

Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales



Caracterización de la radiación ultravioleta en la provincia de Huelva e incidencia en la productividad y el valor biotecnológico de cultivos de interés comercial

Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:

Carlos Casal Bejarano

Fecha de lectura: 7 de noviembre de 2008

Bajo la dirección de los doctores:
Carlos Vílchez Lobato
Benito A. de la Morena Carretero
Juan Pedro Bolívar Raya

Huelva, 2010

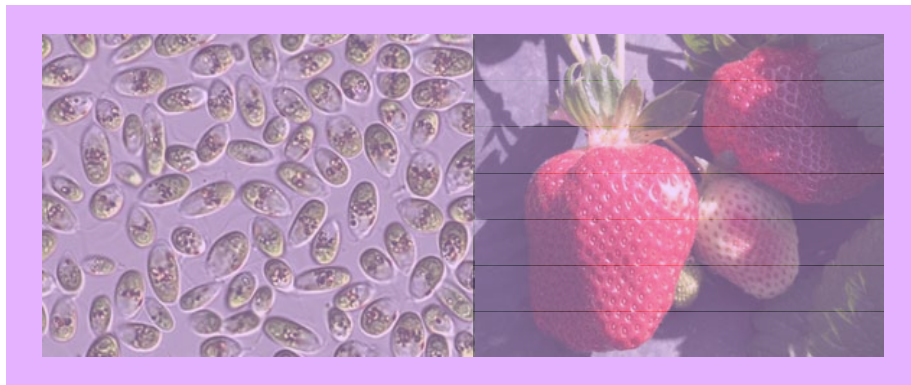
ISBN: 978-84-92944-87-3

D.L.: H 65-2010

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA
EN LA PROVINCIA DE HUELVA E INCIDENCIA EN LA
PRODUCTIVIDAD Y EL VALOR BIOTECNOLÓGICO DE
CULTIVOS DE INTERÉS COMERCIAL**

CARLOS CASAL BEJARANO



UNIVERSIDAD DE HUELVA

**Departamento de Química y CCMM
“Prof. J. Carlos Vílchez Martín”**



UNIVERSIDAD DE HUELVA

*Departamento de Química y Ciencia de los Materiales
"Prof. J. Carlos Vílchez Martín"*

INSTITUTO NACIONAL DE TÉCNICA AEROSPACIAL

Departamento de Observación de la Tierra, Teledetección y Atmósfera

CARACTERIZACIÓN DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN LA PROVINCIA DE HUELVA E INCIDENCIA EN LA PRODUCTIVIDAD Y EL VALOR BIOTECNOLÓGICO DE CULTIVOS DE INTERÉS COMERCIAL

Trabajo realizado para optar al grado de Doctor en Ciencias Ambientales por el
Licenciado:

Carlos Casal Bejarano

Bajo la dirección de:

Dr. Carlos Vílchez Lobato
Profesor Titular de Universidad
Bioquímica y Biología Molecular

Dr. Benito A. de la Morena Carretero
Jefe de la Estación de Sondeos
Atmosféricos de "El Arenosillo"

Dr. Juan Pedro Bolívar Raya
Catedrático de Universidad
Física Aplicada

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AA	Ácido ascórbico
AEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente a la del Ácido Ascórbico
AOs	Antioxidantes
AOT	Espesor óptico de aerosoles
Caro	Carotenoides
cel	Célula
Chl	Clorofila
CICEM	Centro de Investigación para el Cultivo de Especies Marinas
cos	Cosecha
d	Día
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
DMF	Dimetilformamida
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
DPS	Coeficiente o índice de epoxisaturación
ESAt	Estación de Sondeos Atmosféricos
EVA	Etilenvinil acetato
GGPP	Geranil-geranil pirofosfato
h	Hora
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
INTA	Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial
IPP	Isopentenilpirofosfato
min	Minutos
PAL	Fenilalanina amonioliasa
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
PBRs	Fotobiorreactores
PE	Polietileno
PEP	Fosfoenolpiruvato
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
PVC	Cloruro de polivinilo
RAEA	Red Andaluza de Experimentación Agraria
rpm	Revoluciones por minuto
TRIS	Tris-(hidroximetil) aminometano
UV	Radiación ultravioleta total
UV-A	Radiación ultravioleta A
UV-B	Radiación ultravioleta B
UVI	Índice ultravioleta
pg	Picogramo
p/v	Peso/volumen
Vc	Velocidad de acumulación de carotenoides
v/v	Volumen/volumen
ZE	Zeaxantina epoxidasa

Abreviaturas**Consideraciones previas: marco de colaboración científica INTA – UHU**

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1. LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA	5
1.1. El espectro electromagnético	5
1.2. Factores que influyen en la irradiancia UV recibida a nivel superficial	8
<i>1.2.1. Radiación solar extraterrestre</i>	8
<i>1.2.2. Ángulo cenital solar</i>	10
<i>1.2.3. Dispersión Rayleigh</i>	11
<i>1.2.4. Ozono estratosférico</i>	12
<i>1.2.5. Nubosidad</i>	14
<i>1.2.6. Albedo superficial</i>	15
<i>1.2.7. Altitud</i>	15
<i>1.2.8. Aerosoles y gases contaminantes</i>	15
1.3. Interacción con la atmósfera	17
1.4. Niveles de radiación ultravioleta	19
1.5. Efectos biológicos de la radiación ultravioleta	21
2. EL CULTIVO DE MICROALGAS	22
2.1. Antecedentes e introducción	22
2.2. Principales usos	24
<i>2.2.1. Nutrición humana</i>	25
<i>2.2.2. Nutrición animal</i>	26
<i>2.2.3. Biofertilizantes</i>	27
<i>2.2.4. Compuestos de valor obtenidos de microalgas</i>	27
2.3. Mercado actual y perspectivas de futuro	28
2.4. Producción de microalgas en Andalucía	30
2.5. Biotecnología del cultivo de <i>Dunaliella</i>	31
2.6. Factores que estimulan la acumulación de carotenoides	35
<i>2.6.1. Variables ambientales: calidad e intensidad de luz y temperatura</i>	35
<i>2.6.2. Factores nutricionales: compuestos químicos, sales y limitación de nutrientes</i>	36
3. EL CULTIVO DE FRESA	36
3.1. Antecedentes e historia del cultivo	36
3.2. El sector fresero en Huelva	37
3.3. Forzado del cultivo: utilización de microtúneles y macrotúneles plásticos	38
3.4. La fresa como alimento saludable	40
4. CAROTENOIDES Y POLIFENOLES: COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	41

4.1. Carotenoides	42
4.2. Polifenoles	44
5. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL	48
II. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO	51
1.1. Estirpes de microalgas	51
1.2. Variedades de fresa	51
2. CONDICIONES DE CULTIVO	52
2.1. Filtros de corte	52
2.2. Modificación de la región fotosintéticamente activa (PAR)	53
2.3. Cultivo de microalgas	53
2.4. Cultivo de fresa	56
3. DETERMINACIONES FÍSICAS	57
3.1. Caracterización de instrumentos de medida de radiación solar ultravioleta	57
3.1.1. Laboratorio de calibración de la ESA _t	58
3.1.2. Caracterización de la respuesta angular del radiómetro Eldonet	59
3.2. Caracterización de materiales empleados en la modificación de las condiciones radiativas de cultivo	60
3.3. Medida de la irradiancia incidente en cultivos de laboratorio	61
3.4. Contaje celular	62
3.5. Determinación de parámetros agronómicos en fresa	62
4. DETERMINACIONES QUÍMICAS	63
4.1. Contenido de clorofilas y carotenoides totales en células de estirpes del género <i>Dunaliella</i>	63
4.2. Identificación cualitativa y cuantificación de carotenoides en células de estirpes del género <i>Dunaliella</i> mediante cromatografía líquida (HPLC)	64
4.3. Análisis de sólidos solubles en fresa	67
4.4. Contenido de carbohidratos en frutos de fresa	68
4.5. Contenido de antocianos en frutos de fresa	68
4.6. Contenido de compuestos fenólicos totales en frutos de Fresa	70
5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	71
5.1. Medida de la actividad fotosintética en cultivos de microalgas del género <i>Dunaliella</i>	71
5.2. Ensayos de actividad antioxidante	72

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
1. CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y PAR EN LA PROVINCIA DE HUELVA	77
1.1. Niveles de radiación ultravioleta en el período 2001-2006	77
1.2. Dosis de radiación ultravioleta y PAR durante el período 2004-2006	80
1.3. Índice de claridad para la radiación PAR	84
2. INFLUENCIA DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN LA PRODUCTIVIDAD Y VALOR BIOTECNOLÓGICO DE CULTIVOS DE <i>DUNALIELLA</i>	87
2.1. Estudio de la productividad y acumulación de carotenoides de varias estirpes cultivadas bajo PAR en condiciones de laboratorio	88
2.1.1. <i>Cinéticas de crecimiento</i>	88
2.1.2. <i>Cinéticas de acumulación de carotenoides</i>	91
2.2. Estudio de la productividad y acumulación de carotenoides de varias estirpes cultivadas bajo radiaciones UV-A en condiciones de laboratorio	98
2.2.1. <i>Cinéticas de crecimiento</i>	98
2.2.2. <i>Cinéticas de acumulación de carotenoides</i>	102
2.3. Estudio de la productividad y acumulación de carotenoides de la estirpe <i>D. bardawil</i> cultivada bajo radiaciones UV-B en condiciones de laboratorio	106
2.3.1. <i>Cinéticas de crecimiento.</i>	106
2.3.2. <i>Cinéticas de acumulación de carotenoides</i>	109
2.4. Estudio de la productividad y acumulación de carotenoides de varias estirpes cultivadas en condiciones exteriores	112
2.4.1. <i>Cinéticas de crecimiento</i>	113
2.4.2. <i>Cinéticas de acumulación de carotenoides</i>	115
2.5. Estudio de estrategias para la estimulación de la productividad y acumulación de carotenoides en <i>Dunaliella</i> EMS	119
2.5.1. <i>Efecto de la salinidad del medio de cultivo en la productividad y acumulación de carotenoides</i>	120
2.5.2. <i>Efecto de la radiación UV sobre la productividad y acumulación de carotenoides en condiciones exteriores</i>	122
2.5.3. <i>Efecto de la región espectral visible (PAR) sobre la productividad y acumulación de carotenoides en condiciones de laboratorio</i>	131
2.5.4. <i>Efecto de la región espectral visible (PAR) sobre la productividad y acumulación de carotenoides en condiciones exteriores</i>	137
2.5.5. <i>Optimización del proceso de producción de biomasa y estimulación de la acumulación de carotenoides en condiciones exteriores</i>	143

2.6. Hacia el cultivo exterior a escala piloto: experiencia en tanques abiertos exteriores	155
2.6.1. <i>Cinéticas de crecimiento</i>	156
2.6.2. <i>Cinéticas de acumulación de carotenoides</i>	158
2.7. Continuación de la línea de investigación	159
3. INFLUENCIA DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE CULTIVOS DE FRESA	161
3.1. Efectos sobre la productividad: campaña 2004/2005 y 2005/2006	161
3.1.1. <i>Campaña 2004/2005</i>	161
3.1.2. <i>Campaña 2005/2006</i>	166
3.2. Efectos sobre la calidad nutricional del fruto: campaña 2005/2006	175
3.2.1. <i>Total de sólidos solubles</i>	175
3.2.2. <i>Contenido de carbohidratos</i>	176
3.2.3. <i>Contenido de compuestos fenólicos totales</i>	177
3.2.4. <i>Contenido de antocianos totales</i>	178
3.2.5. <i>Actividad antioxidante</i>	179
3.3. Continuación de la línea de investigación	182
IV. CONCLUSIONES	185
V. BIBLIOGRAFÍA	189
Anexo - Perfiles de temperatura y humedad en la finca experimental	209

RESUMEN

El interés por conocer los efectos de la radiación solar ultravioleta (UV) recibida a nivel superficial sobre la Biosfera ha aumentado considerablemente en los últimos años, en especial desde mediados de los años 80, cuando la comunidad científica reconocía la existencia de un debilitamiento de la capa de ozono. Desde entonces, se han desarrollado numerosos estudios encaminados a investigar los efectos que el incremento de la radiación ultravioleta derivado de la disminución del contenido de ozono, puede tener sobre la salud humana. La principal preocupación de las organizaciones internacionales fue, desde el primer momento, garantizar la salud de las personas y poner remedio a la emisión incontrolada de sustancias responsables de la destrucción de la capa de ozono a través del conocido protocolo de Montreal. Sin embargo, el análisis de los efectos de los niveles naturales de radiación UV sobre especies individuales despierta menos interés en la comunidad científica. En este sentido, excepto los estudios realizados con anfibios, cultivos muy concretos y ciertas especies de algas, los trabajos existentes no son numerosos.

A lo largo de este trabajo de Tesis se han caracterizado los niveles de radiación ultravioleta (dosis total, UV-A y UV-B) y fotosintéticamente activa (PAR) que se reciben en la costa occidental de la provincia de Huelva. Para ello, se ha llevado a cabo un análisis correspondiente al período 2004 – 2006, empleando las bases de datos existentes en la ESA de INTA. Este estudio ha permitido evaluar el riesgo al que estaría sometida la población expuesta a la radiación ultravioleta, especialmente en verano, y conocer cómo se distribuye temporalmente la radiación solar en las bandas espectrales citadas. Además, se han analizado los índices de claridad para la región visible del espectro con la intención de valorar la transparencia de la atmósfera y la estabilidad meteorológica mensual en nuestra región. Seguidamente, se analizó la influencia de la radiación UV sobre dos cultivos vegetales de valor comercial: la microalga *Dunaliella* y la fresa.

Así pues, tras obtener una caracterización descriptiva de los niveles de radiación UV y PAR, se han estudiado tres estirpes de *Dunaliella* en cultivos bajo condiciones controladas de laboratorio para decidir cual de ellas podría ser más apropiada para el cultivo exterior. En esta parte de los trabajos se ha analizado el efecto de radiaciones UV-A y UV-B sobre la productividad y valor biotecnológico de cultivos de microalgas, constatando el valor potencial de la radiación ultravioleta (UV), fundamentalmente la menos energética, UV-A, en la estimulación de la acumulación de carotenoides sin pérdida de viabilidad. Asimismo, se ha confirmado el papel esencial de la radiación UV-B en la acumulación de β -caroteno y en detrimento de la viabilidad celular de los cultivos, después de cortos períodos de iluminación con una alta relación UV-B/PAR. La estirpe de *Dunaliella* que resultó más adecuada para continuar con la investigación en cultivos exteriores fue el mutante obtenido por el grupo (*Dunaliella* EMS). La mencionada microalga mostró un crecimiento rápido, una buena capacidad de adaptación a las condiciones exteriores y niveles cuantitativamente comparables al de otras estirpes del género en cuanto a la acumulación de carotenoides.

Dunaliella EMS ha sido ensayada en condiciones exteriores de cultivo para analizar la influencia de la radiación ultravioleta sobre su productividad y la acumulación de carotenoides. Asimismo, se han desarrollado estudios acerca de

la estrategia más conveniente modificando la calidad de luz en el rango visible (PAR) a la hora de producir cultivos de *Dunaliella*. Para cerrar los trabajos realizados con microalgas, se ha llevado a cabo, a escala piloto, alguna experiencia de cultivo exterior en sistemas de mayor volumen en tanques de 300 litros.

Por otra parte, dada la importancia socioeconómica del sector de la fresa en nuestra provincia, se ha evaluado el efecto de la radiación ultravioleta sobre cultivos de las variedades 'Camarosa' y 'Ventana' desde el punto de vista tanto de la productividad del fruto como de su calidad nutricional. Los resultados obtenidos manifiestan que la productividad de los cultivos se ve incrementada en ausencia de radiación ultravioleta.

Sin duda, el cambio climático global, cada vez más asumido por una gran mayoría de instituciones y la sociedad en general, supone un nuevo reto para la comunidad científica, que en los próximos años habrá de buscar respuestas a los cambios que podrían derivarse de dicho fenómeno. En consecuencia, este tipo de estudios podrían ayudar a entender las interrelaciones existentes entre los niveles de radiación ultravioleta que se alcanzan de manera natural en una localización concreta y el desarrollo de ciertos cultivos de interés comercial. En base a este conocimiento podrían preverse actuaciones frente a hipotéticos cambios drásticos en las condiciones de radiación reinantes.

I. INTRODUCCIÓN

1. LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA.

En este apartado se ha realizado un repaso de la bibliografía más relevante relacionada con la radiación ultravioleta (UV). Esta revisión engloba información sobre su origen, sus fuentes (el Sol esencialmente), el fundamento físico, es decir, las radiaciones electromagnéticas, y los efectos biológicos sobre la biosfera, de manera general, y, en la salud humana, en particular.

Para entender y realizar una valoración completa de los efectos de la radiación ultravioleta, es necesario conocer los niveles superficiales tanto a escala global como local. Por tanto, se describen los principales factores que influyen en la irradiancia UV recibida en superficie ($W \cdot m^{-2}$), así como los distintos procesos de atenuación que tienen lugar en la atmósfera. Antes de entrar a considerar los factores antes referidos y a describir los procesos de interacción que tienen lugar en la atmósfera, se expone, a modo de recordatorio general, un breve resumen relativo al espectro electromagnético.

1.1. El espectro electromagnético.

Las cargas eléctricas estacionarias producen campos eléctricos y las cargas eléctricas en movimiento campos eléctricos y magnéticos. Los cambios cíclicos en estos campos producen radiación electromagnética, de manera que ésta consiste en una oscilación perpendicular de un campo eléctrico y magnético. La radiación electromagnética transporta energía de un punto a otro y se mueve a la velocidad de la luz (siendo ésta un tipo de radiación electromagnética). Independientemente de su frecuencia y longitud de onda, todas las ondas electromagnéticas se desplazan en el vacío a una velocidad (c) igual a $299792 \text{ km} \cdot \text{s}^{-1}$. Todas las radiaciones electromagnéticas presentan las propiedades típicas del movimiento ondulatorio, como la difracción y la interferencia.

Las ondas de radiación electromagnética se componen de crestas y valles (convencionalmente las primeras hacia arriba y las segundas hacia abajo). La distancia entre dos crestas o valles consecutivos se denomina longitud de onda (λ) y la frecuencia de la onda (ν), viene determinada por las veces que una oscilación tiene lugar en la unidad de tiempo, es decir, el número de crestas que, cada segundo, pasan por un punto determinado. Esta frecuencia es tan importante que las propiedades de la radiación dependen de ella y se mide en Hercios (Hz) o ciclos por segundo. Velocidad, frecuencia y longitud de onda guardan una relación entre sí:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (1)$$

El tiempo que tarda la onda en realizar una oscilación se llama período (T), es decir $1/\nu$. Sustituyendo en (1) obtenemos que la longitud de onda es inversamente proporcional a la frecuencia. Este hecho es muy importante al considerar aspectos energéticos, ya que a mayor frecuencia, más energía transporta la onda y, por ende, el tipo de efectos que ésta puede provocar en un organismo depende directamente de la frecuencia.

Así pues, el espectro electromagnético (Figura 1) está constituido por la sucesión de todas las ondas de diferente longitud y frecuencia (radiaciones

electromagnéticas). La radiación ultravioleta se compone de ondas electromagnéticas y por tanto pertenece al espectro electromagnético, que no es más que una ordenación de las diferentes ondas atendiendo a criterios como los efectos que provocan o las fuentes que las originan.

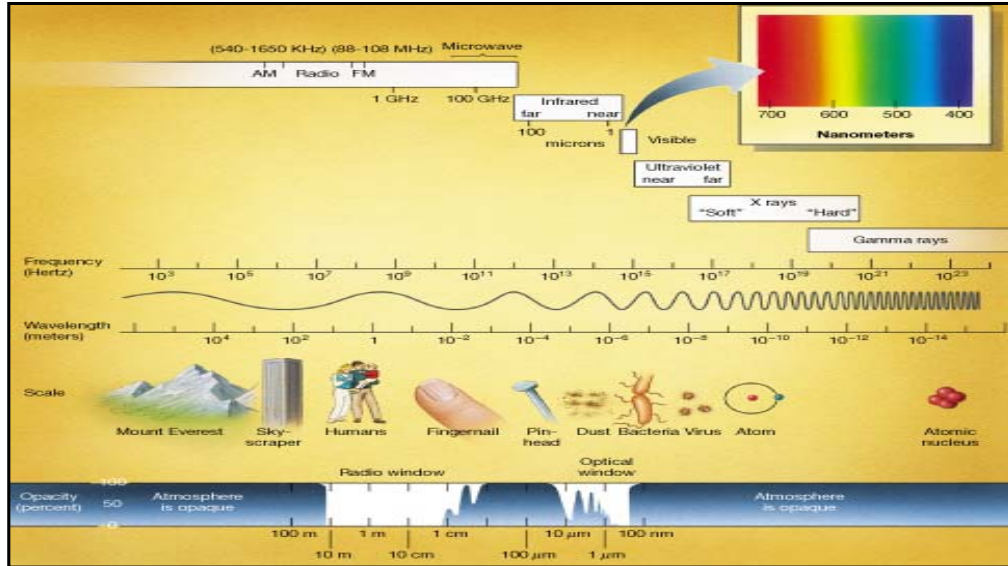


Figura 1. El espectro electromagnético se extiende desde longitudes de onda que van desde $< 10^4$ m (radiofrecuencia) hasta 10^{-14} m (rayos gamma).

Los límites del espectro no deben considerarse barreras estrictas entre los distintos tipos de radiaciones; por ejemplo, los rayos X, en realidad, también se producen tanto en la zona de radiación gamma, como en la de ultravioleta. De la misma forma, la radiación térmica comparte zonas del espectro con la infrarroja y con las ondas hertzianas.

El espectro puede dividirse en dos partes claramente diferenciadas: radiaciones ionizantes y no ionizantes.

A frecuencias altas la radiación es muy energética y puede ionizar átomos, es decir, arrancarles electrones, de tal manera que quedan eléctricamente cargados (iones). En este rango de frecuencias ($>10^{16}$ Hz) se encuentran los rayos X, los rayos gamma y la radiación ultravioleta (tipos UV-B y UV-C). Estas radiaciones, denominadas ionizantes, pueden producir alteraciones genéticas y determinadas enfermedades, como el cáncer.

Los campos electromagnéticos situados, por ejemplo, en el espectro de frecuencias de las microondas tienen suficiente energía como para generar calor, pero no producen ionización en la materia. Pertenecen pues al rango de radiaciones no ionizantes.

Algunas de las fuentes que originan los distintos tipos de radiaciones se indican en la Figura 1:

- Ondas de radio: Oscilación de la carga eléctrica en antenas emisoras.
- Microondas: Oscilación dentro de un magnetrón o cavidad resonante.
- Infrarrojos: Radiación térmica emitida por los cuerpos a temperatura ambiente. Emitida por la superficie terrestre.

- Luz visible: Aceleración de los electrones en los tránsitos energéticos entre órbitas permitidas.
- Ultravioleta: Saltos de electrones en átomos y moléculas excitados.
- Rayos X: Electrones que saltan de órbitas externas en átomos pesados.
- Rayos gamma: Procesos de estabilización en el núcleo después de emisiones radiactivas.

Centrándonos en la región que nos ocupa, y localizados entre los rayos X y la región visible, los rayos ultravioleta fueron descubiertos por Johann Wilhelm Ritter en 1801 al lograr oscurecer sales de plata exponiéndolas más allá del extremo violeta de la luz visible. La radiación ultravioleta (UV) constituye una parte importante del total que el Sol envía a la Tierra, y se produce por saltos de electrones en átomos y moléculas excitados y por radiación térmica de un cuerpo que se encuentre a una $T \approx 10.000$ K. Estos rayos tienen tal energía que producen ionizaciones en átomos presentes en la atmósfera alta dando lugar a la ionosfera terrestre. Además, este fuerte efecto químico los hace tóxicos para la vida, llegando a producir efectos negativos en la mayoría de los seres vivos. (Day y Neale 2002; Pahkala et al. 2002; Ries et al. 2002; Roleda et al. 2004). Tal es así, que la radiación UV-B puede destruir la vida. El ozono es la sustancia presente en nuestra atmósfera encargada de absorber los rayos ultravioleta e impedir que lleguen a nosotros. La región ultravioleta del espectro se extiende desde longitudes de onda que van desde $4 \cdot 10^{-7}$ a $8 \cdot 10^{-9}$ m, pudiéndose diferenciar, dentro de ésta, tres zonas en función de los efectos que produce sobre los seres vivos:

- ◆ UV-C (100 – 280 nm)
- ◆ UV-B (280 – 315 nm)
- ◆ UV-A (315 – 400 nm)

Esta clasificación se definió por primera vez en el 2º Congreso Internacional sobre la luz celebrado en Copenhague en Agosto de 1935 (citado en Sliney y Wolbarsht 1980). Las subdivisiones no son totalmente rígidas y difieren algo dependiendo de la disciplina considerada.

La radiación UV-C es altamente dañina para los seres vivos y bajo su presencia no sería posible la vida en la Tierra tal y como la conocemos actualmente, pero es totalmente absorbida por el ozono, de modo que en ningún caso alcanza la superficie terrestre. Por otro lado, parte de la radiación UV-B es absorbida por el ozono, pero un porcentaje nada despreciable (cerca de un 10%) alcanza la superficie terrestre y afecta a los seres vivos. Finalmente, los efectos de la radiación UV-A son similares a los de UV-B, pero mediante dosis alrededor de 1000 veces superiores, por lo que proporcionalmente resulta menos perjudicial, aunque la intensidad que alcanza en la superficie terrestre es muy superior a la de UV-B (hasta 15 veces), por lo que no hay que infravalorarla.

Aunque la radiación ultravioleta es una gran desconocida para muchos, ya en 1979, la Organización Mundial de la Salud (WHO), en colaboración con el Programa de Medio Ambiente de las Naciones Unidas (UNEP) y el Comité Internacional de Radiación No Ionizante (INIRC) de la Asociación Internacional para la Protección frente a la Radiación (IRPA), publicaba el primer monográfico de Criterios de Salud Ambiental sobre Radiación Ultravioleta (EHC). Años más tarde, en la Conferencia de Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo (UNCED) de 1992, se declaró bajo Agenda 21 que deberían

realizarse actividades sobre los efectos de la radiación ultravioleta. De manera específica:

a) Acometer, como materia de urgencia, la investigación de los efectos que el incremento de radiación ultravioleta superficial como consecuencia de la disminución del contenido de ozono tiene sobre la salud humana.

b) Sobre la base de la investigación anterior, considerar la implantación de medidas apropiadas de remediación para minimizar estos efectos (EHC 160, 1994).

La preocupación por los efectos de la radiación UV sobre la salud humana y la Biosfera no es algo nuevo. Las medidas que se han venido realizando en los últimos años confirman que las disminuciones en el contenido de ozono provocan incrementos en la radiación ultravioleta superficial. Esta relación ha sido mejor documentada a partir de nuevos lugares, además de los ya existentes.

1.2. Factores que influyen en la irradiancia UV recibida a nivel superficial.

1.2.1. Radiación solar extraterrestre.

Constante solar

La constante solar (I_{cs}) se define como la cantidad de energía solar que incide perpendicularmente por unidad de tiempo sobre una superficie de área unitaria normal a la dirección Tierra - Sol colocada fuera de la atmósfera terrestre. Se considera la distancia promedio.

Su valor ha sido objeto de muchas investigaciones y a partir de numerosas mediciones realizadas desde satélites, la NASA adoptó un valor promedio llamado NASA Design Standard. Este valor era $1353 \pm 25 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ y ha sido adoptado en la literatura como constante solar. Sin embargo, una reciente revisión realizada por Fröhlich y Brusa (1981) ha resultado en la referencia radiométrica mundial (WRR) del WRC (Centro de Radiación Mundial) cuyo valor es $1367 \pm 7 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$.

Variación de la radiación solar extraterrestre

Debido a que la intensidad de la energía solar varía de forma inversamente proporcional al cuadrado de la distancia, la variación anual de la distancia Sol – Tierra da lugar a una variación de la radiación solar extraterrestre tal y como se muestra en la Figura 2. La forma elíptica de la órbita terrestre explica que la distancia oscile un 3.4% anualmente. Aún así, esta variación no es significativa (frente a la inclinación) para la Tierra debido a la poca excentricidad de la órbita terrestre. La radiación solar que incide sobre el hemisferio Norte en el invierno perihelio¹ es más intensa que la que recibe el hemisferio Sur en el invierno afelio¹.

$$\text{Análíticamente: } I_o(n) = I_{cs} \cdot (1 + 0.033 \cdot \text{Cos}(360 \cdot n/365)) \quad (2)$$

¹Perihelio/Afelio: posición más próxima/alejada de la Tierra al Sol respectivamente (147.166.500 el 3 de Enero y 152.171.500 km hacia el 4 de Julio).

Siendo n el día juliano (sucesivamente se cuentan los días hasta 365) e I_0 la irradiancia solar extraterrestre en función del día del año.

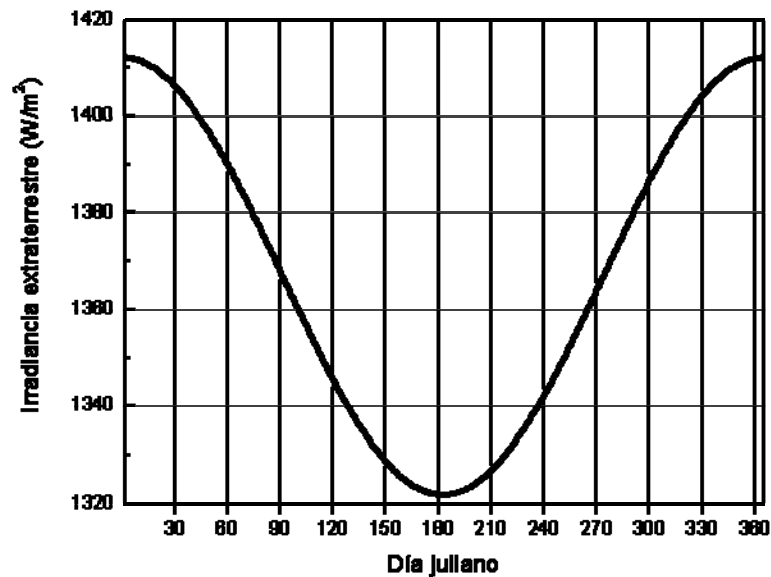


Figura 2. Variación anual de la irradiancia extraterrestre (I_0). Se observa casi un 7% de variación máxima, con el máximo de $1412 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ y el mínimo de $1321 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$.

Además del factor distancia, la intensidad de radiación ultravioleta producida por el Sol tiene leves variaciones, asociadas a su período de rotación aparente - entre 25.03 y 27.62 días -, al ciclo de manchas solares -11 años-, y a la aparición de protuberancias y explosiones en la fotosfera (cara externa del Sol que vemos desde la Tierra). Estas fluctuaciones afectan sobre todo a las componentes más energéticas del espectro, que no llegan a la superficie terrestre. Sin embargo, pueden afectar al ciclo de producción y destrucción de ozono en la alta atmósfera, y, en consecuencia, a la transmisión atmosférica de otras porciones del espectro ultravioleta.

Distribución espectral

El Sol es, con diferencia, la mayor fuente de energía radiante con interés biológico. La energía solar se constituye de ondas electromagnéticas de diferentes longitudes de onda y la constante solar nos da información acerca de la energía total por unidad de tiempo y área sin considerar la frecuencia de la radiación. Sin embargo, para muchos propósitos (absorción atmosférica, fotobiología, energía fotovoltaica, estudio de efectos, etc.) es necesario conocer cómo se distribuye esta energía en función de la longitud de onda, es decir, su distribución espectral (Figura 3).

El espectro solar se aproxima al de un cuerpo negro a 5777 K. En la esquina superior derecha de la Figura 3 se representa detalladamente el rango comprendido entre los 290 y 400 nm, es decir, la región UV-B y UV-A. Los datos han sido extraídos del primer atlas espectral solar que se obtuvo con el Telescopio Pierce/McMath del Observatorio Solar Nacional de Kitt Peak, Arizona, en Junio de 1984. En esta zona, que será objeto de posteriores análisis, pueden observarse las continuas y amplias fluctuaciones de varios órdenes de magnitud que sufre el espectro. Este hecho explica en parte la dificultad que supone estudiar y medir la radiación ultravioleta desde la superficie con un cierto grado

de fiabilidad y la compleja instrumentación necesaria si no se quiere cometer grandes errores.

Conocer el espectro solar es importante para estudiar la radiación ultravioleta superficial, puesto que es usado en modelos de transferencia radiativa (TR), que últimamente son comparados con las medidas experimentales realizadas desde la superficie. Según el informe de la WMO del año 1999, las medidas de satélite disponibles en aquel año mostraban una buena concordancia entre ellas, dentro del $\pm 3\%$ (Cebula et al. 1996).

Es importante conocer la estabilidad de la irradiancia solar en las longitudes de onda de la región UV ya que ésta rige muchos procesos geofísicos, incluyendo la formación del ozono estratosférico. También puede usarse como un estándar de referencia para las medidas UV. Los cambios en la irradiancia solar desde 1700 hasta el presente fueron determinados por Fligge y Solanki (2000). Su modelo asume que las variaciones de irradiancia solar sobre escalas temporales que van desde días a siglos solamente se deben a la cambiante distribución de las propiedades magnéticas de la superficie solar. El estudio determinó un incremento de la irradiancia espectral solar en el mínimo del ciclo de actividad solar desde el mínimo de Maunder (año 1700) del 3% para longitudes de onda menores de 300 nm y del 1.3% para la banda de 300 – 400 nm. El total (todas las longitudes de onda) y la irradiancia visible muestran un incremento cercano al 0.3%. Rozema et al. (2002) apuntan que un incremento a largo plazo basado en la radiación solar UV-C conduciría a un incremento en la producción de ozono estratosférico, lo que reduciría la irradiancia UV-B superficial.

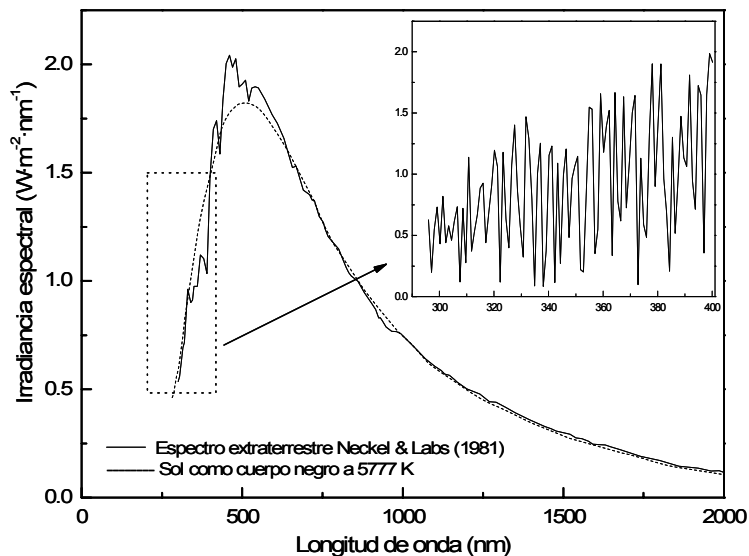


Figura 3. Distribución espectral extraterrestre obtenida por Neckel y Labs a partir de una revisión del espectro de Fröhlich y Wehrli (WRC).

1.2.2. Ángulo cenital solar.

El ángulo cenital solar, junto con el contenido de ozono presente en la columna atmosférica, puede considerarse el principal factor del que depende la irradiancia superficial ultravioleta. El ángulo cenital solar (Figura 4) se define como aquel que forma la dirección aparente del Sol con la vertical local y depende de la hora del día, la estación (día), y la latitud del lugar. El ángulo es

mínimo al mediodía solar y va aumentando al alejamos de la vertical, siendo mayor en el ocaso y al amanecer. Por otro lado, los valores anuales más pequeños se dan cuando el Sol está directamente encima de nuestra cabeza (mediodía local), en los equinoccios, y en el Ecuador. Dada una localización, el ángulo cenital está cambiando constantemente a lo largo de dos escalas temporales cíclicas, la diaria y la anual, y la radiación incidente también sigue estas pautas (Webb 1997).

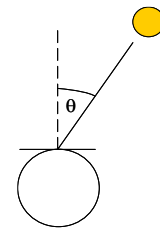


Figura 4. Ángulo cenital (θ).

La influencia de este factor tiene dos aspectos, uno de ellos puramente geométrico, ya que el flujo de radiación que atraviesa una superficie cualquiera varía con la orientación de la superficie; es decir, si ésta es paralela a la dirección de incidencia, el flujo de radiación es cero, mientras que si es perpendicular, resulta máximo. Además de este efecto, el aumento del ángulo cenital implica que la radiación tiene que atravesar una capa atmosférica más gruesa, y por consiguiente, su atenuación es mayor.

1.2.3. *Dispersión Rayleigh.*

La atenuación de la radiación solar no sólo se produce por absorción, sino también por la denominada dispersión de Rayleigh. La dispersión es un proceso físico asociado a la interacción de la luz con la materia que tiene lugar en todas las longitudes de onda del espectro electromagnético. Cuando la luz incide sobre las partículas de materia de un tamaño similar al de la longitud de onda de la radiación incidente, ni la fracción de la radiación reflejada ni la dirección de ésta siguen las leyes básicas de la óptica geométrica. Por tanto, al paso de una onda electromagnética, una partícula extrae continuamente energía de la onda incidente y vuelve a radiarla en todas direcciones, pero no de forma isotrópica. De esta manera, la partícula puede considerarse como una fuente secundaria de energía electromagnética, denominada radiación dispersada. El haz de fotones es desviado de su dirección original por la partícula material sin que exista variación en la energía total electromagnética (no hay absorción). Si la dispersión es igual en todas las direcciones, la intensidad reemitida es isotrópica y el diagrama de radiación es simétrico respecto a la dirección de la onda incidente. En principio, una pequeña partícula anisotrópica² tiende a dispersar la luz de la misma manera en la dirección hacia adelante y hacia atrás, pero conforme las partículas se hacen mayores, la energía dispersada se concentra cada vez más en la dirección hacia adelante y cada vez con mayor complejidad, como se refleja en la Figura 5.

²Partícula anisotrópica: aquella cuyo tamaño y propiedades varían en función de la dirección considerada.

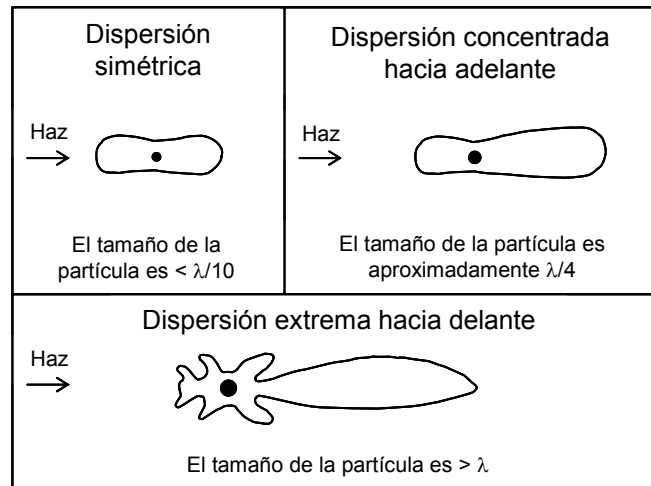


Figura 5. Funciones de fase para distintos tamaños de partícula. Adaptado a partir de McCartney (1976).

En la atmósfera, las partículas responsables de la dispersión cubren tamaños desde el correspondiente a moléculas de gases (aprox 10^{-8} cm = 1 Ångstrom) hasta grandes gotas de agua de lluvia y partículas de granizo (1 cm). La intensidad relativa del proceso de dispersión depende del radio de la partícula y de la longitud de onda de la radiación incidente. Cuando las partículas son mucho menores que la longitud de onda incidente, tiene lugar la dispersión Rayleigh, que se produce cuando la luz incide sobre moléculas de aire (N_2 , O_2) de pequeño tamaño ($\varnothing \approx 1$ nm), menores que la longitud de onda de la radiación visible ($\lambda_{VIOLETA} = 380$ nm, $\lambda_{ROJO} = 780$ nm). El coeficiente que caracteriza este tipo de dispersión viene dado por:

$$\sigma_{RAY} = 8.79 \cdot 10^{-3} \cdot \lambda^{-4.092} \propto \lambda^{-4} \quad (3)$$

Es decir, la dispersión Rayleigh resulta ser inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda incidente.

1.2.4. Ozono estratosférico.

Como ya se comentó, junto con el ángulo cenital solar, el contenido de ozono en la columna atmosférica, y más concretamente la capa de ozono estratosférico, es el principal factor atmosférico que provoca una mayor atenuación de la cantidad de radiación ultravioleta que llega a la superficie terrestre.

El ozono es una molécula presente en la atmósfera terrestre, entre los 10 y 50 km de altitud en su mayor parte (90%) y especialmente entre los 25-30 km, donde su concentración es mayor (estratosfera). Si pudiésemos “concentrarlo” todo en una sola capa, ésta sólo tendría un espesor de 3 mm. Su contribución a la composición del aire no supone, incluso en la capa de ozono, más de un 0.01%. Esta pequeña proporción nunca habría sido tan importante y de interés para la comunidad científica de no ser por su determinante importancia en el mantenimiento de la Biosfera.

Chapman publicó en 1930 la primera teoría que explicaba la presencia de ozono en la estratosfera. Considera que el ozono se encuentra en equilibrio a unos 40 km de altura como consecuencia de procesos continuos de formación y

destrucción (Chapman 1930). La razón de su existencia en la estratosfera se debe a que la reacción de formación:



exige la presencia de oxígeno atómico que se genera por fotodisociación en la región ultravioleta a longitudes de onda menores de 242 nm.



La concentración de oxígeno atómico aumenta con la altura en relación directa con la radiación ultravioleta disponible. Por el contrario, el oxígeno molecular disminuye con la altura de acuerdo a la ley barométrica, de forma que existe una región en la alta estratosfera en donde la reacción (4) es máxima.

Simultáneamente, el ozono se destruye por dos mecanismos básicos. Por un lado reacciona con el propio oxígeno atómico para recuperar la forma estable:



y, sobre todo, es fotodisociado por la propia radiación ultravioleta. Esta fotodisociación tiene lugar fundamentalmente entre los 200 y 300 nm (región de Hartley), pero también en el visible (región de Chappuis) y en una pequeña banda que se extiende desde el extremo menos energético de Hartley hasta aproximadamente 340 nm:



Las constantes de reacción y de fotodisociación de estas reacciones conducen a una producción de ozono cuatro veces superior a la destrucción. Sin embargo, el principal mecanismo destructor no es la fotodisociación por oxígeno atómico sino la reacción con óxidos de nitrógeno, y en mucha menor medida, con compuestos de origen antrópico que contienen Cl y Br (halones y CFC's) (Figura 6).

El ozono puede ser disipado por los óxidos de nitrógeno. Estos compuestos son químicamente muy estables en las capas inferiores de la atmósfera y no son disociados hasta que alcanzan las capas superiores (hasta una altura aproximada de 42 km) al ser transportados por las corrientes de aire ascendente. El ciclo catalítico de los óxidos de nitrógeno es el siguiente:



Balance neto: $\text{O}_3 + \text{O} \rightarrow 2\text{O}_2$

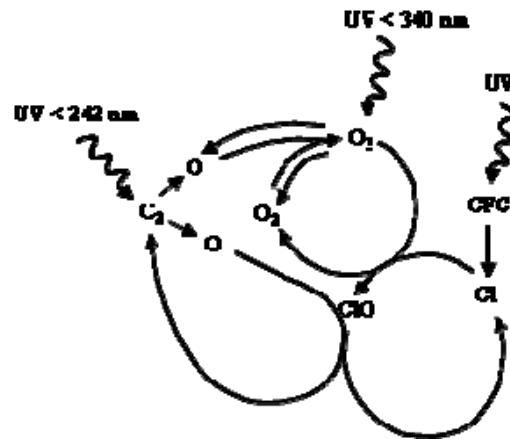


Figura 6. Ciclos de formación/destrucción del ozono y papel de los CFC's.

Las ecuaciones de Chapman no representan más que una moderada aportación al balance global de ozono en la estratosfera ya que ésta es más compleja de lo que en un principio consideró Chapman. Sin embargo, en la actualidad no se cuestionan las reacciones (4) – (7), constituyendo la base sobre la que se ha desarrollado toda la posterior fotoquímica de esta región (Gil 1990).

1.2.5. Nubosidad.

Las nubes tienen más influencia que ninguna otra variable atmosférica sobre la irradiancia superficial ultravioleta. La fracción de cielo cubierto y el tipo de nubes afectan a la intensidad y composición espectral de la radiación ultravioleta a nivel superficial. Sin embargo, los efectos de las nubes sobre la irradiancia solar ultravioleta son extremadamente complejos y se conoce muy poco acerca de las propiedades nubosas y de sus relaciones con la radiación UV (Estupiñán et al. 1996). Estos efectos son difíciles de cuantificar y altamente variables dependiendo de la cantidad y cobertura nubosa, de la morfología de la nube, de las distribuciones de tamaño de las partículas y de la posible presencia de absorbentes en su interior (Madronich et al. 1998; Mayer et al. 1998).

El efecto de atenuación se debe principalmente a la reflexión de la radiación ultravioleta por las gotas de agua o cristales de hielo que forman la nube. El efecto neto no siempre es una disminución de la irradiancia; en ocasiones, las nubes cubren gran parte del cielo pero no ocultan el disco solar. En estas circunstancias, la radiación solar reflejada hacia arriba por la superficie terrestre, es reflejada a su vez por las nubes nuevamente hacia la Tierra, por lo que aumenta así el nivel de irradiancia superficial. Este fenómeno depende del tipo de nube, de la cobertura nubosa y de las condiciones locales. Se sabe que pueden aparecer potenciaciones de hasta el 25% bajo nubes fracturadas (Estupiñán et al. 1996; Sabburg y Wong 2000; Weihs et al. 2000), o si hay reflexiones desde la parte superior de las nubes bajo sitios de observación a gran altitud (McKenzie et al. 2001b). Sabburg y Wong (2000) postularon que la máxima potenciación de la radiación UV-B ocurre cuando se adiciona la radiación difusa, procedente de la dispersión múltiple, entre nubes bajas o neblina y cirros altos, particularmente cuando el Sol todavía es visible a través de ellos. Incluso para grandes fracciones nubosas, la atenuación de la irradiancia puede ser pequeña si las nubes no obstruyen el haz directo. Por lo tanto, uno de los parámetros más importantes es observar si el Sol está o no occultado (Grant y Heisler 2000; Schwander et al. 2002).

La transmisión de las nubes depende en parte de la longitud de onda. En la región UV-A, ésta se incrementa ligeramente hacia longitudes de onda más cortas debido al aumento de las reflexiones múltiples entre la nube y las moléculas de aire que la rodean (Seckmeyer et al. 1996). A longitudes más cortas, en el rango UV-B, las largas distancias que el fotón ha de recorrer en su trayectoria pueden incrementar la absorción por el ozono troposférico, dando lugar a un marcado descenso en la transmisión efectiva (Mayer et al. 1998).

1.2.6. Albedo superficial.

Una parte de la radiación UV que llega a la superficie terrestre es absorbida mientras que otra vuelve reflejada al espacio. La cantidad reflejada depende de las propiedades de la superficie y normalmente es menor del 10% (hierba, tierra y agua). Las principales excepciones son suelos ricos en yeso, que reflejan cerca de un 15 – 30%, la arena de la playa, alrededor del 25%, y la nieve, que puede reflejar hasta el 90% (Diffey 2002). Según el informe de la WMO de 1999, la nieve potencia la radiación UV a 324 nm entre un 8 y un 39%.

1.2.7. Altitud.

Como consecuencia de la disminución del espesor atmosférico que tiene que atravesar la radiación UV en un lugar elevado, se produce un aumento de ésta con la altitud. En la práctica, en la dependencia de este factor influyen además diferencias en el albedo superficial, las extinciones por aerosoles de la capa limitante y las concentraciones de ozono troposférico. Por lo tanto, la dependencia no se representa por un valor simple (Seckmeyer et al. 1997). Incluso cuando se ignoran estos efectos, se ha encontrado que la dependencia de la irradiancia UV cambia frente al ángulo cenital y la longitud de onda a mayor altitud. En general, para la radiación ultravioleta eritemáticamente pesada (es decir, aquella que provoca eritema), las irradiancias en condiciones despejadas aumentan entre un 5 y 10% por kilómetro (McKenzie et al. 2001b; Schmucki y Philipona 2002; Zaratti et al. 2003), con el incremento más grande para un ángulo cenital de 60 – 70°. En algunos casos, el gradiente vertical en regiones montañosas puede ser más grande (superando el 50% por km) debido a efectos locales como el incremento del albedo con la altitud y las altas concentraciones de ozono o aerosoles en la baja troposfera (Seckmeyer et al. 1997).

Un claro ejemplo del efecto de este factor geográfico se encuentra en los Alpes, donde existen series temporales de 20 años que muestran como en días soleados la dosis diaria de radiación global incrementa un $8 \pm 2\%$ por cada 1000 m (irradiancia total), un $9 \pm 2\%$ por 1000 m (irradiancia UV-A) y un $18 \pm 2\%$ por 1000 m (irradiancia efectiva eritemática). Además, se observa una dependencia espectral de la variación de la radiación UV-B con la altitud. Así, la irradiancia a 370 nm aumenta un 9% cada 1000 m, un 11% a 320 nm y un 24% a 300 nm, siendo ésta la más efectiva en provocar daños sobre la materia orgánica (Schmucki et al. 2002).

1.2.8. Aerosoles y gases contaminantes.

Las pequeñas partículas suspendidas en el aire, ya sean líquidas o sólidas, es decir, los aerosoles, pueden tener un efecto significativo sobre la transmisión de radiación UV-B hacia la superficie terrestre. La magnitud de este efecto depende del número de partículas y de su constitución físico - química (hollín, polvo, neblina, humo, ceniza, aerosoles marinos, etc.). Con frecuencia,

estas partículas se encuentran en la parte más baja de la troposfera (capa limitante) y se asocian con la contaminación.

Los aerosoles atenúan la radiación ultravioleta a través de la atmósfera. Dicho fenómeno se describe mediante el espesor óptico de aerosoles (AOT)³ y el valor medio del albedo de dispersión simple de la columna (w_o), que es el cociente entre la dispersión o *scattering* y la extinción:

$$w_o(\lambda) = \frac{\sigma_d(\lambda)}{\beta(\lambda)} \quad (10)$$

Siendo el coeficiente de extinción, $\beta(\lambda)$, la suma del coeficiente de dispersión $\sigma_d(\lambda)$ y el de absorción $\sigma_a(\lambda)$.

Generalmente, se asume que la dependencia de la longitud de onda del AOT es proporcional a $\lambda^{-\alpha}$, donde λ es la longitud de onda y α el coeficiente de Ångstrom:

$$\alpha = \frac{2 \cdot \pi \cdot r}{\lambda} \quad (11)$$

Siendo r el radio de la partícula considerando que ésta es esférica.

Recientemente se han realizado progresos significativos en relación a la medida y cuantificación de los efectos que los aerosoles tienen sobre la atenuación de longitudes de onda de la región UV-B. Las medidas superficiales han mostrado que se dan grandes reducciones de la radiación UV-B cuando se presentan aerosoles absorbentes como el humo procedente de la quema de biomasa (Ilyas et al. 2001; Kirchhoff et al. 2001), los incendios forestales (McArthur et al. 1999), o el polvo desértico (di Sarra et al. 2002a). Trabajos recientes sugieren que los aerosoles antropogénicos que absorben en la región UV pueden jugar un papel más importante en la atenuación de irradiancias UV del que se había asumido con anterioridad (Jacobson 2001).

Por otra parte, los efectos del dióxido de azufre sobre la radiación UV son despreciables si consideramos una escala global, pero podrían ser significativos en sitios cercanos a fuentes de contaminación local o con continua actividad volcánica (Fioletov et al. 1998).

Otros gases que absorben en la región UV (p.e. dióxido de nitrógeno, ácido nítrico y formaldehído) no son significativos bajo condiciones naturales, pero también podrían serlo en situaciones de fuerte contaminación. Se ha estimado que los aerosoles sulfatados antropogénicos (asociados primariamente con la combustión de fuel) han disminuido las irradiancias superficiales de radiación UV-B en un 5 – 18% en regiones industrializadas del Hemisferio Norte (Liu et al. 1991).

Por lo tanto, en la atmósfera baja de determinadas áreas urbanas se producen concentraciones importantes de gases contaminantes como el ozono troposférico, el dióxido de azufre o el dióxido de nitrógeno, que absorben

³AOT: Parámetro adimensional que indica la atenuación de la radiación solar provocada por la concentración de aerosoles presente en la columna atmosférica.

radiación ultravioleta. Paradójicamente, a pesar del debilitamiento de la capa de ozono estratosférico que estos gases provocan, el aumento de su concentración en la troposfera de áreas contaminadas conlleva una disminución de la intensidad de radiación ultravioleta.

1.3. Interacción con la atmósfera.

La atmósfera no es un cuerpo transparente, en ella se encuentran pequeñas moléculas y partículas en suspensión (aerosoles) que interactúan con la radiación incidente. Cuando la energía encerrada en los cuantos de radiación ($h\nu$) choca con estas partículas y moléculas, se dan fenómenos de dispersión, absorción o emisión que dependen de la longitud de onda. Generalmente, en la atmósfera, cuanto mayor es la longitud de onda (λ), menor es la dispersión, mientras que la absorción presenta comportamientos variables. Las partes del espectro electromagnético donde la radiación no es absorbida, llegando a la superficie terrestre, se denominan “ventanas atmosféricas”. La más importante de todas ellas es la ventana biológica, que abarca el intervalo comprendido entre los 300 y 1000 nm, e influye en gran parte de los procesos de la Biosfera, la fotosíntesis esencialmente. Además de la energía de la región visible, las plantas también hacen uso de las energías a ambos lados de este rango, es decir, de pequeñas partes tanto de la zona infrarroja como de la ultravioleta.

Conceptos de scattering y absorción

La mayoría de la luz que alcanza nuestros ojos no lo hace directamente a través de sus fuentes, sino de forma indirecta por medio del proceso de *scattering*. En la atmósfera podemos observar muchos ejemplos coloridos de *scattering* generados por moléculas, aerosoles, nubes que contienen gotas y cristales de hielo. El cielo azul, las nubes blancas, el arco iris o las aureolas, por nombrar algunos..., todos son fenómenos ópticos debidos al *scattering*. Éste es un proceso físico fundamental asociado con la luz y su interacción con la materia en el que una partícula situada en el camino de una onda electromagnética extrae continuamente energía de la onda incidente y la re-emite en todas las direcciones. Por lo tanto, cada partícula puede ser considerada como una fuente puntual de energía dispersada. En este sentido, en un volumen dispersante que contiene muchas partículas, cada partícula se expone y dispersa la luz que ya ha sido dispersada por otras partículas (Figura 7)

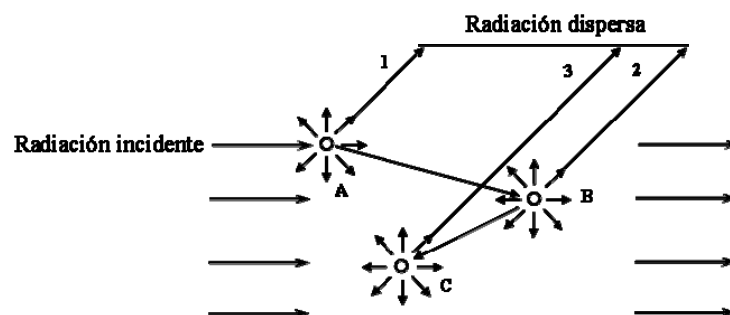


Figura 7. Proceso de *scattering* múltiple.

A menudo, el *scattering* viene acompañado de absorción. En el espectro visible apenas hay absorción por parte de las moléculas atmosféricas. Tanto la dispersión (cambio de dirección del fotón) como la absorción (conversión en calor u otra forma de energía) eliminan energía de un haz de luz que atraviesa el

medio. El haz es atenuado y a esta atenuación se le conoce con el nombre de extinción. Por lo tanto, la extinción es el resultado de la dispersión más la absorción.

Absorción en la región ultravioleta

La radiación solar que atraviesa la atmósfera es absorbida principalmente por el O₂, O₃, N₂, CO₂, H₂O, O, y N, aunque el NO, N₂O, CO y CH₄, en menor grado, también presentan espectros de absorción. La absorción y emisión de radiación tiene lugar cuando los átomos o moléculas sufren transiciones de un estado energético a otro. Los átomos muestran espectros lineales asociados con la energía electrónica. Sin embargo, las moléculas pueden presentar además dos tipos adicionales de energía (rotacional y vibracional) que originan complejos sistemas de banda.

Los espectros debidos a las transiciones electrónicas del ozono y del oxígeno y el nitrógeno, tanto atómico como molecular, aparecen principalmente en la región UV, mientras que aquellos debidos a transiciones rotacionales y vibracionales de moléculas triatómicas como el H₂O, O₃, y el CO₂ se encuentran en la región infrarroja (Figura 8).

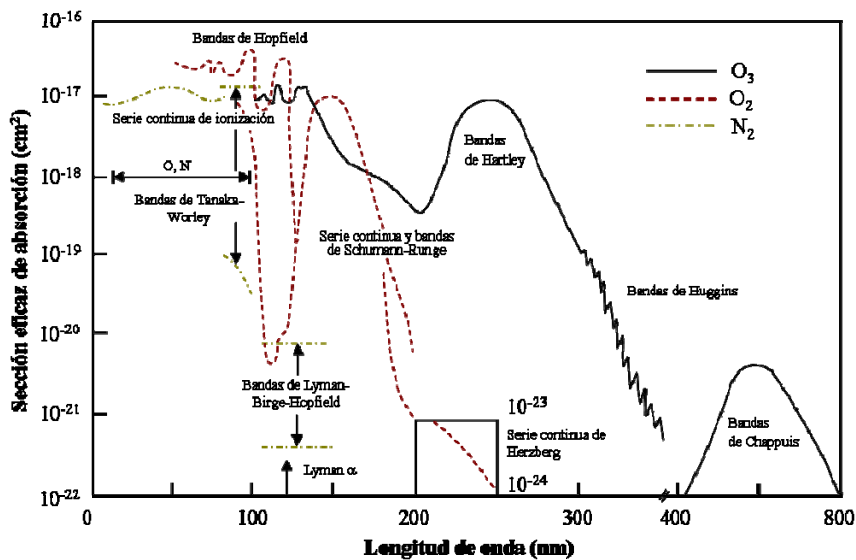


Figura 8. Secciones eficaces de absorción del ozono, oxígeno y nitrógeno moleculares en la región UV. Las regiones de absorción del oxígeno y nitrógeno atómicos también se muestran.

En definitiva, la absorción de radiación solar ultravioleta (UV) representa un importante papel en la dinámica de la atmósfera superior.

Atenuación atmosférica

El espectro de la radiación solar que incide en la parte superior de la atmósfera es muy amplio y abarca desde radiaciones ionizantes de longitud de onda del orden de 100 nm hasta radiación infrarroja de unos 10000 nm, encontrándose su máximo en torno a los 450 nm. A su paso por la atmósfera, la radiación solar sufre una importante atenuación (procesos de absorción y dispersión), por lo que la amplitud de su espectro queda notablemente reducida. A nivel del mar y en ausencia de nubes, el espectro solar abarca

aproximadamente el intervalo 300 – 2000 nm, con una irradiancia máxima a unos 480 nm (Figura 9).

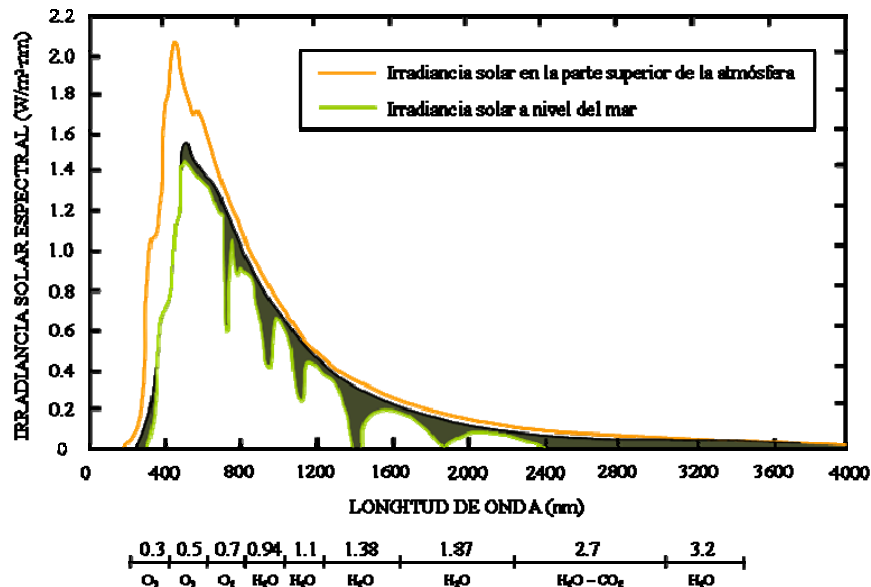


Figura 9. Curvas de distribución de irradiancia espectral (Thekaekara, 1976). Las áreas negras representan la absorción de varios gases en una atmósfera despejada. La línea segmentada representa los distintos gases implicados en la absorción y la longitud de onda (en μm) en la que se centran sus bandas.

En la región UV, la intensa banda de Hartley que presenta el ozono, centrada en unos 250 nm, atenúa completamente la escasa radiación solar en el UV-C.

La radiación ultravioleta que penetra hacia la superficie terrestre presenta dos componentes, la directa y la difusa (Chandrasekhar 1960). La componente directa se atenúa exponencialmente a su paso por la atmósfera, mientras que la cuantificación de la atenuación que experimenta la componente difusa es más compleja y requiere el uso de modelos de transferencia radiativa (Kerr 1997). Parte de la radiación directa incidente se transforma en difusa debido al fenómeno de *scattering*, de forma que la irradiancia total UV incidente sobre un plano horizontal a nivel superficial es la suma de la radiación directa transmitida desde el Sol y la radiación difusa dispersada a lo largo de la atmósfera.

