, H.H. (2000). Favorable effects of blue-green algae *Aphanizomenon flos-aquae* on rat plasma lipids. *Journal of the American Nutraceutical Association*, 2(3), pp. 59-65.

Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., and Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), pp. 726-732.

Kwak, H.W., Kang, M.J., Bae, J.H., Hur, S.B., Kim, I.S., Park, Y.H., and Lee, K.H. (2014). Fabrication of *Phaeodactylum tricornutum* extract-loaded gelatin nanofibrous mats exhibiting antimicrobial activity. *International journal of biological macromolecules*, 63, pp. 198-204.

Laing, I., and Millican, P.F. (1986). Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture*, 54(4), pp. 245-262.

Landrum, J.T., and Bone, R.A. (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archives of biochemistry and biophysics*, 385(1), pp. 28-40.

Langseth, L. (1995). *Oxidants, antioxidants, and disease prevention*, 1-26. En Bruselas: Ed. ILSI Europe.

8. Recursos Bibliográficos

Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.P., and Bernard, O. (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science and Technology*, 43 (17), pp. 6475-6481.

Larsen, G.L., and Henson, P.M. (1983). Mediators of inflammation. *Annual review of immunology*, 1(1), pp. 335-359.

Lawrence, T., Willoughby, D.A., and Gilroy, D.W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), pp. 787-795.

Layman, D.K. (2014). Eating patterns, diet quality and energy balance: a perspective about applications and future directions for the food industry. *Physiology and behavior*, 134, pp. 126-130.

Lazarus, S., and Bhimba, V. (2008). Antibacterial activity of marine microalgae against multidrug resistant human pathogens. *International Journal on Applied Bioengineering*, 2(1), pp. 32-34.

Leaf, A. (2001). The electrophysiologic basis for the antiarrhythmic and anticonvulsant effects of n-3 polyunsaturated fatty acids: Heart and brain. *Lipids*, 36(1), pp. S107-S110.

Lee, J.B., Hayashi, K., Hirata, M., Kuroda, E., Suzuki, E., Kubo, Y., and Hayashi, T. (2006). Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep-sea water in Toyama Bay. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(10), pp. 2135-2139.

Li, T.T., Liu, Y.Y., Wan, X.Z., Huang, Z.R., Liu, B., and Zhao, C. (2018). Regulatory efficacy of the polyunsaturated fatty acids from microalgae *Spirulina platensis* on lipid metabolism and gut microbiota in high-fat diet rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), pp. 3075.

Lima-Filho, J.V.M., Carvalho, A.F., Freitas, S.M., and Melo, V.M. (2002). Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4), pp. 311-314.

Liu, H.C., Chang, C.J., Yang, T.H., and Chiang, M.T. (2017). Long-term feeding of red algae (*Gelidium amansii*) ameliorates glucose and lipid metabolism in a high fructose diet-impaired glucose tolerance rat model. *Journal of food and drug analysis*, 25(3), pp. 543-549.

Liu, M., Li, X.Q., Weber, C., Lee, C.Y., Brown, J., and Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(10), pp. 2926-2930.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., and Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), pp. 118-126.

Lodish, H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2005). Energética celular. *Biología Celular y Molecular*, 5ª ed. Madrid: Médica Panamericana.

Luengo, E. (2007). *Alimentos funcionales y nutraceuticos*. Madrid: Sociedad Española de Cardiología.

Madhavi, D.L., and Salunkhe, D.K. (1995). Toxicological aspects of food antioxidants. *Food antioxidants*, Cap. 5, pp. 281-374. Boca Raton (FL): CRC Press.

Madhumathi, V., Deepa, P., Jeyachandran, S., Manoharan, C., and Vijayakumar, S. (2011). Antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from freshwater lake. *International Journal of Microbiology Research*, 2(3), pp. 213-216.

8. Recursos Bibliográficos

Mallikarjun Gouda, K.G., Kavitha, M.D., and Sarada, R. (2015). Antihyperglycemic, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Butanol Extract from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 39(5), pp. 594-602.

Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Shakir, C., and Seghal Kiran, G. (2009). Antibacterial activity of *Falkenbergia hillebrandii* (Born) from the Indian coast against human pathogens. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, 78, pp. 161–166.

Marchioli, R., Barzi, F., Bomba, E., Chieffo, C., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., and Mantini, L. (2002). Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation*, 105(16), pp. 1897-1903.

Margulis, L., Mazur, P., Barghoorn, E.S., Halvorson, H.O., Jukes, T.H., and Kaplan, I.R. (1979). The Viking Mission: implications for life on Mars. *Journal of molecular evolution*, 14(1-3), pp. 223-232.

Martínez, J.L., and Rojo, F. (2011). Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), pp. 768-789.

Martinez-Gonzalez, J., and Badimon, L. (2006). Estatinas y ácidos grasos omega-3. Disminución de la mortalidad cardiovascular dependiente e independiente de la reducción de la colesterolemia. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 6(4), pp. 20D-30D.

Martinez-Gonzalez, J., and Badimon, L. (2007). Influence of statin use on endothelial function: from bench to clinics. *Current pharmaceutical design*, 13(17), pp. 1771-1786.

Massana, R., Del Campo, J., Dinter, C., and Sommaruga, R. (2007). Crash of a population of the marine heterotrophic flagellate *Cafeteria roenbergensis* by viral infection. *Environmental microbiology*, 9(11), pp. 2660-2669.

Masuda, M., Abe, T., Sato, S., Suzuki, T., and Suzuki, M. (1997). Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales) 1, 2. *Journal of Phycology*, 33(2), pp. 196-208.

Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), pp. 217-232.

Mayer, A.M., and Hamann, M.T. (2005). Marine pharmacology in 2001–2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 140(3-4), pp. 265-286.

Mayer, C., Côme, M., Ulmann, L., Chini Zittelli, G., Faraloni, C., Nazih, H., and Mimouni, V. (2019). Preventive Effects of the Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum*, Used as a Food Supplement, on Risk Factors Associated with Metabolic Syndrome in Wistar Rats. *Nutrients*, 11(5), pp. 1069.

Mehta, J., Lawson, D., and Saldeen, T. (1988). Reduction in plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) with omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) intake. *American heart journal*, 116(5), pp. 1201-1206.

8. Recursos Bibliográficos

Mei, L.I., Xitao, X., Renhao, X.U.E., and Zhili, L.I.U. (2006). Effects of strontium-induced stress on marine microalgae *Platymonas subcordiformis* (Chlorophyta: Volvocales). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 24(2), pp. 154-160.

Mendiola, J.A., Torres, C.F., Toré, A., Martín-Álvarez, P.J., Santoyo, S., Arredondo, B.O., and Ibáñez, E. (2007). Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content. *European Food Research and Technology*, 224(4), pp. 505-510.

Mercasa (2018) *Informe Alimentación Anual en España. Producción, industria, distribución y consumo* 21ª edición. Madrid: Mercasa – Distribución y Consumo.

Metting, F.B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of industrial microbiology*, 17(5-6), pp. 477-489.

Mišurcová, L., Škrovánková, S., Samek, D., Ambrožová, J., and Machů, L. (2012). Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition. *Advances in food and nutrition research*, 66, pp. 75-145.

Molnár, P., Deli, J., Tanaka, T., Kann, Y., Tani, S., Gyémánt, N., and Kawase, M. (2010). Carotenoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from Golden delicious apple. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 24(5), pp. 644-648.

Moon, M.L., Joesting, J.J., Lawson, M.A., Chiu, G.S., Blevins, N.A., Kwakwa, K.A., and Freund, G.G. (2014). The saturated fatty acid, palmitic acid, induces anxiety-like behavior in mice. *Metabolism*, 63(9), pp. 1131-1140.

Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal feed science and technology*, 91(1-2), pp. 3-20.

Mundt, S., Kreitlow, S., and Jansen, R. (2003). Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), pp. 263-267.

Najdenski, H.M., Gigova, L.G., Iliev, I.I., Pilarski, P.S., Lukavský, J., Tsvetkova, I.V. and Kussovski, V.K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International journal of food science and technology*, 48(7), pp. 1533-1540.

Nasirian, F., Sarir, H., and Moradi-kor, N. (2019). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of *Nannochloropsis oculata* microalgae in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomolecular concepts*, 10(1), pp. 37-43.

Navarro, F. (1998). *Coenzima Q-reductasa de la membrana plasmática del hepatocito. Purificación, caracterización y función antioxidante*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

Navarro, F., Forján, E., Vázquez, M., Montero, Z., Bermejo, E., Castaño, M.Á., Toimil, A. and Domínguez, M.J. (2016). Microalgae as a safe food source for animals: nutritional characteristics of the acidophilic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Food and nutrition research*, 60(1), pp. 30472.

Navarro, F., Forján, E., Vázquez, M., Toimil, A., Montero, Z., Ruiz-Domínguez, M.D.C., and Vega, J.M. (2017). Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Phycological Research*, 65(1), pp. 38-43.

8. Recursos Bibliográficos

Naviner, M., Bergé, J.P., Durand, P., and Le Bris, H. (1999). Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonemacostatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture*, 174(1-2), pp. 15-24.

Nazih H, Bard J-M (2018) Microalgae in human health: Interest as a functional food. In: Levine I.A., Fleurence J. (eds) *Microalgae in health and disease prevention*. Elsevier BV, pp 211-226.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), pp. 593-656.

Nuño, K., Villarruel-López, A., Puebla-Pérez, A.M., Romero-Velarde, E., Puebla-Mora, A.G., and Ascencio, F. (2013). Effects of the marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* in diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 5(1), pp. 106-115.

Okuda, Y., Kawashima, K., Sawada, T., Tsurumaru, K., Asano, M., Suzuki, S., and Yamashita, K. (1997). Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 232(2), pp. 487-491.

Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular engineering*, 20(4-6), pp. 459-466.

Oswald, W.J. (1988) Micro-algae and waste-water treatment. *Microalgal biotechnology*. M.A. Borowitzka and L.J. Borowitzka, Editors. Cambridge: Cambridge University press, pp. 305–328.

Otero, A., García, D., and Fábregas, J. (1997). Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), pp. 465-469.

Pan, Y.Y., Zeng, F., Guo, W.L., Li, T.T., Jia, R.B., Huang, Z.R., and Liu, B. (2018). Effect of *Grifola frondosa* 95% ethanol extract on lipid metabolism and gut microbiota composition in high-fat diet-fed rats. *Food and function*, 9(12), pp. 6268-6278.

Pane, G., Cacciola, G., Giacco, E., Mariottini, G.L., and Coppo, E. (2015). Assessment of the antimicrobial activity of algae extracts on bacteria responsible of external otitis. *Marine drugs*, 13(10), pp. 6440-6452.

Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Alvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., and Sáez, J.F. (2007). *Biología celular*. 3ª edición. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

Patil, N., Le, V., Sligar, A.D., Mei, L., Chavarria, D., Yang, E.Y., and Baker, A. (2018). Algal polysaccharides as therapeutic agents for atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5, pp. 153.

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

Pepys, M.B., and Hirschfield, G.M. (2003). C-reactive protein: a critical update. *The Journal of clinical investigation*, 111(12), pp. 1805-1812.

Pérez-Jiménez, J., and Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food research international*, 39(7), pp. 791-800.

8. Recursos Bibliográficos

Pérez-Jiménez, J., and Saura-Calixto, F. (2007). Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. In *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones*. Cartagena, 29 mayo – 1 junio 2007, pp. 1150-60.

Perona, J.S., Portillo, M.P., Macarulla, M.T., Tueros, A.I., and Ruiz-Gutiérrez, V. (2000). Influence of different dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 84(5), pp. 756-774.

Pittman, J.K., Dean, A.P., and Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource technology*, 102(1), pp. 17-25.

Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A., and Ibanez, E. (2009). Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16), pp. 7159-7170.

Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G.G.B., Herrero, M., Señoráns, F.J., and Ibáñez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), pp. 450-455.

Porras-Loaiza, A.P., and López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), pp. 121-134.

Pratt, R., Daniels, T.C., Eiler, J.J., Gunnison, J.B., Kumler, W.D., Oneto, J.F., and Smith, J.H.C. (1944). Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*, 99(2574), pp. 351-2.

Pulz, O., and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6), pp. 635-648.

Rai, P.K., Mallick, N., and Rai, L.C. (1994). Effect of Cu and Ni on growth, mineral uptake, photosynthesis and enzyme activities of *Chlorella vulgaris* at different pH values. *Biomedical and environmental sciences*, 7(1), pp. 56-67.

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., and Tredici, M.R. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), pp. 100-112.

Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F.J., Cifuentes, A., and Ibáñez, E. (2010). Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), pp. 456-463.

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

Rosell, K.G., and Srivastava, L.M. (1987). Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae. In *Twelfth International Seaweed Symposium*. Springer, Dordrecht, 41, pp. 471-475

Ruiz-Domínguez, M.C., Vaquero, I., Obregón, V., de la Morena, B., Vílchez, C., and Vega, J.M. (2015). Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa* sp.(strain onubensis) under nutrient starvation. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), pp. 1099-1108.

Russell, A.D. (2002). Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. *Journal of applied microbiology*, 92, pp. 1S-3S.

8. Recursos Bibliográficos

Ryan, A.S., Bailey-Hall, E., Nelson, E.B., and Salem, N. (2009). The hypolipidemic effect of an ethyl ester of algal-docosahexaenoic acid in rats fed a high-fructose diet. *Lipids*, 44(9), pp. 817-826.

Rzymski, P., and Jaśkiewicz, M. (2017). Microalgal food supplements from the perspective of Polish consumers: patterns of use, adverse events, and beneficial effects. *Journal of applied phycology*, 29(4), pp. 1841-1850.

Sakamoto, T., Inoue-Sakamoto, K., and Bryant, D.A. (1999). A Novel Nitrate/Nitrite Permease in the Marine Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002. *Journal of Bacteriology*, 181(23), pp. 7363-7372.

Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3), pp. 121-137.

Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., Reina, G.G.B., Señorans, F.J., and Ibáñez, E. (2009). Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT-Food Science and Technology*, 42(7), pp. 1213-1218.

Sastry, V.M.V.S., and Rao, G.R.K. (1994). Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. *Botanica marina*, 37(4), pp. 357-360.

Schuhmann, H., Lim, D.K., and Schenk, P.M. (2012). Perspectives on metabolic engineering for increased lipid contents in microalgae. *Biofuels*, 3(1), pp. 71-86.

Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe, C.J., Lea-Smith, D.J., and Smith, A.G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current opinion in biotechnology*, 21(3), pp. 277-286.

Semple, K.T., Cain, R.B., and Schmidt, S. (1999). Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology letters*, 170(2), pp. 291-300.

Silverman, M.P., and Lundgren, D.G. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of bacteriology*, 77(5), pp. 642-647.

Simopoulos, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E. and Barlow, S. (Ed.) (1991). Health effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. Proceedings of the 2nd International Conference. Washington, D.C., March 20-23, 1990. (1991). World review of nutrition and dietetics, 66, XIV–572.

Simopoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American journal of clinical nutrition*, 70(3), pp. 560s-569s.

Singh, S.C., Sinha, R.P., and Hader, D.P. (2002). Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta protozoologica*, 41(4), pp. 297-308.

Sloan, A.E. (2000). The top ten functional food trends. *Food technology*, 54(4), 33-62.

Soares, S., Vitorino, R., Osorio, H., Fernandes, A., Venâncio, A., Mateus, N., and de Freitas, V. (2011). Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), pp. 5535-5547.

Sohal, R.S., and Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273(5271), pp. 59-63.