Resumiendo, procesos de interacción con la atmósfera, como la absorción o dispersión, provocan que la radiación UV sea fuertemente dispersada. En general, más de la mitad del total que alcanza la superficie corresponde a la componente difusa. Más del 40% de la irradiancia a 300 nm que llega a la superficie terrestre no proviene directamente del disco solar (radiación directa) sino del resto del cielo (radiación difusa), lo que da una idea del importante papel que juega la dispersión Rayleigh.

1.4. Niveles de radiación ultravioleta.

Desde principios de la década de los 90, los científicos han puesto un gran énfasis en monitorizar la radiación ultravioleta (UV). Este interés se basa en una infinidad de razones, entre las que se incluyen detectar cambios en la cantidad de radiación que alcanza la tierra, incrementar el conocimiento público acerca de ésta, evaluar sus efectos biológicos, o establecer una climatología

básica, entre otras. La radiación UV se mide alrededor del mundo en más de 100 lugares, principalmente en América del Norte y Europa. Para esta medida suelen emplearse instrumentos superficiales o estimaciones a partir de satélites, como por ejemplo el TOMS. Los instrumentos localizados en superficie constituyen la mejor opción para medir el nivel de radiación UV que alcanza la tierra en un lugar concreto.

Ya se ha comentado anteriormente como el nivel de radiación ultravioleta se ve influenciado por diferentes factores geográficos. Cuando no se dispone de medidas, entender los procesos que afectan a la radiación UV permite a los científicos estimar los niveles en diferentes lugares y períodos de tiempo. La mejora en el conocimiento de estos factores también ayuda a que los científicos estimen como afectará a los niveles UV un medio ambiente cambiante y viceversa.

En las Figuras 10 y 11 se muestran los niveles promediados de irradiancia eritémica recibidos en el Hemisferio Norte que causan eritema en la piel para tener una idea general de la variación de la radiación ultravioleta recibida a lo largo del año y, más concretamente, la evolución del índice UVI⁴ promedio en España en las distintas estaciones del año.

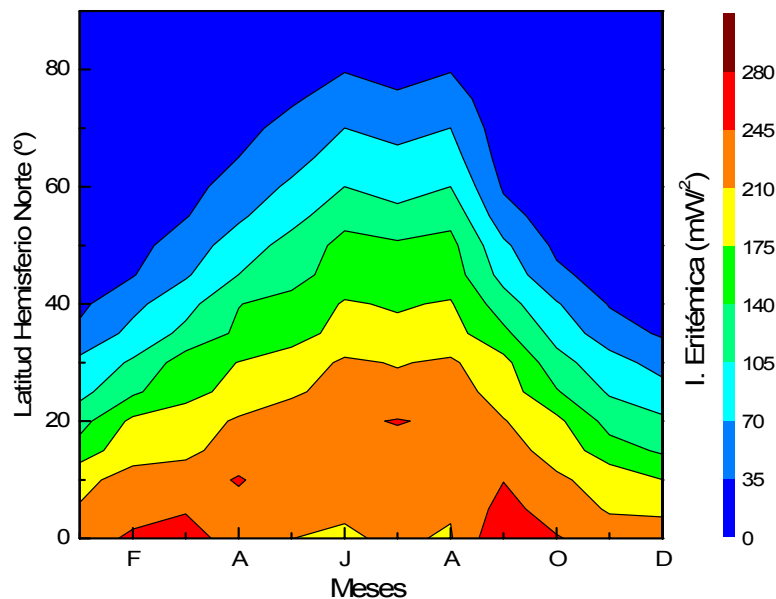


Figura 10. Distribución espacio-temporal de la Irradiancia eritémica superficial para el Hemisferio Norte bajo cielos despejados y al mediodía usando valores típicos de ozono (Driscoll 1992).

⁴Índice UVI: Se define como la irradiancia efectiva en producir eritema que se obtiene al integrar la distribución espectral UV pesada por el espectro de acción de la CIE (McKinlay y Diffey 1987). Numéricamente equivale a $I_e (W \cdot m^{-2}) \times 40$.

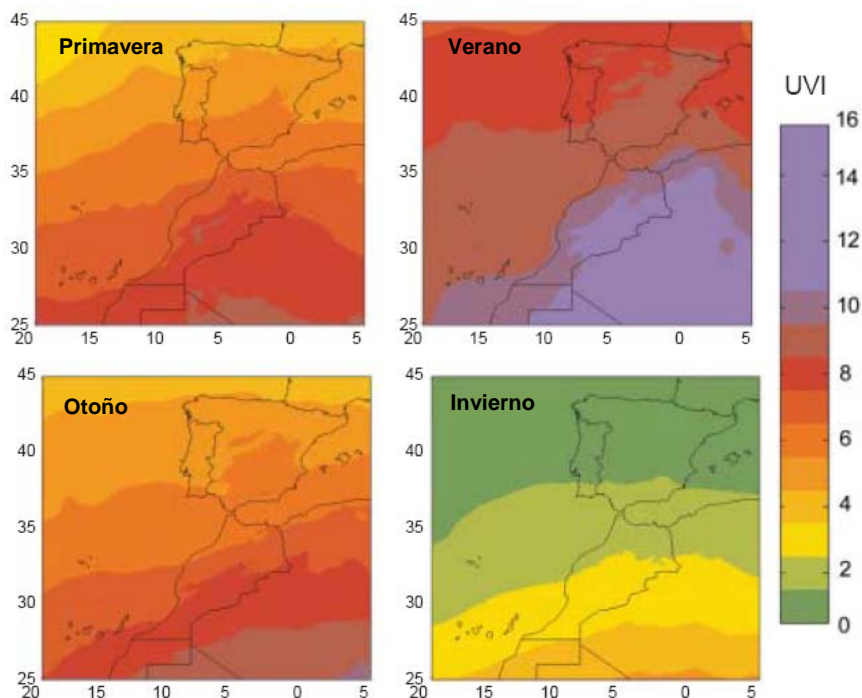


Figura 11. Distribución espacial del UVI modelado para toda España en primavera, verano, otoño e invierno bajo cielos despejados y al mediodía (Carreño et al. 2002).

1.5. Efectos biológicos de la radiación ultravioleta.

La radiación ultravioleta presenta una gran variedad de efectos, perjudiciales en su mayoría, sobre un amplio rango de organismos. Estos efectos van desde impactos a nivel molecular, celular, individual o de ecosistema, hasta afecciones de la salud humana. En general, la respuesta biológica a la radiación ultravioleta es más significativa en las longitudes de onda más cortas, pues son las más energéticas (Tabla 1) (Paul y Gwynn-Jones 2005).

Los efectos sobre especies individuales y ecosistemas han sido estudiados tanto en laboratorio como en experimentos de campo (Rozema et al. 1997; Day y Neale 2002). Existen evidencias claras de que la radiación UV presenta efectos letales sobre especies pertenecientes al fitoplancton y zooplancton, pero también afecta a anfibios, plantas terrestres y peces. Sin embargo, los efectos sobre los ecosistemas pueden ser inesperados o confusos. Algunos estudios muestran que la radiación UV puede cambiar los ecosistemas favoreciendo a las especies más resistentes.

Tabla 1. Visión general de la radiación UV y sus efectos biológicos.

Región espectral	Propiedades físicas y biológicas	Papel en animales	Papel en plantas
UV-C	Longitud de onda corta, altamente energética y fuertemente absorbida por los ácidos nucleicos	Ninguno UV-C artificial crea serios daños piel y ojos	Ninguno Fuentes artificiales causan daños severos en los tejidos expuestos
UV-B	Radiación UV más energética que alcanza la biosfera Absorbida por muchas moléculas biológicas, incluidos los ácidos nucleicos	Posibles efectos agudos y crónicos en piel y ojo Compromete el sistema inmunitario Factor que disminuye muchas poblaciones de anfibios La exposición aguda crea quemaduras en humanos; la exposición crónica origina cánceres de piel	Induce muchos cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que conllevan muchos efectos ecológicos
UV-A	Menos energética que UV-B pero presente en intensidades mucho más altas Absorbida por muchas proteínas, incluyendo importantes fotorreceptores	Reconocida como un importante factor en el desarrollo de cánceres de piel en humanos Ampliamente empleada en la visión de muchos vertebrados e invertebrados	Influye en la morfología y crea algunos efectos específicos (p.e. apertura de estomas o formación de pigmentos)

Por otra parte, la radiación ultravioleta afecta a la salud humana originando, ante todo, efectos perjudiciales: quemaduras; fotoenvejecimiento; daño ocular, especialmente cataratas; inmunosupresión; daños en el ADN y mutaciones y cánceres de piel (Soter 1990; Matsumura y Ananthaswamy 2004). Los cánceres de piel no melanómicos (NMSC) y los carcinomas de células basales (BCC) y/o escamosas (SCC) son originados casi de forma exclusiva por la exposición UV acumulada, mientras que el melanoma maligno cutáneo (CMM) tiene uno o más factores que contribuyen a su desarrollo: quemaduras, lunares, herencia genética, exposición química, entre otros.

Sin embargo, la exposición a radiación UV también puede afectar a la salud de forma beneficiosa. Se usa para tratar la piel y algunas enfermedades, es necesaria para la formación de vitamina D₃, posiblemente disminuye la hipertensión, y reduce la aparición de ciertos cánceres internos como el de próstata (Longstreth et al. 1998). Asimismo, está demostrado que influye en el estado de ánimo, presenta efectos terapéuticos (UV-A) interviniendo en los mecanismos de defensa inmunológicos, activa la función barrera de la piel mediante un bronceado razonable y posee efectos desinfectantes y esterilizantes contra la casi totalidad de microorganismos (virus, esporas de hongos, bacterias, protozoos, etc.).

2. EL CULTIVO DE MICROALGAS.

2.1. Antecedentes e introducción.

Las microalgas constituyen un grupo de organismos extremadamente heterogéneo. Para que un organismo sea considerado microalga debe reunir las siguientes características: ser pequeño (normalmente microscópico), unicelular

(pero puede ser colonial con poca o ninguna diferenciación celular), colorido (debido a la presencia de pigmentos fotosintéticos y accesorios), aparecer mayormente en agua y muy probablemente ser fotoautotrófico (pero no necesariamente todo el tiempo) (Olazola 2003). Aunque habitan prácticamente en la totalidad de ecosistemas acuáticos, también se encuentran en suelos, rocas, plantas, etc. Actualmente se conocen unas $5 \cdot 10^5$ especies de microalgas, cuya clasificación ha ido modificándose significativamente con el tiempo (South y Whittick 1987; Ben-Amotz y Avron 1990; Richmond 1990). Filogenéticamente, las microalgas pueden ser procariotas o eucariotas y, en términos evolutivos, recientes o muy antiguas. Esta diversidad hace de las microalgas, como grupo, una fuente potencialmente rica de una amplia gama de productos químicos con aplicaciones en la alimentación, nutrición, cosmética, farmacéutica e incluso en industrias de combustibles (Borowitzka 1999).

El cultivo de microalgas es una de las actividades biotecnológicas más modernas. Los primeros cultivos fueron logrados por Beijerinck (1890) con *Chlorella vulgaris*, mientras que el uso de los mismos como sistemas modelo para estudiar la fisiología de plantas fue desarrollado por Warburg a principios de 1900 (Warburg 1919). Sin embargo, la idea de producir microalgas a gran escala, controlando en parte el crecimiento, tuvo su origen en Alemania en los años cuarenta, donde se llevó a cabo el cultivo masivo de diatomeas que acumulaban notables cantidades de lípidos bajo condiciones limitantes de nitrógeno. Después de 1948, el cultivo en masa de microalgas empezó realmente a ser centro de atención para la investigación en Stanford (USA), Essen (Alemania) y Tokio. El libro editado por Burlew (1953) resume muchos de estos estudios tempranos.

Tras estas experiencias previas, el cultivo de microalgas a gran escala comercial comenzó en Japón a principio de los 60 con el cultivo de *Chlorella* (Tsukada et al. 1977), seguido en los 70s del establecimiento en el lago Texcoco (México) de una instalación para cultivar y recolectar *Spirulina* por parte de Sosa Texcoco S.A. (Durand-Chastel 1980). En 1977 Dai Nipón Ink. y Chemicals Inc. establecieron una planta comercial de *Spirulina* en Tailandia. En 1980 había en Asia 46 factorías a gran escala produciendo más de 1000 kg de microalgas (principalmente *Chlorella*) por mes (Kawaguchi 1980). En 1996 se comercializaron cerca de 2000 t de *Chlorella*, sólo en Japón (Lee 1997). La producción comercial de *Dunaliella salina* como fuente de β -caroteno llega a ser la tercera mayor industria de microalgas cuando Western Biotechnology Ltd. y Betatene Ltd. establecen en Australia instalaciones de producción en 1986.

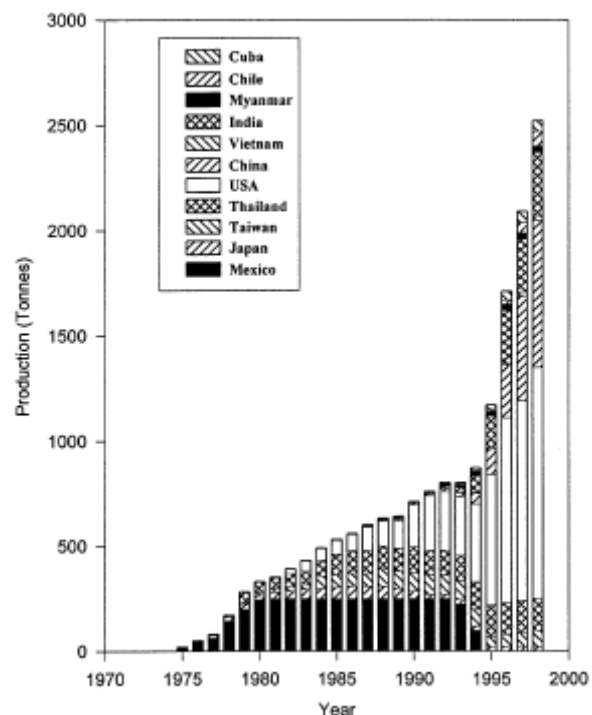


Figura 12. Producción global de *Spirulina* por países basada en la literatura, compañía e información comercial (Borowitzka 1999).

Éstas pronto fueron seguidas por otras plantas comerciales en Israel y USA. Por lo tanto, en un corto período de unos 30 años, la industria de la biotecnología de microalgas ha crecido y se ha diversificado significativamente. El crecimiento de la producción comercial de microalgas posiblemente quede mejor ilustrado a partir de los datos de producción de *Spirulina* (Figura 12).

Por otra parte, a principios de los años cincuenta comenzó a utilizarse el cultivo de microalgas a gran escala en el tratamiento de aguas residuales urbanas, acoplado a la producción simultánea de biomasa rica en proteínas para el ganado. Se pretendía, finalmente, depurar el agua y producir, de manera simultánea, una biomasa de algas y bacterias susceptible de una posterior aplicación práctica (Oswald 1988; Laliberté et al. 1997).

Asimismo, durante los años setenta se empeñaron notables esfuerzos en el estudio de fuentes alternativas de energía, en previsión de la futura escasez y encarecimiento de los productos derivados del petróleo. Así, la conversión biológica de la energía solar atrajo gran interés a escala mundial (Vega et al. 1983). Dado que las microalgas constituyen un sistema eficiente para la captación de la energía solar, existe un continuo interés en el empleo de sistemas de algas para la producción de compuestos de interés energético. Ya en los años ochenta, los problemas económicos derivados de la producción masiva de microalgas catalizaron el desarrollo de nuevas experiencias destinadas a obtener un mayor valor añadido de la biomasa producida, encontrándole otros usos distintos de la alimentación humana y animal. Así, se produjo un notable incremento de trabajos destinados a la obtención de compuestos de interés comercial y alto valor añadido, producidos por las microalgas. Este campo de la biotecnología de microalgas aún está dando sus primeros pasos, ya que todavía son pocas las microalgas cultivadas a gran escala y las moléculas de valor producidas (Pulz y Gross 2004).

En resumen, la historia de la utilización de microalgas a partir de poblaciones naturales data de varios centenares de años (*Nostoc* en Asia y *Spirulina* en África y México) (Spolaore et al. 2006). Sin embargo, el cultivo decidido de microalgas tan sólo tiene unas pocas décadas. Durante el siglo 20, los investigadores y productores comerciales desarrollaron varias tecnologías de cultivo que hoy en día se encuentran en uso para producir biomasa de microalgas: estanques abiertos (Becker 1994), fotobiorreactores cerrados (PBRs) (Tredici 1999) y reactores de fermentación (Apt 1999). Por tanto, el éxito de la producción de microalgas a gran escala depende de muchos factores, y uno de ellos es el desarrollo de grandes sistemas de cultivo para las algas de coste efectivo y el desarrollo de éstos ha sido y sigue siendo un proceso gradual. El estado de las aplicaciones de microalgas en la acuicultura, alimentos, productos químicos especializados y en usos medioambientales se ha revisado recientemente (Olaizola 2003).

2.2. Principales usos.

Actualmente, las microalgas que se comercializan en el mercado se destinan, de manera general, a dos usos. Por un lado, a la comercialización de biomasa y, por otro, a la comercialización de los productos de alto valor añadido que se obtienen a partir de ellas y que requieren un cierto grado de procesamiento.

Los usos tradicionales de las microalgas como biomasa obtenida de forma natural abarcan principalmente campos como la nutrición humana y la alimentación animal. Sin embargo, la versatilidad funcional de la biomasa obtenida a partir de cultivos de microalgas abrió su utilización a otros ámbitos como la agricultura, donde se emplea como biofertilizante, o el tratamiento de aguas, por citar algunos ejemplos. Las microalgas producen un amplio rango de productos, entre los que se incluyen carbohidratos, proteínas, aminoácidos esenciales, productos farmacéuticos y vitaminas, así como también moléculas bioactivas (Tabla 2).

Tabla 2. Aplicaciones de microalgas en diversos campos (Dufossé et al. 2005).

Productos comerciales	Alimentos	Colorantes	Farmacéuticos
Hidrocarburos (combustible)	Nutracéuticos	Alimentos (helados, zumos, gelatinas, confitados)	Antibióticos
Adsorbentes	Alimentos funcionales	Cosmética (barra de labios, cremas, lociones)	Antibacterianos
Enzimas y otros materiales de investigación	Aditivos alimenticios	Productos farmacéuticos	Agentes de relleno
	Espesantes que emulsionan		Ligantes
	Dulces		Recubrimientos de cápsulas duras y suaves
			Espesantes
			Agentes de diagnóstico

Hay una creciente demanda de colorantes naturales que son utilizados en alimentación, productos farmacéuticos, cosmética, textiles y como tintes de impresión. Sin embargo, su utilidad se encuentra bastante limitada ya que los tintes naturales presentan bajos valores de tinción y persistencia. Debido al efecto tóxico que tienen algunos tintes sintéticos, los consumidores finales están aumentando la preferencia por los colorantes naturales. La sostenibilidad es otra de las principales ventajas de los cultivos de microalgas para la producción de colorantes artificiales. Como el cultivo de algas es renovable y respetuoso con el medio ambiente, hay un creciente interés en usarlos como fuente de colorantes naturales, por ejemplo, pigmentos como ficocianina (pigmento azul de *Spirulina*), β -caroteno (pigmento amarillo de *Dunaliella*) y astaxantina (pigmento amarillo-rojizo de *Haematococcus*).

El mercado de biomasa de microalgas genera cerca de $5000 \text{ t}\cdot\text{año}^{-1}$ de materia seca, lo que reporta una facturación de aproximadamente $1.25 \cdot 10^9$ \$ al año (Pulz y Gross 2004). La situación actual del uso de biomasa de microalgas se expone detalladamente en los siguientes apartados.

2.2.1. Nutrición humana.

Hasta el momento, el empleo de microalgas para alimentación humana prácticamente se restringe a *Spirulina* (*Arthrospira*), *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nostoc*

y *Aphanizomenom*. En Europa, la explotación comercial para tal fin se encuentra sometida a estrictas normas de regulación, como la normativa europea EC 258/97. Durante décadas, *Chlorella* y *Spirulina* coparon el mercado internacional de microalgas. Hasta un 75% de la producción mundial se dirigía hacia la alimentación humana en forma de preparados en polvo, pastillas, cápsulas y tabletas. Los efectos beneficiosos para la salud humana de la biomasa de microalgas se explican en base a un efecto modulador del sistema inmune (Belay 1993; Osinga 1999). Actualmente, la mayoría de productos de algas se suministran en forma de polvos y tabletas, pero otras formulaciones basadas en extractos de microalgas están ganando peso en el mercado, como por ejemplo bebidas saludables de *Chlorella*, cápsulas con extractos aceitosos de *Dunaliella* enriquecidos en carotenoides, o cápsulas de extractos líquidos de *Spirulina* ricos en antioxidantes (Mazo et al. 2004; <http://www.antag.es>; <http://www.muysano.es>).

Se estima que en pocos años el mercado de los alimentos funcionales supondrá un 20% de la facturación total de alimentos a nivel mundial. Los beneficios sobre la salud humana convierten a los productos de microalgas en aditivos de alto valor para la preparación de alimentos funcionales. Los extractos de microalgas se están utilizando en la preparación de yogures, pasta, pan y bebidas suaves en Alemania, y similares iniciativas comienzan a tener lugar en USA, Francia, Japón y China (Becker 2004).

2.2.2. Nutrición animal.

Los nuevos usos en la cría de ganado imponen el abandono progresivo de productos químicos, incluidos los antibióticos. En consecuencia, es necesario dedicar mayores esfuerzos a complementar los piensos animales con principios nutricionales naturales destinados a preservar y mejorar la supervivencia, el crecimiento, el desarrollo, la productividad y la fertilidad de los animales. Tras décadas de intentos, hoy en día puede asegurarse que el complemento de piensos animales con un 50% de biomasa de microalgas, rica en proteínas, procedente casi exclusivamente de *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*, afecta positivamente a los animales, potenciando el sistema inmune especialmente (Belay 1993).

El uso de microalgas en acuicultura merece una mención especial. Las microalgas constituyen la base de la cadena trófica, siendo en muchos casos el alimento de larvas de moluscos, de crustáceos y de peces. También es alimento de zooplancton (rotíferos). Más de 40 especies se usan con tal propósito, algunas de las principales se listan en la Tabla 3. Ciertas especies de microalgas adquieren una coloración anaranjada o rojiza en función de los pigmentos que acumulan, lo que las faculta para un uso ornamental en peces. Entre ellas, *Spirulina*, *Dunaliella* y *Haematococcus* son exponentes destacados.

Tabla 3. Especies de microalgas notables en acuicultura.

Taxón	Género
<i>Bacillariophyta</i>	<i>Skeletonoma</i> , <i>Chaetoceros</i> , <i>Phaeodactylum</i>
<i>Primnesiophyta</i>	<i>Isochrysis</i> , <i>Pavlova</i>
<i>Prasinophyceae</i>	<i>Tetraselmis</i>
<i>Chlorophyceae</i>	<i>Chlorella</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Scenedesmus</i>
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Spirulina</i>

El mercado global de los productos empleados en acuicultura (alimentación de peces y mariscos) oscila entre $40\text{-}50 \cdot 10^9$ \$·año⁻¹ y muestra una fuerte tendencia creciente (8% anual), especialmente en las regiones asiáticas del Pacífico (New 1999).

2.2.3. Biofertilizantes.

El empleo de microalgas como abonos y acondicionadores de suelo es prometedor, aprovechando especialmente la capacidad de las cianobacterias para fijar nitrógeno atmosférico (*Anabaena*, *Nostoc*, etc.), siendo por ejemplo empleadas en el cultivo tropical de arroz llegando a proporcionarle hasta más de 20 kg de N por hectárea y año. A una escala superior, se han usado microalgas como agente acondicionador de suelos, para controlar la erosión. Algunos de sus extractos se han revelado como buenos promotores de la germinación y la floración. Las futuras tendencias en el uso agrícola de las microalgas parecen apostar por su actividad preventiva frente al desarrollo de enfermedades que ciertos virus y bacterias generan en plantas. Este sector del mercado mueve cada año $5 \cdot 10^9$ \$.

2.2.4. Compuestos de valor obtenidos de microalgas.

Hoy en día, tanto la biomasa de algas como sus extractos, han logrado alcanzar una firme posición en el mercado. Existe una demanda creciente de productos sofisticados obtenidos a partir de microalgas que se caracterizan por presentar efectos saludables sobre la salud humana. Las microalgas, las cianobacterias fundamentalmente, producen un alto número de moléculas con actividad antioxidante utilizadas como productos dietéticos, en farmacología, cosmética y como suplementos alimenticios, como ya se ha descrito previamente.

Los antioxidantes más destacados presentes en microalgas son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), compuestos antivirales, vitaminas y precursores de éstas, incluyendo el ácido ascórbico (vitamina C), riboflavinas y α , β , γ -tocoferol, y carotenoides, especialmente β -caroteno, astaxantina, luteína y zeaxantina (Spolaore et al. 2006; Del Campo 2007).

Tabla 4. Especies de microalgas prominentemente empleadas en diversas aplicaciones biotecnológicas.

Especies	Productos	Áreas de aplicación
<i>Spirulina platensis</i>	Ficocianinas, biomasa	Alimentación saludable, cosméticos
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biomasa	Alimentación saludable, suplementos alimenticios
<i>Dunaliella salina</i>	Carotenoides, β -caroteno	Alimentación saludable, suplementos alimenticios
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Carotenoides, astaxantina	Alimentación saludable, fármacos, suplementos alimenticios
<i>Odontella aurita</i>	Ácidos grasos	Fármacos, cosméticos, alimentación infantil
<i>Porphyridium cruentum</i>	Polisacáridos, ficoeritrinas	Fármacos, cosméticos, nutrición
<i>Botryococcus braunii</i>	Hidrocarburos, ácidos grasos, carbohidratos	Biodiesel

<i>Isochrysis galbana</i>	Ácidos grasos	Nutrición animal
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Lípidos, Ácidos grasos	Nutrición, biodiesel
<i>Lyngya majuscula</i>	Inmuno-moduladores	Fármacos, nutrición

La Tabla 4 muestra las microalgas y los productos más prometedores en el mercado biotecnológico actual (Cohen 1999; Pulz y Gross 2004).

2.3. Mercado actual y perspectivas de futuro.

Actualmente, la gran mayoría de las plantas industriales para el cultivo de microalgas se localiza en Asia. En la costa asiática del Pacífico existen alrededor de 110 productores comerciales de microalgas, la mayoría de los cuales ha entrado en funcionamiento en los últimos 15 años mostrando una capacidad de producción anual entre 3 y 500 toneladas, que supone la mitad de la producción mundial. La cada vez mayor demanda de productos dietéticos explica la rápida expansión producida en la zona.

Hoy en día no existen plantas comerciales de producción fuera de la costa pacífica con una producción anual superior a las 25 t, a excepción de Nature Beta Technologies, Ltd. (NBT) en Eilat, Israel, con un área productiva de $5 \cdot 10^4$ m², que genera 25 t de *Dunaliella bardawil* ó 1.5 t de β -caroteno. La empresa es de propiedad japonesa (Nikken Sosa Corporation). Por otro lado, también existen algunas pequeñas plantas de producción en la República Checa y Alemania (Lee 1997).

Respecto a los países productores, Japón tiene la mayor tradición en la producción comercial y consumo de microalgas, por ejemplo, la Heian Chlorella G.F.C. Co. Ltd., comenzó a operar en 1969. En 1996 el total de biomasa de *Chlorella* y *Spirulina* desecada que se comercializó fue de aproximadamente 2000 y 400 t, respectivamente, aunque parte de esta producción se importó de Taiwan, Estados Unidos y Tailandia. De hecho, muchas compañías japonesas importan las microalgas y luego las procesan, empaquetan y distribuyen bajo su propia marca comercial. Éste es el caso de la producción de β -caroteno a partir de *Dunaliella*, de EPA (ácido eicopentaenoico) y de DHA (ácido docosahexaenoico), extraídos de *Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis*, respectivamente, en Israel.

En China hay más de 80 compañías productoras de *Spirulina* localizadas en las provincias del sur. En este caso, el mercado local es escaso y se destina a la exportación. Taiwán, con más del 50% de la producción mundial, es el primer productor de *Chlorella*. En la actualidad hay 6 compañías productoras de esta alga y otras 5 que producen *Spirulina*, pero de éstas, al menos tres han tenido que reducir su producción o vender sus instalaciones debido a la excesiva oferta. En Corea se producen microalgas de distintas especies destinadas a la acuicultura. El resto de países productores (India, Tailandia, Vietnam, Indonesia y Filipinas) comercializan *Chlorella* o *Spirulina* mayoritariamente para exportación.

Cyanotech, con una superficie de $75 \cdot 10^3$ m² y una producción de 380 t por año, y Earthrise Farms, con una superficie de estanques de $15 \cdot 10^4$ m² y una producción de 500 t por año, en Hawai y California, respectivamente, son los principales productores norteamericanos de *Spirulina*. Desde 1997, Cyanotech comercializa productos ricos en astaxantina (2% p/p) a partir de *Haematococcus*, para su uso en acuicultura. Existen otras pequeñas compañías en California,

como Unisyn, con una producción de 12 t de *Spirulina* al año, y Neutrilit, con una producción de 1 t de β -caroteno al año.

Finalmente, en Australia existen dos compañías productoras de *Dunaliella*. Betatene Ltd. tiene una superficie de estanques de cultivo, sin agitación, de $4.6 \cdot 10^6$ m² y una producción anual de β -caroteno de entre 7 y 10 t. La otra planta de producción pertenece a Western Biotechnology Pte. Ltd., con una superficie de cultivo de $2.5 \cdot 10^6$ m² y una producción aproximada de 6 t de β -caroteno. Los principales mercados para estos productos son Japón, Estados Unidos, Corea y Europa.

Perspectivas de futuro para la biotecnología de microalgas.

La creciente magnitud del mercado internacional de carotenoides como subproducto procesado de microalgas, es tal, que se estima que alcanzará en torno a mil millones de dólares al final de la década (Del Campo et al. 2007). Las cifras de facturación correspondientes a los principales carotenoides que se comercializan se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Volumen de mercado de los principales carotenoides comercializados (<http://www.bccresearch.com>).

Carotenoide	2004 (10 ⁶ \$)	Estimado 2009 (10 ⁶ \$)
<i>β-caroteno</i>	---	253
<i>Luteína</i>	139	187
<i>Astaxantina</i>	200	259 (2500 \$·kg ⁻¹)
Total de carotenoides	887	1023

A pesar de los datos anteriores, que revelan una tendencia positiva de crecimiento respecto a perspectivas de mercado, para los próximos años, de los carotenoides obtenidos a partir de la biotecnología de microalgas, ésta todavía no ha atraído la atención masiva de las grandes compañías farmacéuticas. Esto puede deberse a la escasez, hasta ahora, de muchas experiencias exitosas. Aún así, los biotecnólogos de microalgas están convencidos del potencial de este tipo de tecnología, que ha cosechado éxitos en los últimos años. De cara a un futuro no muy lejano, es previsible que la biotecnología de microalgas explote su potencialidad en la obtención de productos químicos de alto valor. Ésta seguramente sea el aspecto más prometedor de la biotecnología de microalgas. La diversidad de microalgas nos conduce a creer que es un campo muy fértil para buscar y encontrar nuevas especies explotables desde el punto de vista biotecnológico. La generación de librerías de metabolitos bioactivos de microalgas podría atraer la atención de las compañías biofarmacéuticas con recursos necesarios para financiar ensayos clínicos; introducir una nueva droga en el mercado cuesta cientos de millones de dólares, de los que aún carece la biotecnología de microalgas. La tecnología de fotobiorreactores ha avanzado hasta el punto de que permite escalar cultivos, con relativa facilidad, para producir suficiente material biológico destinado a los esfuerzos investigadores que vienen después del descubrimiento inicial de una nueva droga.

Mientras que las microalgas pueden crecer rápidamente debido a su alta productividad primaria, muchos productos químicos de interés son producto del metabolismo secundario desencadenado bajo condiciones que no estimulan un rápido crecimiento. Una vez que se descubre un producto químico y se caracteriza, éste podría producirse sintéticamente. Además, la ruta bioquímica

que origina el producto deseado puede ser transferida a un organismo más fácilmente cultivable. Por lo tanto, el futuro de las microalgas en la fabricación de nuevas moléculas de alto valor podría limitarse a productos químicos suficientemente complejos que no pueden ser químicamente sintetizados o cuyas rutas de síntesis no pueden transferirse a otros organismos. Para aquellos productos químicos que serán producidos a partir de microalgas, se necesitará desarrollar nuevas estirpes de crecimiento más rápido que acumulen una alta concentración de los mismos, ya sea mediante selección clásica o manipulación genética, y mejorar los PBRs (fotobiorreactores) hasta que se produzca consistentemente entre 40 y 60 g·m⁻² de biomasa de microalgas al día (Olaizola 2003).

La biotecnología de microalgas, que aún se encuentra en su infancia, puede verse como una puerta de entrada a la industria de obtención de moléculas complejas de alto valor farmacológico o alimentario, mediante procesos limpios con recursos naturales renovables. Esta biotecnología acaba de comenzar a explotar el enorme potencial fisiológico de las numerosas especies de microalgas que crecen en todos los nichos ecológicos. Es esperable que la investigación conduzca a una diversificación de soluciones técnicas para el cultivo de microalgas a través de PBRs. Sin duda, el mayor cuello de botella de la biotecnología de microalgas es el coste de producción de la biomasa. Aumentar los rendimientos de los PBRs abaratará dichos costes y colocará a las microalgas en una posición competitiva respecto a procesos químicos de obtención de moléculas de valor farmacológico, alimentario y energético.

Hay algunos indicios para suponer que las aplicaciones en acuicultura serán un campo rentable para las microalgas a corto plazo y las aplicaciones farmacéuticas y energéticas lo serán a medio plazo (Pulz y Gross 2004).

2.4. Producción de microalgas en Andalucía.

En Andalucía, la tecnología del cultivo de microalgas es aún incipiente. La situación geográfica de Andalucía, con un clima mediterráneo caracterizado por unas temperaturas medias anuales altas y una escasa pluviosidad, convierte a esta región en la más cálida de la Península Ibérica y en una zona de especial interés para el cultivo de microalgas.

El rango de amplitud de las temperaturas máximas y mínimas oscila, en general, entre 12 y 16 °C, tolerable habitualmente para el cultivo de microalgas, si bien, la variación máxima sostenida condicionaría la productividad de estos cultivos. Para definir el enclave de una planta de producción se debe conocer el perfil de temperaturas de la zona para compararlo con las temperaturas óptimas de crecimiento de la especie a cultivar, asegurándose de que no se sobrepasan los límites que pueden comprometer su viabilidad. El número de meses en que la temperatura media se mantiene igual o próxima a la temperatura óptima de crecimiento deberá ser máximo, para garantizar así una alta productividad.

La energía solar de la que disponen los cultivos de microalgas es fundamental dado que su productividad presenta una relación casi lineal con la irradiancia (Richmond 2004). Andalucía se caracteriza por disfrutar de unas 3100 h de sol al año, pudiendo alcanzarse concretamente en la costa de la provincia de Huelva unas 3200 h de sol anuales.

Las condiciones ambientales existentes en muchas áreas de Andalucía, caracterizadas por altas dosis de radiación solar, así como por otras circunstancias climáticas (régimen térmico idóneo, precipitaciones reducidas, incluso con zonas semiáridas adecuadas a este fin), hacen de nuestra región un lugar ideal para la localización de cultivos de microalgas mantenidos en sistemas innovadores de producción.

Hoy en día, en Andalucía se desarrollan las únicas iniciativas españolas de producción intensiva de microalgas a media escala para su comercialización. La primera iniciativa corresponde a la empresa Fitoplancton Marino, S.L., ubicada en el Puerto de Santa María (Cádiz), que produce *Nannochloropsis* liofilizada para acuicultura utilizando cultivo intensivo en fotobiorreactores tubulares (<http://www.easyalgae.com/ubicacion.asp>). La segunda iniciativa viene promovida por una agrupación de sociedades (la Universidad de Almería, la empresa Albaida S.A. y la Fundación Cajamar), dedicada al cultivo de *Scenedesmus almeriensis*, microalga aislada en la costa mediterránea de Andalucía que acumula cantidades relevantes de luteína, carotenoide de valor comercial, cuya planta de producción se localiza en la Estación Experimental "Las Palmerillas" de Cajamar. La tercera iniciativa andaluza, en planta experimental exterior, está auspiciada por el Grupo Empresarial Rafael Morales (Huelva) y desarrollada conjuntamente por dicho Grupo y la Universidad de Huelva (grupo de investigación Biotecnología de Algas, perteneciente al Instituto andaluz de Biotecnología).

2.5. Biotecnología del cultivo de *Dunaliella*.

Historia y descripción del género

El género *Dunaliella* de algas verdes fue descrito inicialmente por Teodoresco (1905), basándose en material recolectado a partir de un lago salino rumano conteniendo *Dunaliella salina* como especie tipo. El género se nombró en honor de M. F. Dunal, primera persona que informó de la aparición del organismo que hoy se conoce como *Dunaliella salina* en algunas salinas en Montpellier, Francia, y que proporcionaba una coloración rojiza. Él llamó *Haematococcus salinus* y *Protococcus salinus* a los organismos observados (Dunal 1838). En el mismo año, Clara Hamburger también publicó su descripción sobre estas especies (Hamburger 1905). En su monumental trabajo sobre *Dunaliella*, Massyuk (1973) examinó sistemáticamente los conceptos taxonómicos y revisó el género de forma comprensible, reconociendo un total de 29 especies así como también diversas formas y variedades. Un excelente informe de la historia reciente de este género ha sido presentado por Oren (2005).

Desde las observaciones originales de Dunal, las algas del género *Dunaliella* han sido el objeto de numerosos estudios sobre su fisiología, bioquímica, ecología y aplicaciones comerciales (Borowitzka y Borowitzka 1988; Avron y Ben-Amotz 1992). Este hecho es debido a factores como: (1) la facilidad de cultivo de la mayoría de especies; (2) la capacidad de varias especies para crecer sobre amplios rangos de salinidad y en salinidades extremas; (3) la acumulación de niveles extremadamente altos de β -caroteno en *D. salina*; y (4) la amplia tolerancia a metales pesados y pesticidas que muestran algunas especies (Borowitzka y Siva 2007)

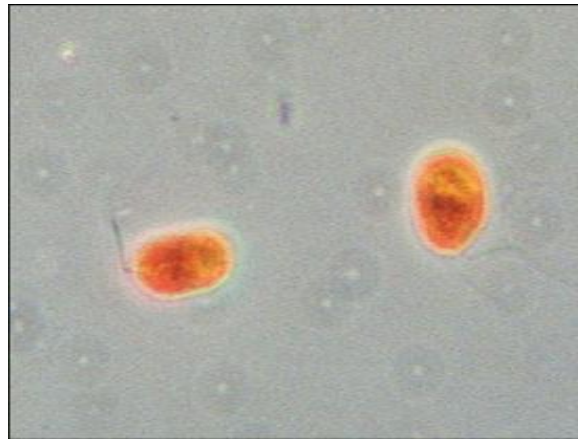


Figura 13. Células de *Dunaliella salina* presentes en salmuera cristalizada de las salinas de Eilat, en la costa del mar Rojo de Israel (Oren 2005).

Las células de *Dunaliella* pasan del verde al rojo oscuro (Figura 13) debido a la acumulación de β -caroteno ($> 5\%$ del peso seco) como gotas en el estroma de los cloroplastos. Estas células tienen una forma ovalada o casi esférica (especialmente las células rojas), de elipsoidal a cilíndrica, con extremos anteriores y posteriores redondos, normalmente radialmente simétricos, pero bajo algunas condiciones extremas pueden cambiar su forma a bilateral, dorsiventral o asimétrica. Las células de *Dunaliella* carecen de una pared celular de polisacáridos rígida lo que les permite efectuar rápidos cambios de volumen en respuesta a cambios externos de la presión osmótica (Ben-Amotz 2004). Su organización celular presenta un gran cloroplasto, unas pocas vacuolas, un núcleo y un nucleolo. La longitud de la célula oscila entre 5 y 29 μm (media entre 10.9 – 16.9 μm) y la anchura entre 3.8 y 20.3 μm (media entre 7.9 – 13.2 μm). El flagelo (son biflageladas) es de un tamaño aproximadamente igual al de la célula. El cloroplasto, que presenta una silueta en forma de taza, con lóbulos laterales bien desarrollados, a veces alcanza la base del flagelo. Las células suelen presentar un gran pirenoide, generalmente axial o basal, con amilosfera bien desarrollada. Asimismo cuentan con un estigma anterior, difuso y difícil de distinguir, especialmente en las células rojas. Las células de *Dunaliella* sufren complejos ciclos de vida que abarcan, además de la división de células vegetativas móviles, la posibilidad de la reproducción sexual heterotálica. En este caso, se produce la unión de dos gametos de similar tamaño para formar un cigoto (Lerche 1937). En ocasiones, las células también pueden formar agregados con forma de palmera.

El nicho ecológico de estas especies lo constituyen lagos salinos naturales y artificiales, estanques y diques a lo largo del mundo, desde la Antártida hasta regiones desérticas subecuatoriales. Al ser un microorganismo hipersalino, el rango de salinidad de estos hábitats varía desde el 5% hasta saturación de sal, siendo el óptimo de un 20-25% de sal.

La producción de β -caroteno por *Dunaliella* es realmente un mecanismo de adaptación al estrés producido por condiciones ambientales o nutricionales extremas, propias de los ambientes naturales donde crece la microalga. Las células de *Dunaliella* suelen ser muy polimórficas y destacan por su capacidad para acumular más de un 5% (hasta un 14%) de peso seco de β -caroteno bajo condiciones de alta luz y alta salinidad, además de grandes cantidades de

glicerol (Borowitzka y Brown 1974; Borowitzka 1981), aunque también acumulan carotenoides minoritarios como: luteína, zeaxantina, violaxantina, criptoxantina y α -caroteno.

Esta microalga también es una fuente de proteínas rica en ácidos grasos esenciales, empleándose directamente como alimento ya que está reconocida como alimento seguro (GRAS). Las especies de *Dunaliella* han mostrado varias actividades biológicas como antihipertensivo, broncodilatador, analgésico, relajante muscular y actividad anti edema (Villar et al. 1992)

Cultivo a gran escala

Dunaliella es una de las microalgas más adecuada para el cultivo en masa exterior. Su capacidad para prosperar en medios con altas concentraciones de iones como sodio, cloro, azufre, magnesio, calcio, etc., en tierras irradiadas con altas dosis de radiación solar, con acceso a agua salobre o marina a temperaturas extremas desde 5° hasta 40° C, la hacen atractiva para biotecnólogos e inversores. De hecho, desde los años 80 se ha invertido capital en la aplicación de *Dunaliella* para la producción natural de β -caroteno.

La primera etapa en la producción de β -caroteno pasa por obtener cultivos de *Dunaliella* de alta densidad celular. Actualmente, el cultivo a gran escala se realiza en las modalidades que se describen a continuación (Ben-Amotz 2004).

a) Cultivo extensivo

Se desarrolla sin agitación y con un control mínimo de las condiciones ambientales en lagunas ubicadas en espacios de costa y/o salinas naturales de poca profundidad. Los problemas de contaminación biológica se resuelven, por lo general, con alta salinidad, a la cuál se adaptan bien estirpes naturales de la zona de cultivo. La productividad suele ser baja, pero se compensa con los bajos costes de producción. El requisito limitante para la producción extensiva es la superficie de cultivo necesaria.

b) Cultivo intensivo

Usa una alta biotecnología para controlar todos los factores que afectan al crecimiento y la bioquímica del alga. Los estanques se construyen siguiendo sofisticadas directrices de ingeniería, suelen abarcar áreas de hasta 3000 m² y presentan sistemas de agitación por palas. El rendimiento promedio anual del cultivo intensivo es de unos 200 mg β -caroteno·m⁻²·d⁻¹. En una planta moderna de cultivo intensivo en una superficie de 50000 m² pueden producirse 3650 kg de β -caroteno por año.

c) Cultivo muy intensivo

Se desarrolla en fotobiorreactores cerrados (PBRs). Son sistemas tubulares, de gran longitud y pequeño diámetro, hechos de materiales plásticos. Diseñados para un mayor aprovechamiento de la luz durante el estrés, los rendimientos son mayores que en los sistemas anteriores, si bien los costes resultan aún muy elevados, dificultando todavía la producción a escala industrial.

El crecimiento de las microalgas en cultivo depende de diversos factores ambientales y nutricionales. Entre los primeros, la intensidad y calidad de luz, la temperatura y el pH son los que ejercen una influencia más notable en la tasa de crecimiento. En cuanto a los factores nutricionales, el CO₂ es la fuente de carbono en el cultivo fotoautotrófico, limitando así la competencia y crecimiento de otros microorganismos que crecen con fuentes de carbono reducido. La composición del medio de cultivo se basa en una mezcla de sales minerales, incluyendo nitrato o amonio como fuente de nitrógeno inorgánico, y fosfato y sulfato como fuentes de fósforo y azufre, respectivamente. El medio se completa con una disolución de elementos metálicos en concentraciones muy bajas (ppm), necesarios mayoritariamente como cofactores de numerosas actividades enzimáticas del metabolismo celular.

Producción comercial

Hoy en día, el β-caroteno natural obtenido de cultivos de *Dunaliella* se distribuye ampliamente en muchos mercados bajo tres categorías diferentes: extractos de β-caroteno, polvo de *Dunaliella* para uso humano y *Dunaliella* seca para uso alimenticio (Figura 14). El β-caroteno obtenido a partir de *Dunaliella* presenta muchas ventajas como su mejor absorción, alta eficiencia y composición isomérica (Metting 1996). El β-caroteno extraído purificado se vende mayoritariamente en aceites vegetales en concentraciones del 1 al 20% para colorear varios productos alimentarios y para uso personal en geles suaves, normalmente 5 mg β-caroteno cada gel. Las formulaciones del β-caroteno natural pueden encontrarse en los supermercados en las secciones de vitaminas, alimentos saludables o complementos alimenticios. El polvo de *Dunaliella* se comercializa en forma de tabletas o cápsulas que contienen entre 3 y 20 mg de una mezcla de *all-trans* y *9-cis* β-caroteno por unidad. El precio del β-caroteno natural varía entre 300 y 3000 \$·kg⁻¹ según la demanda y las especificaciones (Ben-Amotz 2004).



Figura 14. Cultivo de *Dunaliella* y formatos comercializables de sus productos.

Actualmente, las siguientes compañías están cultivando *Dunaliella* con fines comerciales:

1. Betatene Ltd., Cheltenham, Vic 3192, Australia, una división de Cognis Ltd., Australia.
2. Cyanotech Corp., Kailua-Kona, HI 96740, USA.
3. Inner Mongolia Biological Eng. Co., Inner Mongolia, 750333, P. R. China.
4. Nature Beta Technologies (NBT) Ltd., Eilat 88106, Israel, una filial de Nikken Sohonsa Co. Gifu, Japón.

5. Tianjin Lantai Biotechnology, Inc. Nankai, Tianjin, en colaboración con el Instituto de investigación científica salina. China.
6. Western Biotechnology Ltd. Bayswater, WA 6053, Australia, una filial de Cognis Ltd.
7. Parry agro industries Ltd., Murugappa group, India.
8. AquaCarotene Ltd., Subiaco, WA 6008, Australia.
9. También se localizan pequeñas plantas en Chile, México, Cuba, Iran, India, Taiwán y Japón.

2.6. Factores que estimulan la acumulación de carotenoides.

Comúnmente se acepta que condiciones conducentes a una ralentización del crecimiento de la microalga activan la producción de carotenoides. Entre tales condiciones se incluirían las ya citadas de alta intensidad de luz y limitación de nitrógeno o/y otros nutrientes, además de alta concentración de sal, pH extremo, temperatura baja, o presencia de agentes oxidantes como herbicidas. A continuación se describe más pormenorizadamente el efecto de algunos de los factores citados sobre la acumulación de β -caroteno.

2.6.1. Variables ambientales: calidad e intensidad de luz y temperatura.

La radiación PAR (400-700 nm) es esencial en la carotenogénesis (Loeblich 1982; Ben-Amotz 1987), si bien los máximos niveles de β -caroteno en células de *Dunaliella* se alcanzan dependiendo de la salinidad del medio (Borowitzka y Borowitzka 1990). El aumento de intensidad de PAR de 50 a 1250 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ incrementa notablemente el contenido de β -caroteno en *D. salina* (Orset y Young 2000). De manera análoga, las altas intensidades de luz producen en *Haematococcus pluvialis* un notable incremento del contenido en astaxantina cuando el alga se crece en presencia de sal de hierro (Boussiba et al. 1992; Kobayashi et al. 1992; Shaish et al. 1993).

Las algas con un elevado contenido en β -caroteno son más resistentes a la fotoinhibición de la fotosíntesis en comparación con otras con bajo contenido en este pigmento. La protección frente a la fotoinhibición en células de *Dunaliella* con un alto contenido en β -caroteno es muy fuerte cuando se usa exclusivamente el rango azul de visible como factor fotoinhibitorio, menor cuando es la luz visible y no existe cuando se emplea únicamente el rango rojo del visible. Estas observaciones evidencian que la acumulación masiva de β -caroteno protege el alga frente al daño oxidativo provocado por altas irradiancias a través de la absorción en la región azul del espectro (Ben-Amotz et al. 1989).

Otro tipo de radiaciones más energéticas que las PAR son las radiaciones ultravioleta (UV). Los estudios sobre la influencia de las radiaciones UV en las microalgas han revelado efectos tanto positivos como negativos (Horwitz 1994). Algunos de los carotenoides de valor comercial producidos por la microalga *Dunaliella bardawil* absorben radiaciones UV (Tsukida et al. 1982). Considerando la funcionalidad de los carotenoides en la neutralización de radicales libres y el oxígeno singlete, es en principio coherente vincular a la respuesta antioxidante de la microalga la posible acumulación de carotenoides en cultivos de *Dunaliella* incubados bajo radiación UV.

La temperatura es una de las variables ambientales más importantes que afectan al crecimiento y al desarrollo de organismos vivos, influyendo en el

control de la concentración y actividad enzimática y, por tanto, en el nivel de carotenoides acumulados (Hayman et al. 1974). *Dunaliella* presenta un incremento del β -caroteno intracelular 7.5 veces superior cuando la temperatura desciende de 34 a 17 °C (Ben-Amotz 1996; Orset y Young 2000). En *Haematococcus*, el contenido de carotenoides aumenta hasta 3 veces al incrementar la temperatura (Tjahjono et al. 1994).

2.6.2. Factores nutricionales: compuestos químicos, sales y limitación de nutrientes.

Numerosos agentes químicos afectan a la carotenogénesis en gran número de microorganismos. Entre ellos destacan sales, aminos, alcaloides y antibióticos (Govind et al. 1982).

La máxima acumulación de β -caroteno en la célula es dependiente de la salinidad. La formación de carotenoides es rápida, por ejemplo, cuando la salinidad del medio se incrementa del 15 al 25% de NaCl, observándose un aumento lineal del contenido en carotenoides totales de 10 a 260 mg·g⁻¹ de proteína, en 4 o 5 días (Borowitzka y Borowitzka 1990).

Haematococcus pluvialis incrementó la producción de astaxantina cuando se incubó en medios suplementados con sal férrica (Kobayashi et al. 1992; Tjahjono et al. 1994). *Chlorococcum* también mostró una tendencia hacia la acumulación de carotenoides en presencia de sales inorgánicas (Liu y Lee 2000).

Por su parte, el efecto de la carencia de algunos nutrientes, como el nitrógeno, fósforo y azufre, sobre la acumulación de carotenoides en *Dunaliella*, está descrito por algunos autores (Mil'ko 1963; Ben-Amotz y Avron 1983; Ben-Amotz 1987; Phadwal y Singh 2003). La limitación de nitrógeno ralentiza el crecimiento, lo que implica un incremento de la cantidad de energía absorbida por el alga durante su ciclo de división celular. Cuanto más elevada sea la radiación incidente por célula, menor será su tasa de crecimiento y mayor su contenido en β -caroteno (Ben-Amotz et al. 1989; Ben-Amotz y Avron 1990).

3. EL CULTIVO DE FRESA.

3.1. Antecedentes e historia del cultivo.

La facilidad con la que ha podido ser recolectado el fruto de fresa de las especies silvestres ha retrasado su domesticación y cultivo hasta tiempos modernos. Mientras que los cultivos más importantes para la alimentación humana fueron domesticados hace 10000 años, las primeras especies de fresa lo han sido en los últimos 2000; y aún más recientemente, la especie mayoritariamente cultivada en el mundo; hace poco más de dos siglos y medio. Ya en los siglos I a III a.C., autores como Ovidio o Plinio citaban en sus escritos a las fresas como plantas de frutos muy apreciados por su sabor y fragancia. En el siglo XIII, el médico griego Nicholas Myrepsur destaca la bondad de esta planta en el tratamiento de enfermedades.

El cultivo en Europa no comienza hasta el siglo XIV, cuando en 1368 el Rey Carlos V manda plantar una zona del jardín real con 1200 plantas. Siete años más tarde, los duques de Burgundy dedican cuatro parcelas de su jardín en

el castillo de Couvres al cultivo de fresa. La primera descripción de la fresa se realiza en el “Herbario Latino de Mainz”, publicado en Alemania en 1484. A lo largo del siglo XVI, las referencias acerca del cultivo de fresa son cada vez más frecuentes, citándose las tres primeras especies de fresas europeas: *F. vesca*, *F. moschata* y *F. viridis*. A final del siglo XVI e inicios del XVII, los colonizadores descubren en el este de Norteamérica la “fresa de Virginia” (posteriormente *Fragaria virginiana*) y en 1624 aparecen las primeras referencias de ésta en Europa.

Además de la fresa de Virginia, otra especie habitaba en el continente americano, la posteriormente conocida *Fragaria chiloensis*, que se extendía por toda la costa pacífica. Su llegada a Europa data de 1714 y pronto se detectan problemas de esterilidad, que fueron superados mediante la polinización cruzada entre individuos de *F. chiloensis* y *F. virginiana*, naciendo así la primera especie híbrida cultivable; *Fragaria x ananassa*, descrita por Duchesne en 1766. Desde entonces, a partir de ésta se obtiene la inmensa mayoría de las variedades que actualmente se cultivan.

En España, las referencias fundadas del cultivo de fresa datan del siglo XVI; en el Palacio del Real Sitio, en Aranjuez (Madrid), donde la Casa Borbónica tuvo mucho que ver en su introducción.

Los inicios del cultivo de fresa en la provincia de Huelva están muy poco documentados, aunque diversos autores sostienen que fue en Moguer, Palos de la Frontera y Lucena del Puerto donde surgió el cultivo, en torno al año 1923.

Pero sin ninguna duda, el verdadero precursor e impulsor del cultivo de fresa en Huelva fue Antonio Medina, quien, en la década de los cincuenta, logra instalar una parcela de experimentación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en la finca “Las Madres”, introduciendo 72 variedades procedentes de Florida, Texas y California. Los resultados obtenidos evidenciaron que las variedades procedentes de la Universidad de California eran las que mejor se adaptaban a las condiciones climáticas y de suelo del litoral onubense, por lo que desde 1962, se decidió adoptar las técnicas de cultivo californianas.

3.2. El sector fresero en Huelva.

Este sector es uno de los pilares básicos de la economía agraria onubense y un puntal de extraordinaria importancia para la economía regional. La provincia de Huelva concentra el 94% de la producción de fresa nacional y es la principal productora europea. Con apenas el 2% de tierra cultivada, genera más del 50% de la renta agraria. Así pues, el sector fresero de Huelva es uno de los sectores agrícolas que ha experimentado un mayor desarrollo en los últimos 30 años. Este sector, conjugando la introducción de nuevas variedades de fresa y técnicas de cultivo, innovaciones tecnológicas e iniciativa empresarial, ha convertido a Huelva en la primera región productora de fresa del mundo. De esta forma, el cultivo de fresa genera empleo y riqueza en la zona, permitiendo la creación, en torno a él, de una industria auxiliar y de una importante red de servicios.

La alta producción fresera de la provincia de Huelva se debe, fundamentalmente, a la conjunción de una serie de factores ambientales que propician su exitoso desarrollo. La principal característica de la provincia de

Huelva es su benigna climatología (Figura 15). En Huelva, la climatología adecuada coincide con un determinado tipo de tierra y de agua. Las cualidades onubenses para el cultivo de fresa son varias, esencialmente, suelos arenosos ligeramente ácidos (pH entre 5 y 7), agua de gran calidad, inviernos suaves y un elevado número de horas de sol (~ 3100). Éste último factor, la luz, es de vital importancia para el cultivo de fresa.

La adaptación del fresón (*F. ananassa*) a ambientes concretos, viene regulada principalmente por la temperatura y el fotoperíodo (Larson 1994). Aunque las plantas de *F. ananassa* poseen gran capacidad de adaptación, éstas sólo producen órganos florales entre ciertos límites climáticos bastante constantes, ofrecidos por el litoral onubense, que presenta el mínimo de nubosidad más destacado de España. Las plantas de fresa se adaptan a casi todas las temperaturas entre 15 y 55 °C, pero las temperaturas ideales para la fructificación se encuentran entre 15 y 20 °C de media anual (Márquez 1986).

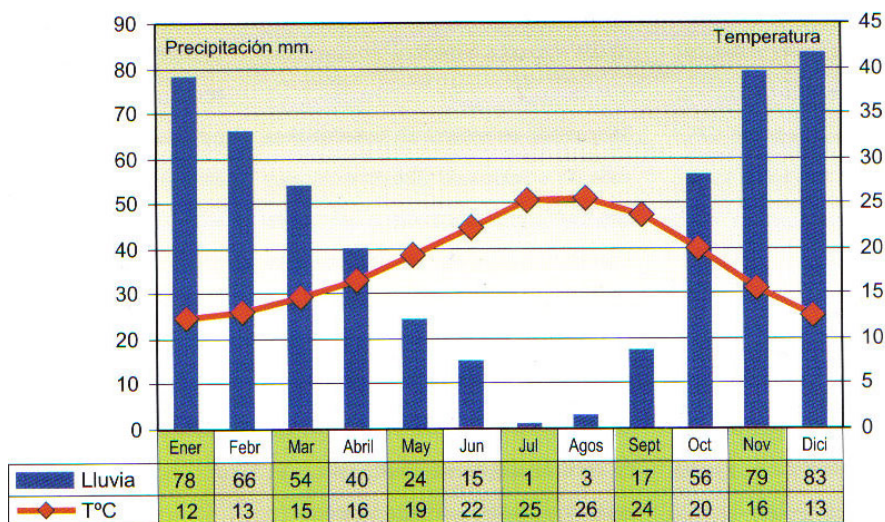


Figura 15. Climatograma de Gausson para la Tierra Llana de Huelva.
Fuente: Observatorio Meteorológico de Huelva. 1961 - 1990. Elaboración J. A. Márquez 2007.

Como ya se ha mencionado, el cultivo moderno de la fresa en la provincia de Huelva se inició en la década de los 50. Hasta el año 1982 la superficie cultivada se mantuvo por debajo de las 1000 ha, pero a partir de 1983 se inició una etapa de crecimiento rápido y sostenido de las plantaciones, que culminó con 6000 ha de plantación en 1989, alcanzando las 170000 t. A continuación, tuvo lugar un período de reajuste a la baja (1991-1992) y un posterior crecimiento moderado que se prolongó hasta el año 2000, alcanzándose la máxima superficie plantada con 8750 ha y superando la cota de las 300000 t. En los últimos años se ha observado una tendencia decreciente del número de hectáreas plantadas unida a un ligero incremento del rendimiento de producción por superficie ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$), alcanzándose un máximo de $46000 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ durante el año 2007. Desde el año 2000, la superficie plantada tiende a estabilizarse en la franja de las 6000 - 7000 ha, con una producción en torno a las 300000 t (Figura 16).

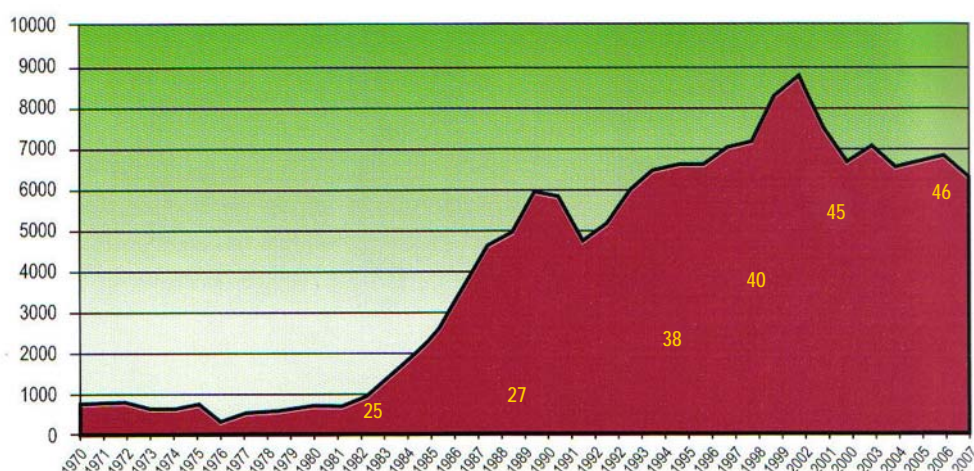


Figura 16. Evolución de la superficie plantada de fresa en la provincia de Huelva. Se muestran, asimismo, algunos rendimientos de producción significativos ($t \cdot ha^{-1}$) (Junta de Andalucía 2008)

3.3. Forzado del cultivo: utilización de micro y macrotúneles plásticos.

De entre todas las prácticas culturales que conlleva el cultivo de fresa a lo largo de su ciclo anual (Figura 17), el forzado del mismo con materiales plásticos de cubierta es clave para obtener un plus de precocidad de cosecha frente al aire libre. De esta forma, además de proteger al cultivo de las inclemencias del frío invernal, se consigue un incremento de cosecha por planta o unidad de superficie.

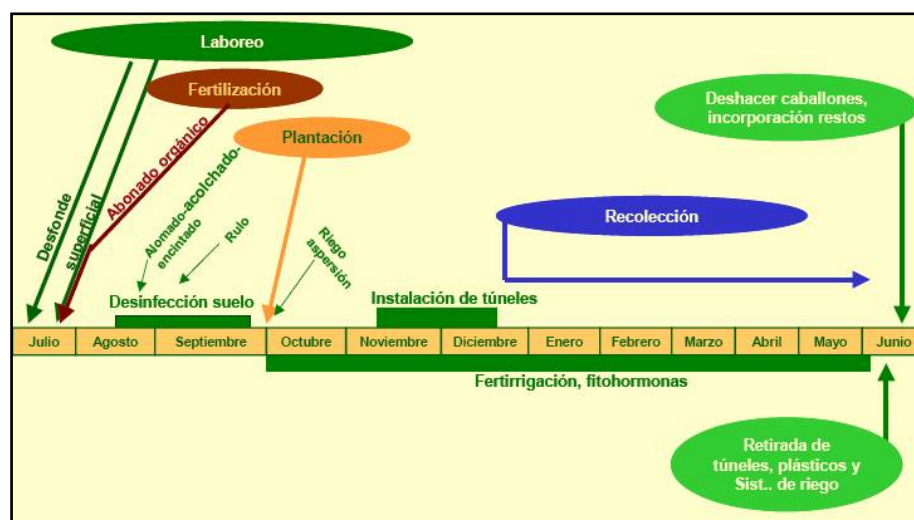


Figura 17. Esquema general del ciclo de cultivo de la fresa de Huelva.

Fuente: Diagnóstico del Sector Fresero de Huelva 2003. Consejería de Agricultura y Pesca.

Al atravesar la cubierta plástica la radiación solar diurna, se origina un nuevo microclima en el interior del túnel caracterizado por un calentamiento del aire que rodea la masa vegetal. Ese calor se irá perdiendo lentamente, pero quedará un plus térmico que favorecerá ese microclima durante las horas nocturnas y madrugadas principalmente. Este balance energético dependerá de parámetros como el volumen del aire almacenado, su estanqueidad, el diseño del forzado, así como el tipo de material plástico empleado. Pero por otro lado, el forzado también se traduce en una disminución de la radiación en el interior del túnel debido a fenómenos como la reflexión, dispersión y/o absorción de

radiación por parte del material plástico, hecho que depende fundamentalmente de su composición química, de su espesor y de la presencia de impurezas depositadas en ambas caras del film.

El uso de filtros de polietileno que absorben radiación ultravioleta para el control de insectos y enfermedades ha ganado interés en los últimos años (Elad 1997; Raviv y Antignus 2004). La posibilidad de usar materiales de cobertura que bloquean la radiación UV como una aproximación al manejo integrado de plagas para controlar enfermedades causadas por hongos y transmitidas por insectos debe incrementar debido a la creciente demanda de cultivos ecológicos por parte de los consumidores (Krizek et al. 2005).

Concretamente, en la zona de Huelva, pueden distinguirse dos tipos de estructuras de forzado:

Microtúneles

Son túneles pequeños que, en general, miden de 50 a 80 cm de altura y de 60 a 90 cm de ancho. Polietileno (PE) térmico, cloruro de polivinilo (PVC) y, sobre todo, copolímero EVA de diversas riquezas (6%, 12%, 18%), fabricado a base de PE con un aditivo de acetato de etil vinilo, son los materiales plásticos más empleados. Los grosores oscilan entre 75 y 100 μm . Los hay perforados y no perforados. Actualmente se estima un porcentaje de utilización del 20% de la superficie cultivada.

Macrotúneles

Son túneles de grandes dimensiones dentro de los cuales se pueden realizar todas las operaciones de cultivo. Las formas son variables; en general, semicirculares o elípticas para evacuar las aguas de lluvia correctamente y ofrecer buena resistencia a las acometidas del viento. Las anchuras habituales son de 6.60 m (con capacidad para 6 lomos), aunque existen zonas que emplean anchuras de 4.40 m (para 4 lomos). Las alturas alcanzan de 2 a 3 m y las longitudes habituales son de 50-70 m, con máximos de hasta 100 m, para tener una correcta aireación. Los materiales plásticos son los mismos citados para los microtúneles, aunque en este caso el espesor oscila entre 150 y 200 μm . En la actualidad se puede estimar un porcentaje de utilización del 80% de la superficie cultivada.

Comparando ambos sistemas, el microtúnel muestra un menor rendimiento e inercia en el balance energético en relación a los macrotúneles. Los parámetros climáticos (temperatura y humedad relativa) descenderán/ascenderán más rápidamente en el primer caso. El menor volumen de aire implicado hace que la protección climática de los microtúneles sea más irregular.

3.4. La fresa como alimento saludable.

El consumo de fresas aporta una serie de constituyentes (Tabla 6) que le confieren beneficios potenciales para la salud del consumidor (Hannum 2004). Muchos de éstos se asocian a las propiedades antioxidantes y neutralizadoras de radicales libres de algunos de sus compuestos, siendo responsables de los efectos beneficiosos que los estudios epidemiológicos han asociado al consumo regular de frutas y hortalizas dentro de una dieta equilibrada. Estos estudios han

puesto de manifiesto la relación entre este consumo y un menor riesgo de sufrir enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y el síndrome metabólico (enfermedades interrelacionadas), debido a un menor aporte de calorías (~ 30 cal por cada 100 g) y una mayor ingesta de fibra (<http://www.alcentral.com.ar>).

En los últimos años, los investigadores han ido demostrando el papel que diferentes hortalizas y frutas, entre ellas la fresa, tienen en la salud. Estos alimentos no sólo aportan una cantidad relevante de fibra, vitaminas (A y C fundamentalmente) y sales minerales, sino que además proporcionan una serie de constituyentes con actividad biológica: las sustancias fitoquímicas. La fresa, además de ser una fuente excelente de fibra y de vitamina C (principalmente ácido ascórbico y una pequeña proporción de dehidro-ascórbico) (Allende et al. 2007), también aporta un amplio espectro de sustancias fitoquímicas con diferentes propiedades biológicas que le otorgan ese papel beneficioso para la salud humana. La fresa es una extraordinaria fuente de polifenoles, que combina pigmentos antociánicos con taninos condensados (procianidinas) e hidrolizables (elagitaninos), todos ellos con excelentes propiedades biológicas (Larrosa et al. 2006). Además de la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer, los compuestos fenólicos de las fresas pueden ejercer efectos interesantes sobre el sistema inmune (Seeram et al. 2001). Por otro lado, la posibilidad de que los compuestos fenólicos puedan ayudar a prevenir problemas neurológicos en el cerebro es una idea de la que se está empezando a tener evidencia científica (Joseph et al. 1998; Bickford et al. 2000).

Tabla 6. Composición química del fruto de fresa fresco.

Constituyente	Contenido (por 100 g de fruto)
Agua	80 – 85 g
Proteínas	0.2 – 0.1 g
Lípidos	0.5 g
Carbohidratos	5 – 13 g
Sacarosa	0.2 – 2.1 g
Glucosa	0.8 – 3.5 g
Fructosa	1.0 – 3.1 g
Ácido cítrico	321 – 1240 mg
Ácido málico	100 – 680 mg
Fenoles	58 – 210 mg
Vitamina C	25 – 120 mg
Potasio	164 mg
Fósforo	21 mg
Calcio	21 mg

Los valores recogidos en la Tabla anterior pueden variar en función de las variedades consideradas.

4. CAROTENOIDES Y POLIFENOLES: COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Seguidamente, se definirán y describirán las estructuras bioquímicas de los carotenoides y de un conjunto de sustancias que se engloban dentro del grupo conocido como los polifenoles, así como sus funciones y sus rutas de biosíntesis. Tanto los carotenoides como los polifenoles han demostrado tener

cualidades antioxidantes y están presentes en microalgas y en frutos de fresa, respectivamente.

4.1. Carotenoides.

Los pigmentos carotenoides, abundantes en muchas frutas y vegetales (Edge et al. 1997), son poli-isoprenoides de 40 átomos de carbono que forman una cadena que constituye la “espinas dorsal” de la molécula (Figura 18), pudiendo presentar estructuras cíclicas (anillos) en los extremos, algunas de las cuales se complementan con grupos funcionales que contienen oxígeno. Los carotenoides que contienen exclusivamente carbono e hidrógeno en su estructura se conocen como carotenos, mientras que los derivados oxigenados de estos hidrocarburos se conocen como xantofilas (luteína, zeaxantina, violaxantina).

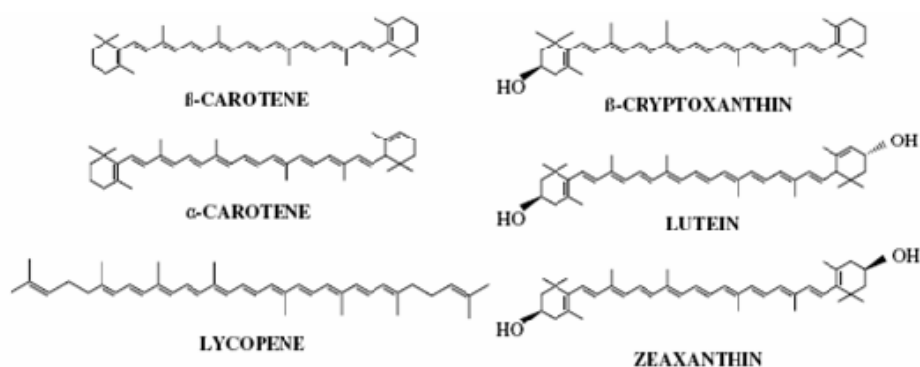


Figura 18. Estructuras de los principales carotenoides encontrados en el plasma humano (Krinsky y Johnson 2005).

La estructura de un carotenoide puede determinar en parte su función biológica. El patrón distintivo de enlaces simples y dobles que se alternan en la espina dorsal del carotenoide permite absorber el exceso de energía de otras moléculas, mientras que la naturaleza de los grupos específicos de los extremos influye en su polaridad. Lo primero puede explicar las características antioxidantes de los carotenoides, mientras que lo último explica las diferencias existentes en la interacción entre las membranas biológicas y los carotenoides (Britton et al. 1995).

La coloración de los carotenoides tiene relación directa con su estructura. Cada doble enlace de carbono interactúa con cada uno de los otros enlaces mediante un proceso de conjugación. Conforme aumenta el número de insaturaciones, mayor es la longitud de onda máxima de absorción, confiriendo al carotenoide una apariencia más rojiza. En general, los máximos de absorción varían entre 450 y 490 nm.

Los carotenoides son responsables de muchas de las tonalidades rojas, anaranjadas y amarillas de hojas, frutas y flores, así como de los colores de algunos pájaros, insectos, peces y crustáceos. Algunos ejemplos familiares de la coloración de los carotenoides son el naranja de las zanahorias, el rojo de pimientos y tomates, y el rosa de flamencos y salmones (Pfander 1992). Se conocen unos 600 carotenoides naturales (Ong y Tee 1992), y aún se continúan identificando carotenoides nuevos (Mercadante 1999). De este amplio grupo, sólo se le atribuyen efectos beneficiosos sobre la salud humana a escasamente dos docenas, que se encuentran en los tejidos y la sangre, y tan sólo dos en el ojo (Krinsky y Johnson 2005).

Los carotenoides son pigmentos accesorios que se encuentran en estructuras fotosintéticas, localizándose en la membrana de los tilacoides y en la de envoltura de los cloroplastos. Los principales carotenoides de cloroplastos de plantas superiores y microalgas son α y β -caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina y neoxantina.

En organismos fotosintéticos, los carotenoides juegan un papel vital en los centros de reacción fotosintética. Por un lado, los carotenoides actúan como componente estructural esencial para el ensamblaje y estabilidad de los complejos proteínicos colectores de luz. Por otro lado, participan en los procesos de transferencia de energía como pigmentos accesorios en la captura de luz. Finalmente, protegiendo los centros de reacción de la autooxidación a través de la disipación del exceso de energía en ambientes de alta intensidad de luz a través del ciclo de las xantofilas, reduciendo el oxígeno singlete, reaccionando con oxígeno triplete o con moléculas de clorofila excitadas para prevenir la formación de oxígeno singlete, y reaccionando con productos de la peroxidación de lípidos para terminar reacciones en cadena (Codgell y Frank 1987; Demmig-Adams y Adams 1992; Osmond et al. 1997; Harvey 1998).

Los carotenoides también desempeñan un importante papel potencial en la salud humana actuando como antioxidantes biológicos, protegiendo las células y los tejidos de los efectos perjudiciales de radicales libres y del oxígeno singlete. El licopeno es particularmente eficaz en anular el potencial destructivo del oxígeno singlete (Di Mascio et al. 1989). La luteína y la zeaxantina actúan como antioxidantes protectores en la región macular de la retina humana (Snodderly 1995). La astaxantina, presente en salmones, camarones y otros mariscos, es otra xantofila de origen natural que presenta unas potentes características antioxidantes (Di Mascio et al. 1991). Otras de las funciones que se pueden relacionar con el potencial antioxidante de los carotenoides es la activación del sistema inmunológico (Bendich 1989), la protección contra quemaduras solares (Matthews-Roth 1990) y la inhibición del desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Nishino 1998).

Rutas metabólicas

Como compuestos isoprénicos, los carotenoides se pueden sintetizar vía ácido mevalónico a partir de intermediarios de dos átomos de carbono. Los estadios iniciales de esta ruta conducen a la formación de los precursores isopentenilpirofosfato (IPP) y dimetilalilpirofosfato (DMAPP).

En plantas y microalgas, junto a la vía del ácido mevalónico, activada en el citoplasma, funciona otra vía de síntesis de los precursores IPP y DMAPP localizada en los cloroplastos, siendo ésta la principal ruta de síntesis de carotenoides (Figura 19). Esta vía se inicia con la condensación de una molécula de piruvato y otra de gliceraldehído-3-fosfato. El producto, 1-dexosi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP), es isomerizado a 2-metil-D-eritrosa-4-fosfato, que mediante reducciones, fosforilaciones y deshidrataciones se convierte, primero, en 2-metil-eritrol-4-fosfato y, finalmente, en IPP. Sucesivas condensaciones de moléculas de IPP y DMAPP dan lugar a la formación de diversos compuestos isoprénicos. La condensación de dos moléculas de geranil-geranil pirofosfato (GGPP), da lugar al inicio de la vía específica de biosíntesis de carotenoides formando el fitoeno (Sandman 1991), que pasa después de una serie de desaturaciones a fitoflueno, neurosporeno y licopeno. A partir de estos dos últimos compuestos, mediante

distintos procedimientos enzimáticos, se originan los carotenoides que existen en la naturaleza.

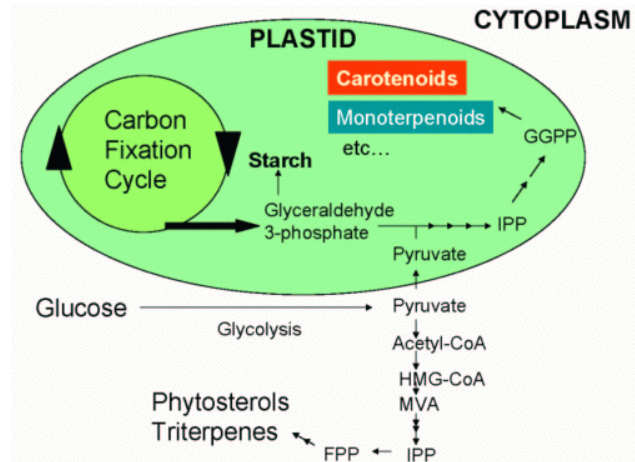


Figura 19. Biosíntesis de isoprenoides en plantas y algas verdes.

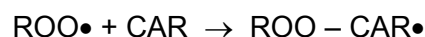
Reacciones con radicales libres

Se conoce durante muchos años que los carotenoides “blaquean”, es decir, pierden su color cuando se exponen a radicales o especies oxidantes. Este proceso implica la interrupción del sistema de dobles enlaces conjugados mediante segmentación o adición a uno de los dobles enlaces. La fragmentación puede detectarse caracterizando los productos formados, que frecuentemente son carbonilos (Handelman et al 1991) o epóxidos (Kennedy y Liebler 1991). La adición de productos como el 4-nitro-β-caroteno también ha sido evidenciada siguiendo un tratamiento de carotenoides con humo conteniendo óxidos de nitrógeno (Baker et al. 1999), así como la adición de productos entre el generador de radicales y los carotenoides (Liebler y McClure 1996).

Hay al menos tres posibles mecanismos para la reacción de carotenoides con especies radicales: (1) adición de radicales; (2) transferencia de electrones al radical; o (3) abstracción del hidrógeno alílico, tal y como se observa en las siguientes reacciones.

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. Formación de aductos: | $CAR + R\bullet \rightarrow R-CAR\bullet$ |
| 2. Transferencia de electrones: | $CAR + R\bullet \rightarrow CAR\bullet^+ + R^-$ |
| 3. Abstracción del H alílico: | $CAR + R\bullet \rightarrow CAR\bullet + RH$ |

Se ha propuesto que un radical lipídico peroxilo ($ROO\bullet$) podría añadirse a cualquier lugar de la espina dorsal del carotenoide, resultando en la formación de un radical estabilizado $ROO-CAR\bullet$. Puesto que este radical debe ser bastante estable, interferiría con la propagación de la peroxidación lipídica y explicaría los muchos ejemplos del efecto antioxidante de los carotenoides en solución.



Sin embargo, las siguientes reacciones de este radical aún no se entienden bien (Krinsky y Johnson 2005).

El β -caroteno

Este pigmento es el carotenoide más ampliamente estudiado y uno de los principales que incorporamos en la dieta (Schmitz et al. 1991; Enger et al. 1996). Sus principales fuentes de la dieta incluyen vegetales, de hojas verdes principalmente, y frutas de color naranja o amarillo (Tabla 7). De los 50 carotenoides que pueden metabolizarse a vitamina A, el β -caroteno presenta la actividad provitamina A más alta. El β -caroteno aparece de manera natural bajo las formas isoméricas *all-trans*, *9-cis*, *13-cis* y *15-cis* y funciona como un pigmento accesorio recolector de luz que protege el aparato fotosintético del exceso de irradiancia en todas las plantas verdes, incluyendo las algas (Ben-Amotz et al. 1987), actuando como un filtro de luz (Telfet 2002).

Tabla 7. Contenido de β -caroteno en alimentos (adaptado a partir de Database 1998).

Alimento	Contenido (mg/100 g)	Alimento	Contenido (mg/100 g)
Zanahorias	8 – 18.3	Albaricoque	2.1
Mangos	13.1	Pimiento rojo	2.2 – 2.4
Patata dulce	9.5	Melón	1.6
Calabaza	8	Lechuga romana	1.3
Espinacas	5.2 – 5.6	Pasta de tomate	1.2
Acelgas	3.9		

El β -caroteno es uno de los principales colorantes alimenticios comercializados en el mundo (Raja et al. 2007) y se emplea en multitud de comidas y bebidas para mejorar su apariencia (Coma 1991).

4.2. Polifenoles.

Los polifenoles son pigmentos muy abundantes en vegetales, a los que proporcionan aroma y color. En plantas vasculares se han identificado más de 8000 compuestos fenólicos y polifenólicos. Su interés radica en la capacidad para actuar como antioxidantes y en el hecho de que varios estudios epidemiológicos han demostrado que su consumo reduce el riesgo de sufrir enfermedades coronarias y cáncer (Hertog et al. 1993; 1995; Knekt et al. 1995; Arts y Hollman 2005). Dos alimentos en particular, el vino tinto y el té, verde fundamentalmente, han sido muy publicitados por sus beneficios sobre la salud del corazón (Vinson et al. 2001).

Estructuralmente, los polifenoles o compuestos fenólicos son un conjunto heterogéneo de moléculas que poseen uno o varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas (Souquet et al. 1996), siendo los flavonoides el grupo mejor definido entre los polifenoles de la dieta humana. Estos compuestos, en función de su estructura química, pueden clasificarse en dos grandes grupos (Tabla 8): flavonoides y no-flavonoides, según sean o no derivados del fluoroglucinol (esqueleto de dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado; C6-C3-C6).

Tabla 8. Clasificación de los principales compuestos fenólicos.

Flavonoides (dos grupos bencénicos; C6-C3-C6)	No-flavonoides (un grupo bencénico; C6-)
Antocianos	Ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico (C6-C1) y del cinámico (C6-C3)
Flavonas, flavonoles, flavanoles y flavononas, y flavanoles	Fenoles no carboxílicos (C6, C6-C1 y C6-C3), estilbenos (resveratrol)
Taninos condensados o proantocianidinas	Lignanos

Rutas metabólicas

En la formación de los polifenoles participan dos rutas metabólicas, la vía de los policétidos, minoritaria en plantas superiores, y la vía del ácido siquímico (http://www.acenologia.com/ciencia55_2.htm). A veces, ambas vías pueden participar conjuntamente en la formación de fenoles complejos. La vía de los policétidos discurre a partir de una molécula de acetil CoA, sobre la que se van adicionando sucesivamente unidades de malonil CoA, con pérdida de un átomo de carbono. La ruta del ácido siquímico, que es dependiente de la luz, se inicia en los plastos por condensación de la eritrosa 4-P con el fosfoenolpiruvato (PEP), y por diversas modificaciones se obtiene el ácido siquímico, del cual derivan directamente algunos fenoles. Pero la vía del ácido siquímico normalmente continúa y la incorporación de una segunda molécula de PEP conduce a la formación de fenilalanina, que por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en el ácido transcinámico. Posteriormente, éste es transformado en ácido *p*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático, y la acción de una CoA ligasa lo transforma en *p*-cumaroilCoA, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal (Figura 20).

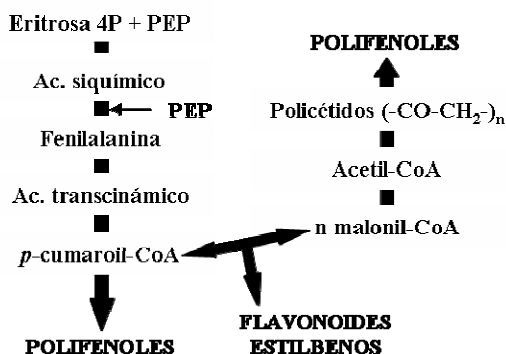


Figura 20. Esquema de la biosíntesis de polifenoles.

Antocianos

Los antocianos forman parte de los extendidos flavonoides y son responsables de la pigmentación roja y azul de muchos vegetales, frutas y flores. Los antocianos que aparecen de forma natural son derivados polihidroxi o polimetoxi de 2-fenil-benzopirilium, que a menudo presentan enlaces β-3-O-glicosídico o β-3,5-O-glicosídicos (Jurd 1972; Harborne 1994). Están formados por un azúcar (generalmente glucosa) unidos a una estructura química responsable del color ó aglicón (antocianidina). Los antocianos sólo se encuentran en plantas terrestres y su producción se piensa que podría deberse a una respuesta evolutiva de éstas frente a la radiación UV. Como otros polifenoles, los antocianos son potentes antioxidantes (Pool-Zobel et al. 1999; Matsumoto et al. 2002). Esta función se relaciona con sus propiedades anti-

carcinogénicas, anti-arteriosclerosis y anti-inflamatorias (Keppler y Humpf 2005). Estos compuestos son importantes en la resistencia de las plantas a los ataques de insectos, efectivos contra enfermedades neuronales (Alzheimer, trastornos cognitivos, etc.) y previenen la oxidación del ácido ascórbico. Asimismo, los antocianos también son usados en la alimentación como colorante E-163 y sólo pueden ser obtenidos a partir de frutos u hortalizas comestibles, siendo los hollejos de la fabricación del vino la fuente más importante a nivel industrial.

Polifenoles en fresa.

Como ya se ha comentado anteriormente, la fresa es una fuente extraordinaria de este tipo de compuestos. Los principales compuestos fenólicos presentes en la fresa pertenecen tanto al grupo de compuestos flavonoides como al de compuestos de tipo no-flavonoide.

Entre los de tipo flavonoide, la fresa contiene pigmentos antociánicos, flavonoles y proantocianidinas. Los pigmentos antociánicos más relevantes son derivados de pelargonidina (principalmente 3-glucósido, 3-rutósido, y, en menor medida, arabinósido o ramnósido), aunque también se han descrito derivados de la cianidina (Goiffon et al. 1999; da Silva et al. 2007). Entre los flavonoles, los mayoritarios son derivados del kaempferol, concretamente el 3-glucósido y el 3-glucorónico, y mucha menor cantidad de los mismos derivados glicosilados de la quercetina (Figura 21). Las fresas son también fuente de proantocianidinas, conteniendo tanto derivados monoméricos como catequina y epicatequina como oligoméricos (desde dímeros hasta polímeros). Entre los polifenoles de tipo no-flavonoides, la fresa presenta derivados de ácidos hidroxicinámicos (paracumárico fundamentalmente y cafeico, en menor medida) y sobre todo del ácido elágico y de elagitaninos. Sin duda, estos últimos son los principales constituyentes polifenólicos no-flavonoides y pertenecen al grupo de los taninos hidrolizables, que en medio ácido dan lugar al ácido elágico.

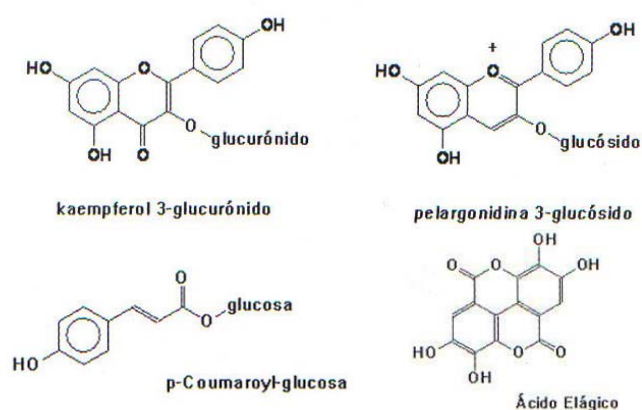


Figura 21. Algunos de los principales compuestos fenólicos presentes en fresa.

5. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL.

Los trabajos desarrollados en la presente Tesis Doctoral han pretendido alcanzar los siguientes objetivos:

- Conocer y caracterizar los niveles de radiación UV y PAR en la región occidental de la costa de Huelva.
- Determinar cual de las tres estirpes empleadas en este trabajo es la que mejor se adapta a las condiciones meteorológicas de la zona, lo cual favorecería la obtención de cultivos masivos de microalgas.
- Analizar el efecto de radiaciones UV sobre la productividad y las cinéticas de acumulación de carotenoides de cultivos de *Dunaliella* EMS bajo condiciones naturales de radiación.
- Identificar una posible estrategia de producción de cultivos de microalgas en régimen semicontinuo modificando la calidad espectral de luz para optimizar tanto la producción de biomasa como la acumulación masiva de carotenoides bajo condiciones estresantes que la estimulen.
- Estudiar la influencia de la región ultravioleta sobre la productividad de cultivos de fresa de las variedades 'Camarosa' y 'Ventana' y sobre el valor nutricional del fruto.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO.

1.1. Estirpes de microalgas.

Durante el desarrollo de la experimentación que concierne al cultivo de microalgas presentada en este trabajo de Tesis Doctoral, se han utilizado tres estirpes de microalgas pertenecientes al género *Dunaliella*:

- La estirpe de microalga *Dunaliella bardawil* (UTEX 2538) aislada en 1978 por Ben-Amotz y Avron en estanques salinos del Lago Bardawil (norte de Sinaí, Israel).
- Un mutante de la estirpe anterior obtenida por mutagénesis química al azar (Jin et al. 2003) según se describe en Salguero (2006).
- La estirpe de microalga *Dunaliella salina* 184.8 cedida por el grupo de Marine Biotechnology de la Universidad de Wageningen (Holanda).

Las microalgas del género *Dunaliella* son organismos eucariotas unicelulares biflagelados, clasificados, dentro de las Clorofíceas, en Volvocales. Estas microalgas contienen un gran cloroplasto que ocupa la mayor parte del citoplasma, lo que les confiere su color verde característico. La carencia de una pared celular rígida es un carácter intrínseco de este género que faculta a la microalga para responder con cambios de volumen frente a factores extracelulares de presión osmótica (Figura 1).

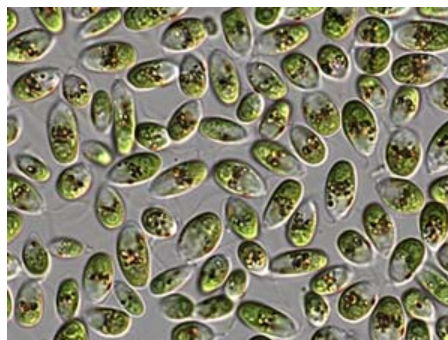


Figura 1. Imagen microscópica de *Dunaliella* sp.

1.2. Variedades de fresa.

Durante el desarrollo de la experimentación referente al cultivo de fresas que se presenta en este trabajo de Tesis Doctoral, se han utilizado dos variedades de fresa de la especie *Fragaria x ananassa* Duch, perteneciente a la familia de las Rosáceas: la variedad 'Camarosa' y la variedad 'Ventana'. Ambas variedades proceden de la Universidad de California y son de día corto (*Junebearer*).



Figura 2. Fotografía de *Fragaria x ananassa* Duch.

La especie *Fragaria x ananassa* Duch. es una especie híbrida obtenida mediante cruzamiento entre *Fragaria chiloensis* L. (originaria de Chile) y *Fragaria virginiana* Duch. (originaria del Este de Norteamérica). Estos individuos híbridos se caracterizan por ser plantas de mejor rendimiento que producen grandes frutos de muy buena calidad. A partir de *Fragaria x ananassa* Duch. se han desarrollado la mayor parte de las variedades que actualmente se cultivan en el mundo (Figura 2).

2. CONDICIONES DE CULTIVO.

En los siguientes subapartados se describen las diferentes condiciones de cultivo bajo las cuales se ha llevado a cabo tanto la experimentación con cultivos de microalgas como de fresas. Se dedica una especial atención a la modificación del ambiente radiativo en el que se desarrollan ambos cultivos, ya que el principal objetivo del trabajo ha sido estudiar la incidencia de la radiación ultravioleta sobre ellos y, por lo tanto, ha sido necesario alterar mediante filtros el tipo de radiaciones incidentes de la región ultravioleta (UV) y visible (PAR).

2.1. Filtros de corte.

Se denominan filtros de corte a aquellos materiales que presentan una transmitancia del 100% o cercana a ella en algunas zonas del espectro, mientras que en el resto, ésta decae prácticamente a cero.

En los trabajos que aquí se contemplan se han utilizado tres tipos de filtros que han sido proporcionados por el Instituto de Botánica de la Universidad Friedrich-Alexander de Alemania. Los datos de transmitancia de cada uno de ellos, en unidades relativas, y proporcionados por el fabricante, se presentan en la Figura 3.

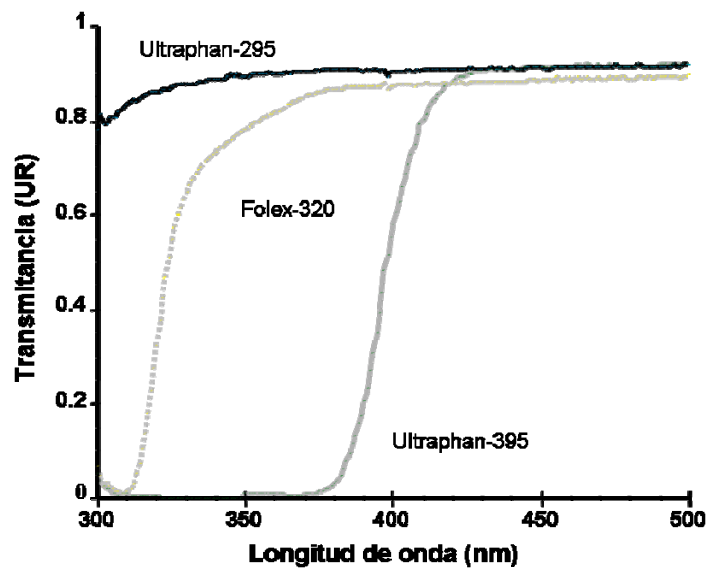


Figura 3. Espectros de transmisión de los filtros de corte UV empleados.

El filtro Ultraphan-295 suele emplearse como control, ya que aunque éste sea prácticamente transparente a las radiaciones en todo el espectro, hay que valorar el efecto que puede ocasionar la propia colocación del filtro sobre las condiciones ambientales que se generan debajo (temperatura y humedad).

Por lo tanto, utilizando en la experimentación este tipo de materiales plásticos rígidos con aspecto de acetato, se logra retener toda la radiación ultravioleta incidente en el intervalo comprendido entre los 280 y 395 nm (Ultraphan-395) y el correspondiente a la región UV-B entre los 300 y 320 nm (Folex-320).

2.2. Modificación de la región fotosintéticamente activa (PAR).

Además de la modificación de las radiaciones ultravioleta realizada durante el desarrollo de ensayos con cultivos de microalgas y de fresa, en ciertos experimentos se alteró la calidad de la radiación visible que recibían durante su crecimiento diferentes cultivos de microalgas incubados tanto en condiciones controladas de laboratorio como en el exterior.

Para lograr esto, se emplearon distintos papeles de celofán de colores que previamente fueron caracterizados con la instrumentación presente en el laboratorio de calibración ubicado en la Estación de Sondeos Atmosféricos de “El Arenosillo”, en INTA, utilizando para ello técnicas espectrofotométricas. Los datos de transmisividad de los mismos se presentan en la Figura 4.

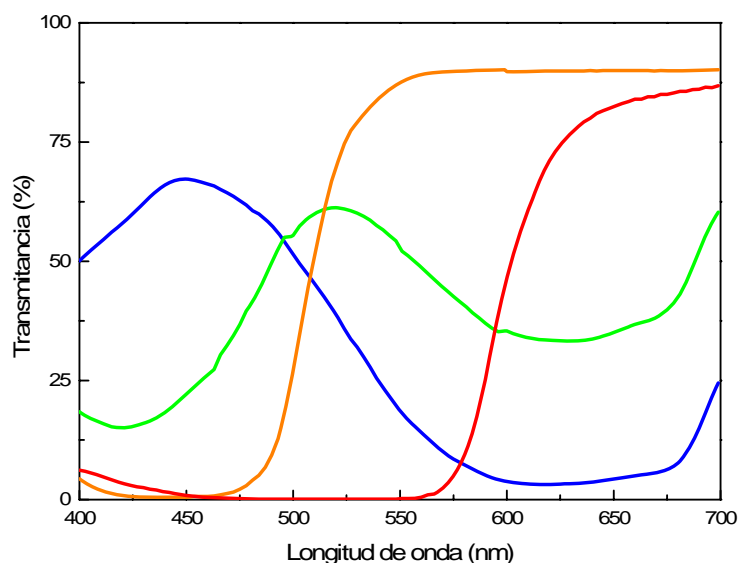


Figura 4. Espectros de transmisión en el rango visible de los papeles de celofán empleados en experimentos con microalgas: azul, verde, rojo y amarillo.

El papel azul presenta un máximo de transmisión centrado en 450 nm (región azul). El rojo deja pasar radiaciones con longitudes de onda superiores a 600 nm (región roja). El amarillo retiene radiaciones correspondientes a la región azul del espectro dejando pasar en torno a un 90% a partir de los 550 nm y, finalmente, el verde presenta un máximo primario de transmitancia centrado en 520 nm y uno secundario en la zona cercana al rojo lejano (~ 700 nm), mostrando en las regiones azul y roja unos valores intermedios de transmisión (25 y 40%, respectivamente).

2.3. Cultivo de microalgas.

Composición del medio de cultivo

Las estirpes empleadas que ya fueron descritas en el presente capítulo se cultivaron en el medio de cultivo J/1, descrito en (Johnson et al. 1968), el cual presenta la siguiente composición por litro (Tabla 1).

Tabla 1. Reactivos para preparar un litro de medio de cultivo J/1.

Componente	Volumen (ml)	Cantidad (g)
Agua	980	
Solución de Fe	10	
Na ₂ EDTA		0.189
FeCl ₃ ·6H ₂ O		0.244
Solución de trazas	10	
H ₃ BO ₃		0.061
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O		0.038
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0.006
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0.0051
ZnCl ₂		0.0041
MnCl ₂ ·4H ₂ O		0.0041
NaCl		116.88
MgCl ₂ ·6H ₂ O		1.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.5
KCl		0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O		0.2
KNO ₃		1.0
NaHCO ₃		0.043
KH ₂ PO ₄		0.035
TRIS 50 mM		6.054

Después de haber mezclado todos los reactivos en sus cantidades correspondientes, es necesario ajustar el pH a un valor de 7.5 con HCl.

Para esterilizar convenientemente los medios de cultivo preparados, éstos se colocaban en un erlenmeyer de capacidad apropiada que era tapado por algodón hidrófobo. El algodón se atravesaba por una varilla de vidrio hueca, cuyo extremo inferior estaba en contacto con el medio, y el superior se prolongaba con un tubo de goma, en el cual se introducía un segmento de vidrio con algodón hidrófobo actuando de filtro de aire para la corriente gaseosa. La esterilización se realizaba con un autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 126 °C y una presión superior a 1 atm.

Cultivo de microalgas en laboratorio

Los cultivos líquidos de microalgas utilizados en los diferentes ensayos de interior, se realizaron fotoautotróficamente en cámara climatizada a 25 °C empleando matraces erlenmeyers de distintos volúmenes; según el caso. Cuando la temperatura alcanzaba valores superiores a 25 °C, se emplearon baños de metacrilato termostatizados con agua a la temperatura indicada.

La fuente de carbono se suministraba burbujeando a través de la varilla de vidrio inmersa en el medio conteniendo la suspensión celular una mezcla de aire enriquecida en CO₂ al 5% v/v. Dicha mezcla era proporcionada por una bala anexa a la cámara conectada a una trampa de CO₂. En algunos experimentos se empleó sólo aire como fuente de carbono, lo cual se indica cuando corresponde.

Generalmente, la fuente de luz empleada para proporcionar energía lumínica a los cultivos fue generada por tubos fluorescentes de luz blanca (Philips 30W/33) que suministraban una intensidad de 150 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie de los recipientes de cultivo.

En todos aquellos experimentos en los que se han incubado cultivos de microalgas bajo radiación UV-A o UV-B, al objeto de analizar la influencia de radiaciones PAR y UV sobre el crecimiento y la producción de carotenoides en estirpes del género *Dunaliella*, se emplearon lámparas Philips 15W/05 (UV-A) y Vilber-Lourmat T-15L (UV-B). Las diferentes irradiancias se alcanzaron variando la distancia entre los cultivos y la fuente de iluminación.

Por otro lado, en los experimentos con algas realizados en el laboratorio de aplicaciones biotecnológicas presente en las instalaciones de la Estación de Sondeos Atmosféricos de “El Arenosillo”, se empleó una cámara de cultivo IBERCEX, modelo F-4, que reproducía de forma similar las condiciones expuestas en párrafos anteriores (Figura 5).



Figura 5. Cámara IBERCEX F-4.

La cámara climatizada IBERCEX F-4 está provista de 6 tomas para gaseo y presenta en su interior 4 lámparas fluorescentes de luz blanca (Philips 30W/33) que suministran a los cultivos ubicados en el centro de cada balda alrededor de $150 \mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie de los matraces. Además, posee un sistema para regular tanto la temperatura interior como los ciclos de luz/oscuridad. En nuestro caso, siempre se aplicó una iluminación continua 24 horas al día.

Cultivo de microalgas en el exterior

Todos los ensayos exteriores con microalgas, a excepción del experimento realizado en las instalaciones del CICEM “Aguas del Pino”, se llevaron a cabo en la terraza de la Estación de Sondeos Atmosféricos de “El Arenosillo” (ESAt – INTA; ver marco de colaboración científica UHU - INTA). La ESAt posee una amplia base de datos meteorológicos de alto interés para los científicos que destaca por el gran número parámetros registrados (temperatura, humedad, ozono, aerosoles, radiaciones, etc.), un cuidado mantenimiento de la instrumentación que los registra y un largo período de medidas al que éstos corresponden.

En los experimentos exteriores desarrollados en la ESAt para analizar la incidencia que la modificación de las condiciones de radiación natural recibidas in situ por los cultivos de microalgas presenta sobre la productividad y acumulación de carotenoides, y en aquellos dirigidos a obtener las curvas de crecimiento de las estirpes empleadas en el transcurso de la investigación, se emplearon unos tubos cilíndricos diseñados por el grupo, a modo de pequeños fotobiorreactores de 250 ml burbujeados con aire. Este sistema de cultivo es el que se muestra en la Figura 6.

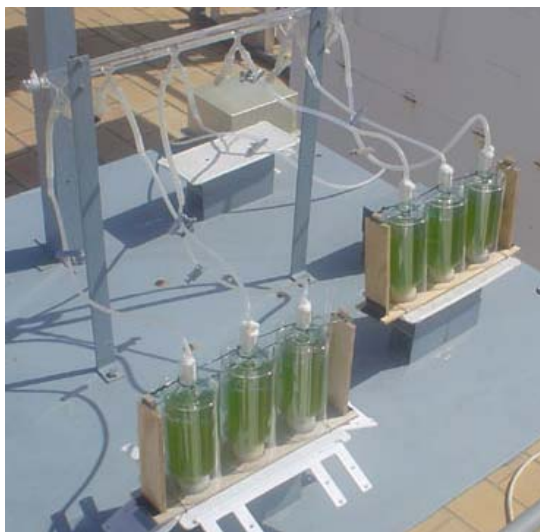


Figura 6. Sistema de tubos cilíndricos-cónicos expuestos a condiciones de radiación natural.

Según se aprecia en dicha Figura, los cultivos se mantienen en incubación mediante gaseo con aire proporcionado por una bomba peristáltica, previo paso por un distribuidor de vidrio del que parten las distintas salidas de gas que conducen el aire a través de la varilla de vidrio hasta el medio de cultivo que contiene la suspensión celular de la estirpe concreta.

En aquellos casos en los que fue preciso, los tubos fueron completamente rodeados con filtros de corte para alterar la calidad espectral de las radiaciones de las que los cultivos disponen.

2.4. Cultivo de fresa.

Los estudios relativos al análisis de la influencia de distintos tipos de radiación UV sobre la productividad de las variedades de fresa ensayadas tuvieron lugar durante las temporadas 2004-2005 y 2005-2006 (de octubre a mayo). En este tiempo, todas las prácticas culturales necesarias para garantizar el desarrollo adecuado del cultivo fueron realizadas por experimentados agricultores de la empresa S.A.T. Gorofres (Palos – Huelva). Estas prácticas incluyen fundamentalmente labores como la desinfección del suelo, el abonado de fondo, el alomado, la plantación, la fertirrigación y la lucha contra enfermedades y plagas, entre otras. Por lo tanto, el manejo del cultivo fue supervisado casi en su totalidad por expertos agricultores.

Básicamente, los estudios consistieron en cambiar el material de cubierta de forzado tradicionalmente empleado en los microtúneles de la zona de Huelva (etilvinilacetato; EVA o polietileno; PE) por los filtros de corte descritos en el apartado 2.1. del presente capítulo. Las fechas de implantación de los materiales varían de un año a otro en función de las oscilaciones de la temperatura exterior. En este trabajo de Tesis se siguieron las indicaciones del agricultor. Generalmente, las plantas se cubren a finales de noviembre o principios de diciembre, antes de la llegada del frío intenso.

Las tareas desarrolladas en estos estudios se centraron en la recolección de frutos y su posterior análisis desde el punto de vista de la productividad y calidad nutricional.

Dado que como ya se ha comentado, los filtros de corte son algo rígidos, característica que dificulta su manejo en campo, fue necesario diseñar un sistema porta-cubiertas con la idea de reproducir las condiciones del cultivo tradicional, tal y como puede apreciarse en la Figura 7.



Figura 7. Armazones diseñados para la colocación del material de cubierta de forzado. Finca experimental de Peguerillas (Ctra. Huelva – Gibraleón).

Así pues, la única diferencia entre tratamientos, entendido cada uno de ellos como la porción de terreno plantado cubierto con un determinado tipo de material de plástico, es la barrera interpuesta entre las radiaciones incidentes y las plantas que se desarrollan en el interior de los microtúneles. El resto de variables no varía entre tratamientos.

3. DETERMINACIONES FÍSICAS.

En los siguientes subapartados se describirán las principales determinaciones físicas que se han desarrollado a lo largo de los trabajos relacionados con la caracterización y/o calibración de los instrumentos empleados en la medida de radiaciones PAR y UV (apartado 1 del capítulo de Resultados y Discusión) y con el cultivo de microalgas y de fresa (apartados 2 y 3 del capítulo de Resultados y Discusión).

3.1. Caracterización de instrumentos de medida de radiación solar ultravioleta.

En el marco de los trabajos experimentales desarrollados en la tesina de investigación sobre la medida y caracterización de la radiación UV en la provincia de Huelva, parte de la cual se describe en el apartado 1 del capítulo de Resultados y Discusión, a continuación se detalla la experimentación más destacable realizada en el laboratorio de calibración de instrumentos de medida de radiación solar de la ESAt, presentando previamente, una breve descripción de éste.

3.1.1. Laboratorio de calibración de la ESA.

Dicho laboratorio consta de dos áreas principales; la zona de equipos y la zona de calibración, separadas ambas por una cortina negra aterciopelada muy tupida que sirve para evitar el paso de luz parásita (*stray light*) hacia la zona de calibración, y para proteger a los operarios de la radiación UV que emiten las lámparas durante el proceso de calibración.

En la primera zona del laboratorio se encuentra un ordenador, un multímetro de alta precisión, una fuente de alimentación y todos aquellos accesorios ópticos y herramientas de taller que el operador pudiera necesitar para realizar labores de ajuste o mantenimiento, mientras que en la segunda, se realizan las calibraciones. Entre los elementos principales de esta zona se encuentra una columna de calibración de 50 kg (Figura 8), una mesa metálica empleada en la fijación, mediante imanes, de un banco óptico cuando se precisa realizar una geometría de calibración determinada, y un sistema de doble monocromador equipado con fuente de Xe y esfera integrante. Por otra parte, un aparato de aire acondicionado regula y controla la temperatura de la sala, parámetro muy importante en todos los procesos de calibración.

Las paredes del laboratorio y el resto de superficies están pintadas de color negro mate para maximizar la absorción de cualquier radiación extraña que pudiera alcanzar de forma indirecta el interior del instrumento a calibrar.

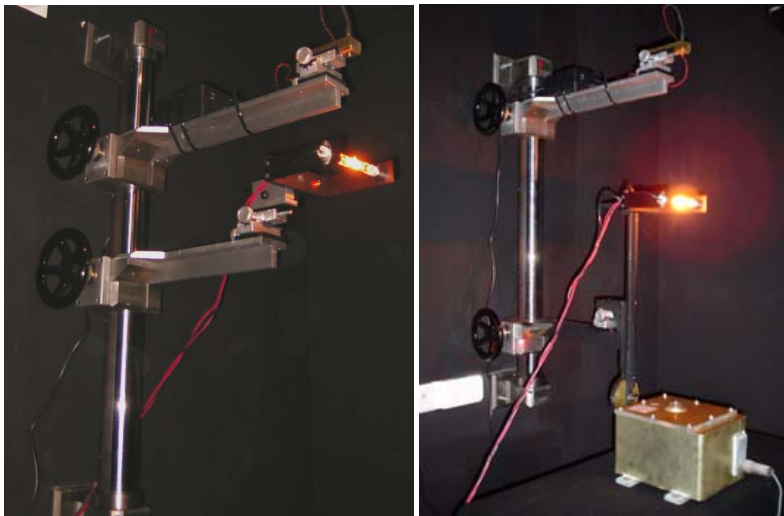


Figura 8. Detalle de la columna de calibración mostrando dos posibles configuraciones.

Como se aprecia en la Figura 8, en la columna se acopla en posición horizontal una lámpara de calibración con filamento de tungsteno que se alinea con el detector del instrumento a calibrar mediante un láser. Dicha lámpara emite 1000 W estándar de irradiancia espectral (200A-H) en el rango UV-Vis, es halógena, y está certificada para garantizar la trazabilidad de las medidas.

En la imagen de la derecha se observa otro tipo de configuración empleada en la caracterización de la respuesta angular de los sistemas de entrada de diferentes tipos de instrumentos, iluminando para ello desde diferentes ángulos.

3.1.2. Caracterización de la respuesta angular del radiómetro Eldonet.

El radiómetro Eldonet es un instrumento que mide radiación electromagnética en 3 bandas espectrales de marcado interés biológico (UV-B, UV-A y PAR) (Lebert et al. 2002) y que se encuentra disponible dentro de la amplia dotación de instrumentos de monitorización de parámetros atmosféricos de la ESA.

El procedimiento desarrollado para caracterizar la respuesta angular del mismo (Figura 9) se describe a continuación:

1. Un día antes de iniciar las medidas se colocó el equipo en el interior del laboratorio para adaptarlo a las nuevas condiciones de temperatura.
2. Una vez ubicado en la mesa de trabajo, se midió una distancia de 50 cm desde el filamento de la lámpara hasta la entrada óptica. A continuación, se procedió a alinear todo el sistema con ayuda del láser.
3. Antes de encender la lámpara, se dejó un período de estabilización, con el Eldonet encendido, de una hora.
4. Tras este intervalo, se encendió la lámpara y se esperó su estabilización.
5. En esta situación, comenzó el registro de las medidas realizando un barrido en ángulos desde -90° hasta 90° , a intervalos regulares de 6° . Dado que en circunstancias reales el instrumento se orienta al N, en el laboratorio la lámpara salió por el E y se puso por el O.
6. Bajo las premisas anteriores, se tomaron dos minutos de medida por cada ángulo, no considerándose válido el minuto siguiente, instante que se aprovechaba para cambiar de posición la lámpara.

Antes y después del experimento, se tomaron en oscuridad los valores de fondo de cada canal para corregir los valores brutos. Finalmente se normalizaron los valores para 0° .

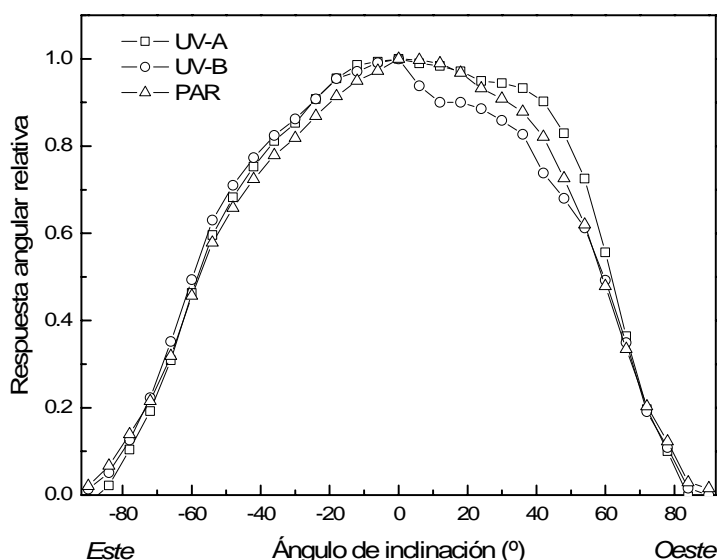


Figura 9. Respuesta angular relativa de los canales del radiómetro Eldonet determinada en el laboratorio de calibración de la ESA.

3.2. Caracterización de materiales empleados en la modificación de las condiciones radiativas de cultivo.

Esta caracterización incluye tanto los ensayos realizados con los filtros de corte y el plástico EVA (etilvinilacetato) como aquellos realizados con los papeles de celofán.

Las tareas de caracterización se efectuaron con la instrumentación disponible en los laboratorios de calibración de instrumentos de medida de radiación solar y de aplicaciones biotecnológicas de la Estación de Sondeos Atmosféricos de “El Arenosillo”.

Para caracterizar los filtros de corte y el plástico EVA que habitualmente se emplea en la zona de Huelva para cubrir las plantas de fresa, se utilizó una lámpara de 1000 W que presenta una zona de emisión en la región ultravioleta. Dicha lámpara se colocó a 50 cm de la entrada óptica de un espectrorradiómetro Brewer MK-III de doble monocromador. Asimismo, encima de la entrada óptica del mencionado instrumento se ubicó un colimador de tela opaca, en cuyo interior, a una posición intermedia, se montaron las distintas muestras plásticas. De esta forma, se garantizó que el Brewer sólo recibiese una irradiancia directa y que no hubiese pérdidas por dispersión del campo radiativo aplicado. El sistema se muestra en la Figura 10.

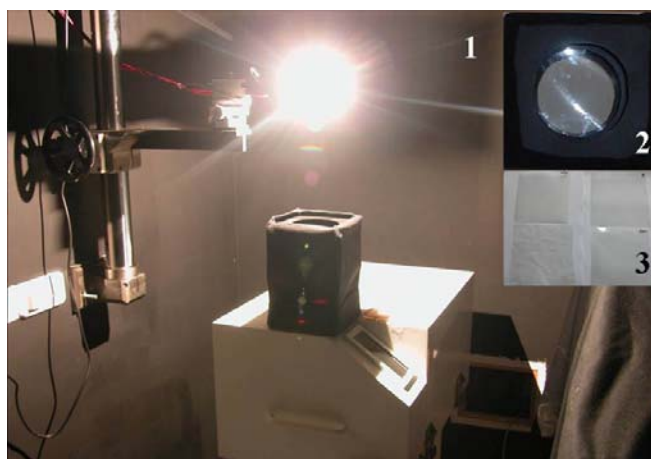


Figura 10. Laboratorio de calibración junto con el Brewer MK-III (1). Colimador de tela opaca (2). Muestras plásticas ensayadas (3).

Por tanto, con este sistema se obtienen los valores de transmitancia espectral relativa en la región ultravioleta para cada uno de los materiales ensayados. Se comparan los valores registrados por el Brewer en ausencia de muestra y los obtenidos después de que el haz de luz haya atravesado cada uno de los filtros. A su vez, este tipo de pruebas permite corroborar si las especificaciones técnicas relativas a las características ópticas de cada material son las que proporciona el fabricante (Figura 11). Obsérvese la similitud de esta Figura con la Figura 3.

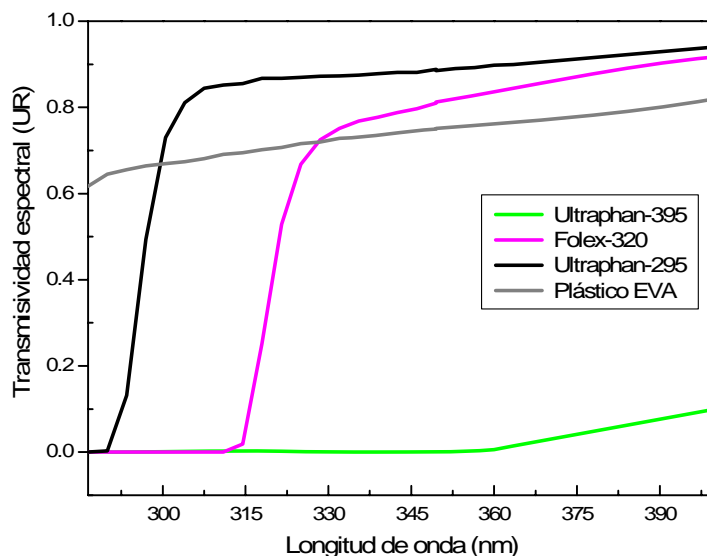


Figura 11. Transmisividades espectrales de las muestras plásticas ensayadas en el laboratorio de calibración.

Por otra parte, aprovechando las disponibilidades de los instrumentos de medida de radiación solar presentes en la terraza de la ESAt, se calcularon las atenuaciones relativas que cada tipo de material plástico provoca en la región visible del espectro solar. Para ello, se empleó un radiómetro Eldonet que posee un canal para la medida integrada de PAR. Se escogió un día despejado para evitar la influencia de nubes y, en torno al mediodía (incidencia directa máxima), se colocaron las muestras plásticas encima de la entrada óptica del equipo (Figura 12). Los valores obtenidos tras realizar dos réplicas de este tipo fueron los siguientes:

- Plástico EVA (16%)
- Ultraphan-295 (6%)
- Folex-320 (11%)
- Ultraphan-395 (8%)

Finalmente, en la caracterización de los papeles de celofán de colores se empleó un espectrofotómetro UV-Vis de laboratorio de la marca ThermoSpectronic. Se seleccionaron una serie de muestras de los diferentes papeles de celofán que se alojaron en el espacio reservado para la inserción de cubetas y, a continuación, se realizó un barrido en longitudes de onda, cada nm, en el rango comprendido entre los 400 y 700 nm. Los resultados obtenidos tras realizar dos réplicas ya se mostraron en la Figura 4.



Figura 12. Radiómetro Eldonet empleado en la evaluación de la atenuación relativa de la irradiancia PAR.

3.3. Medida de la irradiancia incidente en cultivos de laboratorio.

Las irradiancias tanto del rango PAR como UV del espectro con las que se iluminaron los cultivos de microalgas a partir de tubos fluorescentes, se midieron con un fotómetro Delta OHM HD 9021 equipado con tres sondas para la medida de radiación directa en el rango PAR, UV-A y UV-B.

3.4. Contaje celular.

La densidad celular de los cultivos de microalgas se determinó mediante el recuento de células en una cámara de Neubauer constituida por 64 cuadrículas, cada una de las cuales tiene un volumen de 0.00625 mm^3 (Figura 13).

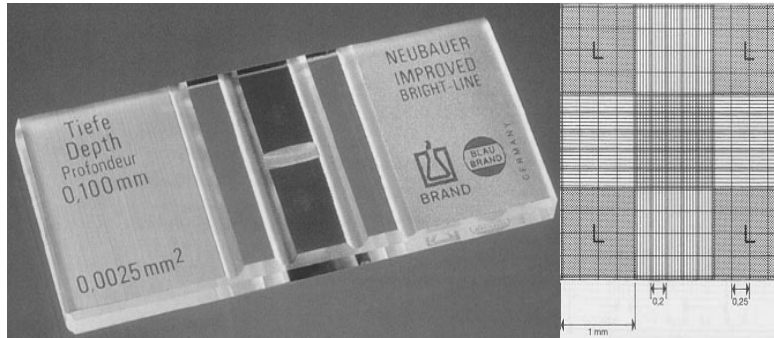


Figura 13. Cámara Neubauer empleada en el recuento celular. A la derecha se observa con detalle las cuadrículas centrales.

La cámara de Neubauer es un portaobjetos adaptado a un microscopio de campo claro o de contraste de fases. La depresión central de la cámara está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando ésta se tapa con un cubreobjetos, el volumen del área marcada con una L es de 0.1 mm^3 ($1 \mu\text{l}$).

Cada muestra de suspensión celular de 1 ml era diluida en 4 ml de agua. Posteriormente se añadían $50 \mu\text{l}$ de etanol a $100 \mu\text{l}$ de la mezcla. Finalmente, ésta se introducía con una micropipeta en el volumen hueco de la cámara hasta colmarlo. A continuación, se procedía al recuento de células en un microscopio Olympus CX41. La densidad celular de la suspensión original se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Densidad celular (n}^\circ \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{\sum 64 / 4}{10^{-4} \text{ ml} \cdot \text{FD}}$$

Siendo $\sum 64/4$ el promedio de los conteos de las áreas marcadas con una L y FD el factor de dilución, en nuestro caso 0.133.

3.5. Determinación de parámetros agronómicos en fresa.

En los trabajos referentes al estudio de la influencia de la radiación ultravioleta sobre la productividad de cultivos de fresa (apartado 3 del capítulo de Resultados y Discusión), se realizaron una serie de determinaciones de parámetros agronómicos.

A todos los efectos, se ha considerado fruta madura toda aquella que, superando una anchura mínima de 20 mm, presentaba al menos tres cuartas partes de la coloración rojiza característica del fruto. En la gran mayoría de las recolecciones efectuadas durante las campañas, se recolectó toda la fruta madura presente en las plantas de cada tratamiento. Sin embargo, en algunos casos, y fundamentalmente en la campaña 2004/2005, se procedió a realizar otro tipo de recolecciones eliminando también frutos no maduros.

Con los datos de los pesos totales recolectados, se calculó la producción total, expresada en $\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$, bajo cada tratamiento. Además, se pesaron los frutos individualmente en una balanza granatario para calcular el peso promedio de los mismos. Asimismo, se contabilizó también el número de frutos cosechado por cada planta. Finalmente, las medidas del ancho de los frutos y del largo se llevaron a cabo con un calibre o pie de rey. La anchura se determinó a partir del diámetro superior en la parte más prominente del fruto, mientras que la largura se midió desde el extremo inferior del fruto hasta la base del pedúnculo de éste. Por otra parte, en base a las determinaciones de la anchura del fruto, se estableció la siguiente clasificación de calibres:

- ◆ Calibre A: $\varnothing \leq 35 \text{ mm}$
- ◆ Calibre B: $35 \text{ mm} < \varnothing \leq 45 \text{ mm}$
- ◆ Calibre C: $45 \text{ mm} < \varnothing \leq 55 \text{ mm}$
- ◆ Calibre D: $\varnothing > 55 \text{ mm}$

4. DETERMINACIONES QUÍMICAS.

En los siguientes subapartados se describirán las principales determinaciones químicas que se han desarrollado a lo largo de los trabajos relacionados con el análisis de muestras de cultivos de microalgas y de frutos de fresa que se incluyen en los resultados expuestos en los apartados 2 y 3 del capítulo de Resultados y Discusión. En este sentido, el grueso de las determinaciones realizadas ha consistido en el desarrollo y/o puesta a punto de diferentes métodos bioquímicos, si bien, también se han empleado algunas técnicas analíticas más directas como es el caso, por ejemplo, de la refractometría.

4.1. Contenido de clorofilas y carotenoides totales en células de estirpes del género *Dunaliella*.

La determinación del contenido en clorofilas a y b de *Dunaliella* se llevó a cabo mediante el método de Liechtenthaler modificado (Liechtenthaler 1987). Para ello, se centrifugó 1 ml de cultivo a 13000 rpm en una centrífuga miniSpin de tubos eppendorf durante 6 min, eliminando posteriormente el sobrenadante. Después de este primer lavado se añadió un ml de agua destilada al pellet y se resuspendió con ayuda de un vortex. A continuación, la muestra resuspendida se centrifugó nuevamente a 13000 rpm y tras 6 minutos se prescindió definitivamente del sobrenadante. Los dos lavados realizados en cada muestra tenían por objeto evitar posibles interferencias en la extracción de pigmentos debido a las altas concentraciones de sal existentes en el medio ($\sim 2\text{M}$). Después del segundo lavado, el pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de agua destilada, se calentó a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto y, finalmente, se realizó la extracción de clorofilas y carotenoides totales adicionando a la muestra 4 ml de acetona en caliente y agitando enérgicamente durante 30 segundos en el vortex. La determinación de clorofilas y carotenoides totales se realizó en el sobrenadante midiendo la absorbancia a 470, 647 y 663 nm en un espectrofotómetro.