8. Recursos Bibliográficos

Soller, M. y Eitan, Y. (1984) Why does selection for liveweight gain increase fat deposition? a model. *World's Poultry Science Journal*, 40(1), pp. 5-9.

Solomon, E.P., Berg, L.R. y Martin, D.W. (2013). *Biología*, 9ª edición. México: Cengage Learning Editores.

Sousa, I., Gouveia, L., Batista, A.P., Raymundo, A., and Bandarra, N.M. (2008). Microalgae in novel food products. *Food chemistry research developments*, pp. 75-112.

Spencer, S.J., Korosi, A., Layé, S., Shukitt-Hale, B., and Barrientos, R.M. (2017). Food for thought: how nutrition impacts cognition and emotion. *Science of Food*, 1(1), pp. 1-8.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), pp. 87-96.

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

Støttrup, J., and McEvoy, L. (2008). *Live feeds in marine aquaculture*. Hoboken (NJ): Ed. Wiley-Blackwell.

Strickland, J.D.H., and Parsons, T.R. (1972). *A practical handbook of seawater analysis*. Ottawa: Ed. Fisheries Research Board of Canada.

Suetsuna, K., and Chen, J.R. (2001). Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Marine Biotechnology*, 3(4), pp. 305-309.

Sukenik, A., Zmora, O., and Carmeli, Y. (1993). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture*, 117(3-4), pp. 313-326.

Thies, F., Garry, J.M., Yaqoob, P., Rerkasem, K., Williams, J., Shearman, C.P., and Grimble, R.F. (2003). Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 361(9356), pp. 477-485.

Thillairajasekar, K., Duraipandiyan, V., Perumal, P., and Ignacimuthu, S. (2009). Antimicrobial activity of *Trichodesmium erythraeum* (Ehr)(microalga) from south East coast of Tamil Nadu, India. *International Journal of Integrative. Biology*, 5(3), pp. 167-170.

Thompson, D., Pepys, M.B., and Wood, S.P. (1999). The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*, 7(2), pp. 169-177.

Tibbetts, S.M., Milley, J.E., and Lall, S.P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), pp. 1109-1119.

Torres, M.L., y Pinilla, M.F. (2007). La Dieta equilibrada: guía para enfermeras de Atención Primaria. Ed. Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación. Zaragoza. Depósito legal: Z-1789-2007.

Tzovenis, I., De Pauw, N., and Sorgeloos, P. (2003). Optimisation of T-ISO biomass rich in essential fatty acids: I. Effects of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture*, 216(1-4), pp. 203-222.

8. Recursos Bibliográficos

Urala, N., and Lähteenmäki, L. (2007). Consumers' changing attitudes towards functional foods. *Food Quality and Preference*, 18(1), pp. 1-12.

Val, A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., and Peláez, F. (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Microbiology*, 4(1), pp. 35-40.

Valentini, K.J., Pickens, C.A., Wiesinger, J.A., and Fenton, J.I. (2018). The effect of fish oil supplementation on brain DHA and EPA content and fatty acid profile in mice. *International journal of food sciences and nutrition*, 69(6), pp. 705-717.

Valenzuela, A., Valenzuela, R., Sanhueza, J., and Morales, G. (2014). Alimentos funcionales, nutraceúticos y foshu: ¿Vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista chilena de nutrición*, 41(2), pp. 198-204.

Vanschoonbeek, K., Feijge, M.A., Paquay, M., Rosing, J., Saris, W., Klufft, C., and Heemskerk, J.W. (2004). Variable hypocoagulant effect of fish oil intake in humans: modulation of fibrinogen level and thrombin generation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(9), pp. 1734-1740.

Vaquero, I., Ruiz-Domínguez, M.C., Márquez, M., and Vílchez, C. (2012). Cu-mediated biomass productivity enhancement and lutein enrichment of the novel microalga *Coccomyxa onubensis*. *Process biochemistry*, 47(5), pp. 694-700.