Las concentraciones de clorofila a y b presentes en el extracto se calculan utilizando como coeficientes de extinción a 663 nm y 647 nm, 74.46 y $18.3 \text{ mg}^{-1}\cdot\text{ml}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectivamente. Los contenidos en clorofila a y b,

total y carotenoides totales presentes en las células del cultivo se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones:

Clorofila a:

$$Chl_a = 5 \cdot [(12.25 \cdot A_{663}) - (2.73 A_{647})]$$

Clorofila b:

$$Chl_b = 5 \cdot [(21.5 \cdot A_{647}) - (5.1 A_{663})]$$

Clorofila total:

$$Chl \text{ total} = Chl_a + Chl_b$$

Carotenoides totales:

$$C_T = \frac{[(5000 \cdot A_{470}) - (1.82 \cdot Chl_a) - (85.02 \cdot Chl_b)]}{198}$$

4.2. Identificación cualitativa y cuantificación de carotenoides en células de estirpes del género *Dunaliella* mediante cromatografía líquida (HPLC).

Para la extracción de las muestras se empleó el método de Liechtenthaler modificado descrito en el apartado anterior. Una vez obtenidos los extractos, en la posterior separación y cuantificación de los carotenoides principales se utilizó un equipo de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), modelo Merck, con una columna de fase reversa RP-18 de 5 μm , equipado con un detector UV-Vis. La longitud de onda para la detección de los carotenoides se ajustó a 450 nm. La fase móvil utilizada fue la siguiente: disolvente A, acetato de etilo; disolvente B, acetonitrilo:agua (9:1 v/v). El flujo aplicado al sistema fue de 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. En la elución de cada muestra se empleó el gradiente descrito por Young et al. (1997), con ligeras modificaciones, el cual se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Gradiente de elución empleado en la separación de carotenoides.

Tiempo	Acetato de etilo	Acetonitrilo:agua
0'	0	100
15'	60	40
22'	76	24
25'	0	100

Las muestras se introdujeron manualmente en el equipo de cromatografía líquida con ayuda de una microjeringa, a través de un *loop* de carga de 20 μl .

Previamente a la cuantificación relativa de los carotenoides, se cromatografiaron muestras de patrones, a diferentes concentraciones, de los principales pigmentos observados en las muestras de microalgas, es decir, de β -caroteno, luteína, violaxantina y zeaxantina. Un ejemplo de ello se muestra en la Figura 14. A partir de los cromatogramas obtenidos en cada caso, se procedió a calcular los factores de conversión adecuados para la cuantificación de los

pigmentos dividiendo la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) del patrón entre el área de cada pico detectado (μV).

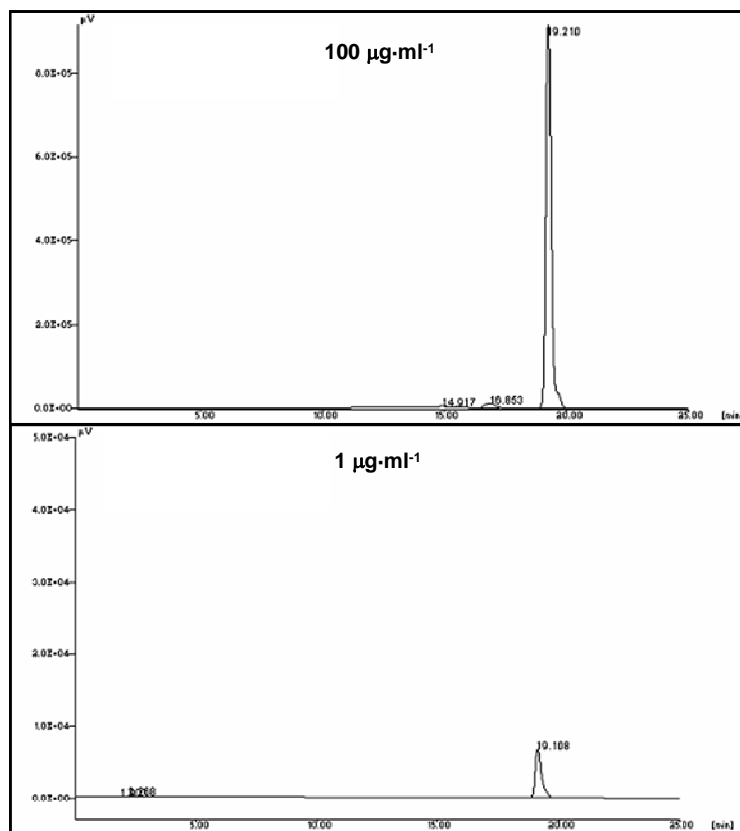


Figura 14. Cromatogramas obtenidos tras pinchar un patrón de β -caroteno a dos concentraciones concretas.

Protocolo DMF/Éter (*N,N*-Dimetilformamida/éter).

Con el objeto de limitar la derivatización y desnaturalización de los carotenoides y para tener una idea cualitativa más precisa de los carotenoides mayoritarios presentes en las muestras de cultivos de *D. bardawil*, se realizó alguna experiencia utilizando solventes orgánicos como DMF y éter en la extracción. Los extractos obtenidos se analizaron por HPLC según se ha descrito anteriormente. El pretratamiento de la muestra se realizó según los siguientes pasos:

1. Se tomaron 0.5 g de peso húmedo de células.
2. Se lavó la muestra dos veces con agua destilada centrifugando a 13000 rpm y agitando con vortex.
3. Una vez lavada la muestra, se rompieron las células con nitrógeno líquido.
4. Paralelamente, se preparó una solución de *N,N*-dimetilformamida saturada con CO_3Mg (0.1 g por cada 250 ml de DMF), para evitar, en la medida de lo posible, la formación de las feofitinas que se forman cuando la clorofila pierde el Mg.
5. Se realizó una primera extracción con 50 ml de DMF durante 12 horas.
6. Tras esta primera extracción, la suspensión se centrifugó, se retuvo el sobrenadante y se almacenó a 4°C en oscuridad. En este instante se estima que ya han sido extraídos en torno al 80% de los pigmentos.

7. Posteriormente se efectuó una segunda extracción con un volumen algo inferior de DMF (~ 25 ml) durante 12 horas.
8. Después de que hubiese transcurrido el período correspondiente a la segunda extracción, se volvió a centrifugar para obtener el sobrenadante, que se unió al almacenado tras la primera extracción.
9. Una vez extraídos los pigmentos, éstos se transfirieron a éter. La transferencia se realizó en un embudo de decantación añadiendo en primer lugar la DMF que contiene los pigmentos y en segundo lugar el mismo volumen de éter. A continuación se tapó el embudo y se mezcló progresivamente durante 10 minutos para que tuviese lugar la transferencia.
10. Simultáneamente, se tenía preparada una disolución de NaCl al 10% próxima a 0 °C. Transcurridos los 10 minutos anteriores, se añadieron 15 ml de esta disolución por cada 200 ml de la mezcla del embudo. Mediante agitación se logró parar la transferencia de pigmentos al éter y que las dos fases se separasen, observándose una fase inferior de color amarillo claro que contenía la DMF y el agua y otra fase superior que contenía el éter con los pigmentos.
11. La fase éter contenía algún resto de DMF, hecho que debe evitarse porque después no es posible su evaporación. Por ello, se lavó al menos tres veces con agua destilada, añadiendo disolución salina hasta la completa separación de fases.
12. Tras haber obtenido la fase éter que contenía los pigmentos, libre de DMF, ésta se evaporó en un rotavapor a una temperatura de 30 °C y después se disolvió el residuo obtenido en acetona. Por último, la muestra se almacenó en oscuridad a -20 °C, estando lista para su análisis en el HPLC.

Todo el procedimiento anterior se realiza bajo luz actínica verde y se debe tener la precaución de que los extractos no reciban luz blanca, por lo que se recomienda tapar la muestra con papel de aluminio.

En la Figura 15 se muestra un cromatograma obtenido tras haber aplicado este protocolo a una muestra de *D. bardawil* que había sido incubada en carencia de nitrógeno e iluminada con una alta irradiancia (~ 1000 $\mu\text{moles fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR).

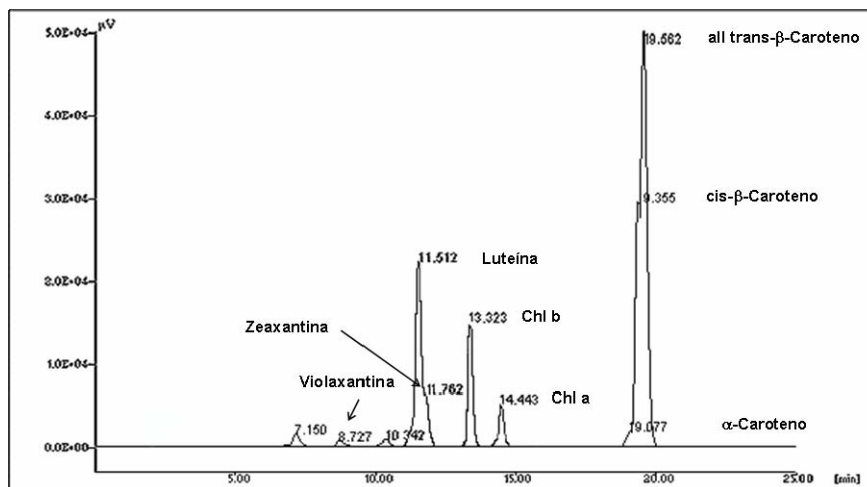


Figura 15. Perfil de carotenoides obtenido a partir de una muestra de *D. Bardawil* utilizando el protocolo DMF/éter.

Según se observa en la Figura 15, la resolución de los picos identificados es mejor que cuando se realiza el pretratamiento de la muestra descrito anteriormente en la determinación de clorofilas y carotenoides totales. Sin embargo, dado el volumen de muestras existentes a partir de los diferentes ensayos con microalgas, se descartó emplear este protocolo de manera rutinaria debido a la gran cantidad de tiempo que acarrea ponerlo en marcha.

4.3. Análisis de sólidos solubles en fresa.

Como los azúcares son los componentes mayoritarios en el zumo de fresa, el análisis de sólidos solubles puede utilizarse como un índice del contenido de azúcares presente en la muestra (Mitcham y Kader 1995).

La medición del contenido de sólidos solubles basada en la refractometría, requiere de instrumentos relativamente baratos, aunque las medidas no se pueden realizar cómodamente en campo. Un refractómetro (Figura 16) es un instrumento que se usa para estimar el contenido de azúcares de la fruta midiendo el índice de refracción del zumo. De esta manera, se establecen los °Brix que presenta el zumo; en nuestro caso, de fresa. La temperatura estándar de medida es de 20 °C. El funcionamiento del refractómetro se basa en las variaciones que experimenta la refracción de un líquido al modificarse su contenido de sustancias disueltas. Así pues, cuanto mayor sea la concentración de azúcares en disolución, más denso será el zumo y, menor la velocidad con la que luz lo atraviese, por lo que el resultado será un mayor índice de refracción, que está directamente relacionado con los °Brix.

En el procedimiento aplicado en esta Tesis, se ha utilizado un refractómetro ATAGO N-20E con una escala de 0 a 20 °Brix y una resolución de 0.1 °Brix. Dicho procedimiento consta de los siguientes pasos:

1. Homogenización, con una licuadora, de todas las fresas recolectadas en cada cosecha, para obtener el zumo.
2. Calibración del refractómetro con agua destilada a la temperatura de trabajo del laboratorio.
3. Toma de muestra del zumo con una pipeta Pasteur para depositarla, en forma de gotas, sobre el prisma del refractómetro hasta cubrirlo completamente.
4. Medición a través del ocular, enfocándolo, para leer nítidamente en la escala sombreada el valor de grados brix.

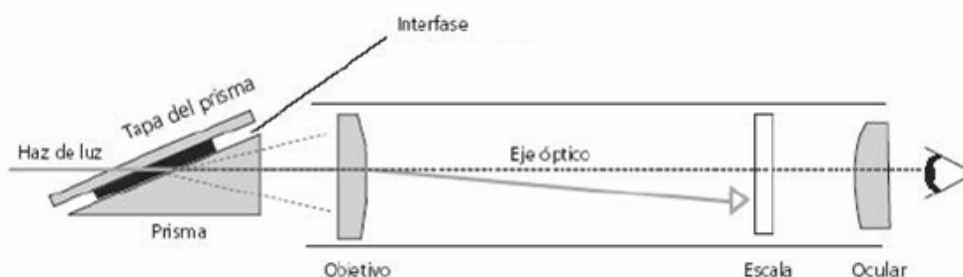


Figura 16. Esquema general de un refractómetro modelo.

4.4. Contenido de carbohidratos en frutos de fresa.

La determinación de carbohidratos totales se realizó según el método descrito por Kochert (1978), con algunas modificaciones. Así pues, nuestro método consistió de los siguientes pasos:

1. Se pesó en torno a 0.05 g de muestra homogeneizada con una licuadora.
2. La muestra se extrajo con 10 ml de tampón TRIS-CIH 10 mM pH 7.3.
3. El extracto obtenido se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos para quedarnos con el sobrenadante.
4. En un tubo de centrifuga, se añadieron, en este orden, 0.05 ml del sobrenadante, 0.95 ml de agua destilada, 0.025 ml de reactivo de fenol y 2.5 ml de H₂SO₄ concentrado.
5. A continuación, se agitó cada tubo vigorosamente en vortex durante un minuto y se dejó reposar media hora.
6. En último lugar, se midió la absorbancia a 485 nm frente a un blanco de agua destilada (1 ml) preparado según los pasos 4 y 5.

Previamente a la medida de las muestras, se elaboró una recta de calibrado a partir de patrones de glucosa con concentraciones comprendidas entre 0.01 y 0.035 mg·ml⁻¹ que fueron sometidos a los pasos 4-6 para obtener la relación entre absorbancia y concentración.

Finalmente, el % p/p de carbohidratos presentes en la muestra, referido al contenido en glucosa, se calculó a través de la siguiente expresión:

$$\% \text{ p/p} = \frac{\text{g glucosa} \cdot V_e}{P_m \cdot V_s} \cdot 100$$

Siendo:

Ve = volumen del extracto (ml)

Pm = peso de la muestra (g)

Vs = volumen del sobrenadante (ml)

4.5. Contenido de antocianos en frutos de fresa.

Método espectrofotométrico

El contenido de antocianos totales presentes en la fresa se determinó mediante el método INA 116.000 descrito por la National Science Foundation (NSF) (<http://www.nsf.org>), con algunas adaptaciones. El ensayo se fundamenta en una técnica espectrofotométrica basada en las distintas absorciones de la disolución de antocianos a diferentes pH, ya que éstos cambian la intensidad de su coloración en función del pH. En concreto, la determinación se realiza usando un método de pH diferencial a valores de pH 1.0 y 4.5. A pH 1.0, los antocianos existen en las formas coloreadas flavinio u oxonio, y, a pH 4.5, se encuentran predominantemente en la forma incolora carbinol. La diferencia de la absorbancia a 510 nm es proporcional al contenido de antocianos de la disolución.

Los pasos fundamentales para desarrollar el mencionado método fueron los siguientes:

1. En primer lugar, se ha de obtener un extracto de los antocianos en disolución. Para ello, se toman alrededor de 0.25 g de zumo de fresa y se rompe con nitrógeno líquido durante dos minutos. Posteriormente, los antocianos se extraen con 10 ml de metanol acidificado al 1% con HCl. Este extracto se mantiene en oscuridad a 4 °C durante 24 horas. Si transcurrido este tiempo, la extracción no ha sido completa, se procede a re-extraer hasta que el pellet sea blanco. Finalmente, se centrifugan las muestras a 3500 rpm durante 5 minutos y se pasan a través de un filtro Millipore de 0.2 µm.
2. En segundo lugar, se preparan las soluciones tamponadas a pH 1.0 y 4.5 según se describe en Fuleki y Francis (1968).
3. En tercer lugar, se toman del extracto dos alícuotas de 1 ml y a cada una de ellas se le añaden 3 ml de la solución tampón correspondiente.
4. Finalmente, una vez que el color se estabiliza, se miden las absorbancias a 510 y 700 nm para corregir el efecto de la turbidez. El blanco se realiza con agua destilada.

La diferencia de absorbancia entre las dos preparaciones se calcula según la ecuación siguiente:

$$\text{Absorbancia} = [A_{510} (\text{pH } 1.0) - A_{700} (\text{pH } 1.0)] - [A_{510} (\text{pH } 4.5) - A_{700} (\text{pH } 4.5)]$$

Asimismo, el % p/p de antocianos totales presentes en la muestra se calcula a través de la siguiente expresión:

$$\% p / p = \frac{A \cdot PM \cdot FD \cdot V}{\epsilon L \cdot Pm} \cdot 100$$

Siendo:

A = Absorbancia

ϵ = Coeficiente de absorción molar de la pelargonidina-3-glucósido (22400)

PM = Peso molecular de la pelargonidina-3-glucósido (433.2)

FD = Factor de dilución

V = Volumen final de extracción (ml)

Pm = Peso de la muestra (g)

L = Longitud de la celda (cm)

Análisis cromatográfico de antocianos

El método de extracción para obtener las soluciones de antocianos presentes en el fruto de fresa ha sido el mismo que el descrito para el método espectrofotométrico.

Los extractos se inyectaron en un equipo de HPLC, modelo Merck, con una columna de fase reversa RP-18 de 5 µm, equipado con un detector UV-Vis. La longitud de onda para la detección de los antocianos se ajustó a 510 nm. La fase móvil utilizada fue la siguiente: disolvente A, metanol:agua:ácido fórmico (45:45:10 v/v); disolvente B, ácido fórmico:agua (1:9 v/v). El flujo aplicado al sistema fue de 1 ml·min⁻¹. En la elución de cada muestra se empleó el gradiente descrito por Valls et al. (2000), con ligeras modificaciones, el cual se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Gradiente de elución empleado en la separación de antocianos.

Tiempo	Disolvente A	Disolvente B
0'	20	80
15'	40	60
25'	80	20
35'	80	20
40'	20	80

Las muestras se introdujeron manualmente en el equipo de cromatografía líquida con ayuda de una microjeringa, a través de un *loop* de carga de 20 μ l.

Los principales antocianos que contiene la fresa son, por este orden, la pelargonidina-3-glucósido (89 – 95%), la cianidina-3-glucósido (3.9 – 10.6%) y la pelargonidina-3-arabinósido (3.1 – 3.9%) (Goiffon et al. 1999). Por tanto, la cuantificación de los antocianos totales identificados se refirió al contenido del compuesto mayoritario; la pelargonidina-3-glucósido. Para ello, se inyectaron patrones de cloruro de pelargonidina-3-glucósido suministrados por Extrasynthese (Francia).

La Figura 17 muestra el perfil típico de antocianos de una muestra de fresa, obtenido mediante el gradiente presentado en la Tabla 3.

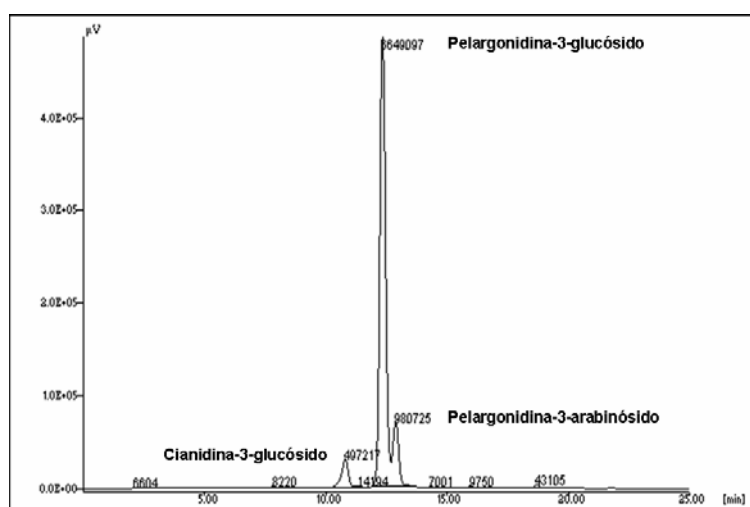


Figura 17. Perfil típico de antocianos presentes en fresa.

Se ha de tener la precaución de no dejar transcurrir mucho tiempo desde la preparación de los extractos hasta el análisis, ya que se ha comprobado que los antocianos tienden a degradarse rápidamente.

4.6. Contenido de compuestos fenólicos totales en frutos de fresa.

La determinación del contenido en compuestos fenólicos totales del fruto de fresa se realizó aplicando el método descrito por Folin y Ciocalteu (1927), con ligeras modificaciones.

El reactivo de Folin – Ciocalteu consiste en una mezcla de ácido fosfotungsténico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y de ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), que se reduce, por oxidación de los fenoles, a una mezcla de azules de tungsteno

(W₈O₂₃) y de molibdeno (Mo₈O₂₃). La coloración azul producida posee una absorción máxima aproximadamente a 765 nm y es proporcional a la cantidad de compuestos fenólicos.

El método empleado en el análisis cuantitativo de estos compuestos se describe, paso a paso, a continuación:

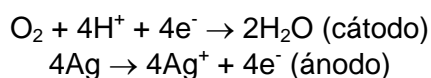
1. La extracción de los compuestos se realizó como ya se ha descrito en el apartado anterior.
2. Seguidamente, se tomaron 150 µl de extracto y se añadieron 0.5 ml de reactivo de Folin y 2 ml de carbonato sódico al 20% p/v, completándose el volumen hasta 10 ml con agua destilada.
3. Se esperó 20 minutos para que se desarrollara el color y se centrifugó 5 min a 3500 rpm.
4. A continuación, las muestras se analizaron en espectrofotómetro a 765 nm frente a un blanco de metanol (150 µl) preparado de la misma forma.

Previamente a la medida de las muestras, se elaboró una recta patrón de calibrado con concentraciones conocidas de ácido gálico que oscilaron entre 0 y 1000 mg·l⁻¹. Los resultados se expresaron en mg de compuestos fenólicos por cada 100 g de peso fresco recolectado, referidos al contenido en ácido gálico.

5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS.

5.1. Medida de la actividad fotosintética en cultivos de microalgas del género *Dunaliella*.

La actividad fotosintética se determinó siguiendo la evolución de oxígeno en un electrodo tipo Clark de Pt/Ag-AgCl. La base que lo sostiene consta de un cátodo de Pt y un ánodo de Ag/AgCl inmersos en una solución saturada de KCl. La aplicación del potencial provoca la reducción del oxígeno y la generación de una corriente eléctrica proporcional a su concentración. Las reacciones que tienen lugar son las que se indican a continuación:



El electrodo de oxígeno se compone de una cámara cilíndrica con una capacidad para 4 ml. El sistema está refrigerado por un baño de agua termostaticado a 25 °C y conectado a un ordenador que recoge la evolución de la intensidad de la corriente en el tiempo. Además, el electrodo se encuentra acoplado a un foco halógeno que actúa como fuente de luz blanca, pudiendo alcanzar intensidades saturantes de hasta 1000 µmoles de fotones·m⁻²·s⁻¹.

En cada medida se introdujo en la cámara del electrodo una muestra de 1 ml de cultivo que fue sometida, en primer lugar, a un período de oscuridad (cubriendo la muestra con una tela opaca) y, en segundo lugar, a un período de iluminación; todo ello bajo agitación magnética continua. La duración de estos períodos varió en función del tiempo transcurrido hasta que se registró una pendiente negativa o positiva de la evolución del oxígeno, según el caso.

En las condiciones descritas, la evolución de oxígeno registrada durante el período de iluminación refleja la cantidad de oxígeno generada por la fotólisis

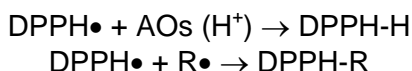
del agua menos el consumido como consecuencia de la respiración. Por otro lado, la evolución de oxígeno en oscuridad corresponde al consumo neto de oxígeno por respiración endógena. Así pues, la suma de ambas cantidades, deducida de las pendientes de las rectas obtenidas, da como resultado la producción neta de oxígeno.

La evolución de oxígeno se presenta como los μmoles de O_2 producidos o consumidos por unidad de tiempo (h) y de biomasa (mg Chl).

5.2. Ensayos de actividad antioxidante.

Para analizar la máxima actividad antioxidante inicial y la capacidad antioxidante de extractos metanólicos de fresa, se desarrolló el método de radicales libres del DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil) descrito por Brand Williams et al. (1995).

El DPPH en disolución presenta una banda de absorción a 515 nm que le otorga una coloración púrpura que desaparece al perder el radical libre (DPPH•). La reducción del DPPH• se mide observando la disminución de la absorbancia a esta longitud de onda, ya que la reducción causada por los antioxidantes (AOs) y/o especies radicales (R•) de la muestra hace que desaparezca la coloración:



El método consistió en los siguientes pasos:

1. La extracción de los compuestos con capacidad antioxidante para retirar radicales libres del medio se realizó del mismo modo descrito en el apartado 4.5 del presente capítulo.
2. Se tomaron 3.9 ml de DPPH $6 \cdot 10^{-5}$ M en metanol y se añadió 0.1 ml de extracto en una cubeta desechable.
3. A continuación, se midió la disminución de absorbancia a 515 nm a 0, 1 y cada 5 min, durante 2 horas o hasta que la absorbancia de la muestra llegó a ser constante.

Antes de realizar los ensayos, se elaboró una recta patrón de calibrado con concentraciones conocidas de DPPH comprendidas entre $1 \cdot 10^{-5}$ y $6 \cdot 10^{-5}$ M para calcular la expresión de ajuste de la recta, siendo muy similar a la ideal:

$$C_{\text{DPPH}} = (A_{515} + 2.58 \cdot 10^{-3}) \times 12509^{-1}$$

Donde C_{DPPH} es la concentración de DPPH (M) y A_{515} el valor de su absorbancia.

Al finalizar el ensayo cinético, C_{DPPH} representa la concentración restante que queda en el medio de reacción después de que todas las especies oxidantes hayan reaccionado con el DPPH.

La capacidad antioxidante se expresó como los mg de equivalentes de ácido ascórbico (AA) en 100 g de muestra (capacidad antioxidante equivalente a la del L-ácido ascórbico; AEAC), es decir, la cantidad de AA requerida para producir la misma actividad secuestrante que el extracto en 100 g de muestra. Para ello, se empleó la siguiente expresión:

$$AEAC = \frac{\Delta A}{\Delta A_{AA}} \times C_{AA} \times V \times \frac{100}{P}$$

Donde, ΔA es el cambio de absorbancia después de añadir el extracto de fresa, C_{AA} la concentración de la solución estándar de L-ácido ascórbico ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), ΔA_{AA} el cambio de absorbancia obtenido después de añadir el mismo volumen de solución estándar que del extracto de fresa, V el volumen de extracción (ml) y P el peso de la muestra empleada para la extracción (g) (Leong y Shui 2002; King y Lee 2004).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVA (PAR) EN LA PROVINCIA DE HUELVA.

Una de las variables que más influye en el desarrollo de cultivos de microalgas y de fresa es la variación de la cantidad de radiación que se recibe a nivel superficial. Como ya se avanzó en la Introducción de esta Tesis, la cantidad de radiación incidente depende de factores como la localización geográfica, el ángulo cenital solar, el contenido de ciertos gases presentes en la columna atmosférica, con una clara incidencia de la concentración de ozono sobre la radiación ultravioleta recibida, y la época del año, entre otros.

Antes de mostrar, en apartados posteriores, los resultados más relevantes, obtenidos después de estudiar el efecto de la radiación ultravioleta sobre la productividad de cultivos de microalgas y de fresa de interés comercial, se presenta una caracterización descriptiva de los niveles de radiación ultravioleta y fotosintéticamente activa (PAR) en la provincia de Huelva. Para ello, se ha tomado como referencia geográfica la Estación de Sondeos Atmosféricos de "El Arenosillo", que cuenta con una amplia base de datos meteorológicos y/o climáticos.

1.1. Niveles de radiación ultravioleta en el período 2001-2006.

En este apartado se expone un análisis de la variación de los valores que alcanza el índice UV en la costa onubense. El índice UVI se obtiene multiplicando la irradiancia eritemática, expresada en $W \cdot m^{-2}$, por 40, y expresando el resultado mediante el número entero más próximo (INCIRP 1995).

Los valores del índice UVI que aquí se presentan han sido registrados por el espectrorradiómetro Brewer MKIII-150 de la ESAt.

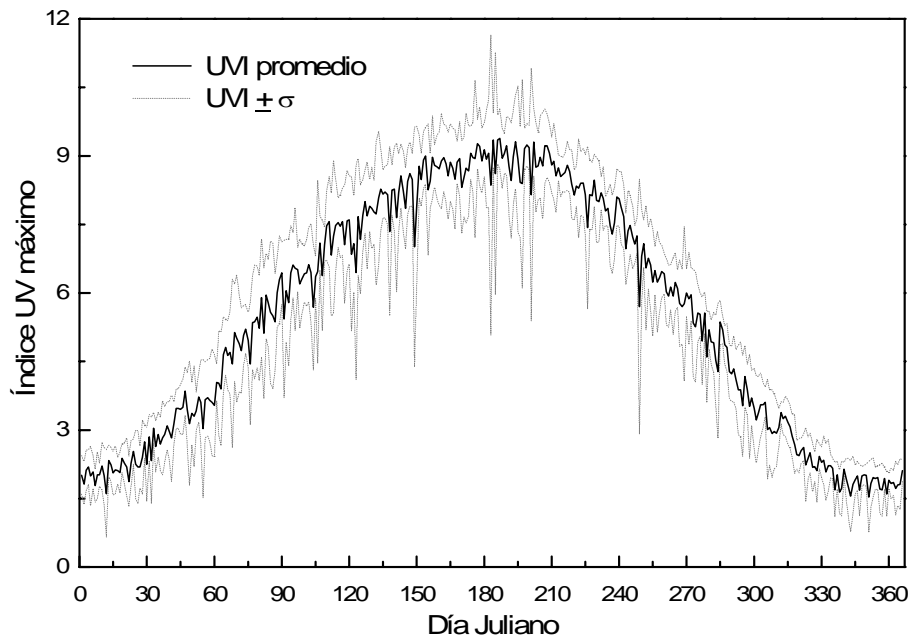


Figura 1. Índice ultravioleta máximo promediado para el período 2001 – 2006.

La Figura 1 representa la variación anual del índice UV máximo diario en la provincia de Huelva. El comportamiento anual de este índice muestra mínimos

entre 1.5 y 2 en invierno (diciembre y enero) y máximos alrededor de 9 en verano (junio y julio). En ausencia de cubiertas nubosas (cielo despejado), los valores máximos diarios se alcanzan en las horas centrales del día, en torno al mediodía solar. Sin embargo, cuando hay cobertura nubosa, el índice disminuye y pueden darse máximos en horas en las que el sol se encuentra más bajo. De manera puntual, en esta zona se llegan a alcanzar índices superiores a 10.

La clasificación del UVI en distintas categorías no está absolutamente estandarizada, pero parece estar aceptado que a partir de 4 es conveniente adoptar medidas de fotoprotección (cremas, ropa, etc.). En la Tabla 1 se presenta la clasificación que se ha utilizado para realizar el análisis del porcentaje de días en que, al año, se alcanza un determinado valor (Figura 2) (según COST – 713). El índice UV debe definirse como un parámetro físico biológicamente pesado. Por lo tanto, el índice es una unidad de medida, no sólo el valor máximo diario (WMO 1998). La estandarización del UVI por parte de la WMO en 1998 sentó las bases del cálculo de dicho índice al dar una serie de recomendaciones en el modo de obtenerlo. Esta homogenización permite comparar valores obtenidos en diferentes países.

Tabla 1. Clasificación del índice ultravioleta en función del riesgo para la salud humana (COST – 713).

UVI	Riesgo
1 – 3	Bajo
4 – 6	Medio
7 – 9	Alto
> 9	Extremo

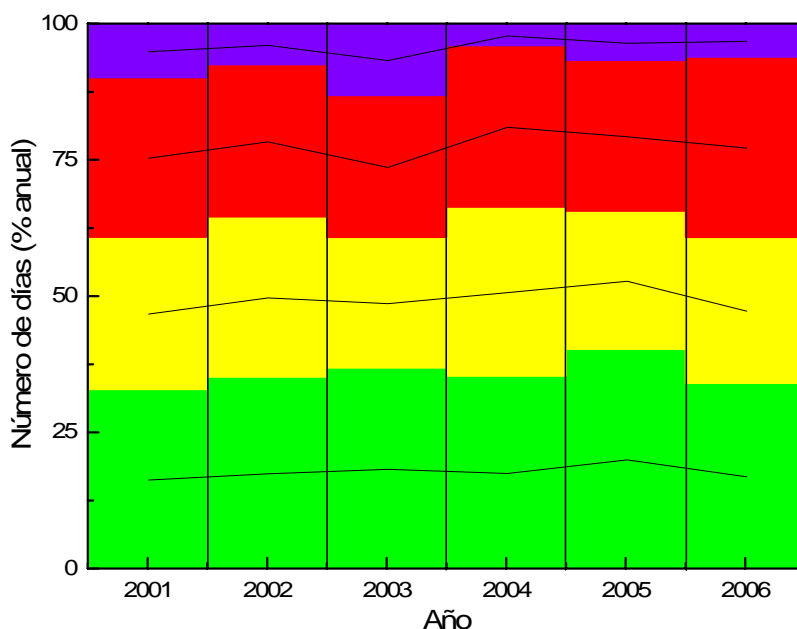


Figura 2. Porcentaje anual del número de días que superan las distintas categorías del índice ultravioleta.

El análisis de la distribución del número de días en que se alcanzaron los valores máximos de cada una de las categorías anteriores, muestra, en general, una evolución en la que se van alternando máximos y mínimos, dando lugar a un comportamiento cíclico a lo largo del período analizado. En promedio, el

número de días en que se alcanzó, durante el período 2001 – 2006, un índice máximo de cada una de las categorías ya descritas en la Tabla 1, se recoge en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje promedio de días que, al año, superan un determinado valor del índice ultravioleta.

UVI	% anual
1 – 3	36
4 – 6	27
7 – 9	29
> 9	8

La Tabla 2 muestra como el número de días al año en que se superaron valores altos o extremos del índice se situó cerca del 40%.

Durante el año 2003 se superó el valor extremo en más de un 15% de los días (≈ 55 días), mientras que al año siguiente, esta proporción disminuyó hasta un 4%. Esto indica que el año 2003 fue, desde el punto de vista meteorológico, bastante estable y seco, ya que el porcentaje de días que superaron el valor 9 casi duplicó el porcentaje promedio calculado para el período de interés. Por el contrario, la escasa proporción de días con valores extremos registrada en 2004, sugiere que dicho año fue más suave, presentando, de todos los años estudiados, la menor proporción de días con índice ultravioleta alto y el mayor porcentaje de días en que hubo un riesgo medio.

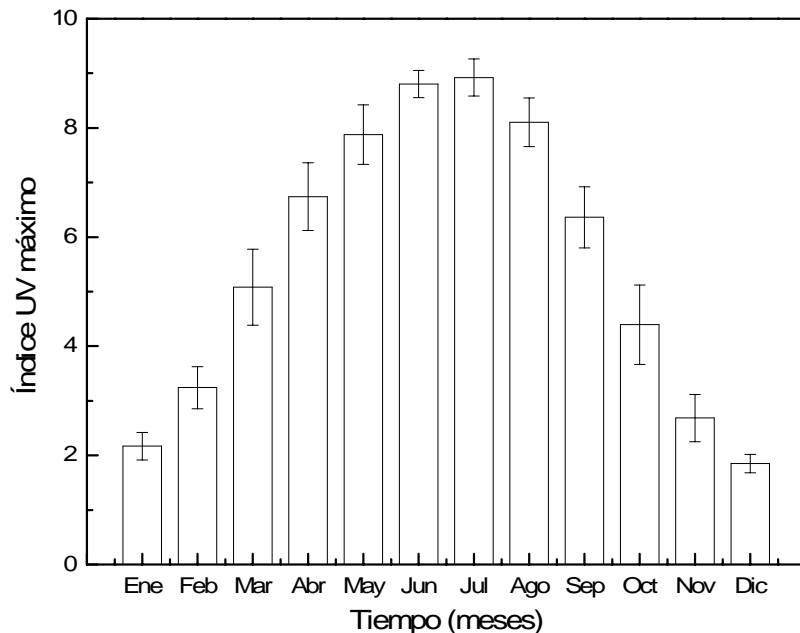


Figura 3. Evolución media mensual del UVI máximo diario para el período 2001-2006.

La Figura 3 representa los valores promedio que alcanzó el índice ultravioleta máximo diario en cada mes. En consonancia con la Figura 1, era de esperar que los promedios mensuales reprodujesen con bastante similitud la evolución mostrada en dicha Figura, obteniéndose en este caso, una curva mucho más suave. Los valores máximos se sitúan en el mes de julio, mientras

que los mínimos corresponden al mes de diciembre. La desviación típica, representada con barras de error, ofrece información acerca de la dispersión de las medidas en cada mes. En consecuencia, la Figura 3 también muestra claramente qué meses son los que presentan una mayor variabilidad meteorológica en la provincia de Huelva. Así, de la Figura 3 se extrae que los meses de marzo y octubre presentan una mayor variabilidad, mientras que por el contrario, junio y diciembre son los meses más estables desde el punto de vista meteorológico.

1.2. Dosis de radiación ultravioleta y PAR durante el período 2004-2006.

En este apartado se expondrán las dosis totales recibidas durante el período 2004 – 2006 en las siguientes regiones espectrales: UV-B (280 – 315 nm), UV-A (315 – 400 nm) y PAR (400 – 700 nm). Los datos de radiación ultravioleta han sido registrados por un espectrorradiómetro Brewer MKIII-150, mientras que los datos relativos a la radiación fotosintéticamente activa (PAR) fueron registrados por un radiómetro Eldonet; ambos instrumentos pertenecientes a la ESAAt.

Dosis de radiación UV-B

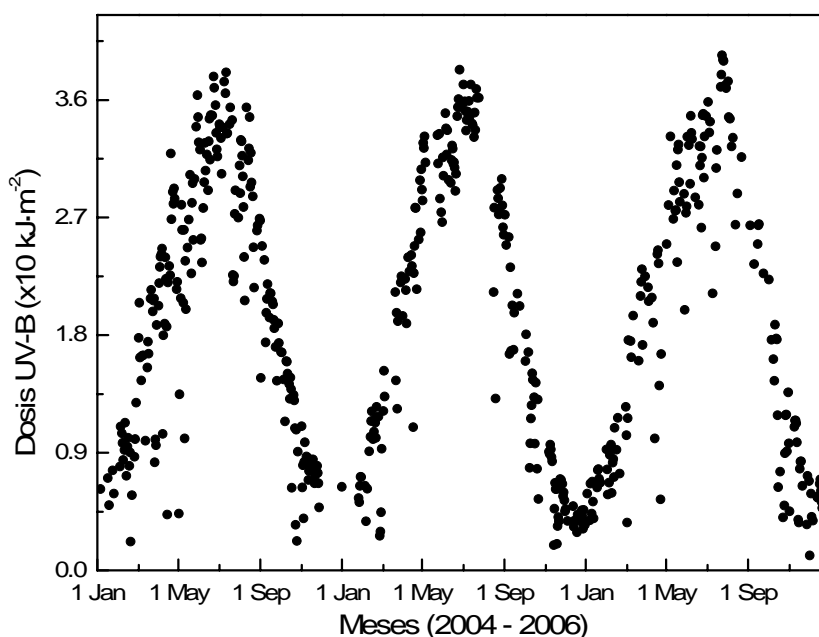


Figura 4. Evolución anual de la dosis UV-B recibida en el "Arenosillo" durante el período 2004 – 2006.

La Figura 4 muestra la evolución anual de la dosis UV-B recibida a nivel superficial. El nivel de dosis UV-B diaria recibida se encuentra comprendido entre 0.11 y 3.9 $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$, con mínimos en los meses de invierno y máximos en los de verano. La envolvente de cada distribución con forma de campana representa los días despejados.

Desde el punto de vista meteorológico, y en base a esta apreciación, a partir de la Figura 4 se observa que el año 2004 fue más inestable, mostrando una mayor dispersión de los valores, con frecuente aparición de bajadas de la dosis UV-B por debajo de la cantidad teórica que marcaría la comentada curva

envolvente. En contraposición, el año 2005 fue más estable, ya que contó con una mayor número de días despejados.

Dosis de radiación UV-A

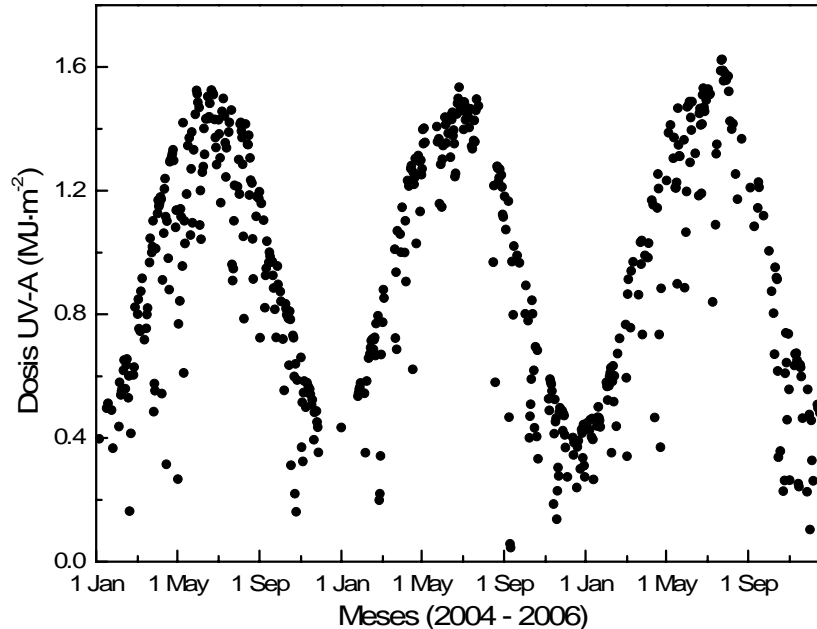


Figura 5. Evolución anual de la dosis UV-A recibida en el "Arenosillo" durante el período 2004 – 2006.

La Figura 5 muestra la evolución anual de la dosis UV-A recibida a nivel superficial. El nivel de dosis UV-A diaria recibida se encuentra comprendido entre 0.2 y $1.6 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$, con mínimos en los meses de invierno y máximos en los de verano.

Desde el punto de vista meteorológico, los comentarios realizados respecto a la variación de la dosis UV-B son igualmente válidos en este caso.

La variación anual de las dosis totales recibidas presenta forma de campaña abierta hacia los extremos, al igual que ocurre con la evolución de las irradiancias o del UVI a lo largo del día o del año. La forma de la distribución de los datos de las dosis UV-A es más ancha que la correspondiente a la de los datos de las dosis UV-B. Esto se debe a que la cantidad de radiación UV-B que llega en los extremos del día es escasa (por la propia naturaleza de esta radiación), por lo que la duración del día no influye tanto como en el caso de la variación de la radiación UV-A o PAR.

Dosis de radiación ultravioleta total

La Figura 6 muestra la evolución anual de la dosis total de radiación ultravioleta recibida a nivel superficial. Como puede apreciarse en la Figura, la radiación UV-A prácticamente contribuye al total con un 98%, dado que la irradiancia UV-A es dos órdenes de magnitud superior a la de UV-B.

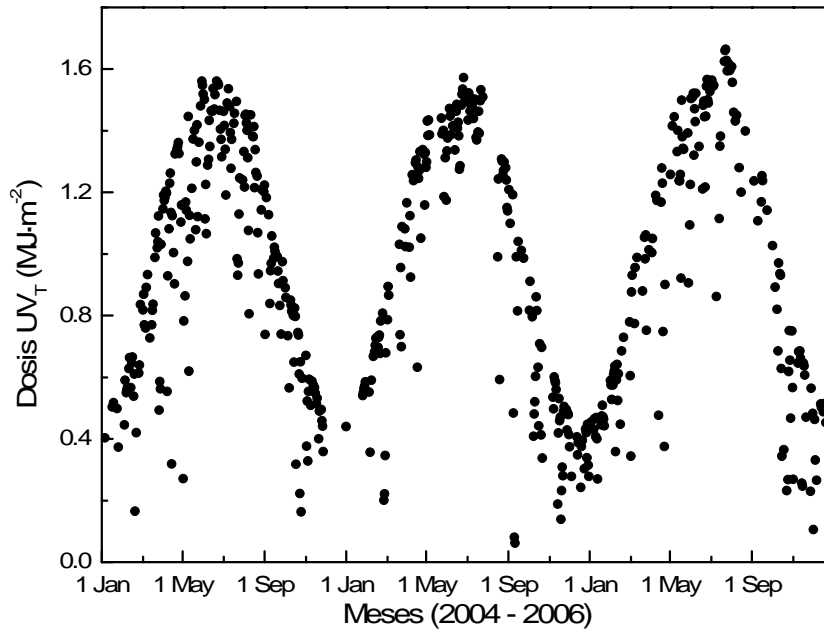


Figura 6. Evolución anual de la dosis total ultravioleta recibida en el "Arenosillo" durante el período 2004 - 2006.

A lo largo del año, la magnitud de la dosis UV-B es del orden del 1 - 3% de la dosis UV-A (datos no mostrados), proporción que es máxima en los meses de verano.

Dosis de Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR)

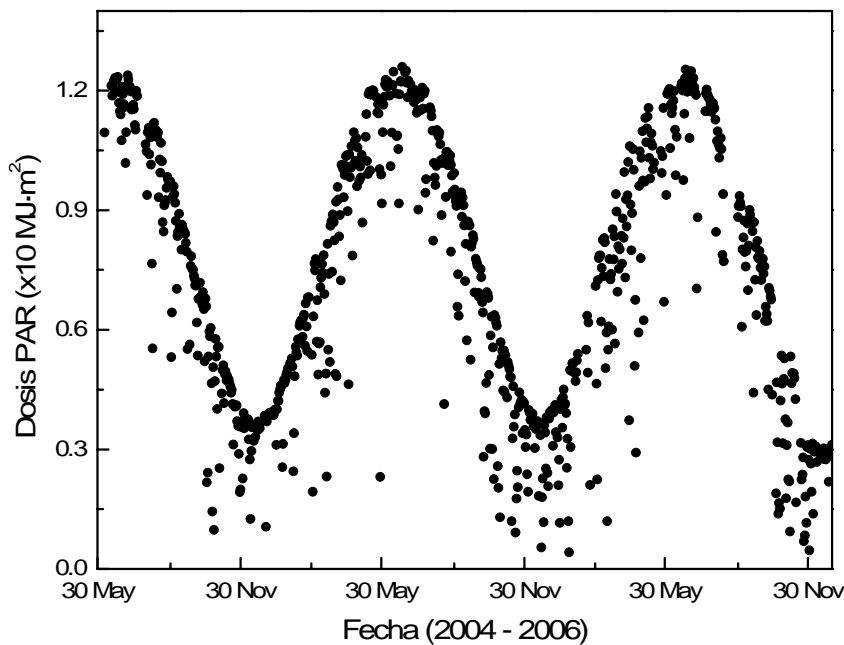


Figura 7. Evolución anual de la radiación PAR recibida en el "Arenosillo" durante el período 2004 - 2006.

El nivel de dosis PAR se encuentra un orden de magnitud por encima de la dosis UV-A. A lo largo del año, la dosis PAR recibida se encuentra comprendida entre 2 y 12 MJ·m⁻², con mínimos en los meses de invierno y máximos en los de verano.

En la Tabla 3 se presentan los promedios de la dosis diaria recibida en cada mes durante el período analizado (mitad 2004 – 2006).

Tabla 3. Dosis PAR diaria mensual ($J \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$).

Meses	2004		2005		2006	
	Días	Dosis diaria	Días	Dosis diaria	Días	Dosis diaria
Enero			30	$4.0 \cdot 10^6$	31	$3.5 \cdot 10^6$
Febrero			25	$5.6 \cdot 10^6$		
Marzo			30	$6.6 \cdot 10^6$	30	$6.9 \cdot 10^6$
Abril			30	$9.3 \cdot 10^6$	27	$8.3 \cdot 10^6$
Mayo						
Junio					25	$1.1 \cdot 10^7$
Julio			25	$1.2 \cdot 10^7$		
Agosto	31	$9.9 \cdot 10^6$	31	$1.0 \cdot 10^7$		
Septiembre	28	$8.1 \cdot 10^6$	30	$8.2 \cdot 10^6$	30	$8.1 \cdot 10^6$
Octubre	30	$5.5 \cdot 10^6$	31	$5.3 \cdot 10^6$	27	$5.2 \cdot 10^6$
Noviembre	28	$4.2 \cdot 10^6$	30	$4.0 \cdot 10^6$	25	$3.0 \cdot 10^6$
Diciembre	26	$3.4 \cdot 10^6$	31	$3.0 \cdot 10^6$	31	$2.7 \cdot 10^6$

*Sólo se muestran aquellos meses con un mínimo de 25 días de datos.

Ratios UV/PAR.

Por otra parte, se ha analizado la proporción de la cantidad total de radiación ultravioleta frente a la de radiación fotosintéticamente activa (PAR) que se reciben diariamente, y, para ello, se han preseleccionado días despejados para evitar la influencia de otros factores meteorológicos. Se tomaron días en los que hubo datos tanto del radiómetro Eldonet como del espectrorradiómetro Brewer MK-III. Los resultados se muestran en la Figura 8.

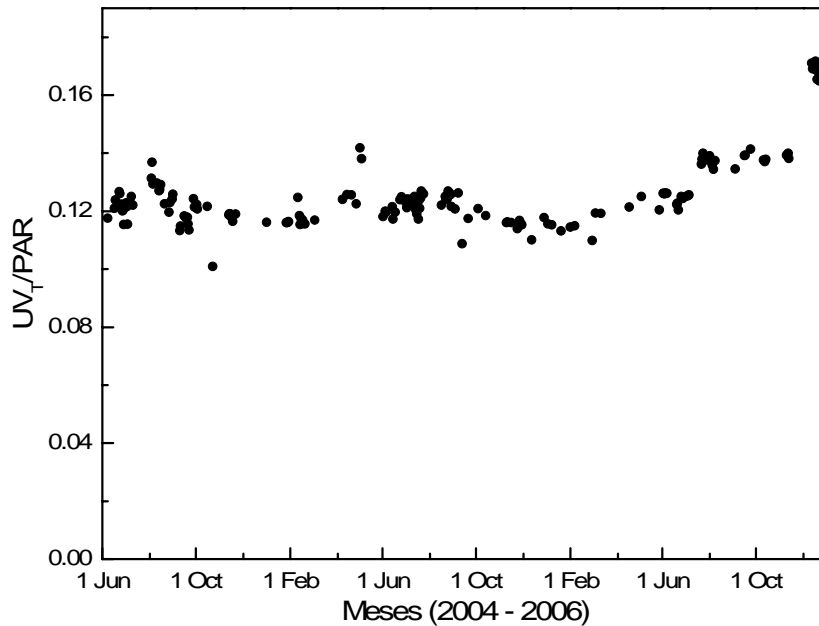


Figura 8. Relación dosis UV_T/PAR diaria durante los días despejados del período analizado.

En general, e independientemente de la época del año, esta relación permanece estable en torno a 0.12. Sin embargo, a partir de la segunda mitad del año 2006 esta relación presenta un incremento hasta alcanzar valores

cercanos a 0.17. Aunque habría que continuar la serie para comprobar si esa tendencia se mantiene en el tiempo y, por tanto, encontrar alguna razón de índole meteorológica y/o climática que pueda justificar el fenómeno observado, se han comparado dosis UV y PAR de distintos años para días coincidentes, observándose disminuciones en las dosis recibidas en ambas regiones espectrales, si bien las caídas en las dosis UV fueron de menor magnitud.

Asimismo, se encontró, que para los días no despejados, la relación no sufre demasiados cambios, tendiendo a aumentar puntualmente en aquellos días que presentan un gran atenuación atmosférica, situándose dicha relación por encima de 0.14 (Figura 9).

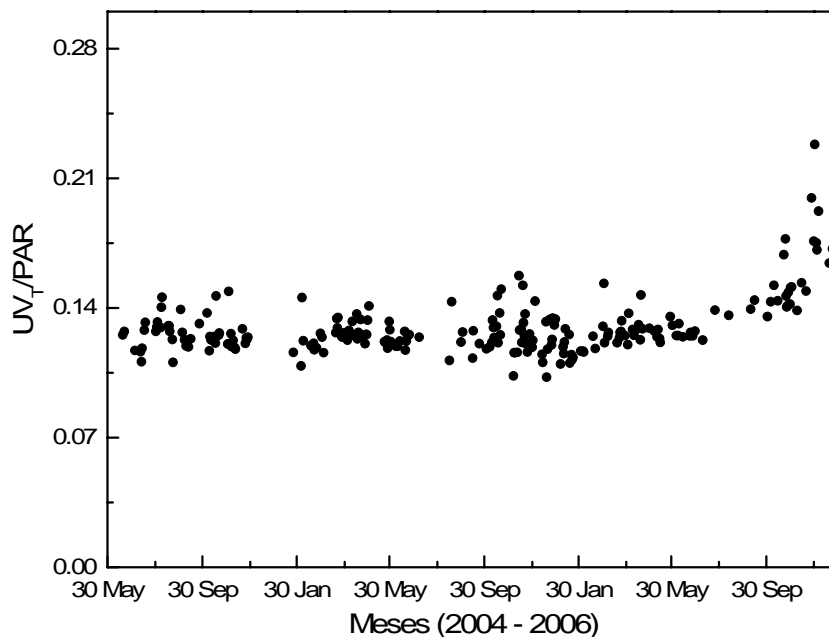


Figura 9. Relación dosis UV_T/PAR diaria durante los días no despejados del periodo analizado.

Mientras que el promedio de la relación UV_T/PAR para los días despejados se situó en 0.126, aquel para los días no despejados arrojó un valor muy similar, 0.129. Sin embargo, sí existieron diferencias en cuanto a la desviación de las medidas respecto al promedio; 0.029 y 0.057, respectivamente.

1.3. Índice de claridad para la radiación PAR.

El índice de claridad para la radiación PAR se define de la misma forma que el utilizado para la radiación global, es decir, el índice de claridad es el cociente de la radiación diaria sobre una superficie horizontal entre la correspondiente radiación extraterrestre (Kudish et al. 2004). Dicho de otro modo, éste nos ofrece información sobre el grado de transparencia de la atmósfera frente al paso de la radiación, ya que se compara la radiación incidente en la zona alta de la atmósfera con la que se registra en superficie.

El cálculo del índice para la radiación global es el más habitual, pero en este caso, se ha optado por calcular el mencionado índice para la región espectral fotosintéticamente activa (PAR).

Para conocer la irradiancia que incide en la parte superior de la atmósfera, considerando un intervalo espectral determinado, necesitamos conocer el espectro extraterrestre. Se ha asumido como valor de la constante solar extraterrestre $I_0 = 1367 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$, que es el aceptado por la comunidad científica. Pero este dato resultaría irrelevante si se desconoce cómo se distribuye espectralmente la radiación extraterrestre, así que, la constante solar correspondiente a la radiación extraterrestre PAR se determinó a partir del espectro extraterrestre de Gueymard (Gueymard 2003), obteniéndose que $I_{0(\text{PAR})} = 534.77 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ para el rango $400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$.

De acuerdo con lo anterior, el índice de claridad $K_{t(\text{PAR})}$, se calculó a partir del siguiente cociente:

$$K_{t(\text{PAR})} = \text{Radiación PAR superficial (W}\cdot\text{m}^{-2}) / \text{Constante Solar PAR (W}\cdot\text{m}^{-2})$$

En la Figura 10 se representa la evolución del índice de claridad PAR en “El Arenosillo”.

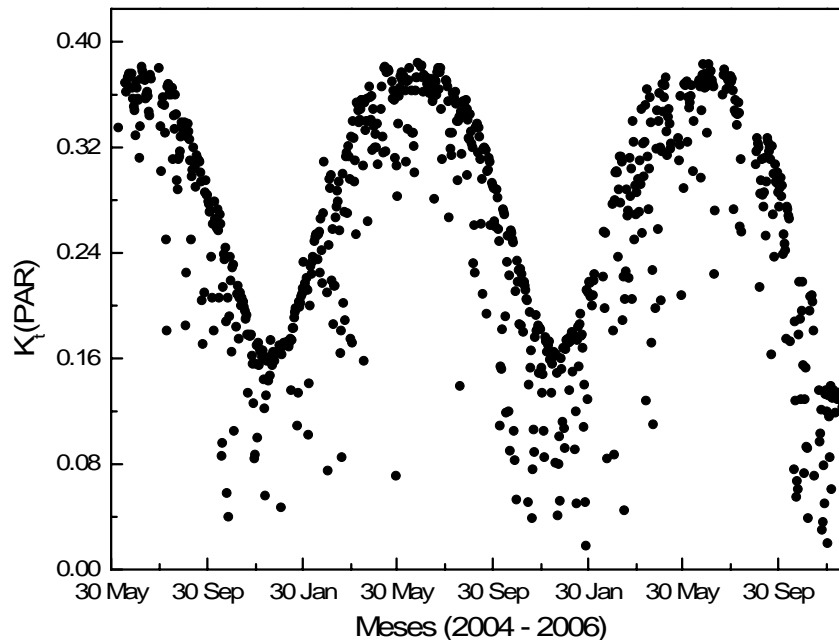


Figura 10. Índice de claridad para la región espectral PAR durante el período analizado.

Como ya se comentó en el análisis de las dosis, la curva envolvente representa los índices de claridad de aquellos días en los que hubo ausencia total de nubes. La Figura 10 muestra que el índice de claridad PAR oscila desde valores mínimos que no llegan a un 10% de transmisión de la radiación fotosintéticamente activa, que se dan en días nublados, y fundamentalmente en invierno-otoño, hasta un máximo de transmisión cercano al 40% en los meses estivales.

La Figura 11 muestra los promedios mensuales del mencionado índice junto con las barras de error correspondientes a las desviaciones típicas calculadas a partir de los promedios diarios. Los promedios diarios se han calculado a partir de los valores que toma el índice cada minuto, ya que se ha utilizado la totalidad de datos existentes en cada día.

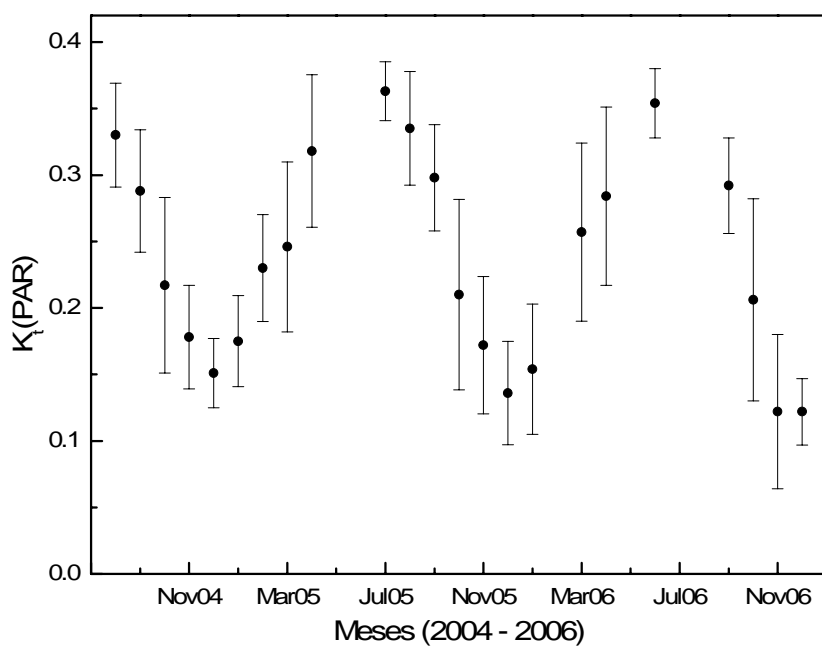


Figura 11. Promedios mensuales del índice de claridad para la región espectral PAR.

Las barras de mayor amplitud representan aquellos meses que mostraron una mayor variabilidad meteorológica. En este sentido, a raíz de la Figura anterior se aprecia que octubre de 2004, marzo, abril y octubre de 2005, y marzo, abril y octubre de 2006, fueron meses especialmente inestables.

2. INFLUENCIA DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN LA PRODUCTIVIDAD Y EL VALOR BIOTECNOLÓGICO DE CULTIVOS DE *DUNALIELLA*.

Como ya se apuntó en la Introducción de esta Tesis, la síntesis natural de carotenoides a partir de cultivos de microalgas empleando diversas estirpes de *Dunaliella* es una práctica explotada comercialmente desde algo más de dos décadas, desde que las empresas australianas Biotechnology Ltd. y Betatene Ltd. establecieron las bases de la producción industrial a mediados de los años 80 (Borowitzka 1999; Del Campo et al. 2007). La luz es el principal factor regulador de la tasa de síntesis de β -caroteno en *Dunaliella* (Orset y Young 1999). Por ello, para planificar procesos de producción a la intemperie es esencial conocer cómo influyen las condiciones lumínicas que reciben los cultivos en un ambiente natural sobre la acumulación de carotenoides de la estirpe considerada. En dicho contexto, sería razonable esperar que el estrés oxidativo producido en las células por la región UV de la luz solar, o por una parte de ella, contribuyese a la estimulación de la biosíntesis de carotenoides en *Dunaliella* cultivada a la intemperie (Hannach et al. 1998; Wu et al. 2005). De ser cierta tal hipótesis de partida, podría diseñarse posteriormente una estrategia para la acumulación de carotenoides consistente en potenciar la incidencia, sobre los cultivos, de aquellas partes del espectro solar que inducen o estimulan dicha acumulación.

Trabajos previos del grupo pusieron de manifiesto, en experiencias de laboratorio, el papel de la radiación UV en la inducción de la acumulación de carotenoides como respuesta al estrés oxidativo impuesto. Así, se concluyó que la aplicación regulada de radiación UV-A a los cultivos de *D. bardawil* durante cortos períodos de tiempo aumenta la tasa de crecimiento y la eficiencia fotosintética de la microalga e induce un incremento en la acumulación de carotenoides de alto poder antioxidante, β -caroteno y zeaxantina (Salguero et al. 2005). Por lo tanto, se sugirió que la radiación UV-A es un factor de estrés oxidativo adecuado para inducir la producción biocompatible de carotenoides en *D. bardawil*.

En este trabajo de Tesis se ha dado un paso más hacia el uso regulado de la luz en la producción de microalgas y en la acumulación de moléculas de interés, los carotenoides, mediante el estudio de tal cuestión, la influencia de la radiación UV en la productividad y acumulación de carotenoides, en cultivos exteriores y, a largo plazo, de *Dunaliella*.

Con este propósito, la primera parte de los trabajos con algas que se han desarrollado en esta Tesis se ha enfocado a la selección de una estirpe de *Dunaliella* con una buena capacidad de adaptación a las condiciones climáticas de la región y a la evaluación del potencial acumulador de carotenoides de la microalga bajo las condiciones radiativas elegidas.

Las estirpes de partida fueron tres: *Dunaliella bardawil* UTEX 2538, un mutante de *Dunaliella bardawil* obtenido por mutagénesis química al azar utilizando etil-metil sulfonato (Salguero 2006), que en adelante denominaremos *Dunaliella* EMS, y *Dunaliella salina* 184.8. Los experimentos se realizaron tanto en condiciones controladas de laboratorio, que sirvieron para conocer el efecto continuado producido por las condiciones radiativas ensayadas, como en condiciones exteriores.

2.1. Estudio de la productividad y acumulación de carotenoides de varias estirpes cultivadas bajo PAR en condiciones de laboratorio.

2.1.1. Cinéticas de crecimiento.

Los primeros experimentos se diseñaron con el objetivo de determinar cuál de las estirpes presentaba un mejor crecimiento. Para ello, las tres estirpes mencionadas anteriormente se crecieron en condiciones controladas de laboratorio, analizándose el contenido en clorofila total, el contenido de carotenoides totales y la abundancia relativa de los carotenoides mayoritarios.

La cantidad de biomasa inicial condiciona la velocidad de crecimiento de los cultivos (Goksän et al. 2003), entre otras razones, porque la disponibilidad de luz para la célula varía con el tamaño del inóculo. La mayor sensibilidad de una microalga a la luz se pone de manifiesto con densidades celulares bajas e intensidad de luz alta, produciéndose una ralentización del crecimiento debida a fotoinhibición (Baroli y Melis 1996; Adir et al. 2003). Igualmente, una densidad de cultivo muy baja retrasa la adaptación celular al medio (Richmond 2004). Para evaluar el efecto de la densidad de cultivo sobre la tasa de crecimiento, se realizaron experimentos partiendo tanto de una biomasa inicial baja como de una biomasa inicial intermedia.

Biomasa inicial baja

En laboratorio, la incubación tuvo lugar en una cámara de cultivo IBERCEX F-4 (ver Materiales y Métodos) equipada con 6 tomas de gas y 4 lámparas de luz blanca que proporcionaron $150 \mu\text{moles de fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en la superficie de los matraces de cultivo. La temperatura de incubación se mantuvo constante en torno a los 22°C y los cultivos fueron irradiados de manera continua, 24 horas al día. Los inóculos se realizaron desde un cultivo madre en mitad de la fase exponencial para obtener en cada matraz una concentración de biomasa inicial cercana a los $5 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$. Todos los cultivos se agitaron mediante burbujeo con aire, en ausencia de CO_2 , condiciones de carbono similares a las que se utilizan en la práctica en cultivos extensivos (Ben-Amotz 2004).

En la Figura 12 se observa que, si bien el crecimiento de las tres estirpes es bastante similar a lo largo de las dos primeras semanas, en la parte final de la etapa exponencial, *D. salina* 184.8 muestra una tasa de crecimiento superior al resto. Los resultados obtenidos muestran que *D. salina* 184.8 alcanza la fase estacionaria antes que *D. bardawil* y que la estirpe mutante. Además, en la última fase del crecimiento, *Dunaliella* EMS crece ligeramente por encima de los valores que alcanza *D. bardawil*.

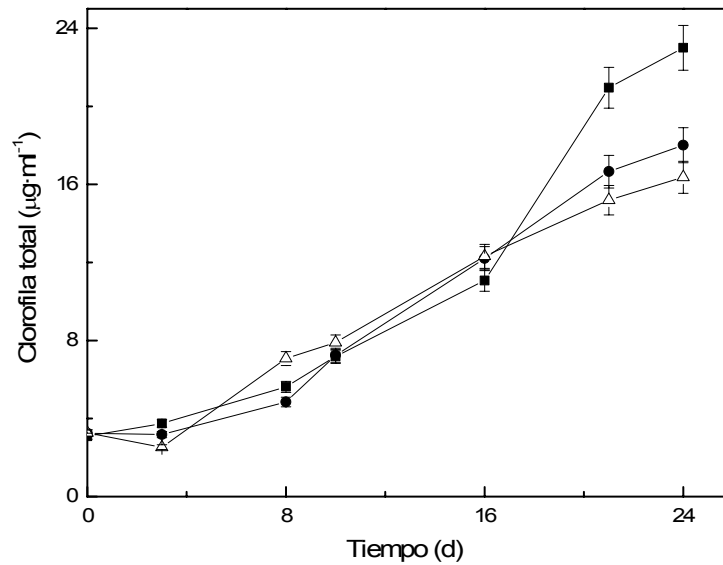


Figura 12. Contenido de clorofila total en cultivos de *D. salina* 184.8 (■), *Dunaliella* EMS (●) y *D. bardawil* (-△) crecidos en cámara de laboratorio bajo condiciones estándar.

Tabla 4. Tasas máximas específicas de crecimiento de las tres estirpes cultivadas en condiciones normales partiendo de una biomasa inicial baja.

Estirpe	Tasa de crecimiento (d ⁻¹)
<i>D. salina</i> 184.8	0.09
<i>Dunaliella</i> EMS	0.05
<i>D. bardawil</i>	0.04

A partir de los datos de la Figura 12 se obtuvieron los valores máximos de la tasa específica de crecimiento de las tres estirpes empleadas, mostrados en la Tabla 4.

Los valores obtenidos para las tres estirpes son algo similares a los valores similares publicados por otros autores para diferentes estirpes de *Dunaliella* (García-González et al. 2003). El crecimiento sostenido de *D. salina* 184.8 en la fase final del mismo, observado en la Figura 12, se refleja igualmente en la mayor tasa de crecimiento.

Biomasa inicial intermedia

La Figura 13 muestra la cinética de crecimiento de las tres estirpes utilizadas en este trabajo de Tesis, partiendo de una cantidad de biomasa unas 4 veces superior a la empleada en el primer experimento, en términos de contenido en clorofila. Los inóculos tenían una concentración de clorofila inicial entre 10 y 15 µg·ml⁻¹. El experimento se realizó bajo las mismas condiciones del primero, en la cámara IBERCEX F-4. Las tasas máximas de crecimiento específico calculadas durante todo el experimento se recogen en la Tabla 5.

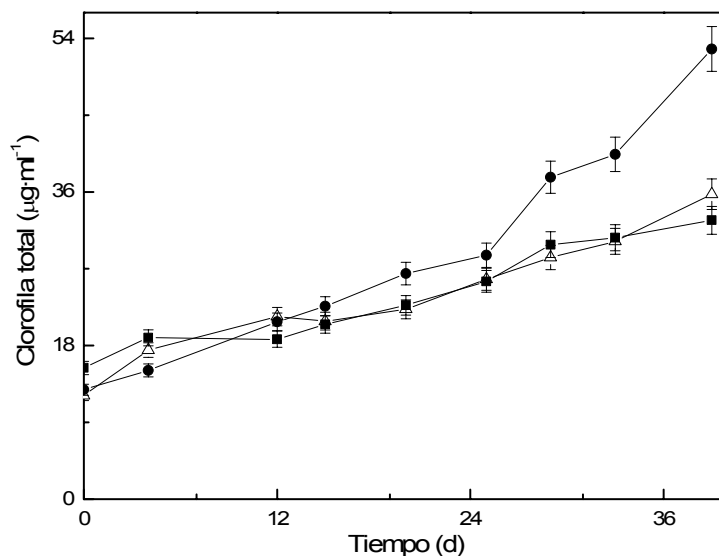


Figura 13. Contenido de clorofila total en cultivos de *D. salina* 184.8 (■), *Dunaliella* EMS (●) y *D. bardawil* (△) crecidos en cámara de laboratorio bajo condiciones estándar.

Para tales concentraciones iniciales de biomasa más altas, *Dunaliella* EMS presenta una tasa de crecimiento superior a las de las otras dos estirpes (Tabla 5). Por otra parte, no se observan diferencias significativas entre las tendencias de crecimiento de *D. salina* 184.8 y *D. bardawil* (Figura 13).

Los resultados obtenidos en ambos experimentos indican, en principio, una capacidad de adaptación ligeramente menor de *D. salina* 184.8 y *D. bardawil* a una situación de menor disponibilidad de luz (cultivos más densos), lo que conduce a menores productividades en cultivos de alta densidad. En este sentido, se ha descrito que la menor disponibilidad de luz puede dar lugar a una alta concentración celular de moléculas antena de clorofila con menor habilidad química para realizar con eficiencia el proceso de transmisión de fotones hasta los centros de reacción de los fotosistemas (Tanaka y Melis 1997), lo que justifica cultivos con clorofilas elevadas y tasas de crecimiento algo más bajas que en los de menor densidad óptica. En este segundo control, con biomasa inicial intermedia, se refleja una mayor tasa de crecimiento de *Dunaliella* EMS.

Tabla 5. Tasas máximas específicas de crecimiento de las tres estirpes cultivadas en condiciones normales partiendo de una biomasa inicial intermedia.

Estirpe	Tasa de crecimiento (d ⁻¹)
<i>D. salina</i> 184.8	0.04
<i>Dunaliella</i> EMS	0.07
<i>D. bardawil</i>	0.03

En conclusión, cuando la densidad inicial del cultivo es baja (5 µg·ml⁻¹ Chl), *Dunaliella salina* presenta el crecimiento más rápido de las tres estirpes, mientras que cuando es intermedia (15 µg·ml⁻¹ Chl), *Dunaliella* EMS parece adaptarse mejor a una situación en la que hay menor disponibilidad de luz. De cara a la producción de biomasa en exterior, los resultados indican que, en procesos semicontinuos, podrían obtenerse mayores productividades con *Dunaliella* EMS.

2.1.2. Cinéticas de acumulación de carotenoides.

La evaluación del potencial biotecnológico de *Dunaliella* pasa por caracterizar la acumulación de carotenoides de las estirpes empleadas. Para ello, en estos primeros experimentos de cultivo de las tres estirpes en condiciones estándar, se tomaron muestras a lo largo del crecimiento para extraer, identificar y cuantificar los carotenoides producidos por las microalgas. Los resultados obtenidos permitirán conocer cuál de las tres estirpes ofrece, a priori, un mayor potencial acumulador de carotenoides.

Biomasa inicial baja

En la Figura 14 se observa que la acumulación de carotenoides, por unidad de volumen, que sintetiza el cultivo de *D. bardawil* a lo largo del experimento con menos biomasa de partida, es un 30% superior a la de las otras dos estirpes que se evalúan, las cuales, como se observa en la gráfica, exhiben una evolución muy similar del contenido de carotenoides. A partir de la Figura 14 se calcularon las tasas promedio de acumulación de carotenoides para las tres estirpes utilizadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

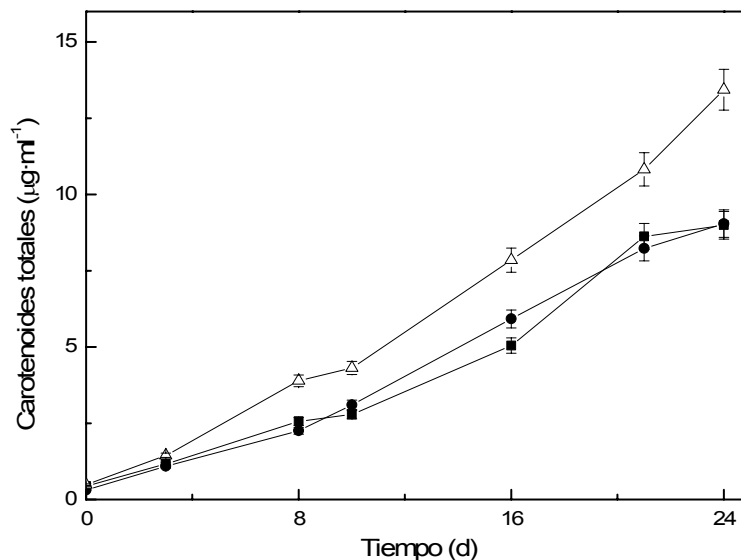


Figura 14. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *D. salina* 184.8 (■-), *Dunaliella* EMS (●-) y *D. bardawil* (-△-) crecidos en cámara de laboratorio bajo condiciones estándar.

Tabla 6. Tasas promedio de acumulación de carotenoides de cultivos de *D. salina* 184.8, *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS crecidos en cámara de laboratorio bajo condiciones estándar.

Estirpe	Tasa promedio de acumulación de carotenoides (d ⁻¹)
<i>D. salina</i> 184.8	0.126
<i>Dunaliella</i> EMS	0.141
<i>D. bardawil</i>	0.138

Las tasas de acumulación de carotenoides totales mostradas en la Tabla 6 revelan que las estirpes *Dunaliella* EMS y *D. bardawil* presentan una tasa superior a la de *D. salina* 184.8, estirpe ésta que sin embargo mostró una tasa de crecimiento superior a las de las otras dos cuando se partía de una cantidad de biomasa baja. Estos resultados coinciden con los incluidos en la Figura 15 y

en la Tabla 7, que muestran la evolución de la relación carotenoides:clorofila a lo largo del crecimiento para las tres estirpes ensayadas, y evidencian una menor capacidad natural de *D. salina* 184.8 para la biosíntesis de carotenoides en condiciones estándar de cultivo en laboratorio, sin imposición de estrés que indujese una acumulación masiva.

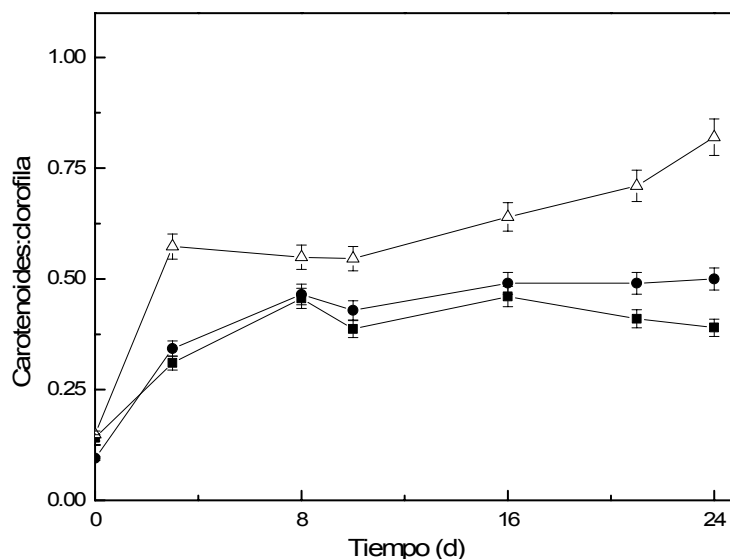


Figura 15. Relación carotenoides:clorofila de cultivos de *D. salina* 184.8 (■), *Dunaliella* EMS (●) y *D. bardawil* (△) crecidas en cámara de laboratorio bajo condiciones estándar.

Tabla 7. Relación carotenoides totales:clorofila durante el crecimiento de las tres estirpes ensayadas. En la primera columna se muestran los promedios correspondientes a las dos primeras semanas y en la segunda, los calculados durante la tercera semana.

Estirpe	Carotenoides:Clorofila Días 1 a 16	Carotenoides:Clorofila Días 16 a 24
<i>D. salina</i> 184.8	0.35	0.40
<i>Dunaliella</i> EMS	0.36	0.49
<i>D. bardawil</i>	0.49	0.76

En *D. bardawil* se observa, desde el primer momento (4 primeros días), un aumento considerable de la relación carotenoides:clorofila, que alcanza un valor cercano a 0.6. Desde el día 10 hasta la finalización del experimento, dicha relación presenta una tendencia creciente hasta 0.8. En contraste, los valores obtenidos en ese mismo período para *Dunaliella* EMS y *D. salina* 184.8 oscilaron entre 0.4 y 0.5, relación un 40% inferior a la observada en *D. bardawil*.

Para conocer la naturaleza de los carotenoides específicos producidos por cada estirpe, en condiciones estándar de crecimiento, se procedió al análisis cromatográfico de las muestras recogidas a lo largo de los experimentos de productividad. La Figura 16A muestra la evolución temporal de la acumulación de los tres carotenoides mayoritarios, β -caroteno, luteína y zeaxantina, en los cultivos de las tres estirpes de *Dunaliella* utilizadas. Los resultados revelan que *D. bardawil* es la estirpe que acumula proporcionalmente más β -caroteno, y *Dunaliella* EMS y *D. salina* 184.8 parecen tener una acentuada tendencia a la acumulación de luteína y zeaxantina. La concentración de β -caroteno sintetizada por *D. bardawil* se incrementa al final de la etapa de crecimiento hasta los 9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, cantidad tres veces superior a la acumulada por las otras dos estirpes. A priori, la producción de los otros dos carotenoides, luteína y zeaxantina, es

similar entre los cultivos de *D. salina* 184.8 y *Dunaliella* EMS, aunque la de luteína es algo mayor en *D. salina* 184.8.

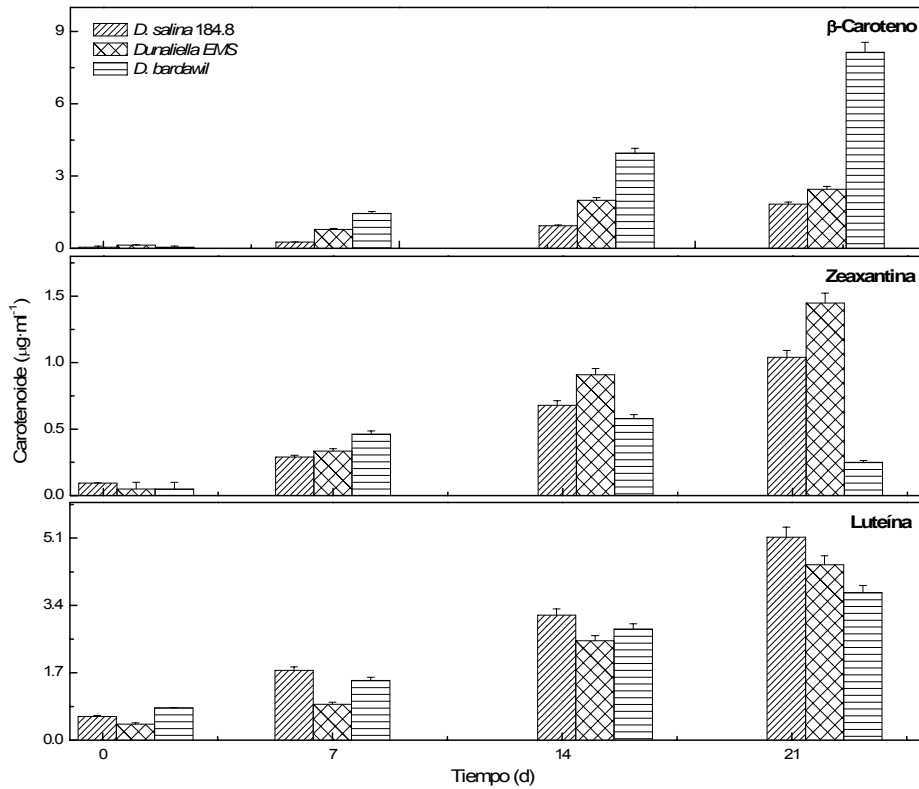


Figura 16A. Concentración de β -caroteno, zeaxantina y luteína en las tres estirpes ensayadas a lo largo de tres semanas de cultivo.

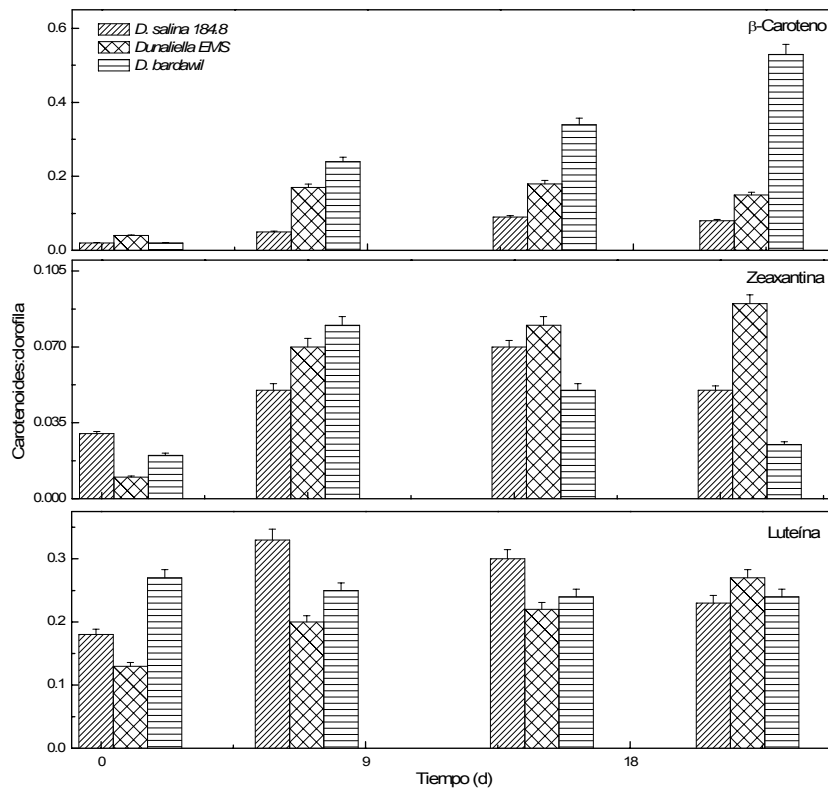


Figura 16B. Acumulación específica de β -caroteno, zeaxantina y luteína por unidad de biomasa en las tres estirpes cultivadas en cámara de laboratorio bajo condiciones estándar.

La Figura 16B muestra los datos de la acumulación específica por unidad de biomasa, tomando el contenido en clorofila como representativo de la cantidad de biomasa, al realizarse el estudio en cultivos en crecimiento y con densidades ópticas no altas (Richmond y Qiang 1997). Los resultados obtenidos con biomasa inicial baja confirman que *D. bardawil* acumula más carotenoides y destaca por ser mejor productor de β -caroteno. Por su parte, *Dunaliella* EMS y *D. salina* 184.8 acumulan, por unidad de biomasa, cantidades de luteína similares o superiores (*D. salina* 184.8) a las de β -caroteno. Otro aspecto a resaltar de la Figura 16B es la rápida acumulación específica de luteína detectada en *D. salina* 184.8 tras la primera y segunda semana, que es un 30% superior a la observada en las otras dos estirpes.

Biomasa inicial intermedia

En este apartado se analizará si la distribución y las diferencias en el contenido celular de carotenoides se mantienen bajo condiciones de biomasa inicial más alta.

Para evaluar el posible efecto derivado del aumento de la concentración inicial de biomasa sobre el contenido celular en carotenoides, se determinó el contenido de carotenoides totales en muestras de cultivos de las tres estirpes a lo largo de las curvas de crecimiento de la Figura 13. Los resultados se muestran en la Figura 17.

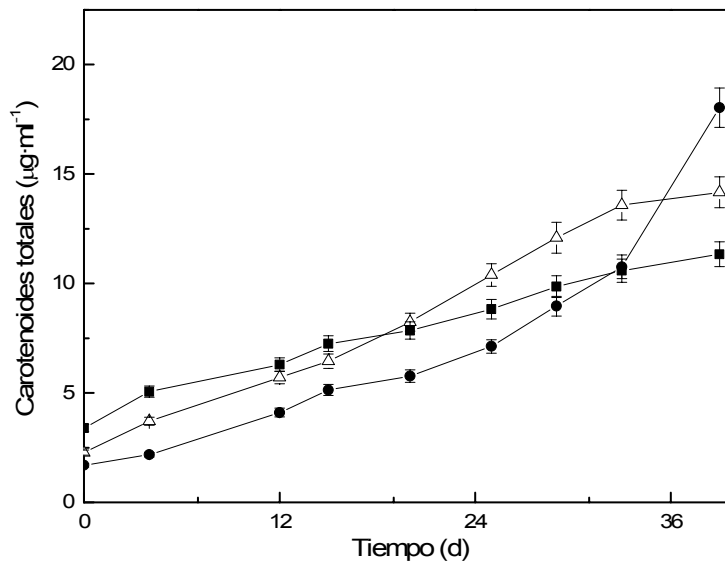


Figura 17. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *D. salina* 184.8 (■), *Dunaliella* EMS (●) y *D. bardawil* (△) crecidos en cámara de laboratorio bajo condiciones estándar.

A diferencia de lo observado en la Figura 14, *D. bardawil* ya no presenta la mayor concentración final de carotenoides e, incluso, su tasa de acumulación a lo largo de todo el período de cultivo se muestra inferior a la de *Dunaliella* EMS (Tabla 8). Por otra parte, continúa observándose en la estirpe *D. salina* 184.8 una inferior capacidad de acumulación independientemente de la concentración del inóculo inicial.

Tabla 8. Tasas promedio de acumulación de carotenoides durante el crecimiento de cultivos de *D. salina* 184.8, *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS en cámara de laboratorio bajo condiciones estándar partiendo de una biomasa inicial baja.

Estirpe	Tasa promedio de acumulación de carotenoides (d^{-1})
<i>D. salina</i> 184.8	0.029
<i>Dunaliella</i> EMS	0.063
<i>D. bardawil</i>	0.052

A partir de los resultados obtenidos se calcularon los valores de la relación carotenoides:clorofila para las tres estirpes (Tabla 9).

Tabla 9. Relación carotenoides:clorofila.

Estirpe	Carotenoides:clorofila (promedio)	Carotenoides:clorofila (máximos)
<i>D. salina</i> 184.8	0.321	0.354
<i>Dunaliella</i> EMS	0.229	0.342
<i>D. bardawil</i>	0.343	0.498

Como se deduce de la comparación de tales datos con los de la Figura 15, correspondientes a una biomasa de partida baja, el aumento de la densidad celular inicial en los cultivos que crecen bajo irradiancias PAR no saturantes produce un aumento del contenido en clorofila que no se ve acompañado de un incremento del contenido de carotenoides, lo que determina una relación carotenoides:clorofila más baja en todos los cultivos. Esto se pone de manifiesto tanto en dicha relación (Tabla 9) como en los contenidos de carotenoides específicos normalizados por unidad de clorofila de la Figura 18B.

La comparación de los contenidos de β -caroteno y luteína de los cultivos de las tres estirpes en ambas condiciones de biomasa inicial, revela que la menor disponibilidad de luz (biomasa inicial intermedia) conduce, en general, a un aumento de la proporción de luteína respecto a los demás carotenoides cuantificados. La proporción de β -caroteno aumenta en condiciones de una mayor disponibilidad de luz (biomasa inicial baja) (Figura 18B), con relaciones mayoritariamente superiores a 0.2.

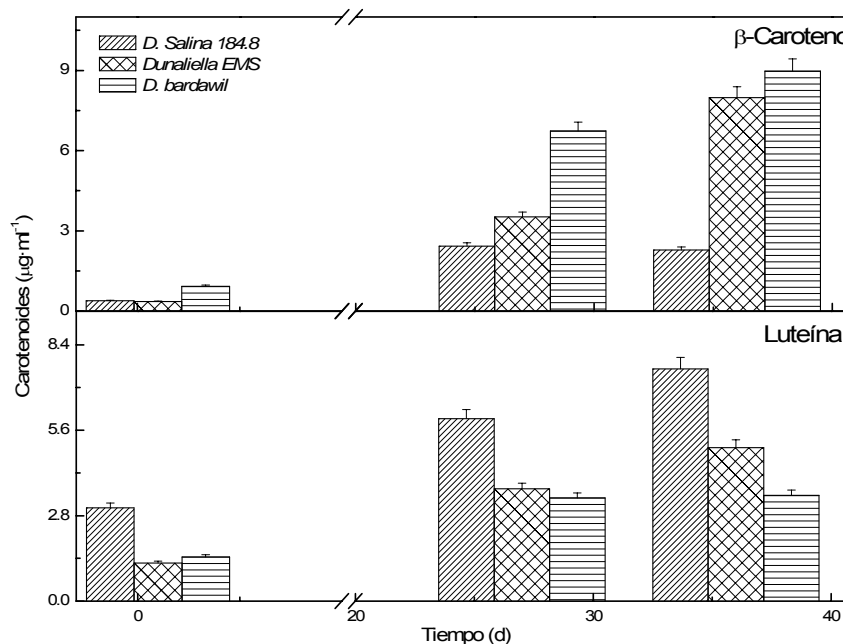


Figura 18A. Concentración de β -caroteno y luteína en las tres estirpes ensayadas.

En la Figura 18A se representan las concentraciones, obtenidas mediante HPLC, de los principales carotenoides específicos identificados que han sido sintetizados por cada estirpe durante el ensayo con biomasa inicial intermedia. Destacan los valores de luteína alcanzados por la estirpe *D. salina* 184.8, lo que confirma a esta microalga como una potencial acumuladora de luteína en comparación con las otras dos. En relación a la concentración de β -caroteno, *D. bardawil* resultó ser de nuevo la mayor acumuladora al final del ensayo, si bien las diferencias con *Dunaliella* EMS fueron mínimas (9 y 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente).

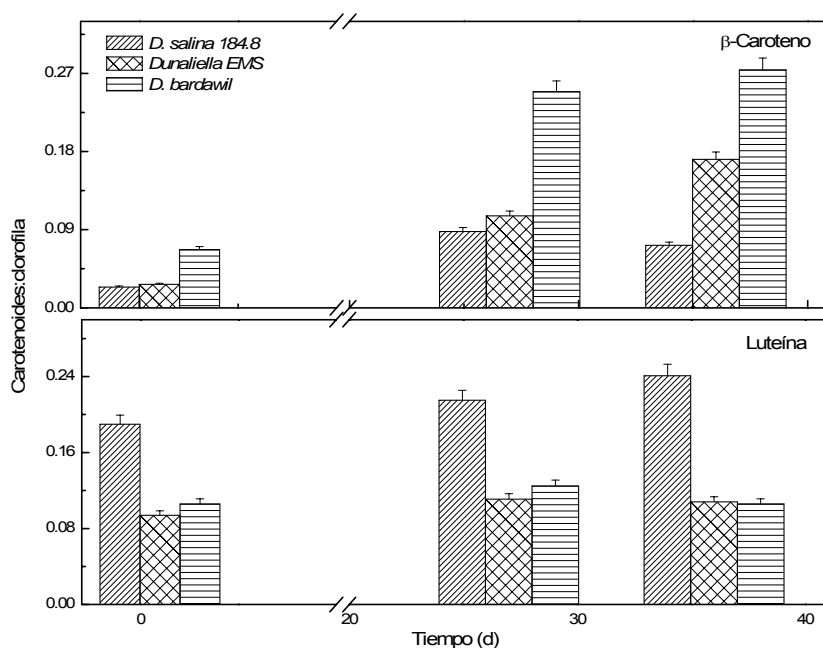


Figura 18B. Acumulación específica de β -caroteno y luteína por unidad de biomasa de las tres estirpes crecidas en cámara de laboratorio bajo condiciones estándar partiendo de una biomasa inicial intermedia.

En resumen, el análisis de las cinéticas de acumulación de carotenoides específicos (β -caroteno y luteína, principalmente) en las dos condiciones de biomasa inicial ensayadas ha revelado el potencial de *D. salina* 184.8 para acumular luteína. Esta circunstancia se pone especialmente de manifiesto al partir de una biomasa inicial intermedia (Figura 18B), puesto que aumentan las diferencias de acumulación de luteína por unidad de biomasa respecto a las otras dos estirpes. Por su parte, *D. bardawil* presenta la mayor acumulación de β -caroteno por unidad de volumen y por unidad de biomasa en las dos condiciones de partida, aunque este hecho se acentúa cuando el cultivo parte de una biomasa inicial baja. Cuando las estirpes empleadas se incuban a partir de una biomasa inicial intermedia, las diferencias relativas a la acumulación volumétrica y por unidad de biomasa de β -caroteno que se observan entre *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS se minimizan.

Condiciones limitantes de nitrógeno inorgánico

Como se adelantó en la Introducción de la Tesis, parece comúnmente aceptado que condiciones conducentes a una ralentización del crecimiento de la microalga favorecen la producción de carotenoides. Entre tales condiciones se incluirían la alta intensidad de luz y la limitación de nitrógeno inorgánico, además de alta concentración de sal, pH extremo, temperatura baja o presencia de

agentes químicos oxidantes como los herbicidas (Ben-Amotz y Shaish 1992; León et al. 2005).

Para comparar en laboratorio el potencial de acumulación de carotenoides de las tres estirpes estudiadas, se optó por utilizar la carencia de nitrógeno como factor de estrés inductor de la producción de aquellos, por ser el factor que estimula una mayor acumulación de carotenoides. Para ello, se cultivaron las mismas estirpes en medio con carencia total de nitrógeno, partiendo de una biomasa inicial intermedia, y repitiendo las condiciones, tanto de temperatura (22° C) como de iluminación (150 μmoles de fotones $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR 24h/día), de los experimentos anteriores.

En la Figura 19 se observa que la estirpe *D. salina* 184.8 alcanza un valor máximo de carotenoides en torno al día 10 de cultivo, mientras que las otras dos mantienen un nivel prácticamente constante durante las dos primeras semanas, para luego, hacia la parte final del experimento, incrementar su actividad carotenogénica. *D. salina* 184.8 responde al estrés oxidativo producido por la carencia de nitrógeno con más rapidez que las otras dos estirpes, observándose seguidamente la disminución del contenido en pigmentos debido a la inhibición del crecimiento que sufre el cultivo. Así pues, dicha estirpe muestra una sensibilidad más alta a este factor de estrés.

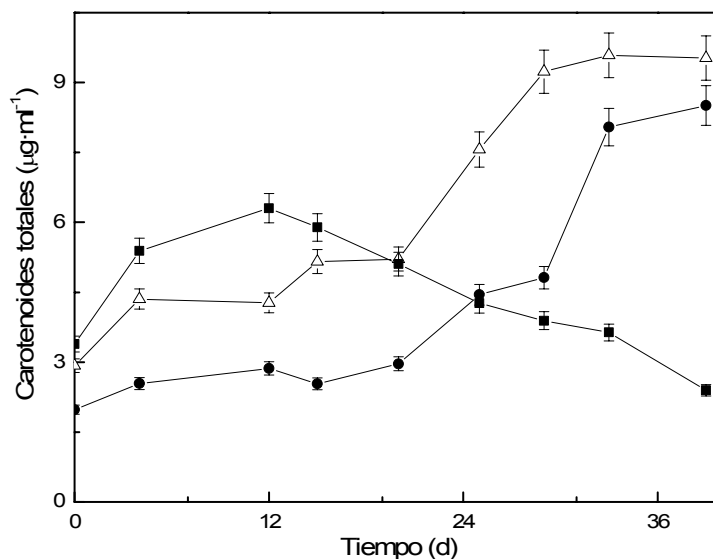


Figura 19. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *D. salina* 184.8 (■-), *Dunaliella* EMS (●-) y *D. bardawil* (△-) crecidos en cámara de laboratorio bajo carencia nutricional de nitrógeno.

Por otra parte, las estirpes *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS poseen una mayor capacidad para sintetizar carotenoides en ausencia de nitrógeno inorgánico respecto a *D. salina* 184.8, que como máximo acumula concentraciones de carotenoides, por unidad de volumen, alrededor de un 30% inferiores.

En cuanto a las relaciones carotenoides:clorofila, durante las tres primeras semanas de cultivo, *D. salina* 184.8, *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS mantienen un valor constante de 0.3, 0.25 y 0.2, respectivamente. En las dos últimas semanas se produce, en las estirpes de *D. bardawil*, un aumento notable de los valores de esta relación, llegando a alcanzar valores cercanos a 1.5. Sin embargo, el valor de dicha relación para *D. salina* 184.8 permanece constante

alrededor de 0.4. El aumento de la relación carotenoides:clorofila en *D. bardawil* es debido a la tardía acumulación de carotenoides, en un estadio de la incubación en ausencia de nitrógeno en que la síntesis de clorofila está inhibida por completo (Young y Beardall 2003). En *D. salina* la fase de disminución de carotenoides coincide con la fase de disminución de clorofila, lo que mantiene casi constante dicha relación. Es obvio que la relación carotenoides:clorofila no es un indicador de la acumulación de carotenoides, sino más bien de las diferencias en la tendencia de las cinéticas de acumulación de ambos tipos de fotopigmentos (Bhosale 2004). En general, valores superiores a 0.5 pueden indicar situaciones de estrés aprovechables para inducir acumulación de carotenoides (Hejazi y Wijffels 2003).

De los resultados obtenidos cabe concluir que, en limitación de nitrógeno, *D. salina* 184.8 alcanza la máxima acumulación de carotenoides antes que *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS, si bien la mayor magnitud de la acumulación en las dos últimas estirpes sugiere valorar la rentabilidad del uso de una u otra en procesos discontinuos de producción de carotenoides.

2.2. Estudio de la productividad y acumulación de carotenoides de varias estirpes cultivadas bajo radiaciones UV-A en condiciones de laboratorio.

Las radiaciones UV producen especies reactivas de oxígeno (Ghetti et al. 1998). La presencia de dichas especies en la materia viva causa estrés oxidativo (Osmond et al. 1997). Para defenderse de tal situación, los organismos fotosintéticos producen diferentes tipos de moléculas antioxidantes, entre ellas vitaminas y carotenoides (Millar et al. 1996). Algunos de los carotenoides obtenidos de microalgas y que presentan mayor valor comercial, como los isómeros 9-cis y all-trans β -caroteno, absorben radiaciones del rango espectral correspondiente a la región UV-A (Tsukida et al. 1982), lo que puede justificar su biosíntesis como uno de los mecanismos moleculares de adaptación y respuesta al estrés oxidativo producido por las radiaciones más oxidantes.

Son escasos los trabajos publicados sobre la viabilidad de cultivos de microalgas expuestos a radiaciones UV. Se han publicado efectos positivos y negativos sobre el crecimiento de las microalgas incubadas bajo radiaciones UV-A, dependiendo de la microalga utilizada y de las condiciones de cultivo (Horwitz 1994; Döhler 1998). La sensibilidad de las microalgas a la adición de UV-A se manifiesta en el hecho de que, dependiendo de la intensidad y de la relación UV-A/PAR, aquella genera respuestas diferentes: desde el aumento de la tasa de crecimiento (Jahnke 1999) hasta afectar a la viabilidad de los cultivos (Döhler et al. 1997). Tales trabajos se realizaron en cultivos incubados durante cortos períodos de tiempo (horas o, como máximo, dos o tres días). Si la radiación UV-A indujese la acumulación de carotenoides en las estirpes utilizadas en esta Tesis, sin pérdida de viabilidad, se abriría una vía para el aprovechamiento de la radiación oxidante en la producción masiva de tales moléculas de interés comercial.

2.2.1. Cinéticas de crecimiento.

Estudios previos realizados con cultivos de *D. bardawil* incubados en laboratorio durante cortos períodos de tiempo sugerían que la radiación UV-A estimulaba el crecimiento de *Dunaliella*. En este apartado del trabajo de Tesis se aborda el estudio comparado de la influencia de la radiación UV-A sobre el crecimiento, durante largos períodos de tiempo, de las tres estirpes objeto de

estudio. Dicha estimulación del crecimiento podría llevar aparejado un incremento de la cantidad de carotenoides totales acumulados por la microalga, por el simple hecho de obtener mayores productividades de biomasa. Además, la radiación UV-A producirá el efecto oxidativo derivado de ser una radiación más energética que la PAR y, presumiblemente, ello estimularía una mayor producción de carotenoides como respuesta antioxidante al estrés impuesto.

Los experimentos de laboratorio para estudiar la influencia de radiaciones UV sobre la productividad de los cultivos de *Dunaliella* se realizaron siempre en condiciones controladas de luz, temperatura y asepsia. La radiación UV se suministró con lámparas adicionales a las de luz blanca fluorescente. De esta forma, aunque estudiar el efecto diferencial producido por las condiciones de luz sobre el crecimiento y/o la acumulación de compuestos de interés en *Dunaliella* es más fácil que en cultivos exteriores, las condiciones lumínicas no son las mismas que en cultivos expuestos a la radiación solar y, en todo caso, se utilizan unas bajas relaciones PAR/UV que sólo pueden alcanzarse en el laboratorio. En consecuencia, los resultados que se obtienen de tales experiencias son muy útiles para aportar nuevo conocimiento sobre la respuesta de la microalga a condiciones oxidantes extremas, pero sin embargo, la extrapolación de tales experiencias a cultivos exteriores requiere de una estrategia experimental diferente.

Para llevar a cabo tales experiencias de laboratorio, cultivos de las tres estirpes empleadas en apartados anteriores se iluminaron con radiaciones UV-A añadidas a la radiación fotosintéticamente activa (PAR) aplicada mediante lámparas de luz blanca fluorescente. El ensayo se desarrolló bajo condiciones controladas de laboratorio en la cámara de cultivo que el grupo Biotecnología de Algas posee en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva.

Los cultivos con las distintas estirpes fueron inoculados en erlenmeyers de 250 ml de medio y crecidos en medio estándar con plenitud de nutrientes. La temperatura se mantuvo constante a 25° C durante todo el experimento, la iluminación de los mismos se realizó empleando lámparas blancas fluorescentes que irradiaban 150 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ continuamente, y el gaseo con aire se enriqueció con un 5% de CO₂ (v/v). Los cultivos control sólo recibieron, bajo estas condiciones, radiación fotosintéticamente activa (PAR); sin embargo, aquellos que fueron sometidos a radiación UV-A recibieron en torno a 18 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación UV-A, además de la correspondiente radiación PAR. La intensidad de la radiación UV-A se eligió en función de resultados previos del grupo, obtenidos tras incubaciones de *Dunaliella bardawil* bajo UV-A durante cortos períodos de tiempo (Salguero 2005). Los inóculos se realizaron desde cultivos madre de cada una de las estirpes cuando se encontraban en la mitad de la fase exponencial de crecimiento, alcanzándose una concentración inicial cercana a los 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Las curvas de crecimiento resultantes se muestran en la Figura 20, en la que se observa que, aparentemente, no hay efectos estimuladores significativos sobre el contenido de clorofila total de cada una de las estirpes cuando los cultivos se incuban adicionando radiación UV-A al PAR. Tan sólo se aprecia, en *D. salina* 184.8, un ligero aumento, no significativo, hacia el final del ensayo cuando hay presencia de radiación UV-A.

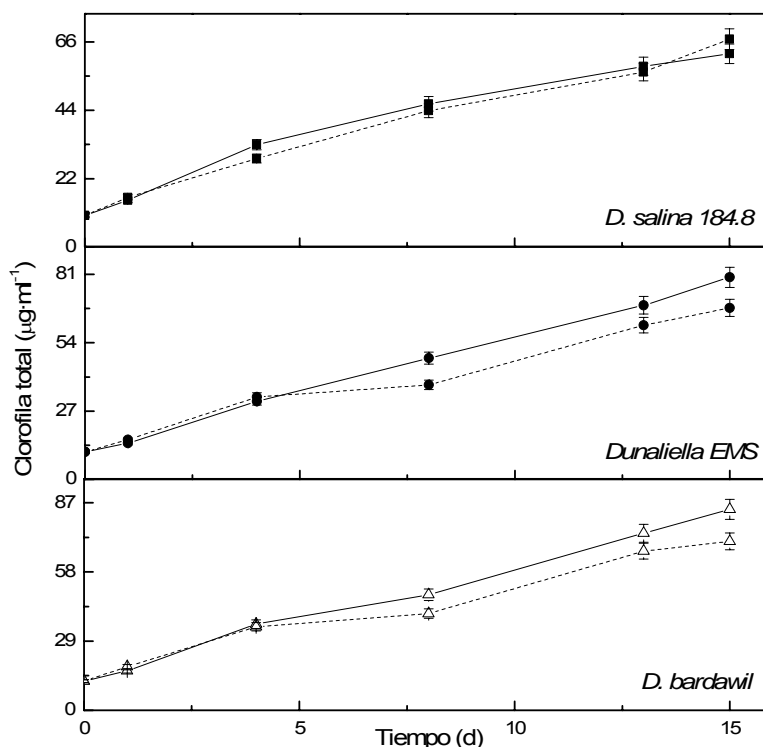


Figura 20. Contenido de clorofila total en cultivos de *D. salina* 184.8 (-■-), *Dunaliella* EMS (-●-) y *D. bardawil* (-△-) crecidos en cámara de laboratorio en condiciones estándar bajo iluminación PAR (línea continua) y PAR + 18 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de UV-A (línea discontinua).

Hacia el final de la segunda semana del experimento, al final de la etapa de crecimiento exponencial, parece que la presencia de radiación UV-A ralentiza el crecimiento, alcanzándose en las estirpes de *D. bardawil* valores más bajos de clorofila, sobre un 15% menos que en los cultivos control incubados en ausencia de radiación UV-A.

La Tabla 10 recoge datos relativos a la variación del número de células en cultivos de las tres estirpes, incubados sólo con PAR y con PAR más UV-A ($18 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$). *D. salina* 184.8 es la única microalga cuyo crecimiento parece resultar retardado cuando se incuba bajo la presencia de radiación UV-A. Los resultados obtenidos para las otras dos estirpes parecen sugerir, en cambio, una ligera estimulación del crecimiento. El análisis de las tasas de crecimiento en la etapa final de cultivo, correspondiente a la segunda semana (fase exponencial, días 9 – 15), revela que la radiación UV-A estimula ligeramente el crecimiento. Bajo su presencia, para *D. salina* 184.8, *Dunaliella* EMS y *D. bardawil* se obtienen valores superiores en comparación con los controles: 0.17, 0.15 y 0.14 d^{-1} frente a 0.12, 0.10 y 0.03 d^{-1} , respectivamente.

Tabla 10. Densidad celular ($\times 10^6 \text{ cel ml}^{-1}$) en cultivos incubados bajo radiación PAR y PAR + UV-A.

Estirpe	PAR		PAR + UVA	
	Día 4	Día 15	Día 4	Día 15
<i>D. salina</i> 184.8	3.52	9.29	1.81	5.08
<i>Dunaliella</i> EMS	2.69	8.09	1.81	9.15
<i>D. bardawil</i>	2.50	4.98	3.06	6.71

Asimismo, los resultados mostrados en la Tabla 11 tras normalizar el contenido de clorofila total por célula, revelan que, en general, la concentración

intracelular de clorofila es mayor bajo la presencia de radiación UV-A en la fase inicial del cultivo, lo que indica que no se producen efectos negativos sobre el crecimiento en dicha fase. El ligero descenso posterior observado en todos los cultivos es consecuencia del aumento de la densidad celular.

Tabla 11. Concentración intracelular de clorofila (pg cel^{-1}) en cultivos incubados bajo radiación PAR y PAR + UV-A.

Estirpe	PAR		PAR + UVA	
	Día 4	Día 15	Día 4	Día 15
<i>D. salina</i> 184.8	9.35	6.69	15.73	13.16
<i>Dunaliella</i> EMS	11.47	9.87	18.02	7.41
<i>D. bardawil</i>	14.42	16.92	11.44	10.55

Los resultados obtenidos permiten concluir que la iluminación de cultivos con altas relaciones UV-A/PAR durante largos períodos de tiempo podría estimular el crecimiento de *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS, respondiendo así al papel positivo que parece desempeñar en la inducción de algunos procesos anabólicos (Horwitz 1994).

Aunque los datos relativos al crecimiento de los cultivos (clorofila y número de células) en presencia de radiación UV-A indican que se mantiene la viabilidad de los cultivos, para confirmar tal extremo y poder proponer, por tanto, la iluminación con radiación UV-A durante períodos prolongados, se llevaron a cabo experimentos con las tres estirpes incubadas bajo PAR suplementada con radiación UV-A, para estudiar la evolución de la producción de oxígeno dependiente de luz derivada de la actividad fotosintética. En la Figura 21 se muestran los valores de la producción de oxígeno dependiente de luz, obtenidos durante el experimento bajo las dos condiciones estudiadas, y para las estirpes consideradas.

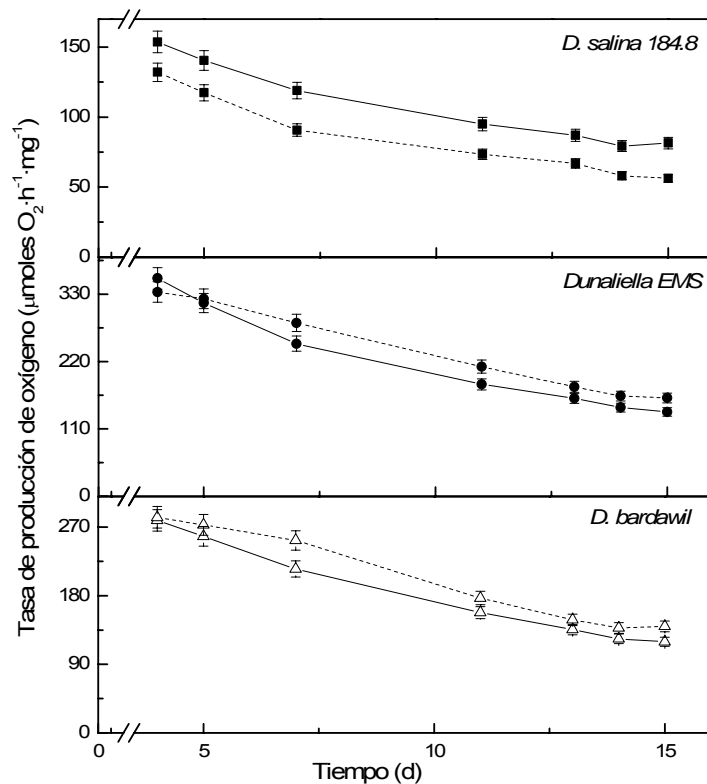


Figura 21. Tasa de producción de oxígeno dependiente de la luz de las tres estirpes ensayadas iluminadas bajo radiación PAR + UV-A ($18 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (línea discontinua) y bajo PAR (línea continua).

La tendencia general es la disminución de la actividad desde el inicio del ensayo hasta el final, en todas las estirpes, y para las dos condiciones de cultivo, siguiendo el patrón habitual de la producción de oxígeno dependiente de luz con el tiempo en cultivos tipo baño (Salguero 2006). El oscurecimiento de los cultivos debido al crecimiento induce la producción de una clorofila antena menos eficiente de cara a la captación de luz (Masuda et al. 2003), dada la menor disponibilidad de energía lumínica debido al “efecto pantalla” de unas células sobre otras.

La disminución de la tasa de producción de oxígeno para las tres estirpes no muestra cambios especialmente significativos cuando éstas se incuban en presencia de radiación UV-A. Tan sólo es apreciable un ligero descenso de la actividad de *D. salina* 184.8 cuando se irradia con UV-A, confirmando la sensibilidad de la microalga a esta radiación, descrita con anterioridad. Por el contrario, bajo incubación con radiación UV-A, las tasas de fotosíntesis de *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS son ligeramente superiores a las de sus respectivos cultivos control. En particular, *Dunaliella* EMS presenta, en ambas condiciones de iluminación, una tasa superior a la de las otras dos estirpes. Estos resultados ponen de manifiesto que, al menos durante un período de dos semanas, los cultivos de las tres estirpes incubadas bajo radiación UV-A no sufren alteración de la viabilidad.

De esta forma, se concluye que la radiación UV-A podría utilizarse para aumentar la productividad de los cultivos sin afectar a la viabilidad celular. En concreto, el mutante *Dunaliella* EMS aislado por nuestro grupo muestra un comportamiento estable y con una actividad anabólica superior a cultivos incubados en ausencia de radiación UV-A, lo que sugiere que podría ser útil en estudios de productividad bajo dicha condición radiativa.

2.2.2. Cinéticas de acumulación de carotenoides.

Al igual que en los experimentos de crecimiento comparado de las tres estirpes, cuando los cultivos se incubaron en presencia de radiación UV-A, se realizó un estudio de las cinéticas de acumulación de carotenoides totales y, específicamente, de los mayoritarios en las microalgas. Si la radiación UV-A, más energética que PAR y, por lo tanto, con mayor potencial oxidante, cumpliera la expectativa de estimular la acumulación de carotenoides como una de las respuestas antioxidantes de las microalgas, su empleo podría ser de utilidad para estudiar procesos de producción a mayor escala, ya que como se ha observado con anterioridad, las estirpes utilizadas mantienen la viabilidad en presencia de radiación UV-A.

En las Figuras 22 y 23 se representan los valores de las concentraciones de los carotenoides totales y específicos (identificados en los cromatogramas de HPLC), obtenidos en extractos celulares de cada estirpe durante el ensayo con radiaciones UV-A.

Según se desprende de la Figura 22, los cambios observados en los niveles de carotenoides totales revelan una influencia positiva de la radiación UV-A en la acumulación de carotenoides de las tres estirpes utilizadas, especialmente en los cultivos de *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS, en los que el efecto positivo se produce de forma más rápida. Sin embargo, en *D. salina* 184.8 no se observa esa influencia hasta el inicio de la segunda semana, cuando comienza a detectarse un aumento significativo de la acumulación de

carotenoides respecto al control. Las evoluciones en el contenido de carotenoides para las dos estirpes de *D. bardawil* son muy similares.

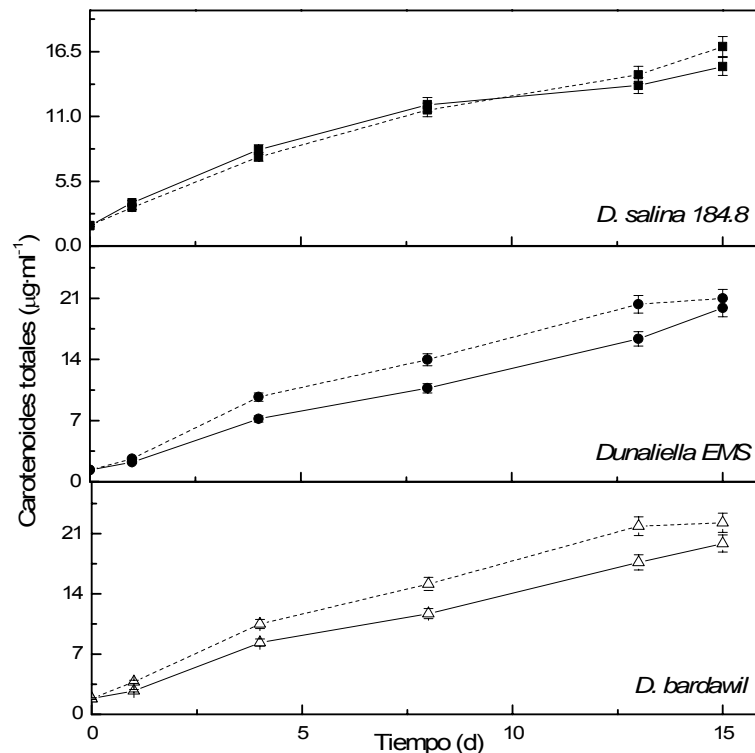


Figura 22. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *D. salina* 184.8 (■), *Dunaliella* EMS (●) y *D. bardawil* (△) crecidos en cámara de laboratorio en condiciones estándar bajo iluminación PAR (línea continua) y PAR + 18 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de UV-A (línea discontinua).

Tabla 12. Tasas de acumulación de carotenoides en función de las distintas condiciones de iluminación (PAR y PAR + 18 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de UV-A.) para las tres estirpes ensayadas.

Estirpe	PAR (d^{-1})			PAR + UV-A (d^{-1})		
	1ª sem	2ª sem	Neta	1ª sem	2ª sem	Neta
<i>D. salina</i> 184.8	0.241	0.034	0.145	0.237	0.055	0.152
<i>Dunaliella</i> EMS	0.259	0.089	0.179	0.292	0.058	0.183
<i>D. bardawil</i>	0.232	0.076	0.159	0.264	0.055	0.166

Las tasas de acumulación de carotenoides (Tabla 12) demuestran que el efecto estimulador de la radiación UV se concentra fundamentalmente en la primera semana de incubación. El análisis de la acumulación de cada uno de los principales carotenoides en las tres estirpes, incubadas éstas bajo radiación UV-A, revela que, en efecto, en la primera semana de iluminación con radiación PAR adicionando radiaciones UV-A de baja intensidad, se produce, en las dos estirpes de *Dunaliella bardawil*, un incremento significativo del 30% de la acumulación de β -caroteno por unidad de volumen (Figura 23). En contraste, no se detectaron diferencias apreciables en los contenidos de los otros pigmentos analizados bajo las dos condiciones de iluminación estudiadas.

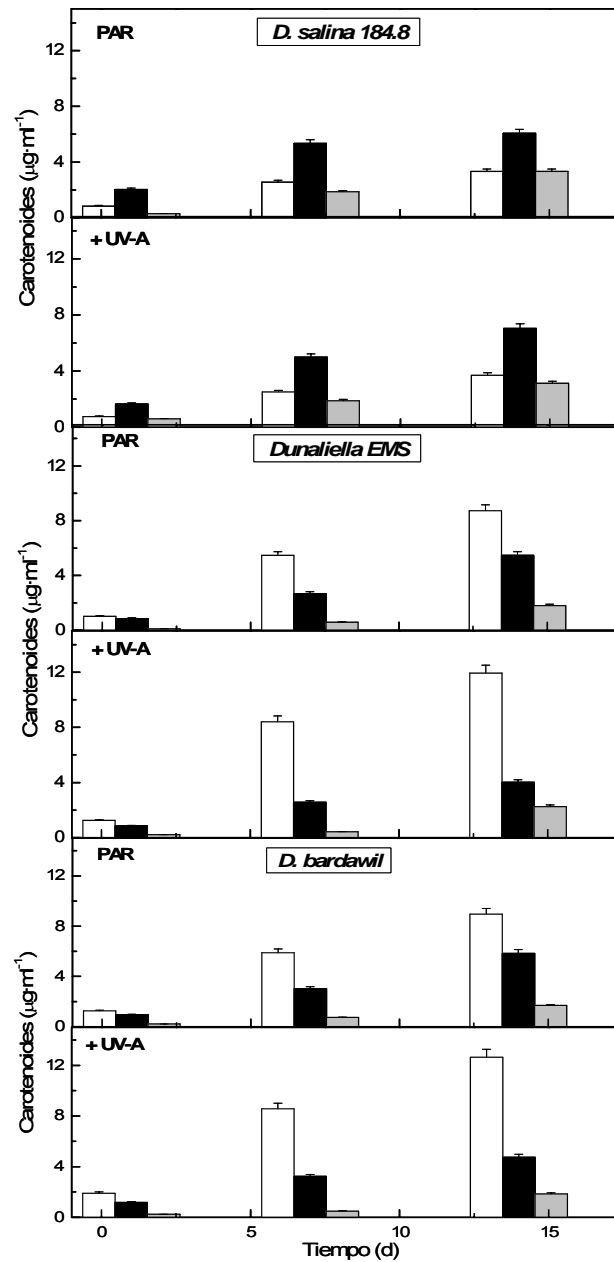


Figura 23. Concentraciones de β-caroteno (blanco), luteína (negro) y violaxantina (gris) en las tres estirpes iluminadas bajo radiación PAR v PAR + UV-A.

Los resultados obtenidos revelan que las radiaciones UV-A de baja intensidad podrían utilizarse para estimular la producción de carotenoides, especialmente β-caroteno y luteína, en *D. bardawil*, mediante el desarrollo de procesos de iluminación discontinua con UV-A. Los períodos de iluminación con radiación UV-A no superarían la semana y servirían para incrementar la concentración de carotenoides antes de iniciar una última fase de estrés en medios de cultivo sin nitrógeno inorgánico. Una iluminación con radiación UV-A por períodos de tiempo superiores (por ejemplo, dos semanas) no parece tener una incidencia significativa en la acumulación de carotenoides, lo que es coherente con una mayor implicación de las moléculas antioxidantes en procesos de neutralización de radicales libres, más abundantes tras un largo período de exposición a radiaciones más oxidantes que PAR (Shao et al. 2008; Wang et al. 2008).

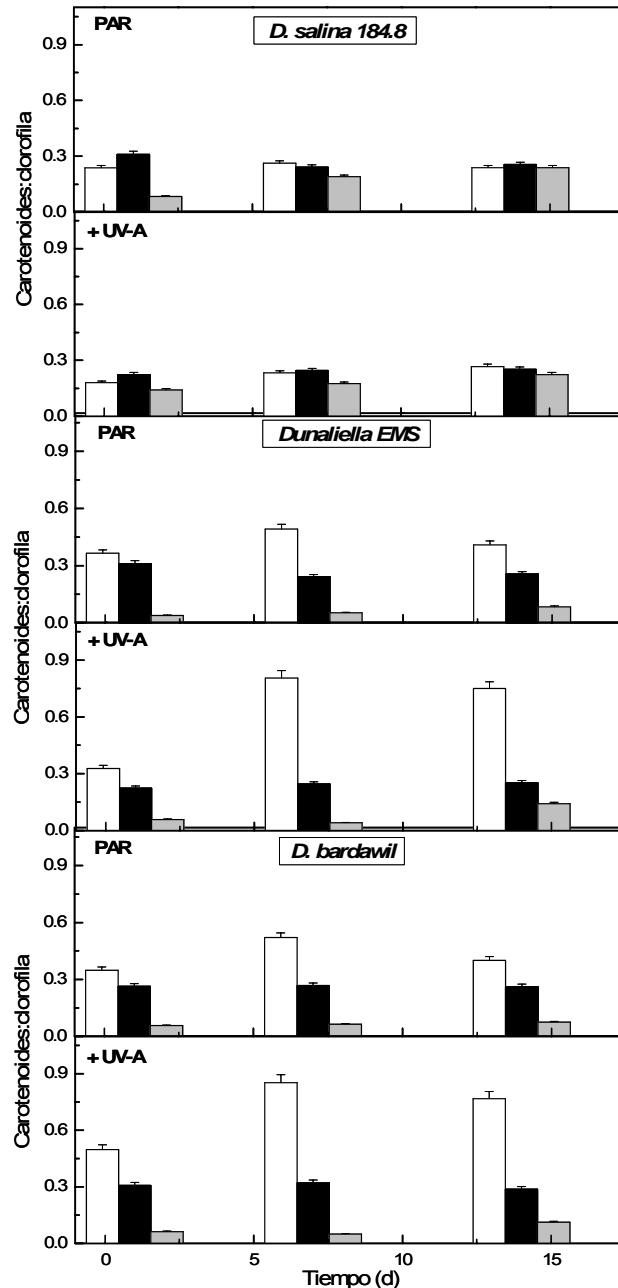


Figura 24. Acumulación específica de β -caroteno (blanco), luteína (negro) y violaxantina (gris) por unidad de biomasa determinada en las tres estirpes iluminadas bajo radiación PAR y PAR + UV-A.