Vaquero, I., Mogedas, B., Ruiz-Domínguez, M.C., Vega, J.M., and Vílchez, C. (2014). Light-mediated lutein enrichment of an acid environment microalga. *Algal research*, 6, pp. 70-77.

Vázquez-Flores, A.A., Álvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J.A., Wall-Medrano, A., and De la Rosa, L.A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*, 6(2), pp. 84-93.

Waitzberg, D.L., and Garla, P. (2014). Contribución de los ácidos grasos Omega-3 para la memoria y la función cognitiva. *Nutrición Hospitalaria*, 30(3), pp. 467-477.

Wan, X.Z., Li, T.T., Zhong, R.T., Chen, H.B., Xia, X., Gao, L.Y., and Zhao, C. (2019). Anti-diabetic activity of PUFAs-rich extracts of *Chlorella pyrenoidosa* and *Spirulina platensis* in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 128, pp. 233-239.

Wang, B., Li, Y., Wu, N., and Lan, C.Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(5), pp. 707-718.

Webster, A.J.F. (1989). Bioenergetics, bioengineering and growth. *Animal Science*, 48(2), pp. 249-269.

Werman, M.J., Sukenik, A., and Mokady, S. (2003). Effects of the marine unicellular alga *Nannochloropsis* sp. to reduce the plasma and liver cholesterol levels in male rats fed on diets with cholesterol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(10), pp. 2266-2268.

Winocur, G., and Greenwood, C.E. (2005). Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. *Neurobiology of aging*, 26(1), pp. 46-49.

Xiao, Y.F., Gomez, A.M., Morgan, J.P., Lederer, W.J., and Leaf, A. (1997). Suppression of voltage-gated L-type Ca²⁺ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular

8. Recursos Bibliográficos

myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), pp. 4182-4187.

Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., and Takriff, M.S. (2014). An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(1), pp. 6.

Yang, T.H., Yao, H.T., and Chiang, M.T. (2017). Red algae (*Gelidium amansii*) hot-water extract ameliorates lipid metabolism in hamsters fed a high-fat diet. *Journal of food and drug analysis*, 25(4), pp. 931-938.

Young, A., Orset, S., and Tsavalos, A. (1997) Methods for carotenoids analysis, en: A. Pessaraki (Ed.), *Handbook of photosynthesis*, Dekker, New York, 1997, pp. 597-622.

Yúfera, M. and Lubián, L. M (1990). Effects of microalgal diets on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. *Introduction to applied phycology*, 209-227. En: katsuka, I. (Ed.). *Introduction to applied phycology*. SPB Academic Publ. Bv. The Hague.

Zeng, X., Danquah, M.K., Chen, X.D., and Lu, Y. (2011). Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(6), pp. 3252-3260.

Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X. and Liu, Z. (2015). Fucoxanthin: A promising medicinal and nutritional ingredient. *Evidence-Based complementary and alternative medicine*, Vol. 2015, pp. 1-10.

Zhang, J., Li, L., Kim, S.H., Hagerman, A.E., and Lü, J. (2009). Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities

of penta-galloyl-glucose. *Pharmaceutical research*, 26(9), pp. 2066-2080.

Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R., Souza-Soares, L.A., and Queiroz, M.I. (2010). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology*, 101(18), pp. 7107-7111.

8. 2. Referencias de figuras y tablas

8. 2.1. Referencias de figuras

Bitog JP, Lee IB, Yoo JI, Hwang SB, Hong SW and Seo IH. (2009). Development of a large-sized photobioreactor for microalgae production. En Proceedings of the 2009 CIGR International Symposium of the Australian Society for Engineering in Agriculture, Brisbane, Queensland, Australia, September, pp.13-16.

Fuentes, J.L., Huss, V.A., Montero, Z., Torronteras, R.S., Cuaresma, M.C., Garbayo, I., and Vílchez, C.L. (2016). Phylogenetic characterization and morphological and physiological aspects of a novel acidotolerant and halotolerant microalga *Coccomyxa onubensis* sp. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 28(6), pp. 3269-3279.