Puesto que el contenido en clorofila no disminuye, el aumento que se observa en las relaciones carotenoides:clorofilas de los cultivos de las tres estirpes cuando se incuban en presencia de radiación UV-A (Figura 24), se debe al efecto estimulador producido por ésta sobre la síntesis de carotenoides, especialmente notable para el β -caroteno.

Por lo tanto, a partir de las Figuras 23 y 24 puede concluirse que las tres estirpes estudiadas, y especialmente *D. bardawil* y la estirpe mutante de *D. bardawil* aislada por nuestro grupo (*Dunaliella* EMS), acumulan un mayor contenido intracelular de carotenoides si se incuban con radiaciones UV-A de baja intensidad durante una semana, sin pérdida de viabilidad. La radiación UV-A parece estimular en mayor medida la acumulación de β -caroteno.

2.3. Estudio de la productividad y acumulación de carotenoides de la estirpe *D. bardawil* cultivada bajo radiaciones UV-B en condiciones de laboratorio.

Las radiaciones UV-B producen daños irreversibles en los organismos, que van desde quemaduras de diverso grado (Afaq et al. 2005) hasta la mutación del ADN (Sethow 1974). Se sabe que las radiaciones UV-B afectan negativamente el crecimiento de plantas (Liu et al. 2004) y microalgas (Malanga y Puntarulo 1995; Masi y Melis 1997). Los efectos negativos producidos por las radiaciones UV-B sobre los organismos fotosintéticos están vinculados, entre otros, al proceso de la fotosíntesis, debido a la generación de radicales libres que oxidan numerosos transportadores de electrones y, finalmente, inhiben la asimilación fotosintética de nutrientes (Ghetti et al. 1998). El estrés oxidativo producido por las radiaciones UV-B estimularía, en teoría, la síntesis de antioxidantes como los carotenoides, aunque la viabilidad de los cultivos resultaría, en todo caso, afectada negativamente. Existen escasas referencias al respecto en la bibliografía y lo publicado no ofrece una visión uniforme sobre la cuestión. Mientras algunos autores destacan el potencial de tales radiaciones en la acumulación de carotenoides en microalgas (Döhler 1998; Yu et al. 2005; Rath y Adhikary 2007), otros no encuentran relación entre la incubación bajo radiación UV-B y la producción de los pigmentos terpenoides (Agrawal 1992; Zhang et al. 2005).

En los siguientes experimentos se ha pretendido analizar de qué manera la adición de radiación UV-B puede afectar al crecimiento y a la síntesis de carotenoides en *Dunaliella*. Para realizar este ensayo, se ha elegido *D. bardawil* debido a que, a raíz de los experimentos previos, se ha demostrado que es la estirpe con mayor potencialidad (junto con *Dunaliella* EMS) para acumular carotenoides, tanto de manera natural como mediante la inducción por condiciones oxidantes, como la adición de radiación UV-A. Es esperable que las radiaciones UV-B produzcan daños irreversibles en la viabilidad de los cultivos a largo plazo. Si la incubación de la microalga con UV-B a corto plazo (24-48h) indujese la acumulación de carotenoides como respuesta al estado oxidativo impuesto, se valoraría el uso modulado de radiación UV-B como estrategia para forzar la acumulación de carotenoides en cultivos de las estirpes de *Dunaliella* utilizadas.

Dado que la radiación UV-B se caracteriza por ejercer una marcada acción oxidativa, es esperable que su incidencia sobre los cultivos afecte a la viabilidad celular. En este apartado del trabajo se ha estudiado a partir de qué niveles la radiación UV-B puede afectar el crecimiento de esta microalga (viabilidad del cultivo). Se estudia y discute el posible papel del ciclo de las xantofilas como mecanismo de respuesta antioxidante al exceso de radiación UV-B. El ensayo se desarrolló durante 4 días bajo condiciones controladas de laboratorio en la cámara de cultivo ya referida.

2.3.1. Cinéticas de crecimiento.

Los cultivos de *D. bardawil* se inocularon en erlenmeyers de 250 ml y se crecieron en medio estándar con plenitud de nutrientes. La temperatura (25° C) no varió a lo largo del experimento. La iluminación PAR de los cultivos se suministró mediante lámparas blancas fluorescentes que irradiaban 150 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 24 horas al día, mientras que la iluminación UV-B se llevó a cabo mediante lámparas transparentes que emitían en el rango de interés (280 –

315 nm). En definitiva, los cultivos control recibieron $150 \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR y los que crecieron bajo radiación UV-B recibieron 1.5, 2.25 y 2.75 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (valores medidos in situ con radiómetro). El gaseo suministrado fue aire enriquecido en un 5% de CO_2 (v/v). Los cultivos madre se encontraban en la mitad de la fase exponencial de crecimiento justo antes de proceder al inóculo de los cultivos del experimento, alcanzándose en éstos, al inicio del ensayo, una concentración cercana a los $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

En las Figuras 25 y 26 se representa la evolución de la concentración celular y de la clorofila a lo largo del experimento, tanto del cultivo control como de aquellos que recibieron distintas dosis de radiación UV-B.

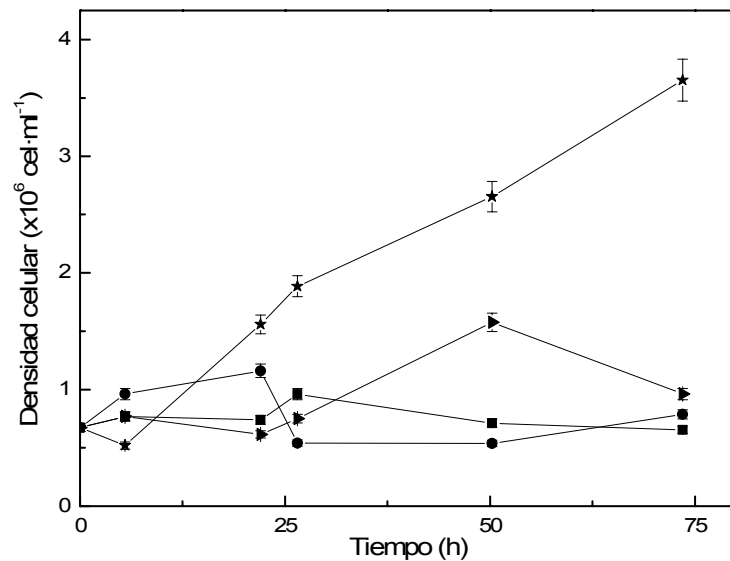


Figura 25. Crecimiento celular de *D. bardawil* en cultivos control irradiados con $150 \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación PAR (★) y en aquellos que además fueron iluminados con 2.75 (●), 2.25 (■) y 1.5 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de UV-B (▶).

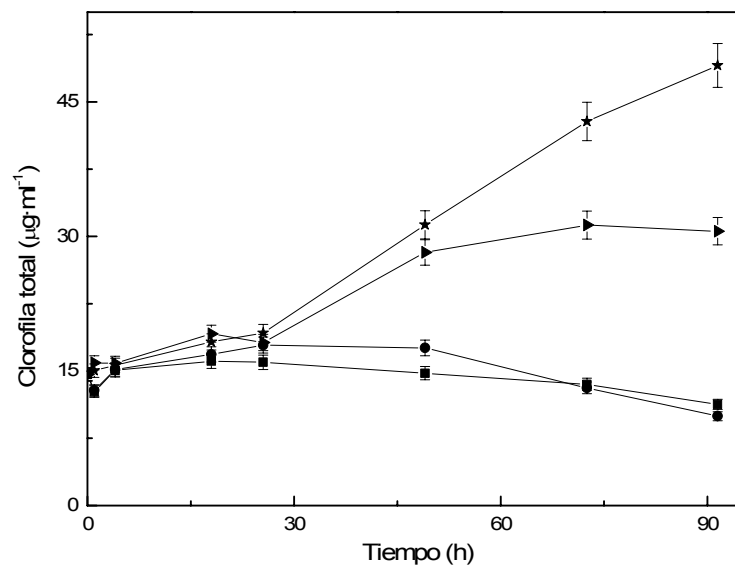


Figura 26. Clorofila total en cultivos de *D. bardawil* irradiados con PAR (★) y en aquellos iluminados además con 2.75 (●), 2.25 (■) y 1.5 (▶) $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de UV-B.

La evolución del número de células del control fue la esperada. Puesto que las condiciones de cultivo en la cámara eran constantes y controladas, y el

medio de cultivo tenía plenitud de nutrientes, la adaptación de la microalga a las nuevas condiciones fue rápida y en apenas unas horas se observó una tendencia de crecimiento exponencial. Para los cultivos que recibieron radiación UV-B, tras el período de adaptación a las condiciones radiativas, tan sólo aquel que recibía una dosis inferior de radiación mostró crecimiento que, en todo caso, fue menor que el del cultivo control, y cesó a los dos o tres días de experimento.

Según los datos mostrados, los niveles más bajos de radiación UV-B ($1.5 \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) retrasan levemente el crecimiento de *Dunaliella* en la etapa inicial de adaptación, y, si la irradiación es continuada, termina por afectar a la viabilidad de los cultivos, produciéndose una disminución en el número de células. Respecto a los otros dos cultivos que se sometieron a mayores irradiancias (2.25 y $2.75 \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), ambos presentan una evolución de clorofila muy similar en el tiempo (Figura 26), estable al principio, y con una tendencia decreciente hacia el final del experimento, consecuencia de la pérdida de viabilidad de los cultivos.

Aunque los datos relativos al crecimiento de los cultivos (clorofila y número de células) en presencia de radiación UV-B indican que la viabilidad de éstos resulta afectada, para confirmar tal extremo y conocer durante cuánto tiempo puede mantenerse la viabilidad, se estudió la evolución de la producción de oxígeno dependiente de luz en cultivos irradiados con radiación UV-B. En la Figura 27 se muestran los valores de la producción de oxígeno dependiente de luz, obtenidos durante el experimento con cultivos de *D. bardawil* bajo las condiciones impuestas.

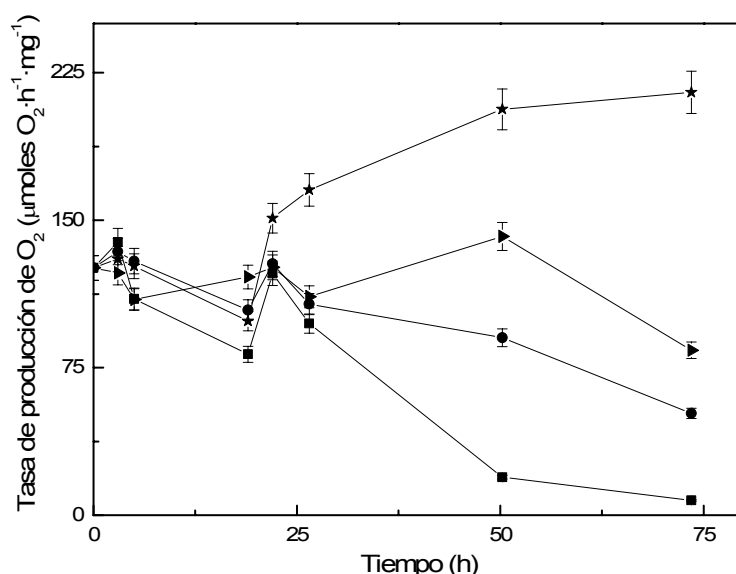


Figura 27. Evolución de la producción de oxígeno dependiente de la luz durante el ensayo con cultivos de *D. bardawil* iluminados bajo PAR (▲) y con UV-B adicional: 2.75 (●), 2.25 (■) y 1.5 (▸) $\mu\text{moles de fotones m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

La disminución de la tasa de producción de oxígeno en los tres cultivos irradiados con radiación UV-B, respecto al control, muestra que, bajo $1.5 \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación UV-B, la viabilidad resulta significativamente afectada salvo durante las primeras 48 horas de incubación.

En conclusión, los cultivos de *D. bardawil* irradiados con $150 \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR suplementada con $1.5 \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de

radiación UV-B muestran, durante las primeras 48 h, cierto crecimiento, inferior al de los cultivos control. Posteriormente, la acción oxidante de la radiación UV determina la ralentización y el cese del crecimiento de los cultivos. Irradiancias UV-B superiores a la anteriormente citada inhiben el crecimiento de los cultivos. Los resultados obtenidos permiten situar la irradiancia UV-B con actividad alguicida para *D. bardawil* alrededor de $1.5 - 2 \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (con una baja irradiancia PAR), lo que tiene cierto valor práctico en la esterilización de aguas (Drabkova et al. 2007).

2.3.2. Cinéticas de acumulación de carotenoides.

En cuanto a la síntesis de carotenoides, según se observa en la Figura 28, los cultivos control alcanzan la mayor concentración, cercana a los $12 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, a las 90 horas de experimento.

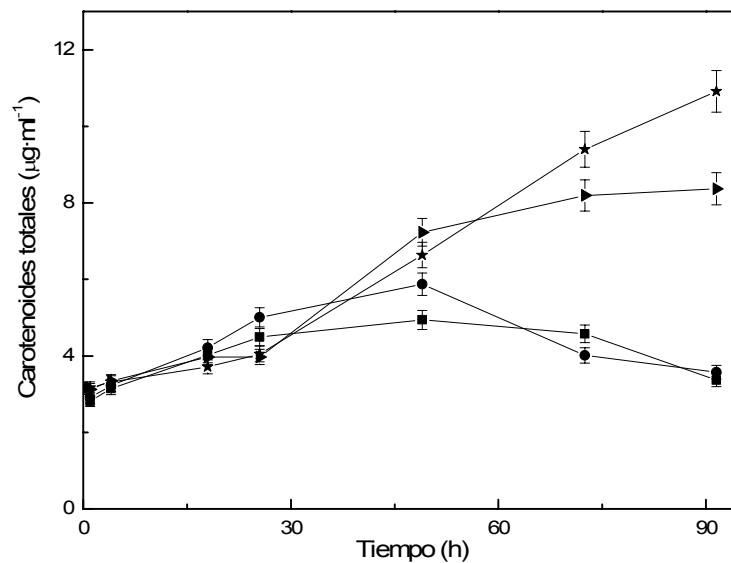


Figura 28. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *D. bardawil* irradiados con PAR (- ★-) y en aquellos irradiados además con 2.75 (-●-), 2.25 (-■-) y 1.5 (-▶-) $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de UV-B.

Destaca cómo la evolución del contenido en carotenoides del cultivo bajo $1.5 \mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ muestra una tendencia muy pareja al control hasta la mitad del experimento (primeras 48 horas). Sin embargo, y a partir de este momento, la acumulación de carotenoides disminuye hasta determinarse, al final del experimento, una diferencia del 30% respecto al control. Por su parte, niveles de radiación UV-B superiores, como 2.25 o 2.75 $\mu\text{moles de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, producen desde el principio del experimento un alto estrés oxidativo que perjudica la viabilidad celular, tal y como se mostró anteriormente, si bien, paradójicamente, a las 24 horas de incubación, los cultivos sintetizan una mayor cantidad de carotenoides que el cultivo control, probable respuesta al estrés impuesto mientras la viabilidad del cultivo lo permite, en coherencia con lo publicado para otras microalgas por varios autores. Dhöler et al. (1997) publicó un aumento del 10% en el contenido en luteína de *Dunaliella tertiolecta* en respuesta al estrés oxidativo producido por radiación UV-B. La mayor respuesta antioxidante (en términos cualitativos) de *D. bardawil* es consistente con su mayor capacidad carotenogénica. Los daños producidos por la radiación UV-B son muy diversos. El cese del crecimiento producido en el plazo de 48 h está relacionado con alteraciones en la permeabilidad de la membrana, que deriva en

una pérdida de la capacidad de incorporar nitrógeno inorgánico vinculada a daños, provocados por dicha radiación, en los mecanismos celulares de incorporación y asimilación fotosintética (Murphy 1983; Döhler 1985; Vincent et al. 2000; Sobrino et al. 2004).

Por lo tanto, dosis mínimas de radiación UV-B pudieran ser eficientes en la estimulación de la carotenogénesis durante pequeños intervalos de tiempo, sin afectar gravemente la viabilidad, a pesar de que el número de células se mantenga por debajo del nivel mostrado por el control. Transcurrido dicho tiempo (48 h), y toda vez que cese la aplicación de la irradiancia UV-B mínima, el cultivo volvería a aclimatarse a las condiciones estándar de luz. Si a partir de las Figuras 25 y 28 se calcula la acumulación de carotenoides por célula a las 50 h ($\text{pg carotenoides}\cdot\text{cel}^{-1}$), el cultivo irradiado con la intensidad más baja de radiación UV-B presenta $4.5 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$, mientras que el cultivo control, prácticamente la mitad. En consecuencia, cada célula de los cultivos incubados bajo $1.5 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiación UV-B acumula en 50 h el doble de carotenoides que una célula del cultivo control. Esto sugiere el uso de UV-B en forma discontinua, como factor estimulador de la acumulación de carotenoides en *D. bardawil*, si bien ha de considerarse el efecto nocivo producido por la radiación UV-B como un inconveniente para la recuperación total de la viabilidad de los cultivos, de cara a un proceso discontinuo a largo plazo.

La Tabla 13, que incluye la relación carotenoides:clorofila de los cultivos durante el ensayo, muestra que el cultivo control mantiene un valor constante alrededor de 0.2, mientras que los cultivos que reciben radiación UV-B presentan valores superiores, alcanzando máximos en torno a 0.35, para irradiancias de 2.75 y $2.25 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y 0.27 para el cultivo irradiado con $1.5 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. A diferencia de lo observado al incubar las microalgas bajo radiación UV-A, las relaciones carotenoides:clorofila en presencia de UV-B se mantienen aproximadamente constantes ya que la disminución del contenido en carotenoides es paralela a la del contenido en clorofila, consecuencia de la pérdida de viabilidad de los cultivos.

Tabla 13. Relación carotenoides:clorofila en cultivos de *D. bardawil* crecidos bajo PAR (Control) y PAR + UV-B.

Cultivo	Carotenoides:clorofila (promedio)	Carotenoides:clorofila (máximos)
Control	0.21	0.22
$2.75 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	0.27	0.36
$2.25 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	0.26	0.34
$1.5 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	0.23	0.27

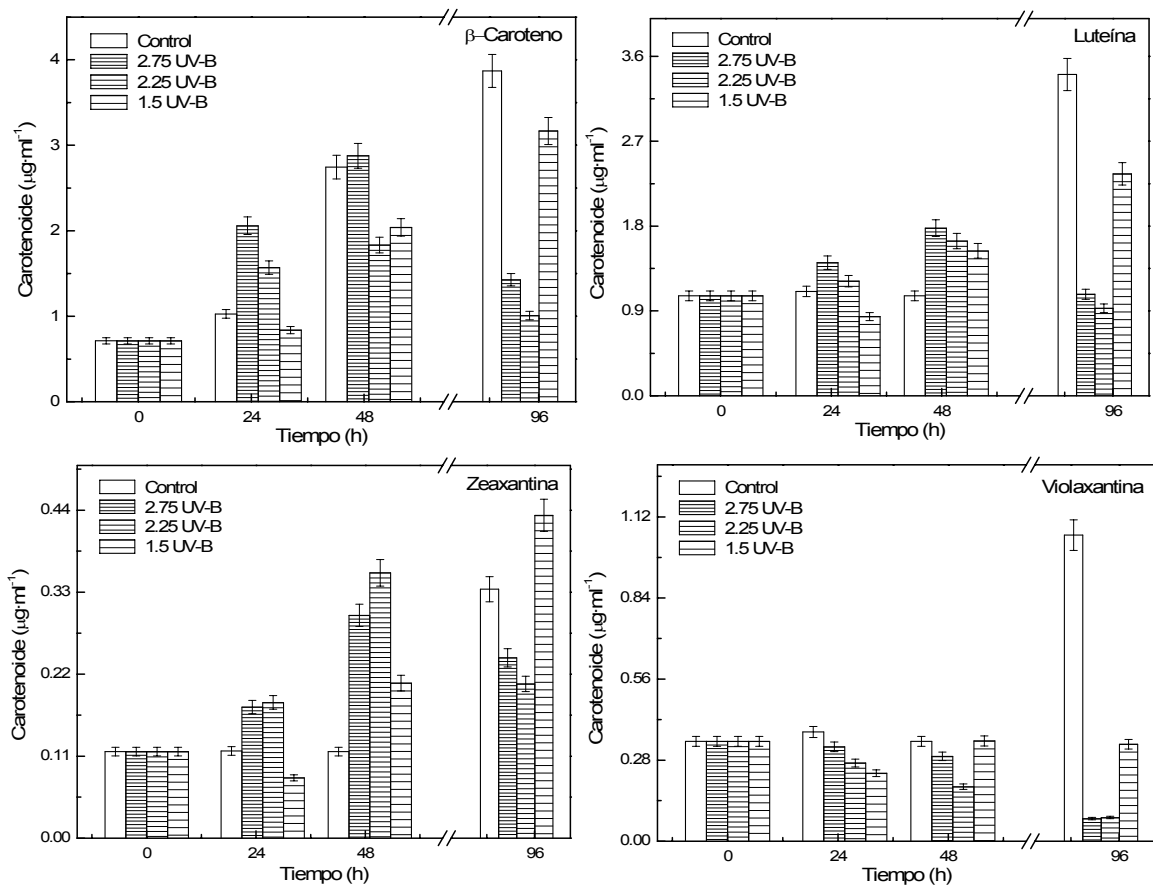


Figura 29. Cuantificación de los contenidos de β -caroteno (arriba izquierda), luteína (arriba derecha), zeaxantina (abajo izquierda) y violaxantina (abajo derecha) identificados mediante HPLC en extractos de cultivos de *D. bardawil* incubados bajo PAR y en aquellos que además recibieron distintas irradiancias de UV-B (2.75, 2.25 y 1.5 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

En la Figura 29, donde se representa la variación, a lo largo del experimento, de las concentraciones de los principales pigmentos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se observa que los principales carotenoides sintetizados bajo estas condiciones son la luteína y el β -caroteno.

Conforme las condiciones se vuelven más oxidantes debido a la presencia continua de radiación UV-B, el β -caroteno acumulado durante los dos primeros días en los cultivos que reciben 2.75 y 2.25 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ disminuye, probable consecuencia, entre otros factores, de su implicación en reacciones de neutralización de especies oxidantes y de los desórdenes metabólicos propios de células no viables (Buma et al. 1996; Sobrino et al. 2004).

Respecto a la variación de los niveles de violaxantina, es destacable, tal y como se observa en la Figura 29, que desde el inicio del experimento el contenido determinado en los cultivos iluminados con 2.25 y 2.75 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de UV-B va disminuyendo paulatinamente, alcanzándose al final del experimento (92 horas) unas concentraciones inferiores a las de partida. En contraste, los niveles de zeaxantina aumentan notablemente bajo la influencia de la luz UV-B durante las primeras 48 h. Este comportamiento antagónico en la evolución del contenido de ambos pigmentos es característico de la actividad de-epoxidasa del ciclo de las xantofilas, lo que corroboraría que *Dunaliella* intenta responder al estado de estrés oxidativo alto incrementando la producción de zeaxantina

(Demming-Adams y Adams 1990; Sobrino et al. 2005), como uno de los antioxidantes más potentes del conjunto de herramientas para neutralizar radicales libres (Havaux et al. 2007).

La violaxantina se obtiene por epoxidación de zeaxantina a través del intermediario anteraxantina, mediante una reacción catalizada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZE). El equilibrio de este ciclo se desplaza hacia la formación de violaxantina en condiciones de baja intensidad de luz, actuando ésta como un pigmento receptor secundario (Demming-Adams y Adams 1996; Eskling et al. 1997). Sin embargo, el ciclo se desplaza hacia la formación de zeaxantina a través de una reacción de depoxidación de la anteraxantina cuando existe un exceso de irradiancia y la célula necesita disipar energía para proteger el aparato fotosintético por otras vías secundarias (Kalituhu et al. 2007).

Con el objetivo de confirmar la probable mayor actividad de la enzima de-epoxidasa de los cultivos de *Dunaliella* incubados bajo radiación UV-B, a las 24, 48 y 92h de ensayo se determinó el coeficiente de epoxisaturación obtenido mediante la expresión $DPS = (Z + 0.5 \cdot A) / (Z + A + V)$, que arrojó los valores que se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Coeficientes de epoxisaturación (formación de zeaxantina) encontrados, en función del tiempo, para cultivos de *D. bardawil* expuestos a radiación UV-B.

Cultivo	DPS (24 horas)	DPS (48 horas)	DPS (92 horas)
Control	0.483	0.490	0.458
2.75 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0.488	0.501	0.523
2.25 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0.494	0.515	0.520
1.5 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	0.489	0.489	0.509

De la Tabla 14 se infiere que los cultivos control presentan el menor índice DPS, indicando con ello el menor desplazamiento hacia la formación de zeaxantina de todos los cultivos del experimento. La incubación bajo UV-B produce el aumento del índice DPS como consecuencia de la mayor actividad de-epoxidasa, destinada a aumentar el contenido en zeaxantina como respuesta al estrés oxidativo. Los resultados obtenidos con *D. bardawil* ponen de manifiesto que la acción oxidante de la radiación UV-B limita la viabilidad de los cultivos, si bien, durante cortos períodos de tiempo y modulando adecuadamente la irradiancia, puede estimular la acumulación de zeaxantina a través del ciclo de las xantofilas, especialmente activo para disipar en parte la radiación oxidante.

2.4. Estudio de la productividad y acumulación de carotenoides de varias estirpes cultivadas en condiciones exteriores.

Hasta el momento se han analizado las cinéticas y la viabilidad de varias estirpes de *Dunaliella* desde el punto de vista de la producción de biomasa y de la acumulación de carotenoides cuando se incuban en condiciones controladas de laboratorio bajo una temperatura e iluminación constantes. No obstante, en el desarrollo de este trabajo de Tesis, el grupo ha querido dar un paso hacia el cultivo de microalgas bajo las condiciones climatológicas reales de nuestra región, caracterizadas por la variación temporal, propia del litoral onubense, de parámetros meteorológicos como la temperatura y las radiaciones PAR y UV.

El objetivo final que se planteó a través de estos ensayos fue identificar y reproducir, en el exterior, condiciones de cultivo que favoreciesen la obtención de cultivos masivos. Para ello, se pondrá especial atención en el análisis de los efectos que provoca la modificación de las condiciones de radiación que las microalgas reciben durante las diferentes etapas de crecimiento de los cultivos. Por lo tanto, en este apartado se expondrán los principales resultados que se han obtenido tras ensayar con las tres estirpes de *Dunaliella* (*D. salina* 184.8, *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS) en condiciones exteriores.

Estos ensayos se han desarrollado en las instalaciones con las que el Centro de Experimentación de "El Arenosillo" cuenta en Mazagón. Concretamente, los trabajos se han llevado a cabo en la terraza del edificio de la Estación de Sondeos Atmosféricos, perteneciente al Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial, y que se ubica dentro del mencionado Centro. Las facilidades técnicas y de personal de la Estación han sido claves para el desarrollo satisfactorio de esta parte de la experimentación. Dicha Estación, encuadrada en un marco formidable para la realización de este tipo de estudios aplicados, presenta un horizonte limpio, con un albedo constante debido a la gran masa arbórea que la rodea, caracterizado a su vez por la ausencia total de obstáculos que interfieran en las medidas de radiación que allí se realizan. En el mismo edificio se haya un laboratorio para la calibración de instrumentos destinados a la medida de radiación solar, un laboratorio de aplicaciones biotecnológicas, y la más avanzada instrumentación en lo que a la monitorización de diversos parámetros atmosféricos se refiere (temperatura, humedad, radiaciones solares, ozono, especies nitrosas y aerosoles) (Casal et al. 2003).

Antes de iniciar la exposición de los resultados y su correspondiente análisis, se hace necesario resaltar que cultivar en condiciones controladas de laboratorio, poco o nada tiene que ver con el cultivo exterior. Varios son los factores que difieren entre ambos escenarios, ya que, aparte de que las condiciones lumínicas que reciben los cultivos de microalgas son muy diferentes en calidad e intensidad, éstos se encuentran sometidos al ciclo de luz-oscuridad diario típico de la región según la época del año y, además, no se controlan algunas variables importantes para el correcto desarrollo del cultivo como, por ejemplo, la temperatura o la salinidad (variable debido a cambios en la tasa de evaporación), entre otros. Asimismo, en nuestro caso, por imposibilidad técnica, no se pudo emplear CO₂ para enriquecer el aire que sirve de fuente de carbono para las microalgas. Por lo general, esto se traduce en un ritmo de crecimiento inferior y, por lo tanto, en una experimentación más lenta (Thyssen et al. 2001; Yang y Gao 2003).

2.4.1. Cinéticas de crecimiento.

Desde finales de marzo hasta comienzos de mayo del año 2005, se cultivaron las tres estirpes de *Dunaliella* en la terraza de la Estación para analizar cuál es la que mejor se adapta a las condiciones ambientales exteriores a las que se ven sometidas durante su crecimiento.

El experimento que se describe a continuación tuvo una duración de 35 días (27 marzo – 3 mayo). Como en el resto de los que se detallan con posterioridad, para el cultivo de las microalgas se emplearon unos tubos cilíndrico-cónicos diseñados por el grupo que dejan pasar en torno a un 80% de la radiación ultravioleta (datos experimentales propios). Tales tubos permitían

cultivar un volumen máximo de 250 ml, siendo esta cantidad igual que la que generalmente se ha empleado en los ensayos interiores desarrollados en el laboratorio. Una bomba de aire convencional suministró el aire necesario.

Los cultivos incubados en los tubos se expusieron a las condiciones exteriores en unas gradillas diseñadas para la experimentación, que se anclaban a una plataforma horizontal colocada en la terraza (ver Materiales y Métodos).

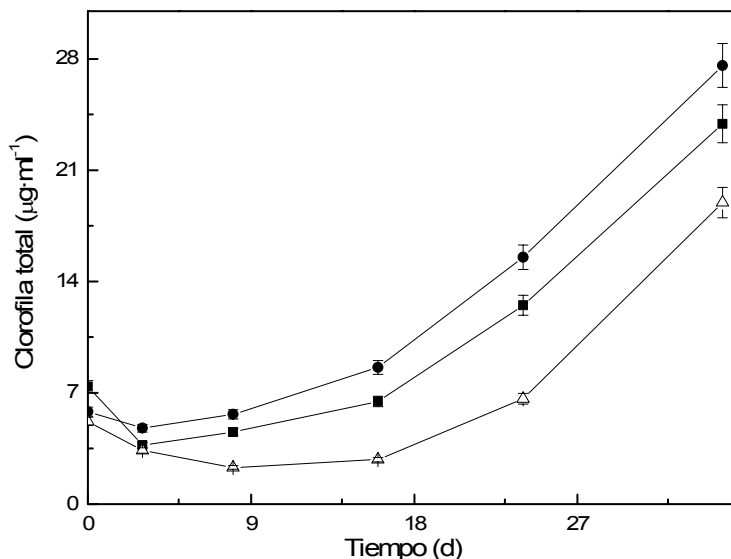


Figura 30. Contenido de clorofila total en cultivos de *D. salina* 184.8 (■), *Dunaliella* EMS (●) y *D. bardawil* (△) crecidos con aire en condiciones exteriores.

Según se infiere de la Figura 30, en los tres primeros días se observa una pequeña recesión del crecimiento en cuanto al nivel de clorofila debido, entre otros factores, a la adaptación a las nuevas condiciones de cultivo. Como veremos posteriormente en el resto de los ensayos, este efecto aparece casi siempre ya que durante los primeros 10 días de incubación, los niveles de clorofila aumentan muy lentamente, con diferencias entre las estirpes comparadas. Finalmente, los cultivos entran en fase de crecimiento exponencial. Las tasas de crecimiento calculadas en cada caso para las diferentes estirpes se presentan en la Tabla 15.

El contenido total de clorofila alcanzado por *Dunaliella* EMS es en todo momento alrededor de un 15% superior respecto al de *D. salina* 184.8. Sin embargo, más significativas son las diferencias observadas respecto a la estirpe madre de la que procede (es decir, *D. bardawil*), ya que en este caso las diferencias llegan a alcanzar valores del 50% en algunas fases del cultivo.

Tabla 15. Tasas de crecimiento calculadas durante la fase de crecimiento exponencial (12 abril – 3 mayo 2005) para las tres estirpes ensayadas.

Estirpe	F. Exponencial (d ⁻¹)
<i>D. salina</i> 184.8	0.062
<i>D. bardawil</i>	0.070
<i>Dunaliella</i> EMS	0.055

El retraso de *D. bardawil* en comenzar el crecimiento exponencial muestra la mayor dificultad de esta microalga para adaptarse a las nuevas

condiciones. Sin embargo, a pesar del prolongado período de aclimatación, el cultivo logró alcanzar en la fase final del experimento una tasa de crecimiento similar a las de las otras dos estirpes.

La comparación de estos resultados con los obtenidos en condiciones de laboratorio evidencia tres hechos: a) *D. bardawil* es la estirpe de *Dunaliella*, de las tres empleadas en esta Tesis, que presenta un crecimiento más lento en exterior; b) *Dunaliella* EMS se revela como la estirpe de crecimiento más rápido; c) *D. bardawil* se aclimata con más dificultad a condiciones ambientales y, por tanto, aparece como menos adecuada para facilitar la operatividad del cultivo en exterior.

2.4.2. Cinéticas de acumulación de carotenoides.

En la Figura 31 se refleja cómo la estirpe mutante alcanza las máximas concentraciones de carotenoides totales a lo largo del experimento, llegando a acumular en torno a unos $45 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de cultivo, lo que representa un 40% y un 70% más de lo observado en *D. bardawil* y *D. salina* 184.8, respectivamente. Los valores obtenidos en *D. salina* 184.8 indican que la mencionada estirpe no presenta una gran capacidad para acumular este tipo de compuestos, al menos en comparación con otras estirpes de *Dunaliella*. Además, el aumento de carotenoides totales en las otras estirpes comienza a ser notablemente superior tras la primera semana de cultivo.

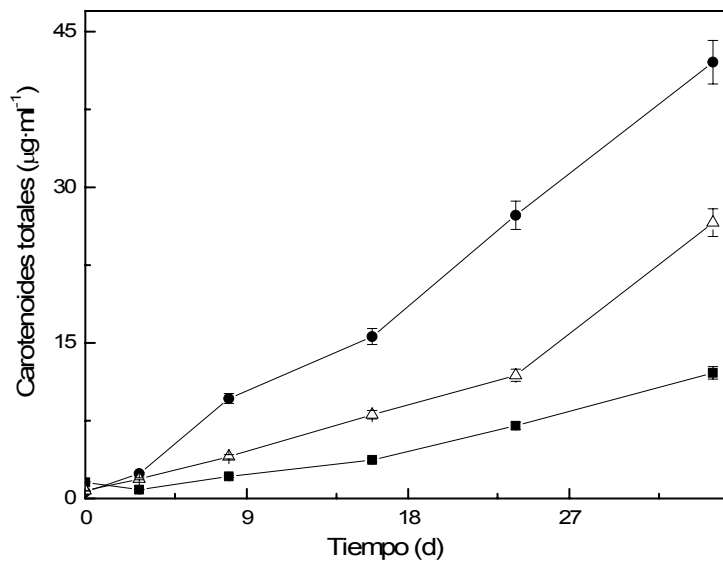


Figura 31. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *D. salina* 184.8 (■), *Dunaliella* EMS (●) y *D. bardawil* (△) crecidos con aire en condiciones exteriores.

La mayor acumulación de carotenoides de *Dunaliella* EMS, por unidad de volumen, no sólo es consecuencia del mayor crecimiento, sino de una mayor acumulación por unidad de biomasa. Los valores máximos de la relación carotenoides:clorofilas (Figura 32) se alcanzan el día 16 de cultivo en las tres estirpes, momento en que se inicia la fase de crecimiento exponencial. A partir de entonces, los valores permanecen prácticamente estables en el caso del mutante (1.7), mientras que para *D. bardawil*, la relación disminuye paulatinamente desde 2.1 hasta 1.4, probable consecuencia del crecimiento tardío. Por otro lado, la relación para *D. salina* 184.8 permanece prácticamente

constante alrededor de 0.55 a partir de la segunda semana, una vez que se ha superado la semana inicial de aclimatación.

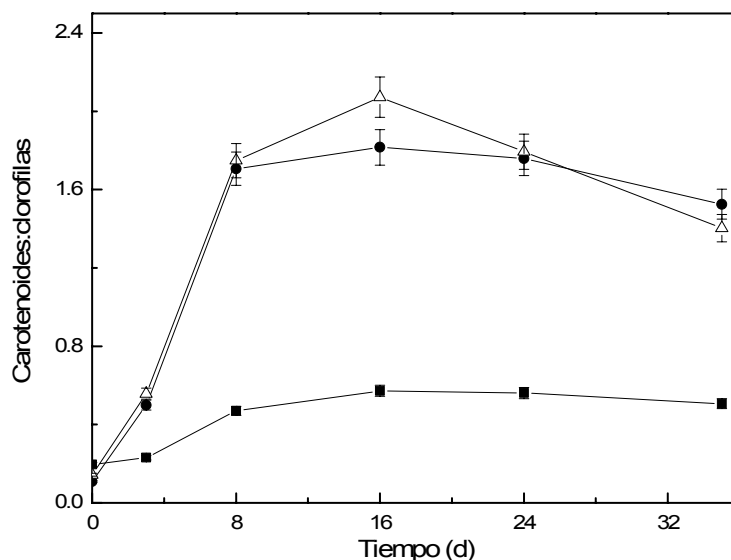


Figura 32. Relación carotenoides: clorofilas en cultivos *D. salina* 184.8 (-■-), *Dunaliella* EMS (-●-) y *D. bardawil* (-△-) crecidas en condiciones exteriores.

De nuevo, la evolución de la relación carotenoides:clorofila puede explicarse en base al criterio expuesto en apartados precedentes. El aumento de la relación hasta el intervalo 1.5 – 1.7 revela que el cultivo sufre un cierto estrés ante la imposición de nuevas condiciones ambientales, especialmente relativas a la luz y la temperatura. La estabilidad de la relación para *D. salina* 184.8, en una situación de viabilidad de los cultivos, vuelve a redundar sobre su menor habilidad natural para acumular carotenoides. Por tanto, los resultados expuestos en las Figuras 31 y 32 muestran con claridad la menor capacidad de *D. salina* 184.8 para acumular carotenoides cuando se cultiva en condiciones exteriores.

La Tabla 16 resume los valores máximos de clorofila y carotenoides totales, así como de la relación carotenoides:clorofila, para las tres estirpes cultivadas en interior y exterior, tras el mismo tiempo de crecimiento, y partiendo de inóculos similares.

Tabla 16. Valores máximos de clorofila (Chl), carotenoides (Caro) y de la relación carotenoides:clorofila (Caro:Chl) obtenidos tras incubar las tres estirpes ensayadas tanto en condiciones de laboratorio como exteriores.

Estirpe	Laboratorio			Exterior		
	Chl ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Caro ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Caro:Chl	Chl ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Caro ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Caro:Chl
<i>D. salina</i> 184.8	23.0	9.0	0.45	23.9	12.1	0.57
<i>D. bardawil</i>	16.4	13.4	0.82	19.0	26.6	2.1
<i>Dunaliella</i> EMS	18.0	9.0	0.50	27.6	42.1	1.8

En conclusión, el resumen de la Tabla 16 muestra con claridad que *Dunaliella* EMS presenta el mejor producto “productividad x contenido en carotenoides” en cultivos que crecen en medio rico en nutrientes, en exterior, con

aire. Por lo tanto, *Dunaliella* EMS es la microalga más idónea, de entre las estudiadas en este trabajo, para abordar estudios de productividad y acumulación de carotenoides en cultivos exteriores. En definitiva, los trabajos realizados mostraron una mayor producción de carotenoides en el mutante debido a un crecimiento más rápido y, además, a un comienzo más temprano de la carotenogénesis.

En la Figura 33, se representa el contenido de carotenoides frente al de clorofila total. De esta forma pueden identificarse los distintos períodos por los que atraviesan los cultivos después de haber iniciado la incubación de las microalgas bajo condiciones climáticas reales. De este tipo de gráficas puede extraerse información adicional sobre si la carotenogénesis ocurre de una forma acentuada y acerca de la intensidad de la fase de aclimatación. En esta representación gráfica, una zona inicial de pendiente negativa indica aclimatación lenta y una segunda zona lineal de alta pendiente revela una carotenogénesis intensa.

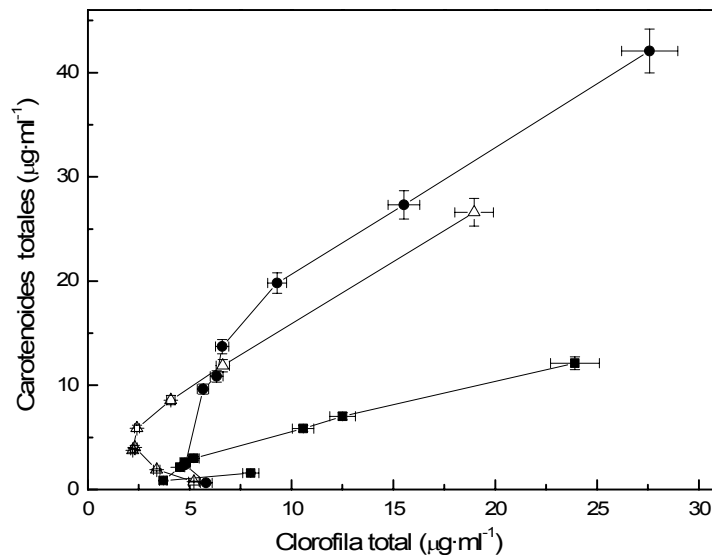


Figura 33A. Contenido de carotenoides totales frente al contenido de clorofila total para las tres estirpes ensayadas en condiciones exteriores: *D. salina* 184.8 (-■-), *Dunaliella* EMS (-●-) y *D. bardawil* (-△-).

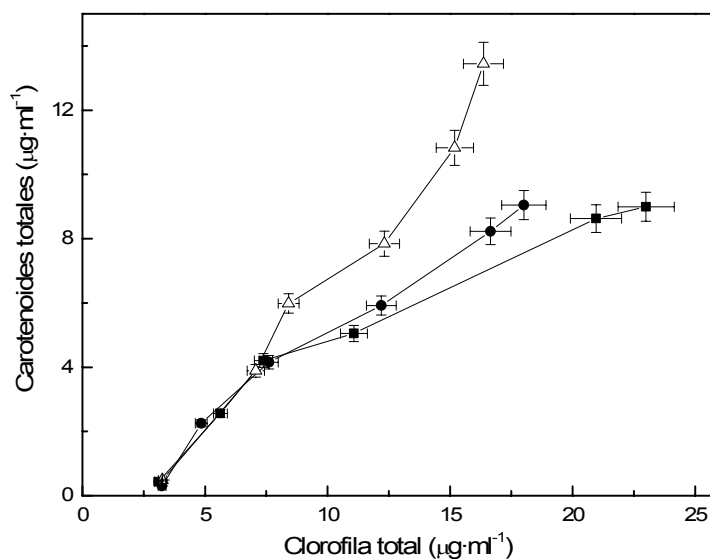


Figura 33B. Contenido de carotenoides totales frente al contenido de clorofila total para las tres estirpes ensayadas en condiciones de laboratorio: *D. salina* 184.8 (-■-), *Dunaliella* EMS (-●-) y *D. bardawil* (-△-).

El perfil observado dependería de cada estirpe y de las condiciones de cultivo (época en la que se cultiva, nutrientes, concentración inicial, disponibilidad de luz, etc.). La Figura 33A muestra una aclimatación más lenta para *D. bardawil* y una carotenogénesis más intensa en el mutante *Dunaliella* EMS. La pendiente de cada curva en la zona lineal, dividida por el tiempo transcurrido entre los puntos extremos de dicho intervalo, permite calcular la velocidad de acumulación de carotenoides correspondiente a la fase de crecimiento, en la que el cultivo se encuentra aclimatado y, por lo tanto, no se ve influenciado por factores de estrés como la propia aclimatación o el agotamiento de nutrientes, entre otros. Los datos del tiempo de aclimatación y de la velocidad de acumulación de carotenoides para las tres estirpes se muestran en la Tabla 17.

Generalmente, el fenómeno de aclimatación delimitado en la figura anterior no suele observarse cuando los cultivos se incuban en laboratorio, con gran parte de las variables controladas. A diferencia de la Figura 33A, en la Figura 33B no se observan tales diferencias en la linealidad de las curvas, indicando una rápida aclimatación de los cultivos a las condiciones de crecimiento, como corresponde a cultivos que no tienen que adaptarse a condiciones distintas de luz o temperatura.

Tabla 17. Tiempos de aclimatación y velocidades de acumulación de carotenoides (V_c ; $\mu\text{g caro} \cdot \mu\text{g chl}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) determinadas, tanto en interior como en exterior, tras el período de aclimatación de las estirpes ensayadas.

Estirpe	Laboratorio		Exterior	
	Aclimatación (días)	V_c	Aclimatación (días)	V_c
<i>D. salina</i> 184.8	0	0.062	8	0.019
<i>D. bardawil</i>	0	0.076	14	0.060
<i>Dunaliella</i> EMS	0	0.063	14	0.064

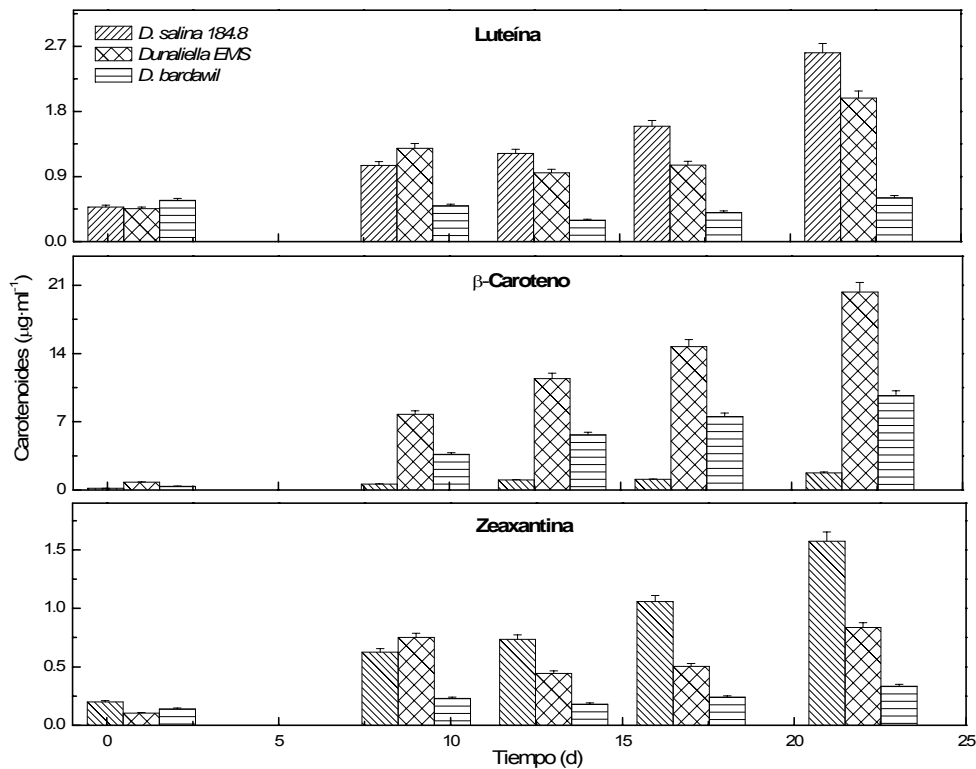


Figura 34. Concentración de luteína, β -caroteno y zeaxantina en cultivos de las tres estirpes de *Dunaliella* ensayadas, incubadas en condiciones exteriores (en la terraza de la Estación de Sondeos Atmosféricos de "El Arenosillo").

Asimismo, además de los datos de carotenoides y clorofila totales, se obtuvieron perfiles de los principales carotenoides identificados mediante HPLC, cuyos valores se representan en la Figura 34.

Los resultados obtenidos confirman lo que ya se había observado en las Figuras 31 y 32. La estirpe *D. salina* 184.8 se muestra como una microalga con mayor tendencia a la acumulación de zeaxantina y luteína. Por el contrario, tanto en *Dunaliella* EMS como en la estirpe de la que procede (*D. bardawil*), la mayor proporción corresponde al β -caroteno.

Si se tienen en cuenta los valores de carotenoides normalizados por la cantidad de clorofila que presenta cada estirpe en cada momento (Tabla 18), se confirma que, por unidad de clorofila, *D. salina* 184.8 acumula más luteína y zeaxantina que las otras dos estirpes. Igualmente, destacan los valores relativos al β -caroteno en *D. bardawil* y *Dunaliella* EMS. Por lo general, el comportamiento entre estas dos estirpes últimas es muy parecido.

Tabla 18. Ratios máximos y promediados de luteína, β -caroteno y zeaxantina, normalizados por unidad de clorofila, para las tres estirpes ensayadas en condiciones exteriores durante las tres primeras semanas de incubación.

PIGMENTO	ESTIRPES		
Luteína:Chl	<i>D. salina</i> 184.8	<i>D. bardawil</i>	<i>Dunaliella</i> EMS
<i>Promedio</i>	0.178	0.133	0.135
<i>Máximo</i>	0.24	0.19	0.21
β-Caroteno:Chl			
<i>Promedio</i>	0.122	1.54	1.18
<i>Máximo</i>	0.17	2.3	1.54
Zeaxantina:Chl			
<i>Promedio</i>	0.11	0.063	0.065
<i>Máximo</i>	0.15	0.09	0.12

En conclusión, de la experimentación realizada se infiere que *Dunaliella* EMS, cultivada en exterior, es una microalga con alta capacidad para la acumulación de β -caroteno, que se aclimata a las condiciones ambientales exteriores con facilidad, lo que la convierte en candidata para procesos discontinuos de producción en condiciones naturales.

2.5. Estudio de estrategias para la estimulación de la productividad y acumulación de carotenoides en *Dunaliella* EMS.

A raíz de la serie de experimentos realizada previamente con tres estirpes de *Dunaliella* tanto en condiciones controladas de laboratorio como en el exterior, bajo la influencia de los ciclos diarios de luz y de temperatura fundamentalmente, factores que afectan de manera importante al crecimiento de microalgas, se optó por seleccionar *Dunaliella* EMS para seguir la investigación, al ser la estirpe que se mostró más prometedora de cara a la producción masiva de carotenoides.

El grueso de los trabajos realizados en la siguiente etapa de experimentación se centrará en analizar qué papel juega la región ultravioleta-visible del espectro solar en la productividad y la estimulación de la

carotenogénesis. Para ello, se han modificado las condiciones radiativas que reciben los cultivos de manera natural, con la intención de identificar qué región espectral influye de manera más directa sobre ambos aspectos.

Además, en otros casos se han realizado ensayos en los que se ha combinado la modificación espectral de la radiación recibida con la limitación de nutrientes. El objetivo de estos experimentos ha sido identificar algún tipo de sinergia entre varios factores que causan estrés oxidativo en las microalgas, produciéndose por tanto la síntesis de carotenoides como principal respuesta biológica.

Antes de iniciar estos estudios que implicaron la modificación de las condiciones radiativas de cultivo, se caracterizó el comportamiento de *Dunaliella* EMS en función de la salinidad del medio de cultivo, al ser ésta una condición de cultivo determinante en la estimulación de la acumulación de carotenoides.

2.5.1. Efecto de la salinidad del medio de cultivo en la productividad y acumulación de carotenoides.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos tras cultivar *Dunaliella* EMS en medios con diferentes concentraciones salinas (2M, 3M, 4M y 5M). Ya se ha comentado en la Introducción la importancia de este factor para asegurar un adecuado desarrollo de los cultivos e inducir acumulaciones masivas de carotenoides, bajo altas concentraciones de sal. En *D. salina*, el óptimo de salinidad para el crecimiento se encuentra entre el 18 y el 22% de sal, mientras que el óptimo de salinidad para la producción de carotenoides es superior a un 27% de NaCl (Borowitzka et al. 1984).

Cinéticas de crecimiento

Durante casi 4 semanas se incubaron, en cámara de laboratorio, cultivos de *Dunaliella* EMS a las concentraciones de sal indicadas, bajo una temperatura constante de 25 °C y una densidad de flujo fotónico de 150 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El gaseo proporcionado consistió en una mezcla de aire enriquecida al 5% en CO₂. Los inóculos se obtuvieron a partir de un cultivo madre en fase exponencial para lograr alcanzar una concentración inicial de clorofila alrededor de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El volumen ensayado en cada caso fue de 250 ml.

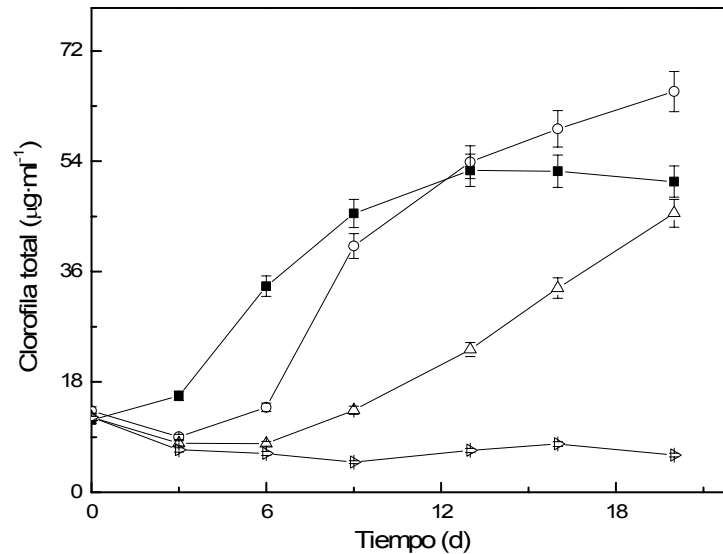


Figura 35. Contenido en clorofila total en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en diferentes concentraciones salinas: 2M (- ■ -), 3M (- ○ -), 4M (- △ -) y 5M (- ▷ -).

Cuando los cultivos se incuban en medios con una concentración molar de sal óptima para el cultivo de estirpes del género *Dunaliella*, es decir, 2M, éstos reproducen perfectamente las distintas etapas de crecimiento (Figura 35). En este sentido, puede observarse que la fase de adaptación a las nuevas condiciones de incubación apenas dura 3 días en el caso del control, mientras que en el resto de cultivos, ésta se alarga hasta el día 6. El cultivo incubado en la mayor concentración salina ensayada (5 M) no muestra crecimiento a lo largo del experimento.

La producción de biomasa, medida como contenido en clorofila, varía al aumentar la concentración de sal. El cultivo incubado a una concentración 2M alcanza la fase estacionaria al cabo de 12 días, llegando a presentar alrededor de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de clorofila total. En el cultivo con 3M de sal, la cantidad de biomasa alcanzada tras 18 días de incubación supera, en un 20%, la del cultivo control.

Cinéticas de acumulación de carotenoides

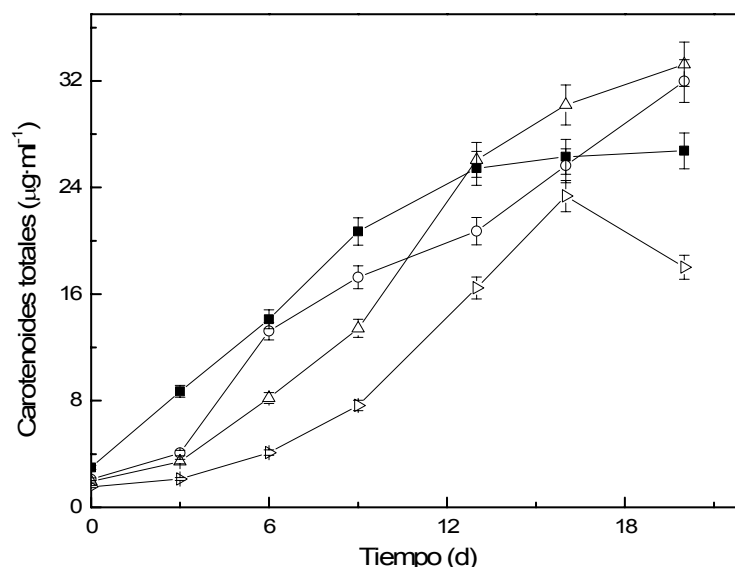


Figura 36. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en diferentes concentraciones salinas: 2M (- ■ -), 3M (- ○ -), 4M (- △ -) y 5M (- ▷ -).

La acumulación de carotenoides se muestra en la Figura 36. En general, las diferencias existentes entre los cultivos incubados en diferentes concentraciones de sal se minimizan. Aún así, durante las dos primeras semanas, el cultivo con 2M de sal presenta una mayor acumulación de carotenoides, alcanzando los $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a los 10 días de incubación. Sin embargo, a partir de la tercera semana, son los cultivos incubados con 3M y 4M de sal los que presentan una mayor acumulación de carotenoides, llegando a alcanzar concentraciones de $32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a la finalización del ensayo, lo que supone un 20% más de lo observado en el cultivo control. El cultivo con mayor cantidad de sal (5M) también sufre carotenogénesis, pero a un ritmo inferior, no observándose un aumento exponencial hasta la segunda semana, consecuencia de la baja viabilidad celular (Figura 35), debida al estrés producido por la alta concentración de sal. Dicho estrés es similar al generado por la ausencia de nitrógeno inorgánico, que induce la acumulación masiva de carotenoides en un cultivo con viabilidad limitada.

Tabla 19. Tasas de crecimiento y relaciones máximas de carotenoides:clorofila observadas durante la fase exponencial de crecimiento en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en diferentes concentraciones de sal.

Concentración de sal	Tasa de crecimiento (d^{-1})	Carotenoides:clorofila
2M	0.12	0.55
3M	0.19	0.95
4M	0.12	1.12
5M	0	2.96

La Tabla 19 recoge los valores de las tasas de crecimiento de los cultivos crecidos en distintas concentraciones de sal y las relaciones máximas de carotenoides:clorofila calculadas durante la fase exponencial. Los datos confirman que la mayor velocidad de crecimiento tiene lugar cuando el mutante de *D. bardawil* (*Dunaliella* EMS) se cultiva en un medio con una concentración salina 1.5 veces superior a la óptima de crecimiento (2M) que figura en la bibliografía relativa al cultivo de estirpes del género *Dunaliella*. Además, la relación carotenoides:clorofila revela el estado de alto estrés oxidativo del cultivo con 5M de sal.

En conclusión, los resultados presentados en este apartado ponen de manifiesto la idoneidad de cultivar *Dunaliella* EMS en concentraciones de sal cercanas a 3M, bajo las que presenta una tasa de crecimiento significativamente superior. Una concentración de sal 4M tampoco parece afectar especialmente la viabilidad del cultivo y estimula la mayor acumulación de carotenoides, por lo que podría ser adecuada para estimular la acumulación masiva en la fase de producción.

2.5.2. Efecto de la radiación UV sobre la productividad y acumulación de carotenoides de *Dunaliella* EMS en condiciones exteriores.

En este experimento se incubó *Dunaliella* EMS tanto en medio de cultivo estándar con plenitud de nutrientes como en carencia total de nitrógeno inorgánico. Asimismo, colocando filtros con diferentes características ópticas recubriendo los tubos cilíndrico-cónicos (ver Materiales y Métodos), se modificó la calidad de la radiación ultravioleta que recibieron los cultivos. Se ubicaron en el exterior seis cultivos de 250 ml agitados mediante burbujeo con aire y sometidos a las variaciones diarias de luz y temperatura. De los filtros empleados, uno retenía la radiación UV en su totalidad (transmitía toda la región

PAR) y otro parcialmente (región UV-B). Además, también se aplicó un filtro “transparente” (permite pasar toda la región UV) para analizar la posible aparición de efectos relacionados con la propia naturaleza del filtro (efectos indirectos sobre la temperatura, disminución de las dosis recibidas, etc.). La concentración inicial del inóculo obtenido a partir del cultivo madre en fase exponencial fue de $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de clorofila total. El ensayo se desarrolló entre el 4 de mayo y el 14 de junio del año 2005.

Cinéticas de crecimiento

De la Figura 37 se desprende que los cultivos presentaron una etapa de adaptación a las nuevas condiciones de incubación de alrededor de dos semanas. En este período, el nivel de clorofila en las tres condiciones lumínicas permaneció estable sobre los $7\text{-}8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de clorofila total, comenzando la fase exponencial de crecimiento del cultivo a partir de la tercera semana. Si bien esta fase exponencial comenzó al mismo tiempo para todos los cultivos, se observan diferencias en cuanto al final de esta etapa del crecimiento, prolongándose en el caso del cultivo incubado en ausencia total de radiación ultravioleta, 5 y 7 días respecto a los que crecen bajo radiaciones PAR + UV-A, y todo el espectro, respectivamente. Esto, como es lógico, se traduce en una mayor concentración de biomasa en el cultivo que no recibe radiación UV (PAR) al final del experimento. Las diferencias relativas, respecto a la concentración de clorofila, existentes entre el cultivo que no recibe radiación UV durante su crecimiento y aquellos que bien reciben todo el espectro solar disponible (PAR + UV-A + UV-B) o no están protegidos frente a la radiación UV-B, son del 15 y 20% respectivamente.

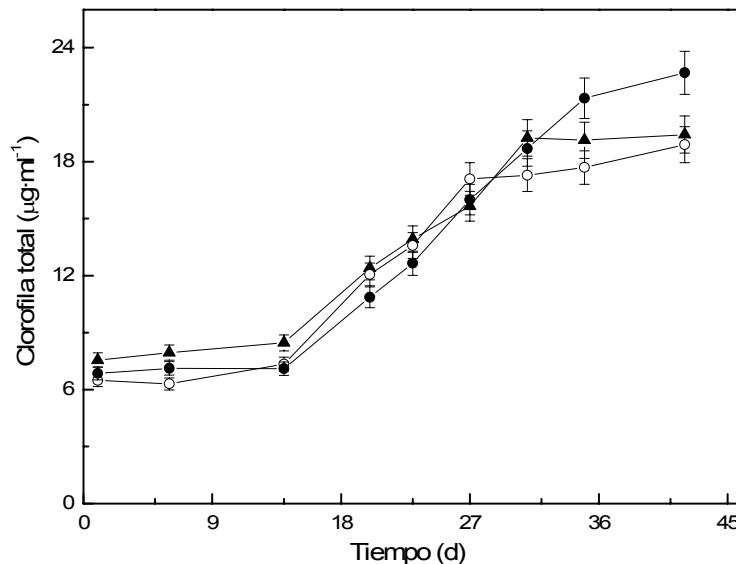


Figura 37. Contenido de clorofila total en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores durante mayo y junio de 2005, recibiendo distintas regiones del espectro ultravioleta: PAR + UV (○), PAR + UV-A (▲) y PAR (●).

Asimismo, en la etapa exponencial, se calcularon las tasas de crecimiento obtenidas en los diferentes ambientes lumínicos, cuyos resultados se exponen a continuación, en la Tabla 20.

Tabla 20. Tasas de crecimiento calculadas durante el intervalo correspondiente a la fase exponencial (17 mayo – 7 junio 2005) de cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo diferentes condiciones radiativas.

Condiciones Radiativas	Tasa de crecimiento (d^{-1})
PAR + UV	0.048
PAR + UV-A	0.065
PAR	0.052

Aunque al final del experimento la cantidad de clorofila presente en el cultivo que no recibe radiación ultravioleta es sensiblemente superior a la de aquellos incubados en presencia total o parcial de radiación ultravioleta, la tasa de crecimiento más alta se observa bajo ausencia de radiación UV-B. Esto podría significar que la atenuación de esta radiación oxidante estimula el crecimiento ya que disminuye la producción de especies oxidantes (radicales libres de oxígeno, fundamentalmente) y el consiguiente efecto oxidativo que éstas producen en la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis (Foyer et al. 1994; Martínez 2007; Roncarati et al. 2008). Ello justificaría que la tasa de crecimiento sea, sin radiación UV-B, un 20% superior respecto a la del cultivo que solo recibe luz fotosintéticamente activa.

Cinéticas de acumulación de carotenoides

En el mismo experimento se analizó el contenido de carotenoides totales. Los resultados se muestran en la Figura 38, donde se observa la habitual tendencia creciente de acumulación de carotenoides, paralela al crecimiento de los cultivos.

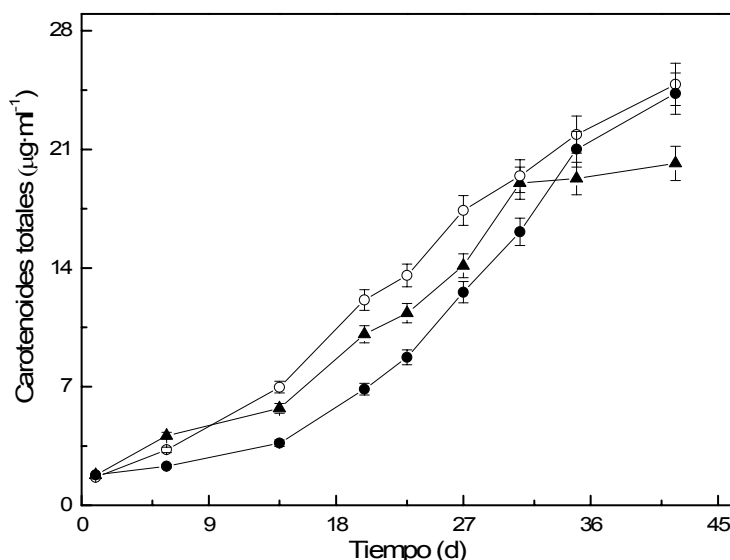


Figura 38. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores durante mayo y junio de 2005, recibiendo distintas regiones del espectro ultravioleta: PAR + UV (- ○ -), PAR + UV-A (- ▲ -) y PAR (- ● -).

Durante gran parte del ensayo, concretamente en el período correspondiente a la fase de crecimiento exponencial, se observaron diferencias significativas entre los cultivos en función de la calidad de la radiación recibida. En este sentido, el cultivo protegido frente a la radiación ultravioleta total (PAR), tardó algo más (una semana) en aumentar su tasa de acumulación de

carotenoides que los cultivos que recibieron parte o todo el espectro de radiación UV. El cultivo que recibió todo el espectro (PAR + UV) presentó una tasa alta desde los primeros días (0.11 d^{-1}). Algo similar ocurrió en el cultivo incubado bajo radiación PAR y UV-A, si bien, en este caso, dicha tasa fue algo inferior (0.090 d^{-1}). La tasa de acumulación de carotenoides para el cultivo que sólo recibió radiación PAR fue 0.055 d^{-1} durante las dos primeras semanas.

En la fase exponencial, por tanto, el cultivo que recibió toda la radiación ultravioleta presentó una acumulación de carotenoides ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 1.25 veces superior a la observada en aquel que no recibió nada de UV. El cultivo que recibió radiación UV-A pero no la más dañina, UV-B, mostró unos niveles intermedios de acumulación de carotenoides totales. También es destacable cómo las diferencias se minimizaron al terminar el experimento, si bien en el cultivo que no recibió radiación UV-B (PAR + UV-A), la acumulación se estancó antes que en el resto (en torno al día 31 de incubación), siendo finalmente la menor de todos los cultivos.

En la Tabla 21 se muestran las relaciones carotenoides:clorofila obtenidas para *Dunaliella* EMS cuando se incubaba en diferentes condiciones de radiación ultravioleta.

Tabla 21. Relaciones carotenoides:clorofila, promedios y máximas, alcanzadas durante la fase exponencial (17 mayo – 7 junio 2005) de cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo diferentes condiciones radiativas.

Condiciones Radiativas	Promedio	Máxima
PAR + UV	0.933	1.30
PAR + UV-A	0.798	1.15
PAR	0.681	1.07

Los datos de la Figura 38 y de la Tabla 21 reflejan, en definitiva, que la presencia de radiación ultravioleta (UV-A + UV-B) estimula la carotenogénesis de manera continuada durante el crecimiento de *Dunaliella* EMS en medio estándar, puesto que su valor promedio y máximo es el más alto de todos. Conforme el cultivo va recibiendo menos radiación ultravioleta, esta relación disminuye.

Este hecho se relaciona con la capacidad de las microalgas para sintetizar carotenoides como respuesta al exceso de radiación oxidante, no aprovechable por las clorofilas para realizar la fotosíntesis. Sin embargo, las rutas del metabolismo secundario responsables de la biosíntesis de tales antioxidantes se activan si dichas condiciones radiativas permiten la viabilidad de los cultivos (Krishna y Mohanty 1998; Agrawal y Pal 2003; van de Poll et al. 2005).

Para determinar si la calidad de la radiación influye en el tipo de carotenoides sintetizados, se analizaron una serie de muestras de cada cultivo mediante técnicas de HPLC (ver Materiales y Métodos). Se tomaron muestras en cada una de las etapas del crecimiento por las que atravesó cada cultivo bajo los escenarios lumínicos descritos, es decir, en la fase de latencia, al inicio de la fase exponencial, al término de ésta y al comienzo de la fase estacionaria (Figura 39).

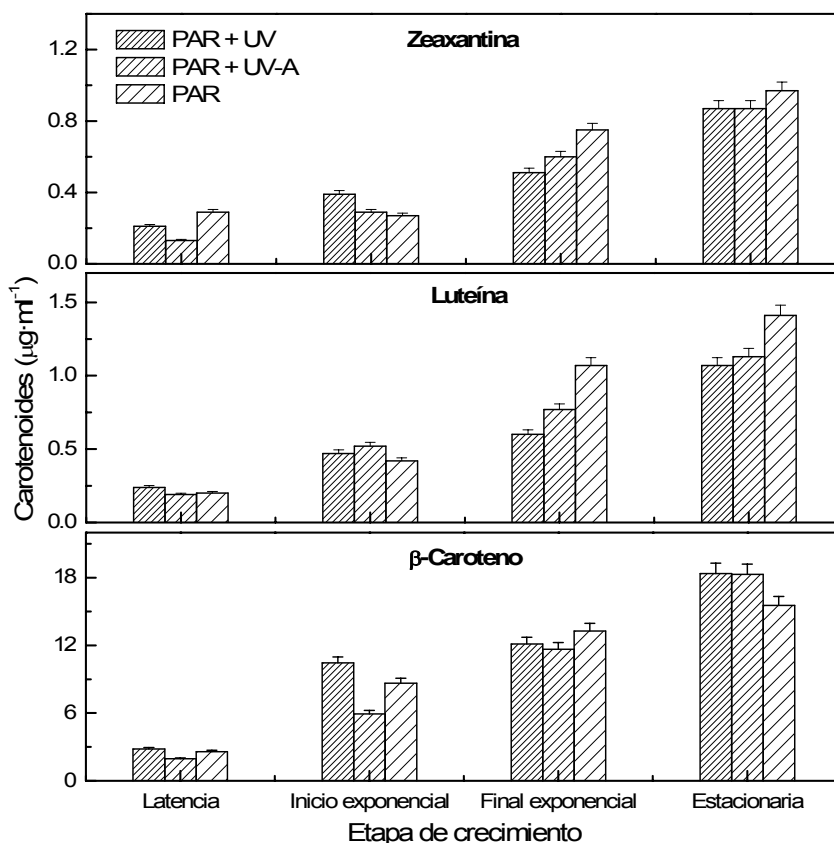


Figura 39. Concentración de zeaxantina, luteína y β -caroteno en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores desde el 4 de mayo al 14 de junio del año 2005, en función de la radiación recibida y la etapa de crecimiento considerada.

En general, en ausencia de radiación ultravioleta (UV), la acumulación de zeaxantina y luteína es más rápida y mayor, lo que es consistente con lo publicado por algunos autores (Bioschof et al. 1998; 2002). Sin embargo, la acumulación de β -caroteno al inicio de la fase de crecimiento exponencial en los cultivos que recibieron radiación UV total destacó por encima de los demás cultivos, que no estuvieron sometidos a tal estrés. Al final del experimento, las diferencias se minimizaron. Los resultados sugieren un papel estimulador de la radiación UV-B sobre la acumulación de carotenoides, que requiere previamente la adaptación del cultivo a tales condiciones de luz.

La comparación de estos resultados con los obtenidos en laboratorio bajo radiación UV-B (apartado 2.3), demuestra que la viabilidad o no de los cultivos depende de la relación UV-B/PAR; irradiancias UV-B inferiores a la solar pueden inhibir el crecimiento con un PAR bajo, mientras que un PAR alto amortigua el efecto letal de una irradiancia UV-B relativamente alta sobre la viabilidad del cultivo. Por tanto, es la modulación de la radiación UV-B respecto al PAR lo que permite utilizarla como factor de estrés para estimular la acumulación de carotenoides.

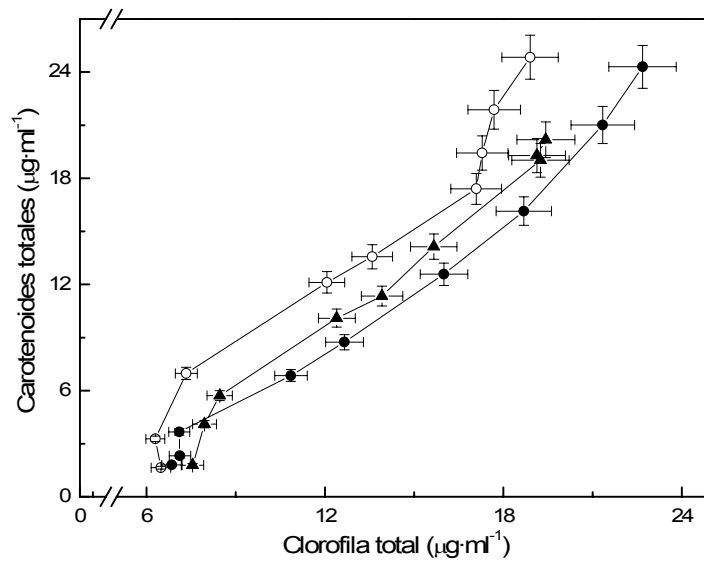


Figura 40. Contenido de carotenoides totales frente al contenido de clorofila total para cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores bajo radiaciones PAR (-●-), PAR + UV-A (-▲-) y PAR + UV (-○-).

En la Figura 40 se aprecian tres zonas bien definidas; una primera de adaptación (clorofila entre 6 y 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), que comprende las dos primeras semanas; una segunda correspondiente a la primera parte de la fase exponencial (clorofila entre 9 y 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), en la que se observan aumentos lineales en las concentraciones de clorofila y carotenoides (3^a y 4^a semana) y una última en la que los cultivos de *Dunaliella* EMS presentan concentraciones más altas de clorofila y tienden a sintetizar un mayor contenido de carotenoides. Los valores de las pendientes obtenidas en cada una de las zonas especificadas, divididos por el tiempo, permitieron obtener la velocidad de acumulación de carotenoides. Los datos obtenidos se exponen en la Tabla 22.

Tabla 22. Velocidades de acumulación de carotenoides observadas en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores bajo diferentes condiciones radiativas.

Condiciones Radiativas	Adaptación ($\mu\text{g caro}\cdot\mu\text{g chl}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	Baja Clorofila ($\mu\text{g caro}\cdot\mu\text{g chl}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	Alta Clorofila ($\mu\text{g caro}\cdot\mu\text{g chl}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)
PAR + UV	0.067	0.082	0.274
PAR + UV-A	0.309	0.072	0.592
PAR	0.533	0.063	0.185

El bajo valor en la velocidad de acumulación de carotenoides obtenido en la zona de alta clorofila para el cultivo que sólo recibe radiación fotosintéticamente activa (PAR) indica una mejor capacidad para extender su fase de crecimiento exponencial cuando los otros cultivos ya se encuentran en fase estacionaria. Esto es debido, entre otras razones, a la ausencia de la acción oxidante provocada por la presencia de radiaciones UV-A y UV-B.

En conclusión, el crecimiento más eficiente de *Dunaliella* EMS en exterior se obtiene en ausencia de radiación UV, mientras que la mayor acumulación de carotenoides ocurre cuando los cultivos reciben todo el espectro de radiación UV.

Incubación en condiciones limitantes de nitrógeno inorgánico

Para averiguar las posibles sinergias existentes entre dos factores de estrés, por un lado, la presencia de radiaciones oxidantes, y por otro, la ausencia de un nutriente esencial como el nitrógeno, se colocaron en la terraza de la Estación de Sondeos Atmosféricos de “El Arenosillo” una serie de cultivos incubados bajo las diferentes condiciones de radiación ya mencionadas (PAR, PAR + UV-A y PAR + UV), pero además, se eliminó el nitrógeno inorgánico del medio de cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 41.

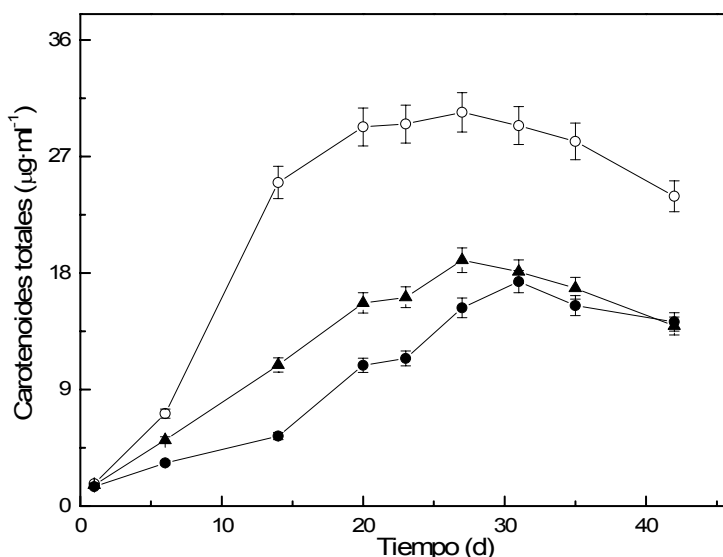


Figura 41. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores, en ausencia total de N, bajo radiación PAR (●), PAR + UV-A (▲) y PAR + UV (○).

La Figura revela un claro efecto sinérgico de la presencia de radiación UV en combinación con la limitación de nitrógeno inorgánico sobre la acumulación de carotenoides. La máxima producción de carotenoides se da en aquellos cultivos que reciben todo el espectro solar disponible y se incuban en ausencia de nitrógeno. Además, la gran diferencia entre los niveles mostrados por estos cultivos (PAR + UV) y aquellos que recibieron PAR + UV-A, indica un fuerte papel estimulador de la acumulación de carotenoides por la radiación UV-B, confirmando lo observado durante el crecimiento respecto a la evolución de carotenoides totales e incidiendo en la relevancia de la relación UV-B/PAR de cara a la estimulación de dicha acumulación.

Ya se ha constatado cómo las diferencias existentes no son tan notables cuando las microalgas se cultivan en medio estándar con plenitud de nutrientes (Figura 38). Sin embargo, la aplicación de un factor de estrés como la limitación de nitrógeno, que supone una estrategia metodológica ampliamente utilizada (Orosa et al. 2000; León et al. 2005; Jin et al. 2006) para estimular la síntesis de carotenoides, propicia una mayor actividad de las rutas metabólicas secundarias responsables del aumento de estas moléculas (Giuliano et al. 2008), singularmente potenciada en presencia de radiación UV-B.

La máxima concentración de carotenoides totales y del pigmento mayoritario, es decir, el β -caroteno, se alcanza antes también en los cultivos que reciben PAR + UV (día 20), en comparación al resto de cultivos que crecen bajo las demás condiciones, los cuales llegan a su máximo diez días después.

Por tanto, los resultados sugieren que, en cultivo exterior, la combinación de la ausencia de nitrógeno e iluminación con todo el espectro de radiación solar UV podría ser la estrategia más eficiente en procesos de producción de carotenoides, en exterior, a partir de cultivos de *Dunaliella* EMS, precedida de una fase de crecimiento en ausencia de radiación UV.

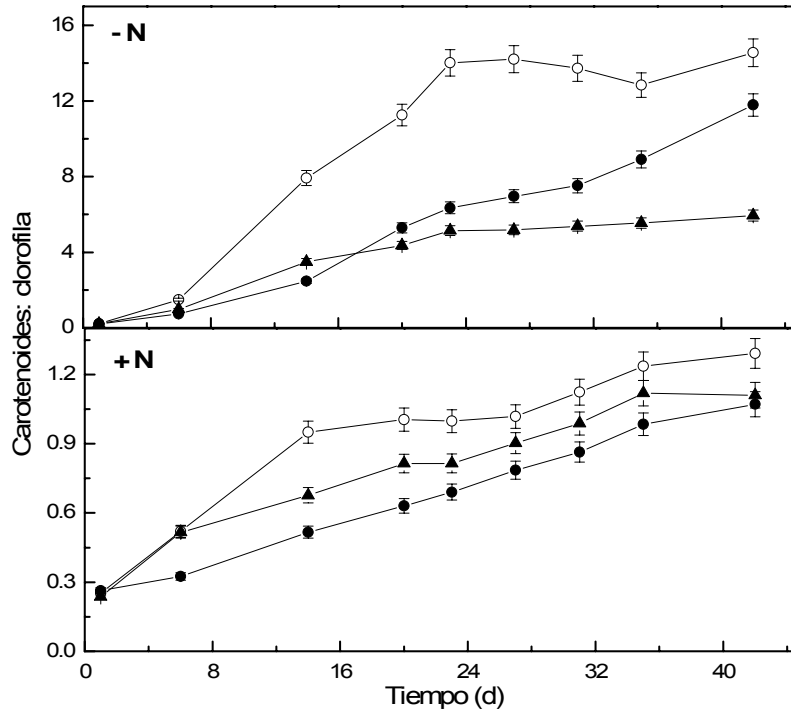


Figura 42. Relación carotenoides:clorofila en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores tanto en carencia de nitrógeno inorgánico (-N) como en plenitud de nutrientes (+N), en función de distintas condiciones de radiación: PAR + UV (○), PAR + UV-A (▲) y PAR (●).

Como era de esperar tras los resultados anteriores, las relaciones carotenoides:clorofila obtenidas bajo plenitud de nutrientes, mostraron valores más altos en los cultivos que recibieron PAR + UV en comparación con aquellos que sólo aprovecharon la región PAR del espectro (Figura 42). En limitación de nitrógeno, la relación obtenida para los cultivos que aprovecharon las radiaciones PAR y UV fue también la más elevada. Estos resultados evidencian el efecto sinérgico de la ausencia de nitrógeno inorgánico y la radiación UV-B sobre la velocidad y la magnitud del pool de carotenoides acumulados.

El análisis cualitativo de los carotenoides producidos se muestra en la Figura 43, que recoge los datos de la acumulación, normalizada por unidad de biomasa, de los principales carotenoides de *Dunaliella* EMS, en cultivos incubados en carencia de nitrógeno, así como la de aquellos crecidos en medio estándar. De la misma, se infiere que, en ambas condiciones de incubación, el carotenoide que se acumula de forma mayoritaria es el β -caroteno. Además, la tendencia de acumulación de luteína es totalmente contrapuesta cuando se elimina el nitrógeno inorgánico del medio. Así, cuando los cultivos se incubaron en medio estándar con plenitud de nutrientes, la concentración de luteína se incrementó, al final del experimento, 5 veces respecto a las observadas en ausencia de nitrógeno en el medio (datos no mostrados). En el caso del β -caroteno ocurrió lo contrario, es decir, la aplicación de dos factores de estrés como la limitación de nitrógeno y la presencia de radiaciones de la región

ultravioleta, provocó que la cantidad final de β -caroteno acumulado fuese el doble de la observada en los cultivos incubados en medio estándar.

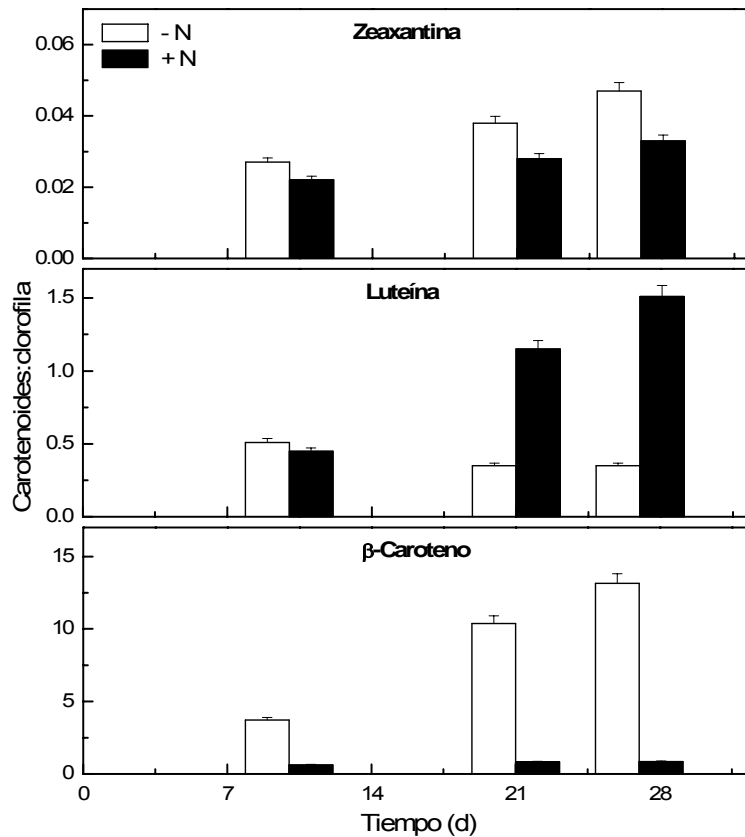


Figura 43. Acumulación específica de zeaxantina, luteína y β -caroteno, por unidad de biomasa (Chl), en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores recibiendo todo el espectro (PAR + UV) tanto en medio estándar de cultivo (■) como en carencia nutricional de N (□). Concentraciones al final del ensayo: β -caroteno, $14.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (PAR + UV +N) y $28.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (PAR + UV - N); luteína, $0.36 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (PAR + UV + N) y $1.50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (PAR + UV - N).

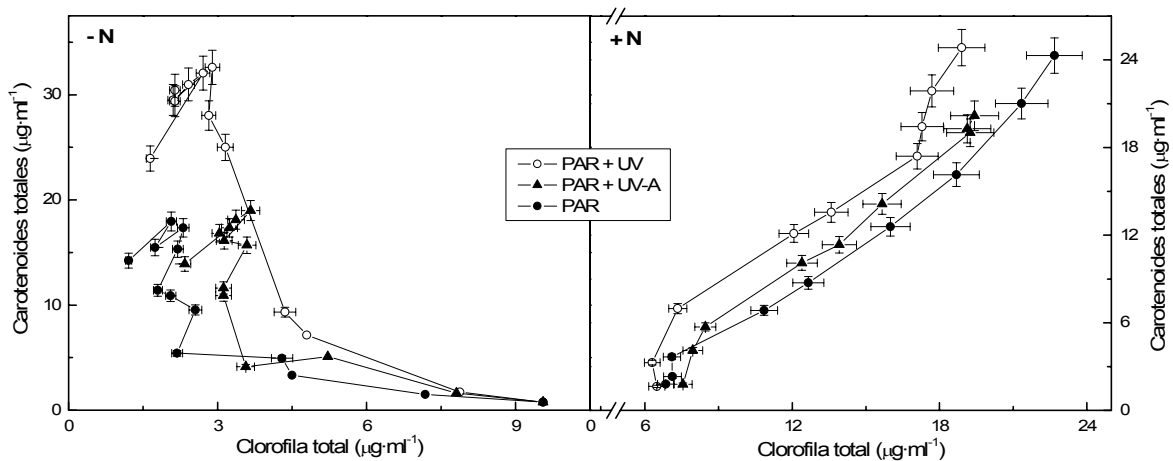


Figura 44. Contenido de carotenoides totales frente al contenido de clorofila total en cultivos de *Dunaliella* EMS expuestos a diferentes condiciones de radiación UV tanto en medio estándar (+ N) como en condiciones limitantes de N (- N).

La Figura 44 expone las evoluciones contrapuestas de la cantidad total de clorofila y de carotenoides totales en una y otra situación, es decir, cuando los cultivos se incuban en un medio pleno de nutrientes y cuando son crecidos en

ausencia de nitrógeno inorgánico, revelando que la mayor acumulación de carotenoides se produce, como es lógico, en cultivos que pierden viabilidad como consecuencia de la carencia de nitrógeno.

2.5.3. Efecto de la región espectral visible (PAR) sobre la productividad y acumulación de carotenoides en condiciones de laboratorio.

Hasta ahora se ha analizado la influencia que las distintas regiones del espectro de radiación ultravioleta que se recibe a nivel superficial tienen sobre la producción de biomasa y la síntesis de pigmentos de interés biotecnológico, sin alterar la región PAR. En los experimentos que se muestran a continuación, se ha alterado, en laboratorio, el espectro visible (PAR) que reciben las microalgas para comprobar los efectos que estas modificaciones ejercen sobre la producción de biomasa y la acumulación de carotenoides. Los organismos fotosintéticos, incluyendo por tanto las microalgas, hacen uso de esta región espectral para realizar la transducción de parte de la energía lumínica incidente en energía química, que termina materializándose en compuestos orgánicos constituidos principalmente de carbono, hidrógeno y oxígeno. Sin embargo, sólo algunas zonas del espectro PAR son plenamente útiles para la fotosíntesis (Han et al. 2003; Scott et al. 2006; Matsuda et al. 2007).

La razón para la realización de dichos controles de laboratorio fue conocer, bajo condiciones de cultivo muy controladas y con anterioridad a los ensayos de modificación del PAR en cultivos exteriores, si el crecimiento y acumulación de carotenoides en cultivos de *Dunaliella* EMS irradiados con diferentes regiones del PAR podrían resultar afectados cualitativamente.

Para conocer las distintas zonas del PAR emitidas por las lámparas de la cámara de cultivo, se caracterizó su distribución espectral, con ayuda de un espectrorradiómetro (Figura 45A). De la observación del espectro se estimó más adecuado estudiar en cámara de cultivo únicamente la influencia de un filtro amarillo (atenúa la región azul de 400 a 500 nm), que transmitía la región espectral comprendida entre 500 y 700 nm, donde se produce la absorción de las clorofilas.

No obstante, aunque no se muestran los resultados en esta Tesis, se realizaron experimentos previos en cámara, también con filtros rojo, verde y azul, que no rindieron resultados relevantes que merezcan ser descritos aquí con algún detalle. Son fundamentalmente dos las razones por las que consideramos que los resultados derivados del uso de filtros rojo, verde y azul en cámara de cultivo no pueden discutirse de una forma amplia, con proyección hacia su aplicación en cultivos exteriores: de una parte, la forma del espectro emitida por las lámparas de la cámara de cultivo difiere extraordinariamente de la de la radiación solar (Figura 45B), y de otra parte, la atenuación que los filtros provocan sobre las bajas irradiancias PAR que se emiten en cámara, de lo que se deriva una disponibilidad de luz visible muy limitada para el crecimiento de los cultivos de *Dunaliella* EMS.

De ahora en adelante, cada cultivo ensayado se referirá por el color del filtro aplicado (p.e cultivo 'Azul', cultivo 'Amarillo', etc.).

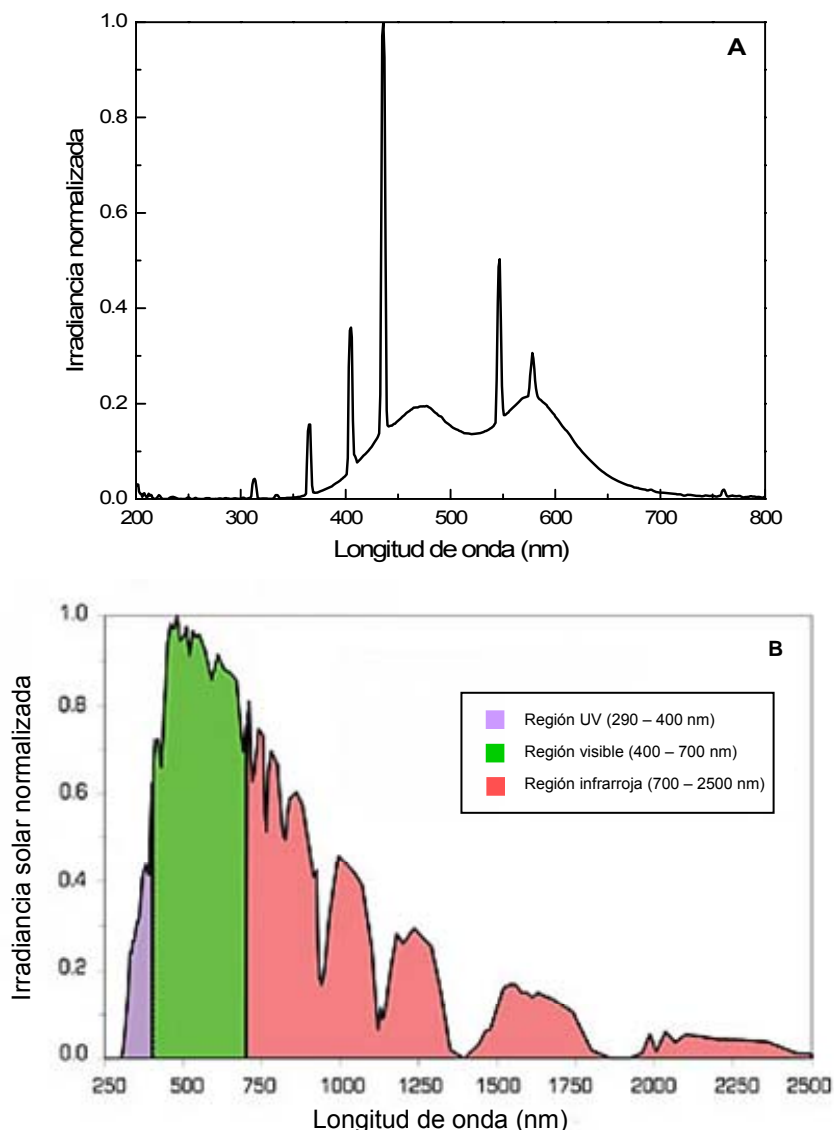


Figura 45. Espectros de irradiancia normalizados, emitidos por lámparas Philips 30W/33 (A) y el sol (B).

A continuación se exponen, con la intención de evaluar la máxima producción de carotenoides, los resultados correspondientes a experimentos con cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones controladas de laboratorio en medio estándar y a aquellos en los que se combinaron dos factores de estrés: la modificación de la región PAR del espectro y la limitación del nitrógeno inorgánico presente en el medio.

Cinéticas de crecimiento

Para modificar la radiación visible incidente en los cultivos se emplearon diversos papeles de celofán de colores caracterizados por una transmitancia específica, dejando pasar una determinada ventana espectral, reteniendo y/o reflejando el resto (ver Materiales y Métodos).

En la cámara de cultivo disponible en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva, se incubaron distintos cultivos de *Dunaliella* EMS en medio estándar con plenitud de nutrientes. Los ensayos mantuvieron unas condiciones controladas de

incubación que fueron las siguientes: iluminación continua con lámparas blancas que irradiaban $150 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR, temperatura constante (25°C) y gaseo mediante mezcla de aire enriquecida al 5% en CO_2 . El cultivo madre se tomó en fase exponencial y los inóculos iniciales tuvieron una concentración cercana a los $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de clorofila total.

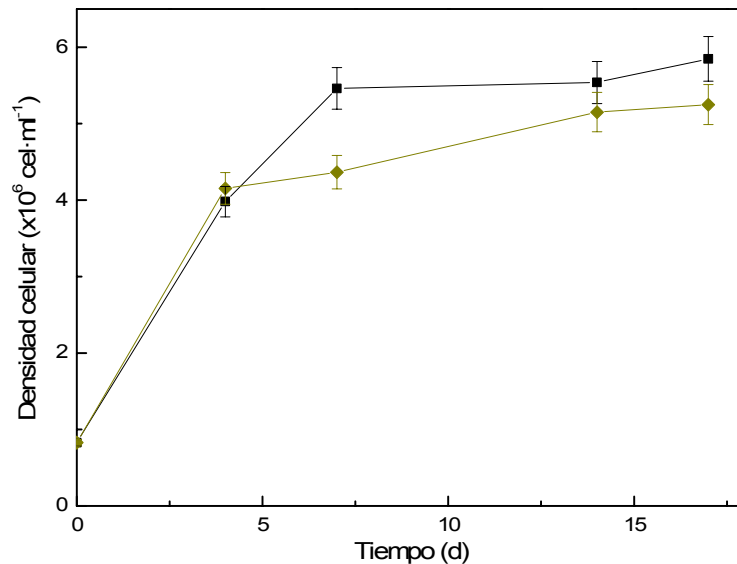


Figura 46. Crecimiento celular de los cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo radiaciones PAR de diferente calidad espectral en condiciones de laboratorio. Control (\blacksquare) y 'Amarillo' (\blacklozenge).

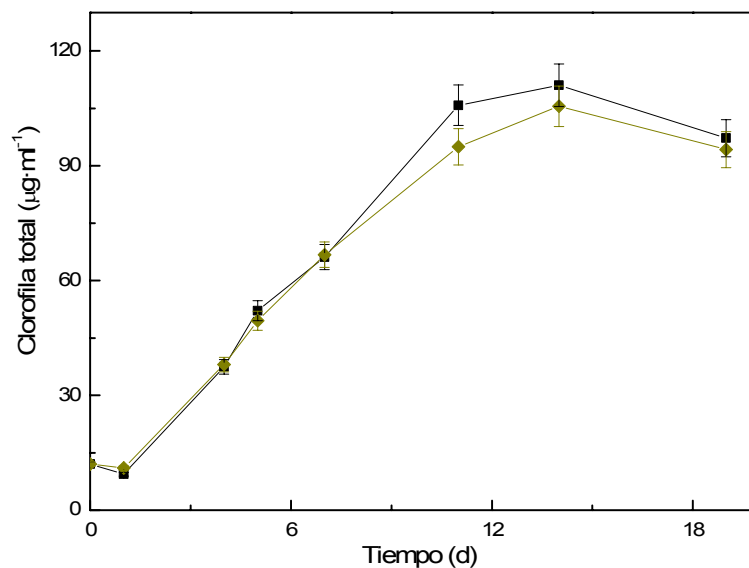


Figura 47. Contenido de clorofila total en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo radiaciones PAR de diferente calidad espectral en condiciones de laboratorio. Control (\blacksquare) y 'Amarillo' (\blacklozenge).

La evolución del número de células y de la clorofila de los cultivos se recoge en las Figuras 46 y 47. Durante la primera semana de incubación puede observarse cómo los cultivos mostraron una evolución similar en cuanto al número de células y, especialmente, en cuanto al contenido celular en clorofila. Por tanto, la atenuación, en cámara de laboratorio, de la zona azul del espectro visible, no afecta negativamente al crecimiento de *Dunaliella* EMS.

Durante la primera semana de cultivo, en la fase de crecimiento exponencial, se calcularon las tasas de crecimiento, cuyos valores se exponen en la Tabla 23.

Tabla 23. Tasas de crecimiento calculadas durante la fase exponencial de crecimiento en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo distintas regiones espectrales de PAR en condiciones de laboratorio.

Cultivo	Tasa de crecimiento (d^{-1})
Control	0.27
Amarillo	0.24

Cinéticas de acumulación de carotenoides

Las cinéticas de acumulación de carotenoides se presentan en la Figura 48.

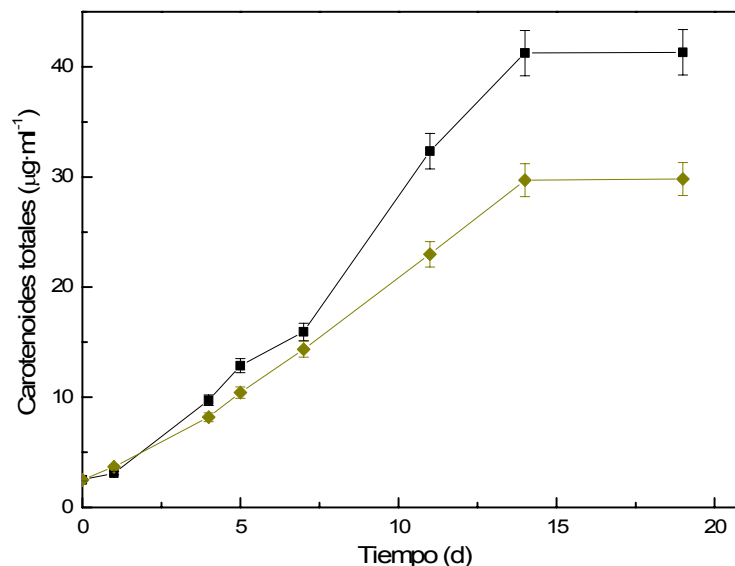


Figura 48. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones de laboratorio bajo PAR modificada. Control (- ■ -) y 'Amarillo' (- ◆ -).

Los cultivos control que durante el experimento recibieron todo el espectro visible (PAR), acumularon un mayor contenido de carotenoides totales ($\sim 40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) hacia la segunda semana del ensayo. Esto supuso una acumulación de carotenoides 1.25 veces superior a la observada en los cultivos que no recibieron la zona espectral correspondiente a longitudes de onda del azul (cultivo 'Amarillo').

Por otra parte, se analizó el tipo y la concentración de los principales carotenoides acumulados en *Dunaliella* EMS, con el fin de conocer si la calidad de luz ejercía alguna influencia cualitativa o cuantitativa reseñable. En la Figura 49 se representan las concentraciones de los principales pigmentos identificados mediante cromatografía líquida.

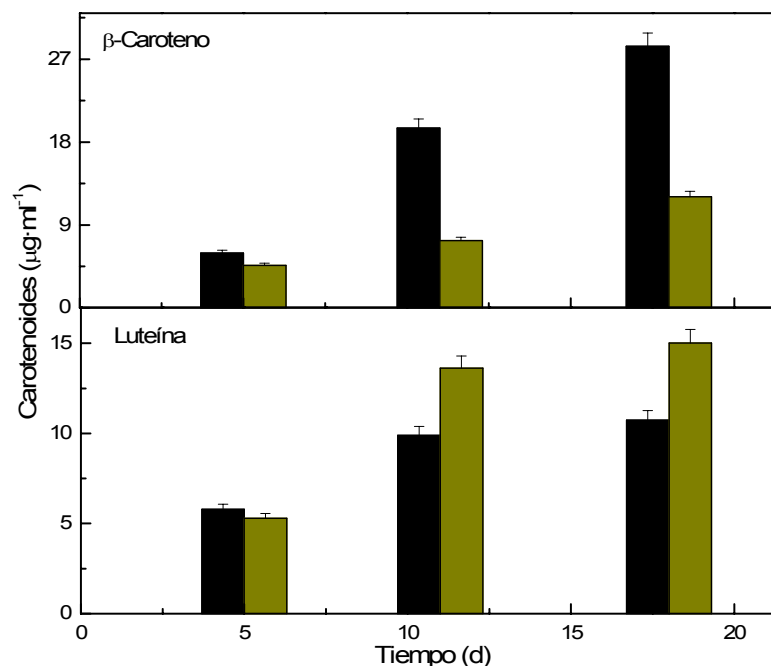


Figura 49. Concentración de β -caroteno y luteína en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo diferentes regiones del espectro visible (PAR) en condiciones de laboratorio. Control (■) y 'Amarillo' (■).

La Figura muestra que existen diferencias significativas en relación a la cantidad de β -caroteno y luteína acumulada en cada cultivo. Mientras que la concentración de β -caroteno acumulada por los cultivos control fue aproximadamente el doble de la acumulada por el cultivo 'Amarillo' al final del experimento, el contenido en luteína de dicho cultivo 'Amarillo' fue, aproximadamente, un 35% superior al de los cultivos control. La atenuación de la región azul del espectro visible produce, en laboratorio, un cambio cualitativo notable en la distribución de los carotenoides mayoritarios de *Dunaliella* EMS.

La Tabla 24 resume los principales resultados obtenidos en la incubación de cultivos de *Dunaliella* EMS bajo distinta calidad de luz, evidenciando que bajo luz amarilla, *Dunaliella* EMS conjuga un crecimiento notable con una elevada acumulación de luteína, lo que abre una vía de estudio para evaluar su posible empleo en procesos de producción de luteína, en laboratorio.

Tabla 24. Valores máximos relativos al crecimiento y acumulación de carotenoides de *Dunaliella* EMS incubada bajo distinta calidad de PAR en condiciones de laboratorio.

Región espectral (PAR)	Densidad celular máxima ($\times 10^6$ cel·ml $^{-1}$)	Contenido máximo β -caroteno ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Contenido máximo luteína ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	β -caroteno:chl máximo ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	Luteína:chl máximo ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
Control	5.85	28.42	10.74	284.4	111.1
Amarillo	5.15	12.06	15.02	124.9	155.5

Después de normalizar los contenidos de pigmentos por la cantidad de clorofila, las diferencias se minimizaron en algunos casos, pero la evolución temporal de la variación de las concentraciones de los principales carotenoides identificados (luteína y β -caroteno) se mantuvo, destacando una mayor

proporción de luteína por unidad de biomasa en el cultivo incubado bajo el filtro amarillo (Tabla 24).

Incubación en condiciones limitantes de nitrógeno inorgánico

Con el objetivo de identificar si existe algún tipo de sinergia entre la limitación de un nutriente básico como el nitrógeno y la diferente calidad de luz PAR que reciben los cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones controladas de laboratorio, se desarrolló el experimento del que, a continuación, se exponen los resultados.

Para alterar la calidad espectral de la luz visible incidente sobre los cultivos de *Dunaliella* EMS se emplearon matraces con papel de celofán amarillo. El gaseo proporcionado fue una mezcla de aire enriquecida al 5% en CO₂, se aplicó una iluminación continuada (24 h/día) de 150 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y la temperatura se mantuvo estable en 25 °C. La concentración inicial de clorofila total alcanzada en los cultivos a partir de inóculos procedentes de un cultivo madre en fase exponencial, fue cercana a los 15 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

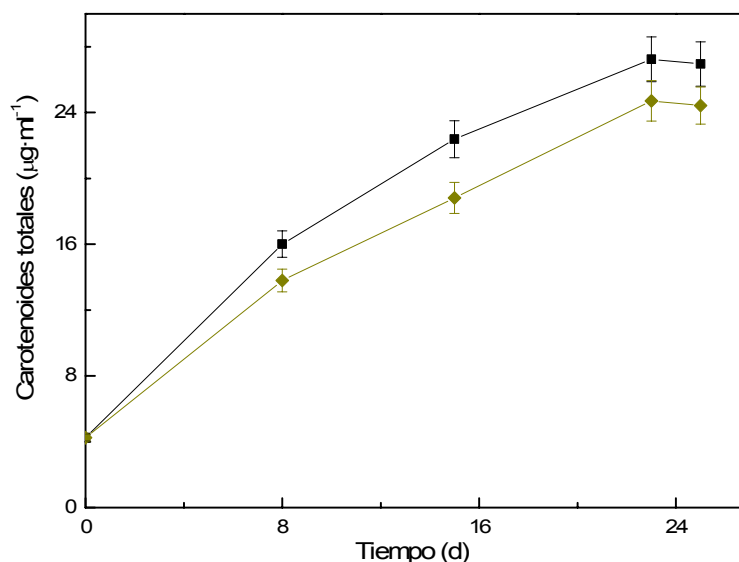


Figura 50. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones de laboratorio bajo PAR modificada y en ausencia total de nitrógeno inorgánico. Control (- ■ -) y 'Amarillo' (- ◆ -).

La acumulación de carotenoides en ausencia de nitrógeno bajo condiciones modificadas de luz visible (Figura 50), muestra una evolución típica, con una fase exponencial de mayor pendiente y otra estacionaria en la que los niveles acumulados se mantienen en torno a un valor constante. El cultivo control alcanzó un máximo de concentración de 30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Por su parte, el cultivo incubado bajo luz amarilla presentó un comportamiento similar al control, aunque en promedio acumuló una cantidad de carotenoides un 15% inferior.

En conclusión, si bien no se observa ningún efecto sinérgico entre la ausencia de nitrógeno inorgánico y la atenuación de la zona azul del espectro PAR en cuanto a la acumulación de carotenoides, la concurrencia de ambos factores no determina ningún descenso acusado de dicha acumulación, lo que abriría la posibilidad de utilizar, en procesos de producción de carotenoides, la limitación del PAR en la mencionada región azul.

2.5.4. Efecto de la región espectral visible (PAR) sobre la productividad y acumulación de carotenoides en condiciones exteriores.

Seguidamente, se investigó si el patrón de crecimiento y acumulación de carotenoides de la microalga variaba cuando se modificaba la calidad de luz visible en el exterior.

A continuación se presentan los principales resultados obtenidos en los experimentos desarrollados en condiciones exteriores con cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en ausencia de ciertas partes del espectro visible de radiación solar.

Los cultivos de *Dunaliella* EMS se inocularon a partir de un cultivo madre que se encontraba en fase exponencial de crecimiento. En esta ocasión, el gaseo se efectuó con aire, y las microalgas estuvieron sometidas a los ciclos diarios de luz y temperatura propios de la zona y de la época del año en la que tuvo lugar el ensayo (desde el 8 de junio hasta el 17 de julio del año 2006). Como sistema de incubación se emplearon tubos cilíndrico-cónicos de 250 ml.

Para modificar el espectro visible de la radiación solar se emplearon papeles de celofán, pero además, se utilizaron filtros que atenuaron toda la radiación ultravioleta (UV-A + UV-B) para analizar exclusivamente el efecto de la modificación de la región visible (PAR) sobre la producción de biomasa y de carotenoides en cultivos de *Dunaliella* EMS. Así pues, se expusieron, en condiciones exteriores, cultivos control que sólo recibieron radiación PAR y cultivos que crecieron bajo determinadas longitudes de onda correspondientes a la región visible del espectro de radiación solar incidente (amarillo, verde, rojo y azul).

Cinéticas de crecimiento

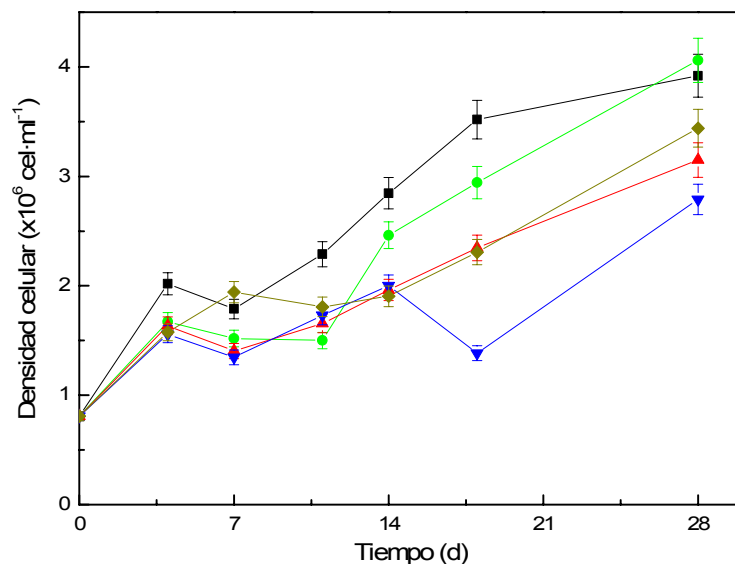


Figura 51. Crecimiento celular en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores bajo radiación PAR modificada y en ausencia de radiación UV. Control (- ■ -), 'Amarillo' (- ◆ -), 'Verde' (- ● -), 'Rojo' (- ▲ -) y 'Azul' (- ▼ -).

La Figura 51, que representa la densidad celular de los cultivos, muestra que la tendencia general de la evolución del número de células presente en

todos los cultivos es creciente, con alguna excepción. Especialmente destacable es la disminución que sufrió la concentración celular del cultivo 'Azul' alrededor de la segunda semana de incubación, no teniéndose una explicación clara de este fenómeno. Las mayores concentraciones celulares (~ 4 millones de células·ml⁻¹) se alcanzaron en los cultivos control y 'Verde', mientras que los cultivos 'Amarillo' y 'Rojo' exhibieron un comportamiento similar.

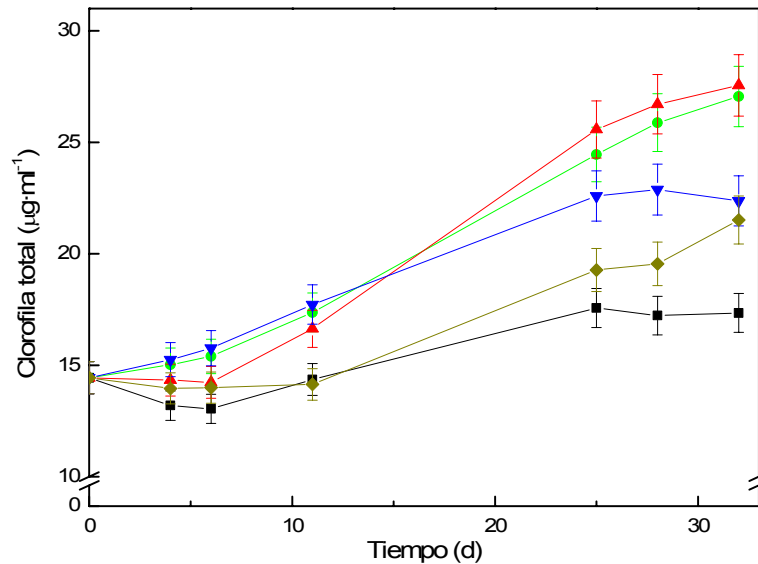


Figura 52. Contenido de clorofila total en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores bajo diferentes regiones del espectro solar visible (PAR) y en ausencia de radiación UV total. Control (- ■ -), 'Amarillo' (- ◆ -), 'Verde' (- ● -), 'Rojo' (- ▲ -) y 'Azul' (- ▼ -).

Como se observa en la Figura 52, que representa la evolución del contenido de clorofila, durante la primera semana de incubación los cultivos se encuentran en la etapa de adaptación a las nuevas condiciones. En este período, el cultivo que recibió todo el espectro visible y aquel que sólo presentó atenuadas las longitudes de onda pertenecientes al azul (control y 'Amarillo') apenas aumentaron su contenido de clorofila total. Sin embargo, los cultivos 'Rojo', 'Verde' y 'Azul' (éste especialmente) comenzaron a crecer levemente antes que los otros. A partir de la segunda semana tuvo lugar la fase exponencial de crecimiento. La fase estacionaria dio comienzo en torno a la cuarta semana, ya que los contenidos de clorofila total tendieron a estabilizarse. Los cultivos 'Rojo' y 'Verde' alcanzaron al final del experimento unos valores máximos cercanos a los 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, lo que supuso un contenido de clorofila total un 64% superior al observado en el control.

En la Tabla 25 se han calculado las tasas de crecimiento a partir del número de células representado en la Figura 51.

Tabla 25. Tasas de crecimiento promedio calculadas durante la fase exponencial de crecimiento en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores, bajo distintas regiones espectrales de PAR y en ausencia de radiación UV.

Cultivo	Tasa de crecimiento (d ⁻¹)
Control	0.037
Amarillo	0.027
Verde	0.047
Rojo	0.038
Azul	0.035

En el exterior, bajo luz solar, las productividades en los cultivos que crecen con luz amarilla son inferiores a las de los cultivos que crecen con luz verde, y también se observa un rendimiento aceptable en el crecimiento de los cultivos crecidos bajo luz roja, como cabría esperar (Jeon et al. 2005), corroborado por la acumulación de clorofila, superior a la del resto de cultivos.

En la Figura 53 se representa la variación de la concentración intracelular de clorofila de los cultivos a lo largo del experimento. En ella se muestra un brusco descenso en los primeros 4 o 5 días de incubación de casi el 50% respecto a los valores de partida. Esta caída tiene su origen en el período de adaptación frente a las nuevas condiciones lumínicas (altas irradiancias) que están recibiendo los cultivos (McIntyre et al. 2002), que se ven en la necesidad de modificar sus contenidos en clorofila antena, en función de la radiación disponible. A partir de este momento, los cultivos tienden a estabilizar la cantidad de clorofila total presente en cada célula (entre 6 $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$; control y 11 $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$; azul), si bien, en todos los casos se aprecia una ligera tendencia de pérdida de clorofila. Los valores más altos de clorofila en el cultivo 'Azul', paralelos a la menor densidad celular, son propios de una falta de correlación entre el presumible mayor rendimiento cuántico de la clorofila antena y una menor actividad anabólica (menor crecimiento). Tan sólo algunas referencias, en macroalgas, describen tal posible falta de correlación, achacable según los autores (Aguilera et al. 2000) a alteraciones de la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis, producidas por la luz azul. Los valores de clorofila en células irradiadas con luz roja son coherentes con lo referido en la literatura, y son propias del aprovechamiento por las células de la zona del espectro visible fotoquímicamente útil para las clorofilas.

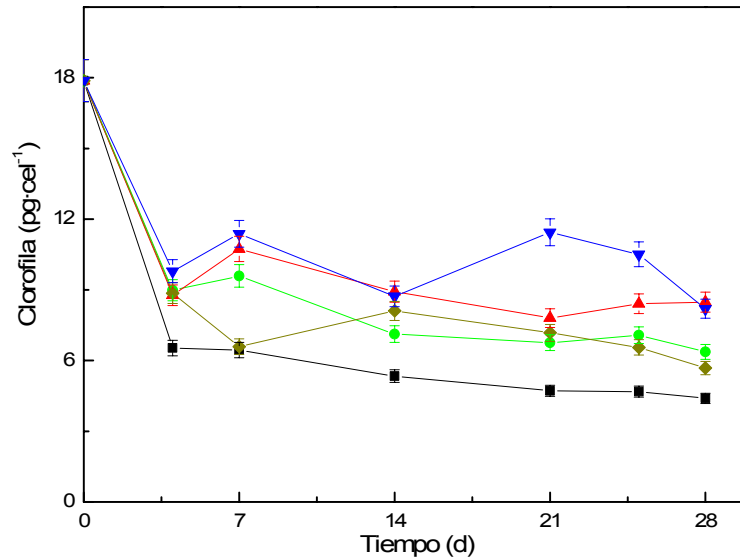


Figura 53. Concentración intracelular de clorofila total en cultivos exteriores de *Dunaliella* EMS incubados bajo radiación PAR modificada en ausencia de radiación UV. Control (- ■ -), 'Amarillo' (- ◆ -), 'Verde' (- ● -), 'Rojo' (- ▲ -) y 'Azul' (- ▼ -).

Cinéticas de acumulación de carotenoides

La Figura 54, que representa la variación temporal del contenido de carotenoides totales en los cultivos de *Dunaliella* EMS, muestra una tendencia lineal creciente, con una primera etapa más pronunciada en los 5 primeros días, período en el que no se aprecian diferencias significativas. Sin embargo, a partir de la segunda semana de incubación, el cultivo que recibió todo el espectro

visible (control) y aquel que no recibió longitudes de ondas pertenecientes al entorno del azul ('Amarillo'), presentaron una acumulación de carotenoides totales inferior en un 15-20% a la observada en los cultivos 'Rojo', 'Azul' y 'Verde' durante el intervalo comprendido entre los días 11 y 28. En todo caso, al final del experimento, las diferencias de acumulación de carotenoides totales entre los cultivos que reciben un PAR modificado no son significativas.

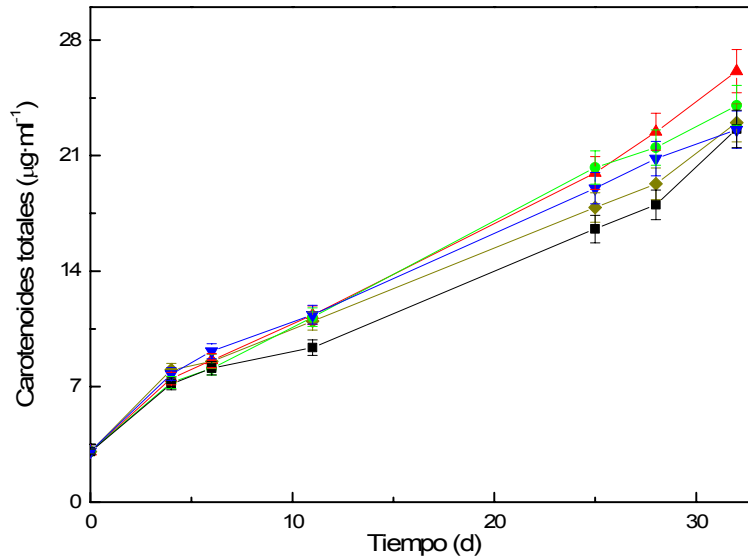


Figura 54. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores bajo PAR modificado y en ausencia de radiación UV. Control (■), 'Amarillo' (◆), 'Verde' (●), 'Rojo' (▲) y 'Azul' (▼).

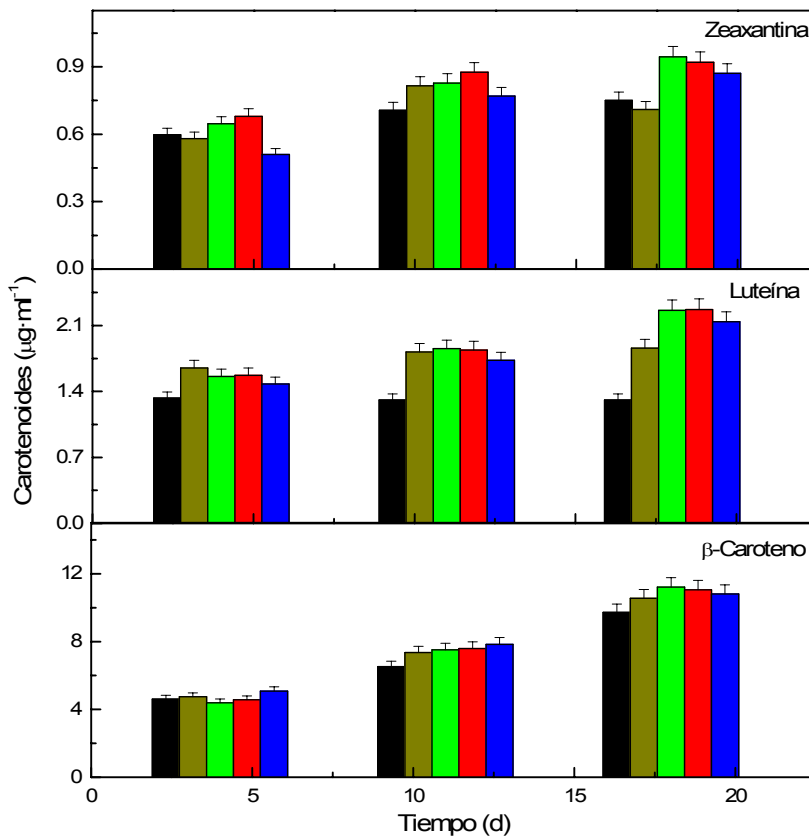


Figura 55. Concentración β-caroteno, luteína y zeaxantina en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores bajo diferentes regiones del espectro visible (PAR) y en ausencia de radiación UV. Control (■), 'Amarillo' (■), 'Verde' (■), 'Rojo' (■) y 'Azul' (■).

En la Figura 55 se representan los principales pigmentos identificados mediante cromatografía líquida. Posteriormente, los valores representados en la misma se han normalizado por la cantidad de clorofila que presentaba cada uno de los cultivos en ese momento. Estos datos se incluyen en la Figura 56.

En general, según se observa en la Figura 55, las oscilaciones identificadas en el contenido de un determinado pigmento, en función de la radiación visible recibida, son poco significativas. Tan sólo es reseñable el aumento de la concentración de β -caroteno paralelo al crecimiento en todos los cultivos, como carotenoide mayoritario de la microalga. En efecto, la acumulación de β -caroteno en los cultivos aumentó con el paso de los días de una forma más clara, si comparamos con la variación de la acumulación del contenido de zeaxantina y luteína. El incremento gradual de la concentración de β -caroteno se apreció en todos los cultivos, por lo que podemos concluir que no se observa un efecto sobre la acumulación de carotenoides específicos, por unidad de volumen de cultivo, derivado de la desigual calidad lumínica bajo la cual se han desarrollado.