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

8. 2.2. Referencias de tablas

Vega, JM, Cárdenas, J. and Castillo F. (1983) *La bioconversión de la energía*. Madrid: Editorial Pirámide.

8. Recursos Bibliográficos

Pulz, O., and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6), pp. 635-648.

8. 3. PÁGINAS WEB

Domínguez, A. (2016) Microalga onubense revela propiedades para disminuir triglicéridos y colesterol en sangre. *EuropaPress*, 8 de octubre. Disponible en: <https://www.europapress.es/andalucia/huelva-00354/noticia-microalga-onubense-revela-propiedades-disminuir-trigliceridos-colesterol-sangre-20161008102436.html>[Consultado el 20 de mayo de 2020]

ALIMENTARIA (08/05/2020). Las “verduras del mar”, también ecológicas. Disponible en: <https://www.revistaalimentaria.es/vernoticia.php?volver=andnoticia=las-verduras-del-mar-tambien-ecologicas>. [Consultado el 07 de junio de 2020]

Ríos del Planeta. (16/01/2020). Río Tinto Huelva: mapa, y todo lo que necesita conocer. Disponible en: https://riosdelplaneta.com/rio-tinto-Huelva/#Mapa_del_rio_Tinto_Huelva [Consultado el 5 de junio de 2020]

Wikipedia (09/11/2020) Río Tinto. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/R%C3%ADo_Tinto [Consultado el 21 de enero de 2019].

9. RELACIÓN DE PUBLICACIONES RESULTADO DE ESTA TESIS



Universidad
de Huelva

9.- RELACIÓN DE PUBLICACIONES RESULTADO DE ESTA TESIS
E INDICIOS DE CALIDAD:

- 1.- Navarro, F., Forján, E., Vázquez, M., **Toimil, A.**, Montero, Z., Ruiz-Domínguez, M.D.C., Garbayo I., Castaño M.Á., Vílchez C. and Vega, J. M. (2017). Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Phycological Research*, 65(1), pp. 38-43.

Resumen: A pesar de que en los últimos años se ha desarrollado mucho la metodología para la producción de biomasa de microalgas a gran escala con un bajo riesgo de contaminación, las microalgas extremófilas están aún inexploradas como fuente de productos farmacológicos. En nuestro caso una cantidad significativa de actividad antimicrobiana fue producida por extractos obtenidos de la microalga acidófila eucariota *Coccomyxa onubensis* en disolventes no polares, probados frente a algunas bacterias patógenas más frecuentes en la práctica hospitalaria, tanto Gram-negativas como Gram-positivas. La actividad más eficaz la mostró el extracto de cloroformo contra *Escherichia coli* S, *Salmonella enterica* y *Proteus mirabilis*; el extracto de hexano contra *P. mirabilis*, *Sa. enterica* y *Ca. albicans*; el extracto de diclorometano contra *Sa. enterica* y el extracto de éter dietílico contra *E. coli* S y *Staphylococcus aureus* MB.

Se trata de una publicación en una revista situada en el segundo cuartil (Q2) en la categoría de "Agricultural and Biological Sciences (miscellaneous)", (Q2) en la de "Plant Science", propuestas en el JCR. El trabajo abre la posibilidad del empleo de la biomasa del alga *C. onubensis* como fuente de nuevos agentes antimicrobianos. Su interés radica en la necesidad que presenta la medicina clínica de encontrar nuevos antibióticos dada la elevada resistencia que presentan los microorganismos patógenos a los actuales fármacos.

Factor de Impacto (2017): 1.47

Factor de Impacto (5 años): 1.46

9. Relación de Publicaciones Resultado de esta Tesis

2.- Navarro, F., Forján, E., Vázquez, M., Montero, Z., Bermejo, E., Castaño, M.Á., **Toimil A.**, Chagüaceda E., García-Sevillano M.Á., Sánchez M., Domínguez M.J., Pásaro R., Garbayo I., Vílchez C. and Domínguez, M.J. (2016). Microalgae as a safe food source for animals: nutritional characteristics of the acidophilic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Food & nutrition research*, 60(1), pp. 30472.

Resumen: Se trata de la primera vez que se realiza un estudio completo de bioseguridad alimentaria dosis dependiente con una microalga extremófila. En el trabajo se estudian los efectos de la suplementación dietética de la microalga acidófila *Coccomyxa onubensis* en polvo, sobre los parámetros de crecimiento y salud de ratas de laboratorio. Como resultado se demuestra que la ingesta de dicha microalga, aún a dosis muy altas, no genera daño alguno a los animales modelo de experimentación, encontrándose todos los parámetros fisiológicos, histopatológicos y bioquímicos dentro de los rangos saludables. Además, los animales alimentados con una dieta enriquecida con microalgas mostraron una disminución estadísticamente significativa en los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre de hasta el 50%. Estos datos sugieren que *C. onubensis* puede ser útil como complemento alimenticio para animales y también puede servir como nutracéutico en alimentos funcionales.

Food & nutrition research es una revista situada en el segundo cuartil (Q2) en la categoría de "Food Science and Thechnology" propuesta en el JCR. El trabajo ha descrito por primera vez la posibilidad de emplear las microalgas extremófilas como fuente de alimento y/o nutrientes seguros, abriendo el campo del empleo de éste tipo de microorganismos como recursos naturales sostenibles, por ejemplo en la acuicultura y como fuente de nutracéuticos de interés en la salud humana. En el momento de su envío a la revista (noviembre de 2015), *Food & Nutrition Research* estaba en el primer cuartil (Q1), habiendo bajado al segundo cuartil justo en el momento de la publicación de éste trabajo, pero el Factor de Impacto de los últimos 5 años es de 3.379.

Factor de Impacto (2016): 2.039

Factor de Impacto (5 años): 3.379

- 3.- Navarro, F., **Toimil, A.**, Ramírez, S., Montero, Y., Fuentes, J. L., Perona, J.S., Castaño M.Á., Pásaro R., Vega J.M. and Vílchez, C. (2020). The acidophilic microalga *Coccomyxa onubensis* and atorvastatin equally improve antihyperglycemic and antihyperlipidemic protective effects on rats fed on high-fat diets. *Journal of Applied Phycology*, 32(6), pp. 3923-3931.

Resumen: En éste artículo, continuación del publicado por nuestro equipo en *Food & Nutrition Research* (2016), se comparan los efectos hipolipemiantes de *Coccomyxa onubensis* con la atorvastatina como fármaco de referencia. Dietas hiperlipidémicas e hipercolesterolémicas se administraron a los roedores y comprobamos que suplementar dicha dieta con la microalga mostró un efecto protector contra los riesgos cardiovasculares, al reducir los niveles séricos de glucosa (38.47%), colesterol total (22.65%) y LDL-colesterol (26,70%). Los efectos protectores de la microalga fueron comparables a los de 10 mg/kg de peso corporal por día de atorvastatina. Además, la adición de polvo de microalga en la dieta disminuye el contenido de ácido palmítico en los tejidos del mesencéfalo y de la médula espinal, lo que da como resultado una protección significativa de los animales contra enfermedades relacionadas con neuroinflamaciones.

Se trata de una publicación en una revista situada en el primer cuartil (Q1) con alta calidad (segundo decil) en la categoría de “Marine and Freshwater Biology”, propuesta en el JCR. El trabajo abre la posibilidad del empleo de la biomasa del alga verde extremófila *Coccomyxa onubensis* como coadyuvante en pacientes con riesgo cardiovascular que no responden bien a los tratamientos sólo con estatinas. En este sentido ha mostrado su interés la Unidad de Cardiología y Lípidos del Hospital Infanta Helena de Huelva ofreciéndose a colaborar en un futuro estudio con humanos.

Factor de Impacto (2020): 3.016

Factor de Impacto (5 años): 3.217

9. Relación de Publicaciones Resultado de esta Tesis