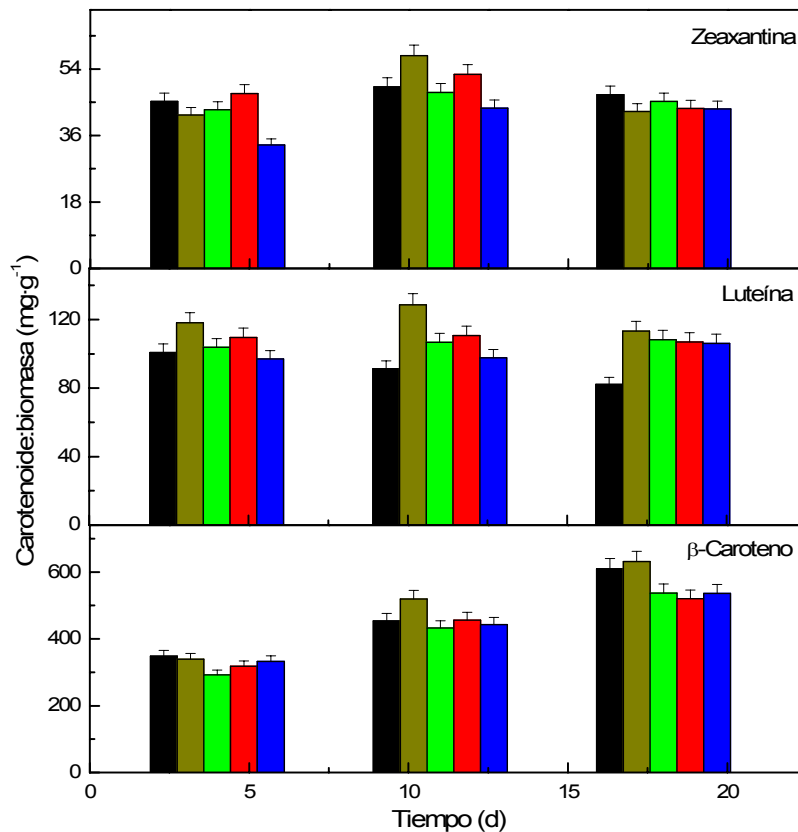


Figura 56. Contenido de zeaxantina, luteína y β -caroteno, por unidad de biomasa, en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores diferentes regiones del espectro visible (PAR) y en ausencia de radiación UV. Control (■), 'Amarillo' (■), 'Verde' (■), 'Rojo' (■) y 'Azul' (■).

Tras normalizarlos contenidos de los pigmentos principales por unidad de biomasa (Figura 56), el cultivo control y aquél que no recibe luz azul ('Amarillo') acumulan, hacia la mitad de la tercera semana, un 15% más β -caroteno que el resto de cultivos. Estos dos cultivos son los que presentan una mayor proporción del pigmento mayoritario por unidad de clorofila. Este hecho se debe a que, a pesar de la baja cantidad de clorofila del control (Figura 52), el porcentaje con el que el β -caroteno contribuye al pool de carotenoides sigue siendo el más alto.

De la Figura 56 es especialmente reseñable el aumento de la presencia de luteína en los cultivos incubados bajo luz amarilla (en ausencia de luz azul) respecto a la de β -caroteno. Esta tendencia es contraria a la observada en cultivos incubados bajo toda la región PAR del espectro (cultivos control), en los que la proporción de β -caroteno respecto a luteína aumenta con el transcurso del tiempo. A pesar de las condiciones de luz tan diferentes entre el exterior y las de la cámara de cultivo utilizada en esta Tesis, dicha observación relativa a la dinámica de acumulación de luteína en *Dunaliella* EMS es común en ambos escenarios, como ya se discutió anteriormente para cultivos en interior.

Otro aspecto a resaltar sobre la dinámica de acumulación de carotenoides bajo PAR-modificado es la diferente escala de acumulación observada entre la situación interior, en laboratorio, y la exterior. Mientras que en el cultivo control, la cantidad máxima de β -caroteno acumulado por unidad de biomasa se encuentra cerca de los $300 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tabla 24), en el exterior, esta proporción prácticamente se duplica al cabo de dos semanas (Figura 56). Esto vendría a confirmar, como se ha visto en otros apartados de esta Tesis, que las condiciones exteriores son mucho más estresantes durante el desarrollo de los cultivos, ya que las variaciones en la intensidad y calidad de luz, de temperatura y del fotoperíodo, poco tienen que ver en ambos casos.

Las diferencias más significativas se observan al representar la concentración intracelular de carotenoides a lo largo del experimento en los cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo radiación PAR modificada (Figura 57).

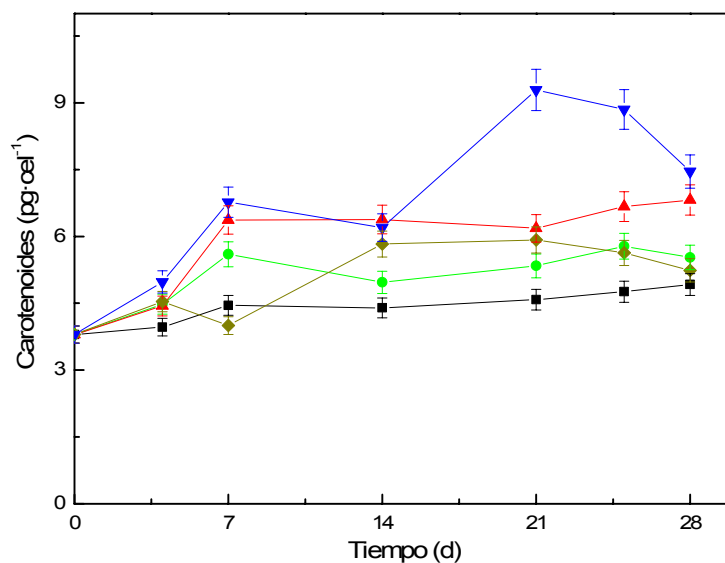


Figura 57. Concentración intracelular de carotenoides totales en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en condiciones exteriores bajo radiación PAR modificada y en ausencia de radiación UV. Control (- ■ -), 'Amarillo' (- ◆ -), 'Verde' (- ● -), 'Rojo' (- ▲ -) v 'Azul' (- ▼ -).

Según la Figura 57, el cultivo control que recibió todo el espectro visible mantuvo una concentración celular de carotenoides promedio cercana a $4.5 \text{ pg}\cdot\text{cel}^{-1}$ en todo el experimento, con una ligera tendencia ascendente. Ésta es también la tendencia habitual registrada en los cultivos incubados bajo luz amarilla y verde, que tendieron igualmente a mantener los niveles intracelulares de carotenoides. Sin embargo, los cultivos crecidos bajo luz azul y roja presentaron desde el primer momento una mayor concentración de carotenoides por célula, que siguió aumentando de manera notable en los cultivos incubados bajo luz azul. Este hecho se vio acentuado hacia la parte final del ensayo,

motivado fundamentalmente por el descenso de la densidad celular (Figura 51), aspecto éste que pudiera estar relacionado, como ya se ha discutido anteriormente, con la falta de correlación entre la síntesis de clorofila y un menor crecimiento, debido a una menor eficiencia fotosintética. En este sentido, la literatura refiere la activación de la acumulación de carotenoides oxigenados (astaxantina) en *Haematococcus pluvialis* y *Thraustochytrium* por incubación de cultivos bajo luz azul, que detiene el crecimiento pero favorece la carotenogénesis en la microalga (Park y Lee 2001; Yamaoka et al. 2004), resultados coherentes con los obtenidos para *Dunaliella* EMS en este trabajo.

En resumen, cuando se incuban cultivos de *Dunaliella* EMS bajo distintas partes de la región PAR del espectro de radiación solar, tras un período inicial de adaptación a las nuevas condiciones de luz impuestas, los cultivos que recibieron luz verde, roja y azul crecieron, por este orden, con tasas específicas iguales e, incluso, algo superiores, a la del cultivo control (que recibió todo el PAR). Dichos resultados sugieren que el uso de PAR modificado (ciertas regiones del espectro) para acelerar la producción de *Dunaliella* EMS no debería afectar negativamente al crecimiento. Tal acción parece más oportuna si, paralelamente, se produce una estimulación de la acumulación de carotenoides.

En este sentido, los cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo luz roja y luz azul acumulan significativamente (hasta el triple, para el cultivo que recibió luz azul) más carotenoides, por célula, que el cultivo control, durante la fase de crecimiento exponencial. El carotenoide mayoritario es siempre β -caroteno, y en cultivos en crecimiento, su proporción respecto a luteína, segundo carotenoide más abundante en la microalga, aumenta a medida que el cultivo se hace más denso y se acerca a la fase estacionaria. El cultivo 'Verde' muestra el mismo comportamiento, pero con menor intensidad respecto al control.

Los cultivos incubados con luz amarilla tienen una mayor tendencia a aumentar la proporción de luteína respecto a la de β -caroteno durante el crecimiento, si bien éste sigue siendo siempre el carotenoide mayoritario. Los cultivos que reciben todo el PAR aumentan el contenido de β -caroteno y disminuyen el de luteína a lo largo del crecimiento.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este apartado permiten sugerir una estrategia de cultivo en exterior destinada a la producción de β -caroteno con el mutante *Dunaliella* EMS consistente en incubar los cultivos bajo luz roja o azul (incluso luz verde) durante la fase inicial del cultivo y, aproximadamente, hasta la mitad de la fase exponencial, con el objetivo de sostener el crecimiento mientras se estimula la rápida acumulación de carotenoides. Dicha estrategia se discute en el siguiente apartado de la Tesis.

2.5.5. Optimización del proceso de producción de biomasa y estimulación de la acumulación de carotenoides en condiciones exteriores.

A partir de los resultados obtenidos anteriormente en este trabajo de Tesis, se infieren los siguientes hechos relacionados con el crecimiento y acumulación de carotenoides por el mutante *Dunaliella* EMS cultivado en el exterior:

- 1) La radiación UV no es determinante para el crecimiento de la microalga, obteniéndose curvas muy similares en cultivos crecidos

sólo con PAR, incluso en este caso con mayor productividad en la fase final del crecimiento exponencial.

- 2) De la región PAR, las correspondientes a luz roja, azul e incluso verde, no disminuyen el crecimiento y, en cambio, ciertas regiones podrían estimular la acumulación celular de carotenoides durante el cultivo de la microalga.
- 3) La radiación UV determina una mayor acumulación de carotenoides en cultivos en crecimiento respecto a cultivos que sólo reciben todo el PAR, si bien al final de la fase exponencial las cantidades acumuladas en ambos cultivos por unidad de volumen son similares. Sin embargo, el uso de regiones específicas del espectro PAR, en concreto luz roja o azul (también luz verde, en menor medida), parece incrementar la acumulación intracelular de carotenoides durante el crecimiento.
- 4) En cultivos en fase de acumulación masiva de carotenoides, en ausencia de nitrógeno inorgánico, la radiación UV-B resulta determinante en la estimulación de dicha acumulación, especialmente cuando los cultivos han sido crecidos previamente sólo bajo PAR.

De tales observaciones, puede inferirse finalmente que durante la primera parte del crecimiento de *Dunaliella* EMS, el uso de luz azul, fundamentalmente, roja, en menor medida, e incluso verde, podría servir para estimular la acumulación de carotenoides, y que la iluminación con todo el PAR durante la fase final de crecimiento contribuiría a aumentar la productividad de los cultivos, siendo la acumulación de carotenoides por unidad de volumen similar a la encontrada en cultivos que reciben todo el espectro (PAR + UV).

Adicionalmente, quedaría por encontrar respuesta a la cuestión de qué papel desempeñan distintas zonas del PAR en la fase de producción masiva de carotenoides, en ausencia de nitrógeno inorgánico. En esta fase, como se ha comentado, la presencia de radiación UV-B es esencial para alcanzar las mayores acumulaciones de carotenoides.

Con los resultados que se obtuviesen podría sugerirse una estrategia de condiciones de luz para la producción discontinua de carotenoides, especialmente β -caroteno, con el mutante *Dunaliella* EMS.

De acuerdo con el análisis anterior, se realizaron experimentos con el objetivo, en una primera fase, de conseguir una producción de biomasa que, paralelamente al crecimiento, estimulase una mayor acumulación de carotenoides por célula, aplicando para ello iluminación de ciertas regiones de la radiación solar fotosintéticamente activa (PAR). En una segunda fase, se estimuló la acumulación de carotenoides en ausencia de nitrógeno inorgánico e irradiando los cultivos con distinto PAR, con objeto de evaluar si alguna región del espectro visible resultaba determinante para potenciar dicha acumulación.

Para explicar detalladamente en qué consistieron los citados experimentos de optimización de las condiciones de luz, en la Figura 58 se expone un diagrama con las diferentes etapas que se desarrollaron a lo largo de las experiencias en exterior. El sistema de cultivo empleado fue el mismo que en

anteriores ocasiones, es decir, cultivos tipo baño consistentes en tubos cilíndrico-cónicos de 250 ml transparentes a la radiación UV, donde los cultivos se incubaron con aire.

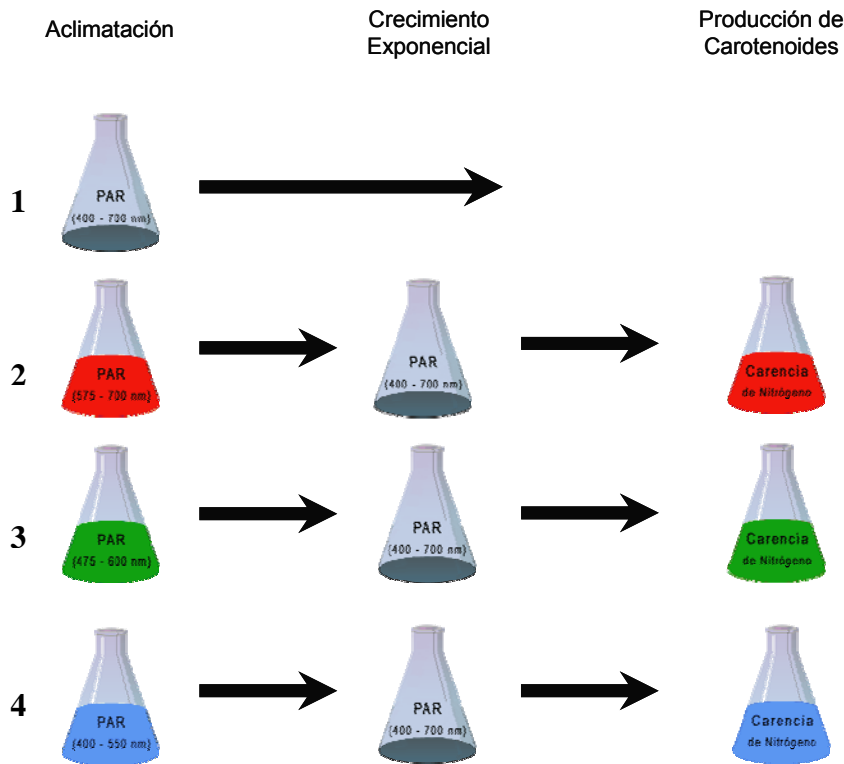


Figura 58. Estrategia experimental del desarrollo de un proceso discontinuo, en exterior, para la producción de biomasa y acumulación de carotenoides de *Dunaliella* EMS bajo diferentes condiciones de radiación visible (PAR). El espectro de radiación solar se alteró con diferentes filtros. El rango espectral del que hace uso cada cultivo se indica entre paréntesis.

El desarrollo de los experimentos tuvo lugar en la terraza exterior de la Estación de Sondeos Atmosféricos de “El Arenosillo” (INTA) y los inóculos empleados, procedentes de un cultivo madre en fase exponencial, alcanzaron una concentración inicial de clorofila total cercana a los $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Al inicio del experimento (etapa de aclimatación) se incubaron cuatro cultivos: tres de ellos (cultivos 2, 3 y 4) recibieron distintas partes del espectro visible, siempre en ausencia de radiación UV, y el cultivo restante (cultivo 1, control) recibió todo el PAR.

El objetivo de cubrir algunos de los cultivos con filtros coloreados era intentar estimular la acumulación de carotenoides por célula, sin pérdida de viabilidad y sin limitación del crecimiento, aplicando iluminación con zonas específicas del espectro visible de la radiación solar (Figura 58, columna “aclimatación”).

A continuación, cuando los cultivos se encontraban en la fase exponencial de crecimiento, se procedió a retirar los papeles de celofán responsables de la modificación del espectro visible. Por lo tanto, en esta fase del experimento, todos los cultivos recibieron el espectro visible en su totalidad, incluido, lógicamente, el cultivo control, que siempre recibía todo el PAR (Figura 58, columna “crecimiento exponencial”).

En la última fase del experimento, cerca de finalizar la etapa de crecimiento exponencial, se recolectaron las células de los cultivos que inicialmente se habían adaptado a diferentes condiciones de luz visible (cultivos 2, 3 y 4), para resuspenderlas seguidamente en un medio con carencia de nitrógeno, con el objetivo de someterlos a la fase de producción intensa de carotenoides. A estos cultivos, nuevamente se les impusieron las mismas condiciones lumínicas iniciales (Figura 58, columna “producción de carotenoides”).

Fase de estimulación de la acumulación de carotenoides en cultivos en crecimiento

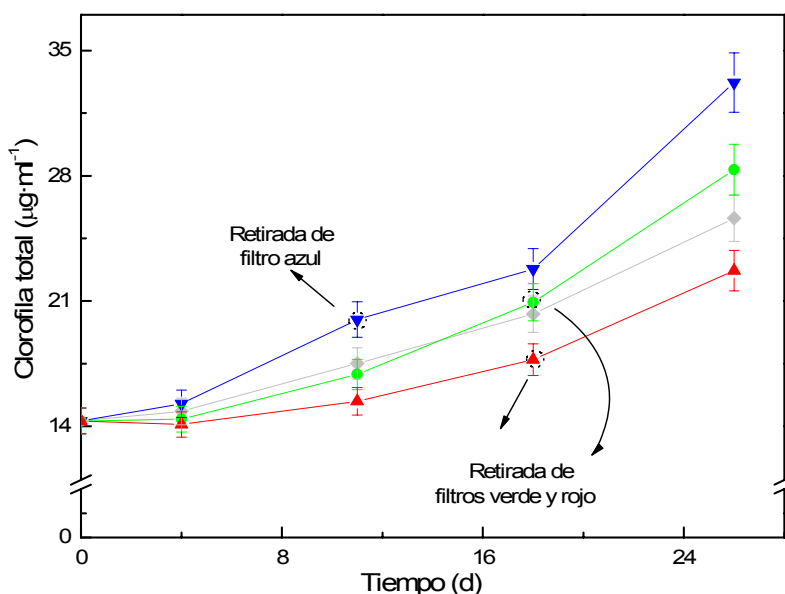


Figura 59. Contenido de clorofila total en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en el exterior a lo largo de las etapas de aclimatación y crecimiento exponencial, modificando las condiciones lumínicas que estos recibieron. 'Azul' (- ▽ -), 'Verde' (- ● -), 'Rojo' (- ▲ -) y PAR (- ◆ -).

Los cultivos se colocaron en la terraza exterior de la Estación de Sondeos Atmosféricos de “El Arenosillo” (Mazagón – Huelva). Los cultivos ‘Rojo’, ‘Verde’ y ‘Azul’ mantuvieron sus correspondientes filtros coloreados hasta los días 18 y 11 de incubación, respectivamente. El momento establecido para la retirada de los filtros que limitaban la radiación PAR, estuvo determinado en cada caso por la entrada del cultivo en la fase exponencial de crecimiento. Así, a partir del día 11 (en el cultivo ‘Azul’) y del día 18 (en los cultivos ‘Rojo’ y ‘Verde’), estos cultivos se incubaron bajo la influencia de todo el espectro visible. Como puede observarse en la Figura 59, la adaptación del cultivo ‘Azul’ a las nuevas condiciones fue más rápida que en los cultivos ‘Verde’ y ‘Rojo’.

A partir de entonces, la velocidad de crecimiento del cultivo ‘Azul’ en la fase exponencial se vio incrementada. La Figura 59 revela que, durante la primera etapa del crecimiento, la atenuación de longitudes de onda pertenecientes al rango de absorción de las clorofilas (550 – 700 nm) (cultivo 4) estimuló su síntesis, observándose una diferencia notable respecto al cultivo control (recibe todo el visible; PAR).

En el otro extremo, el cultivo 'Rojo', que no recibe longitudes de onda pertenecientes al rango de absorción de los carotenoides (400 – 550 nm), es el que menos clorofila total sintetiza, estando un 30% por debajo de los niveles máximos observados en el cultivo 'Azul'.

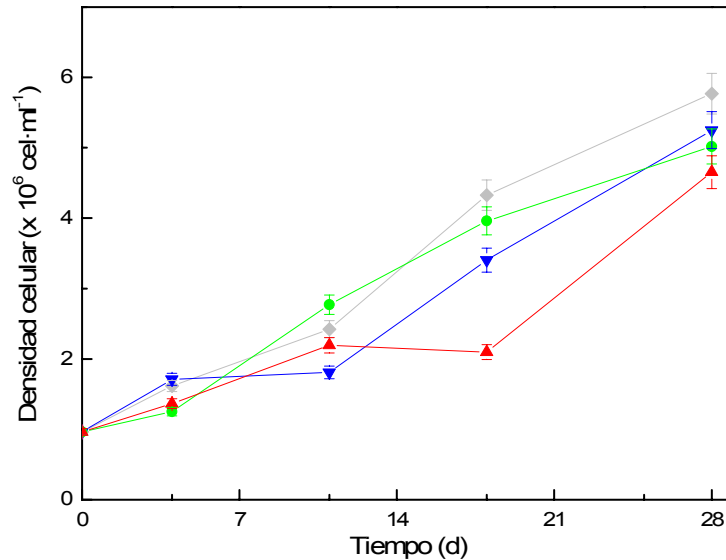


Figura 60. Crecimiento celular de cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en el exterior a lo largo de las etapas de aclimatación y crecimiento exponencial, modificando las condiciones lumínicas que estos recibieron. 'Azul' (-▼-), 'Verde' (-●-), 'Rojo' (-▲-) y PAR (-◆-).

El crecimiento de los cultivos se siguió también mediante el número de células. A diferencia de lo observado en la Figura 59, la variación de la densidad celular demuestra pocas diferencias en los distintos cultivos, siendo en todo caso el cultivo 'Rojo' el que presenta un número de células algo inferior al resto, justo antes de someterlos a condiciones de acumulación masiva de carotenoides ($4.5 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{ml}^{-1}$ el día 28).

Un sencillo cálculo obtenido de los datos de las Figuras 59 y 60 permite observar que los cultivos 'Azul' y PAR presentaban la mayor concentración intracelular de clorofila. Particularmente interesante resulta la acumulación intracelular de clorofila en el cultivo 'Azul'. Los resultados vuelven a coincidir con los obtenidos previamente en esta Tesis para cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo luz del entorno 400 – 550 nm. El notable incremento en clorofila, mantenido durante gran parte del crecimiento y no reflejado en un aumento de la densidad celular, podría derivar de la activación génica de la biosíntesis de dicho pigmento, mediada por fotorreceptores específicos para la luz azul y la presencia de complejos de citocromos activos en fotosíntesis (Im et al. 2006) sin que, como se comentó con anterioridad en esta Tesis, ello suponga una actividad anabólica más alta derivada de la fotosíntesis.

En la Tabla 26 se presentan las tasas de crecimiento promedio calculadas, en todos los cultivos, durante los 28 días de incubación correspondientes a las dos primeras etapas (aclimatación y crecimiento exponencial).

Tabla 26. Tasas de crecimiento promedio (d^{-1}) calculadas en base al número de células de los cultivos de *Dunaliella* EMS incubados bajo diferentes regiones espectrales del PAR a lo largo de las etapas de aclimatación y crecimiento exponencial.

Cultivo	0 – 28 días
PAR	0.064
Azul	0.060
Verde	0.059
Rojo	0.056

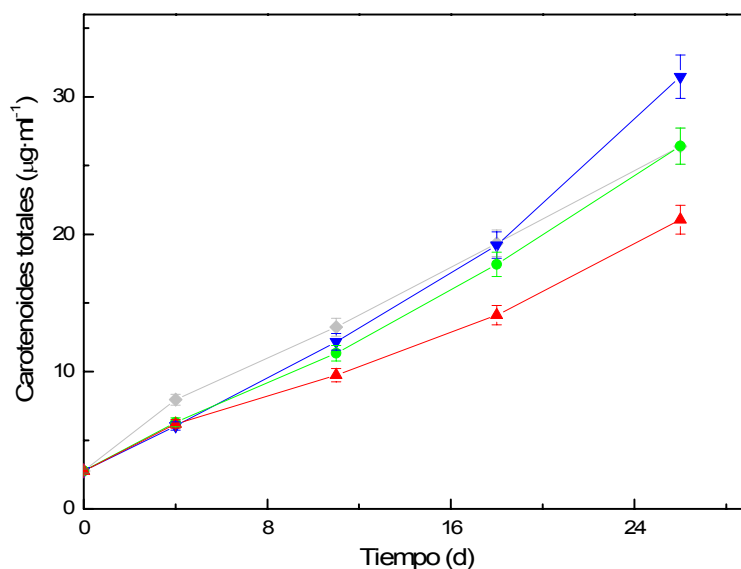


Figura 61. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en el exterior a lo largo de las etapas de aclimatación y crecimiento exponencial, modificando las condiciones lumínicas que estos recibieron. 'Azul' (-▼-), 'Verde' (-●-), 'Rojo' (-▲-) y PAR (-◆-).

El contenido de carotenoides totales, por unidad de volumen, en los cultivos que recibieron luz azul y verde es, cuando menos, igual al determinado en el cultivo que recibe todo el PAR. En términos generales, las evoluciones volumétricas de los contenidos de carotenoides son similares en todos los cultivos, excepto el 'Rojo', como puede apreciarse en la Figura 61. Dicho cultivo presenta el contenido más bajo, alcanzando $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ el día 28 de incubación (justo antes de pasar a la etapa de producción de carotenoides en ausencia de nitrógeno inorgánico).

Las Figuras 62 y 63 ponen de manifiesto que el uso de distinta calidad de PAR produce aumentos del contenido intracelular de clorofilas y carotenoides. Si bien la retirada de los filtros de color hacia la mitad del crecimiento, con el objetivo de estimular la productividad de los cultivos, tiende a igualar finalmente los contenidos celulares de clorofila en los cultivos (Figura 62), la concentración celular de carotenoides en los que reciben luz roja, azul y verde tiende a mantenerse igual o superior a la del cultivo que recibe todo el PAR (Figura 63). En principio, los resultados apoyan la hipótesis de partida de que la modificación de la calidad de luz visible durante el crecimiento podría contribuir a estimular una mayor acumulación intracelular de carotenoides, especialmente bajo luz azul, sin afectar a la viabilidad de los cultivos ni disminuir la productividad (Figura 60).

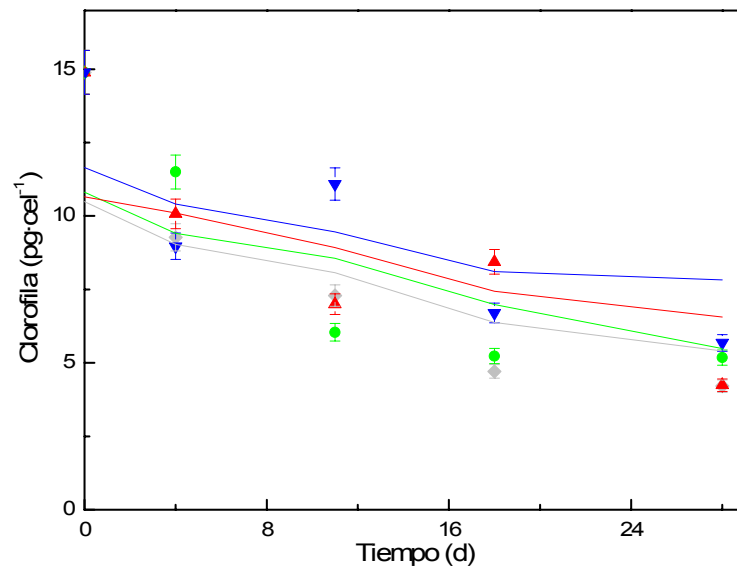


Figura 62. Contenido de clorofila total por unidad celular observado en cultivos exteriores de *Dunaliella* EMS incubados bajo diferentes regiones del PAR. PAR (◆), Verde (●), Rojo (▲) y Azul (▼). Se incluyen las tendencias promediadas.

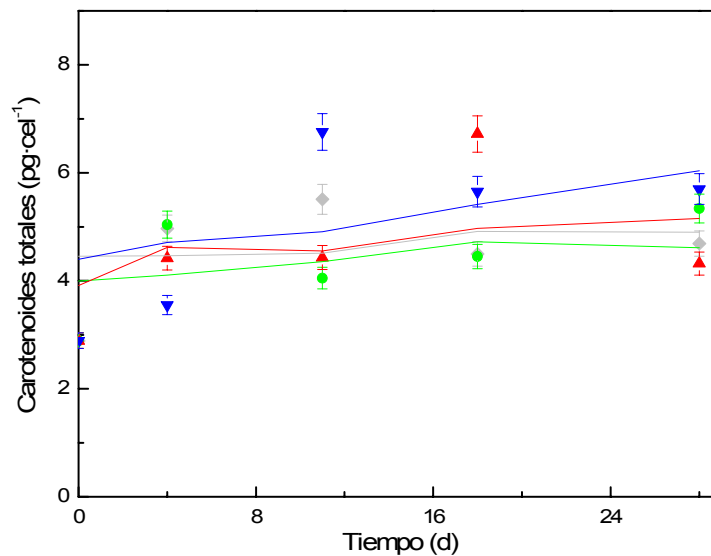


Figura 63. Contenido de carotenoides totales por unidad celular observado en cultivos exteriores de *Dunaliella* EMS incubados bajo diferentes regiones del PAR. PAR (◆), 'Verde' (●), 'Rojo' (▲) y 'Azul' (▼). Se incluyen las tendencias promediadas.

Las Figuras 62 y 63 muestran, en definitiva, dos tendencias contrarias. Conforme avanza el experimento y se van completando las distintas etapas, los cultivos van disminuyendo la proporción celular de clorofila hasta estabilizarse a un nivel determinado (Figura 62), pero al mismo tiempo van incrementando el contenido celular de carotenoides (Figura 63), aumento esperable al final de la fase exponencial y principio de la estacionaria, y mayor especialmente en el cultivo iluminado con luz azul.

También se determinaron los contenidos de los carotenoides mayoritarios, por unidad de volumen, en todos los cultivos iluminados con distintas zonas del PAR, hasta el inicio de la etapa de producción de carotenoides en ausencia de nitrógeno inorgánico (Figura 64). La tendencia de

acumulación de carotenoides específicos según la calidad de PAR es paralela a la observada tras cuantificar carotenoides totales (Figura 61).

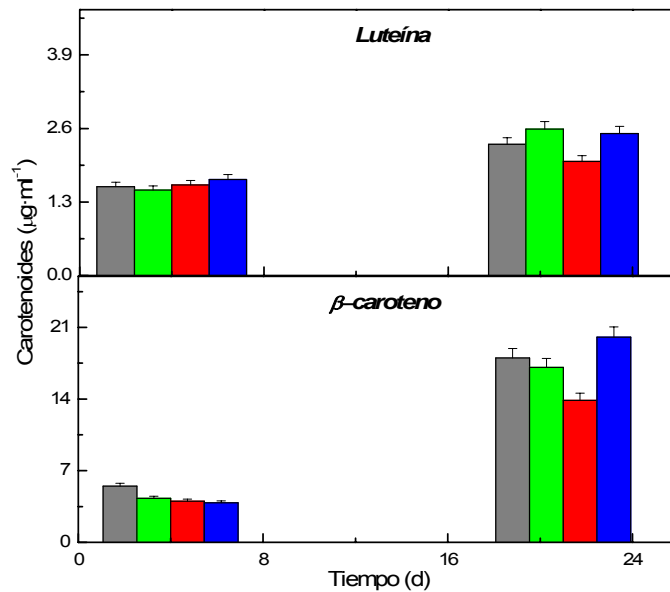


Figura 64. Perfil de los principales carotenoides identificados (Luteína y β -caroteno) en cultivos de *Dunaliella* EMS expuestos a diferentes rangos espectrales del PAR durante las etapas de aclimatación y crecimiento exponencial. PAR (■), 'Verde' (■), 'Rojo' (■) y 'Azul' (■).

A continuación se presentan los datos de carotenoides específicos por célula (Figura 65) para tener una visión más proporcionada de la concentración intracelular de cada uno de ellos en la microalga, bajo las condiciones radiativas específicas aplicadas a cada cultivo.

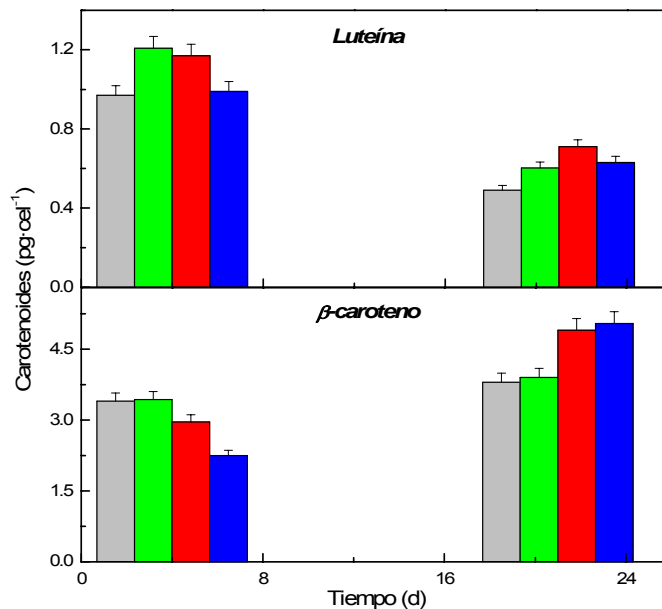


Figura 65. Evolución del contenido de luteína y β -caroteno, por célula, cuantificado en cada uno de los cultivos de *Dunaliella* EMS expuestos a diferentes rangos espectrales del PAR durante las etapas de aclimatación y crecimiento exponencial. PAR (■), 'Verde' (■), 'Rojo' (■) y 'Azul' (■).

La Figura anterior muestra que, durante el crecimiento de los cultivos, el contenido celular de luteína tiende a disminuir mientras que el de β -caroteno aumenta progresivamente. Asimismo, también se observa que los cultivos iluminados con luz azul y roja, presentan una concentración intracelular, especialmente de β -caroteno, superior a la del cultivo que recibe todo el espectro visible (PAR). En una situación de alto estrés oxidativo producida por la carencia de nitrógeno y la radiación solar, la mayor actividad antioxidante de la luteína en comparación con el β -caroteno (Wang et al. 2006) puede justificar la mayor implicación del carotenoide en la respuesta antioxidante de la microalga.

Fase de producción de carotenoides en ausencia de nitrógeno

Finalmente, y para concluir con la exposición de los resultados más relevantes obtenidos en este proceso discontinuo de producción de biomasa y carotenoides a partir de cultivos exteriores de *Dunaliella* EMS incubados bajo diferentes regiones del PAR, se presentan los datos correspondientes a la etapa de producción de carotenoides. La misma tuvo una duración aproximada de dos meses, período durante el cual, los cultivos que habían estado recibiendo diferentes partes de la región PAR en las primeras dos etapas del experimento (aclimatación y crecimiento exponencial), se mantuvieron en condiciones de carencia nutricional de nitrógeno inorgánico. En torno al día 28 de incubación, se recolectaron las células de los cultivos para, a continuación, cambiar el medio estándar inicial de cultivo por otro que no presentaba nitrógeno. Esta situación tuvo continuidad durante 54 días de incubación hasta alcanzar la máxima acumulación de carotenoides.

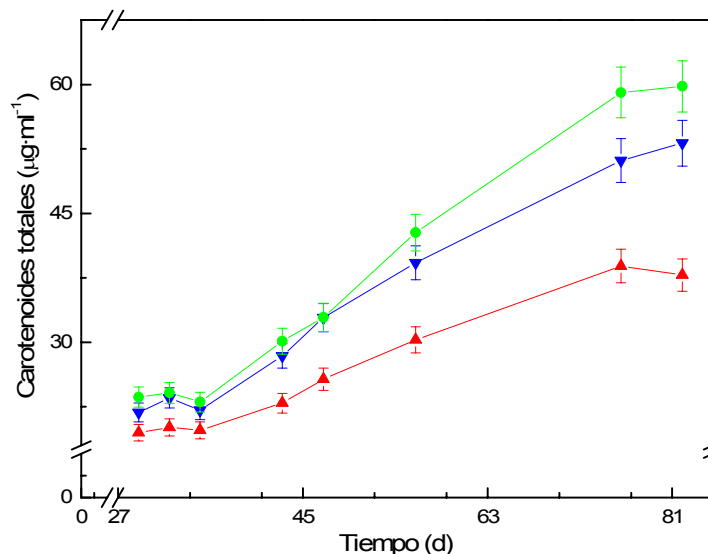


Figura 66. Contenido de carotenoides totales acumulado en cultivos exteriores de *Dunaliella* EMS incubados en medios sin nitrógeno inorgánico bajo radiación PAR modificada. Etapa de producción: 'Verde' (-●-), 'Rojo' (-▲-) y 'Azul' (-▼-).

La Figura 66 muestra diferencias muy notables en los niveles de carotenoides acumulados por los cultivos 'Azul', 'Verde' y 'Rojo'. Lo más significativo de la Figura anterior es que el cultivo 'Rojo', desde el primer momento, muestra una acumulación un 40% inferior a la del cultivo 'Verde'. Las diferencias entre éste y el 'Azul' son menores, en torno a un 15% a favor del cultivo 'Verde'.

Sin embargo, si se tiene en cuenta el número de células a partir del cual se obtienen estos niveles de carotenoides, y asumiendo que no hay crecimiento celular en esta etapa (valor constante de la densidad celular), el cuadro de producción se ve ligeramente alterado. En ese caso, como muestra la Figura 67, la proporción de carotenoides acumulados por unidad celular es superior en el cultivo 'Verde', con un máximo cercano a los 14 $\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$. Del total de carotenoides, el mayoritario (β -caroteno) aumenta a lo largo de la incubación de los cultivos en ausencia de nitrógeno inorgánico, mientras el contenido de luteína de los cultivos incluso disminuye ligeramente (Figura 68).

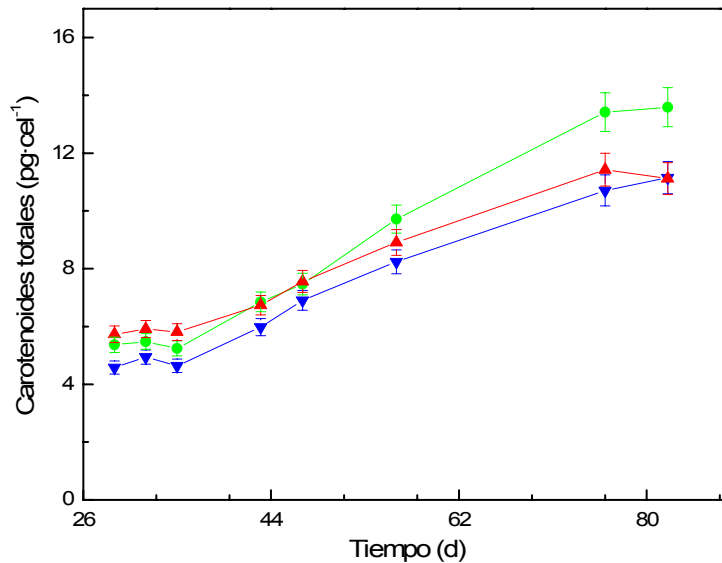


Figura 67. Contenido de carotenoides totales por unidad celular observado en cultivos de *Dunaliella* EMS incubados en medios sin nitrógeno inorgánico bajo radiación PAR modificada. Etapa de producción de carotenoides: 'Verde' (-●-), 'Rojo' (-▲-) y 'Azul' (-▼-).

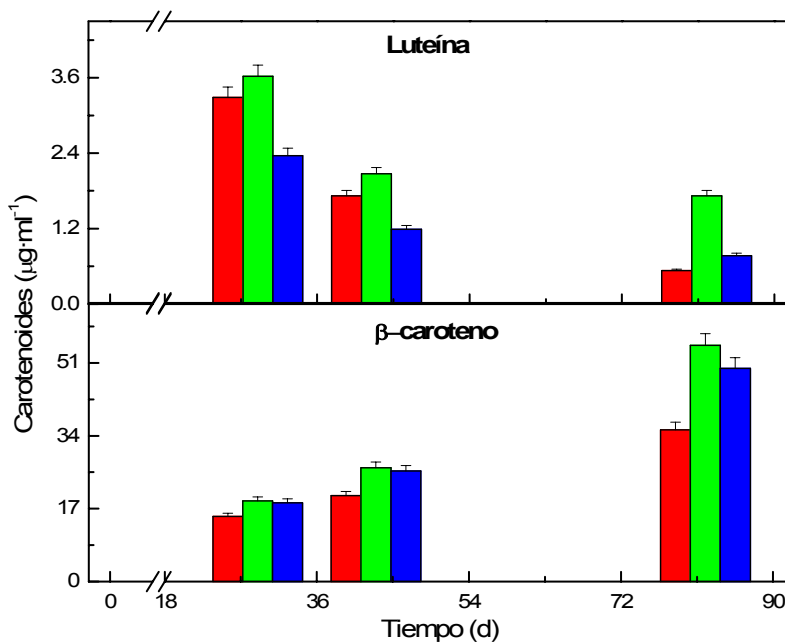


Figura 68. Perfil de carotenoides mayoritarios en cultivos exteriores de *Dunaliella* EMS incubados en medios sin nitrógeno inorgánico bajo radiación PAR modificada. Etapa de producción: 'Rojo' (■), 'Verde' (■) y 'Azul' (■).

De las cinéticas de acumulación de la Figura 67, y de los datos de acumulación del control (recibe todo el PAR) en las mismas condiciones nutricionales (ausencia de nitrógeno inorgánico; datos no mostrados), se puede obtener la máxima acumulación celular de carotenoides. Los resultados se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Concentraciones intracelulares máximas de carotenoides encontradas durante la etapa de producción en cultivos recibiendo distintas regiones de PAR.

Cultivos	Carotenoides (pg-cel ⁻¹)	Luteína (pg-cel ⁻¹)	β-caroteno (pg-cel ⁻¹)
PAR	8.12	---	---
Azul	11.43	0.45	9.47
Verde	13.59	0.82	12.51
Rojo	11.45	0.97	10.41

La Tabla 27 revela que la atenuación de zonas del espectro PAR durante la fase de producción de carotenoides en ausencia de nitrógeno inorgánico, en *Dunaliella* EMS, incide en la máxima acumulación en los distintos cultivos. La acumulación por célula es mayor en los incubados bajo luz verde, siendo la luz PAR la que induce una menor acumulación celular en la citada fase de carencia de nitrógeno.

Explicar de manera rigurosa por qué se produce una tendencia distinta en la acumulación celular de carotenoides durante la iluminación de cultivos con PAR atenuado, dependiendo de si estos se encuentran en crecimiento o en situación de estrés nutricional, no es posible sin caer en simplicidades que obviarían la gran cantidad de complejos procesos fotobioquímicos interregulados que ocurren a la vez y la cantidad de variables de cultivo propias de las condiciones exteriores cambiantes.

Sin embargo, sí es posible apuntar algunas líneas de discusión en las que enmarcar las observaciones derivadas de la experimentación. Los carotenoides absorben mayoritariamente luz azul, entre 400 y 500 nm. Estos pigmentos, que tienen el carácter de accesorios en el proceso fotosintético de conversión fotoquímica de la energía solar, transmiten con rapidez la energía capturada a la clorofila (Griffiths et al. 1955), responsable final de los procesos de conducción de fotones al centro de reacción de los fotosistemas y puesta en acción de la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis mediante su oxidación.

Cuando los niveles de radiación no sobresaturan la actividad de los complejos de membrana involucrados en la fotosíntesis, el pool de carotenoides sintetizado por la célula está mayoritariamente involucrado en el proceso de aprovechamiento de la radiación incidente, junto a las clorofilas. Por el contrario, cuando los niveles de radiación superan en exceso la demanda energética de los fotosistemas, los carotenoides fluctúan en su actividad hacia acciones de protección de los complejos de membrana, para evitar daños por fotooxidación (Sandmann et al. 1993).

Es comprensible, por tanto, que mientras los cultivos crecen en un medio pleno de nutrientes, en el que la demanda celular de energía es pareja a sus necesidades anabólicas, la acumulación de carotenoides tiene, en principio, menos implicación en actividades antioxidantes. Su nivel de acumulación es más

bajo que en situaciones de fuerte estrés oxidativo. En *Arabidopsis* se ha descrito que su biosíntesis está ligada a la de la clorofila y fuertemente regulada por luz a nivel de la expresión de una fitoeno sintasa (Lintig et al. 1997). Por tanto, es esperable que en situaciones de calidad de luz que producen aumentos en el contenido intracelular de clorofila se observe, paralelamente, un aumento de la síntesis de carotenoides, salvo que la ruta se encuentre inhibida por el uso de herbicidas u otros factores ambientales o nutricionales. Tales hechos son consistentes con los resultados comentados anteriormente en este apartado de la Tesis.

La eliminación del nitrógeno inorgánico del medio de cultivo determina la imposibilidad de la microalga para sintetizar clorofila. Teóricamente, dicha situación conllevaría también una menor acumulación de carotenoides. Sin embargo, la situación de alto estrés oxidativo que produce la alta irradiancia y la carencia de nitrógeno inorgánico determinan cambios en el metabolismo de carotenoides, que son masivamente sintetizados para satisfacer, en este caso, la necesidad de la célula de acumulación de moléculas antioxidantes, ya que en dicha situación de estrés la función colectora de luz de los carotenoides queda notablemente inhibida (Havaux et al. 1998). La magnitud de la acumulación de carotenoides estaría vinculada, por tanto, al exceso de energía incidente sobre los cultivos, y a que los rangos de longitudes de onda de las radiaciones incidentes sean adecuados para la absorción por parte de los carotenoides. Atendiendo a los espectros de la luz roja, verde y azul usados en este trabajo, y que se incluyen en Materiales y Métodos, se deduce que la luz azul y verde debería propiciar, en teoría, una mayor acumulación de carotenoides. Esta hipótesis se aproxima con bastante fidelidad a los resultados obtenidos en la fase de acumulación de carotenoides en ausencia de nitrógeno inorgánico.

El análisis anterior permite, finalmente, sugerir alguna estrategia de gestión óptima de luz para estimular la acumulación de carotenoides en *Dunaliella* EMS. En cultivos exteriores que se operan en modo semicontinuo, realizando las diluciones oportunas para mantener los cultivos en un cierto margen de densidad celular, cada dilución se iniciaría con un filtro que permita transmitir especialmente luz azul, hasta alcanzar aproximadamente la mitad del margen de densidad celular decidido. El resto del crecimiento se realizaría con filtros que transmitan todo el PAR, lo que mantendría niveles más bajos de acumulación celular de carotenoides, pero facilitando el desarrollo del cultivo cuando la densidad celular es más alta, extendiéndose, ligeramente en el tiempo, la etapa de crecimiento exponencial del mismo.

Cuando seguidamente se produce la dilución del cultivo correspondiente a la fase de producción de carotenoides en ausencia de nitrógeno, los cultivos se expondrían directamente radiación PAR con alta relación verde/PAR y UV, al ser la radiación UV-B la que tras los diferentes ensayos de este trabajo se ha mostrado claramente determinante en la inducción de la acumulación en cultivos con carencia de nitrógeno inorgánico. Los resultados previos de esta Tesis han mostrado que al irradiar los cultivos sólo con PAR durante el crecimiento, la posterior exposición a PAR + UV parece inducir una rápida y cuantitativamente mucho más alta acumulación de carotenoides, como respuesta adaptativa a la radiación ultravioleta, fundamentalmente UV-B. El ciclo se iniciaría de nuevo en los cultivos en crecimiento.

2.6. Hacia el cultivo exterior a escala piloto: experiencia en tanques abiertos exteriores.

En apartados anteriores de los trabajos con microalgas contemplados en esta Tesis, se describieron una serie de estudios encaminados a evaluar la idoneidad y potencialidad de determinadas estirpes de *Dunaliella* de cara a un posible uso en procesos productivos exteriores. Para ello, se analizaron las cinéticas de crecimiento y acumulación de carotenoides en diferentes situaciones de cultivo, alterando fundamentalmente las condiciones lumínicas de radiación UV y PAR bajo las que se desarrollaron los cultivos; en condiciones controladas de laboratorio y en el exterior.

Después de que la estirpe mutante obtenida por el grupo, *Dunaliella* EMS, mostrase una buena capacidad de adaptación a las condiciones exteriores, un crecimiento equiparable al de otras estirpes de *Dunaliella*, y una alta capacidad para acumular carotenoides, se planteó la posibilidad de llevar a cabo alguna experiencia en sistemas de cultivo exteriores, de mayor volumen.

Aprovechando las instalaciones que el Grupo Empresarial Rafael Morales tiene en el Centro para la Investigación del Cultivo de Especies Marinas (CICEM - “Agua del Pino”) de la Junta de Andalucía, se desarrolló, en Cartaya (Huelva), una experiencia piloto en tanques abiertos exteriores. Se cultivó *Dunaliella* EMS, realizando un estudio comparado, en términos de productividad y acumulación de carotenoides, con una estirpe comercial de *D. bardawil* (UTEX 2538).

Los ensayos se realizaron en dos etapas: una primera en la zona denominada sala de cultivo de microalgas (Figura 69), en la que los cultivos de *Dunaliella* se incubaron, en interior, en bolsas de polietileno de 50 l hasta alcanzar una densidad celular aproximada de $2.5 \cdot 10^6$ cel·ml⁻¹, y una segunda, en la que dichos cultivos se utilizaron para inocular pequeños tanques exteriores abiertos de 300 litros agitados por palas, de tipo “*raceway-open pond*”. Los detalles del sistema se muestran en la Figura 70.



Figura 69. Bolsas de polietileno conteniendo diversas estirpes de *Dunaliella*. Sala de Microalgas.

El medio de cultivo empleado para crecer las microalgas consistió en agua de mar microfiltrada a $0.25 \mu\text{m}$, conteniendo $35\text{-}37 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de sal, a la que se añadió aquella procedente de salinas locales hasta lograr una concentración

próxima a 2M. Dicho medio salino se enriqueció en nutrientes añadiendo medio F2, que incluye vitaminas, metales traza y cloruro férrico. La mezcla de aire enriquecida en CO₂ al 5% (v/v) se proporcionó en el interior de los tanques a partir de una sonda y en las bolsas mediante burbujeo en el extremo inferior de las mismas.

La iluminación de los cultivos incubados en las bolsas se realizó mediante lámparas fluorescentes de luz blanca que proporcionaron alrededor de 100 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR en la superficie de cada bolsa.

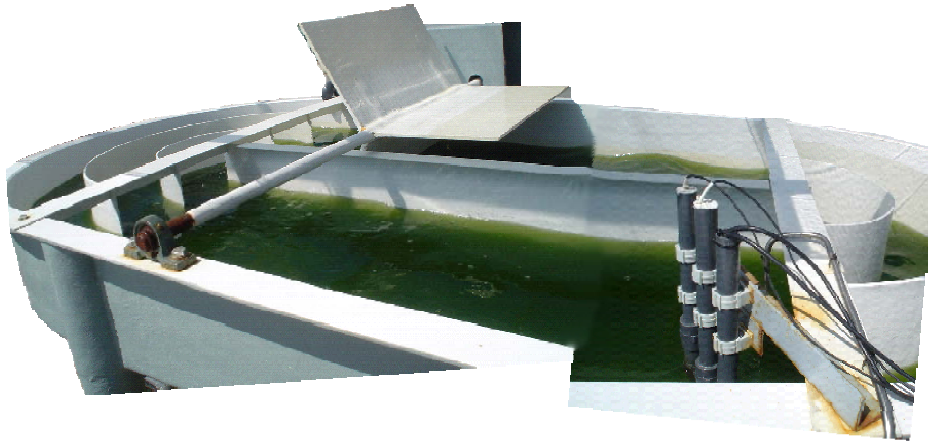


Figura 70. Tanque de cultivo abierto agitado por palas. A la derecha se observan las sondas de pH, temperatura y oxígeno disuelto, así como el sistema de inyección de CO₂.

2.6.1. Cinéticas de crecimiento.

La Figura 71 muestra la evolución del contenido de clorofila en los dos cultivos de *Dunaliella* ensayados, tanto en la etapa de laboratorio (en interior) como en la exterior.

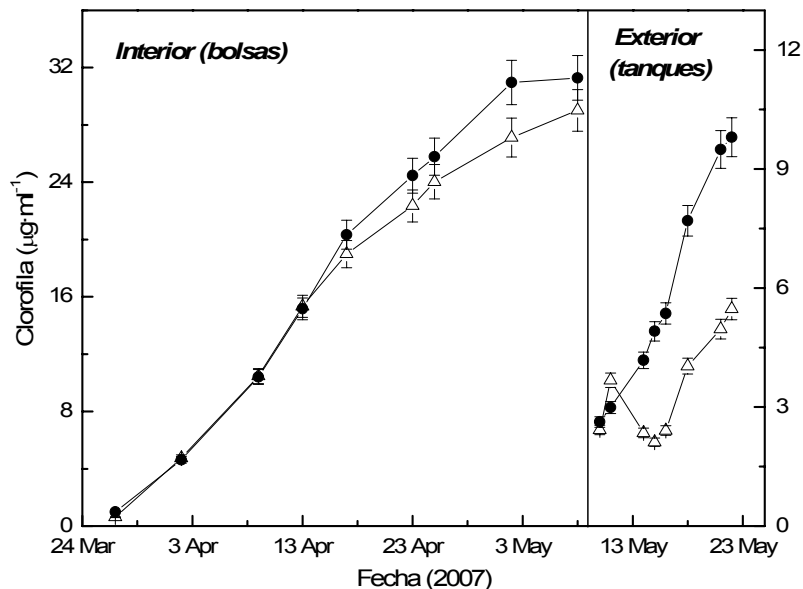


Figura 71. Contenido de clorofila total en cultivos de *Dunaliella* EMS (-●-) y *D. bardawil* (-△-) incubados en las instalaciones del CICEM.

La etapa de cultivo interior duró en torno a 42 días. Según se observa en la Figura anterior, durante las tres primeras semanas, ambos cultivos mostraron un contenido de clorofila idéntico. Sin embargo, a partir de la cuarta semana de incubación (final de la etapa exponencial de crecimiento), *Dunaliella* EMS presentó una concentración de clorofila un 15% superior a la observada en *D. bardawil*.

Una vez en la situación exterior, el cultivo de *Dunaliella* EMS demostró, desde el primer momento, una mayor capacidad de adaptación a las nuevas condiciones durante la primera semana. Tras dicho período, los cultivos se diluyeron para mantener la densidad celular en torno a las 700.000 cel·ml⁻¹ y continuar la producción semicontinua de microalgas.

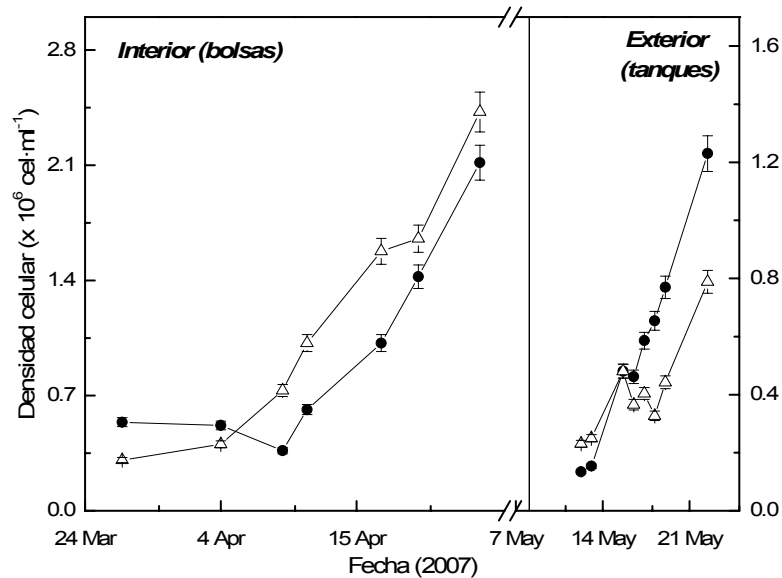


Figura 72. Densidad celular de los cultivos de *Dunaliella* EMS (●) y *D. bardawil* (△) incubados en las instalaciones del CICEM.

En la Figura 72, que representa la densidad celular de ambos cultivos, se muestra cómo el cultivo de *Dunaliella* EMS incubado en las bolsas presentó un menor número de células durante gran parte del ensayo. Sin embargo, la pauta observada en la situación exterior fue radicalmente diferente, ya que en ese caso, el cultivo de *Dunaliella* EMS mostró una densidad celular superior durante el período de crecimiento necesario para alcanzar la densidad celular adecuada para diluir los cultivos.

Así pues, las dos últimas Figuras muestran con claridad que el crecimiento del cultivo de *Dunaliella* EMS es más rápido que el de *D. bardawil*. Este hecho se ve confirmado por las tasas de crecimiento calculadas durante el período de incubación en las bolsas y la etapa exterior en tanques, tal y como se expone en la Tabla 28.

Tabla 28. Tasas de crecimiento en cultivos de *Dunaliella* EMS y *D. bardawil* incubados en las instalaciones del CICEM.

Estirpes	Tasas de crecimiento (d^{-1})		
	Sala de cultivo	Exterior (Abril/Mayo)	Exterior (Julio)*
<i>Dunaliella</i> EMS	0.110	0.216	0.543
<i>D. bardawil</i>	0.080	0.176	0.250

*Los datos mostrados en la tercera columna corresponden a un segundo experimento independiente realizado bajo las condiciones descritas anteriormente.

En ambos escenarios, bolsas interiores y tanques exteriores, *Dunaliella* EMS se mostró como una estirpe con un mejor crecimiento en comparación con *D. bardawil*, especialmente, cuando los valores de luz y temperatura en exterior fueron los más altos del año para nuestra región (mes de julio). En términos generales, y como era esperable, los cultivos incubados en los tanques exteriores presentaron un crecimiento más rápido, inducido fundamentalmente por una mayor disponibilidad de luz.

2.6.2. Cinéticas de acumulación de carotenoides.

Paralelamente al análisis de productividad de *Dunaliella* EMS y *D. bardawil*, se compararon las cinéticas de acumulación de carotenoides de ambas estirpes en ambos modos de cultivo, es decir, en las bolsas interiores y en los tanques exteriores. La Figura 73 muestra la evolución de la acumulación de carotenoides observada durante los ensayos.

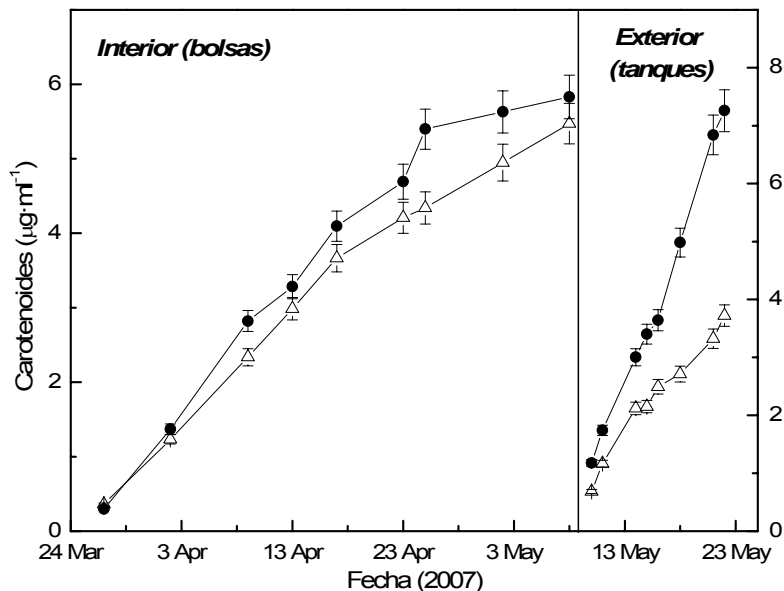


Figura 73. Contenido de carotenoides totales en cultivos de *Dunaliella* EMS (●) y *D. bardawil* (△) incubados en las instalaciones del CICEM.

De la Figura 73 se infiere que *Dunaliella* EMS acumuló, prácticamente desde la primera semana de cultivo en bolsas, un contenido de carotenoides que, en promedio, fue un 15% superior al observado en *D. bardawil*. Además, este hecho se potenció en la situación exterior, ya que las diferencias en la

acumulación de pigmentos se incrementaron notablemente debido a la mayor irradiancia, duplicándose la cantidad acumulada en *Dunaliella* EMS.

Otro de los aspectos a resaltar a partir de estos trabajos, es la esperable mayor relación carotenoides:clorofila encontrada en el cultivo exterior (tanques), respecto a la incubación interior (sala de cultivo). En la Tabla 29 se presentan las relaciones observadas en cada caso, a mitad de la fase de crecimiento exponencial. Estos datos demuestran como la alta irradiancia y la variabilidad de las condiciones climáticas características de una localización exterior, originan un considerable aumento (3.5 veces lo mostrado en la situación interior) de dichas relaciones.

Tabla 29. Relaciones carotenoides:clorofila encontradas para las estirpes ensayadas tanto en condiciones interiores de cultivo como en exterior a la mitad de la etapa de crecimiento exponencial.

<i>Dunaliella</i> EMS		<i>Dunaliella</i> bardawil	
<i>Sala de cultivo</i>	<i>Tanques</i>	<i>Sala de cultivo</i>	<i>Tanques</i>
0.20	0.74	0.19	0.68

Los resultados de la Tabla anterior también apuntan a una mejor capacidad para sintetizar carotenoides, en ambas situaciones, cuando el cultivo muestra viabilidad y se encuentra totalmente activo, es decir, en plena fase de crecimiento exponencial.

En conclusión, esta experiencia piloto ha permitido confirmar algunas de las potencialidades que ya habían sido observadas y descritas en los estudios recogidos en apartados anteriores de esta Tesis, revelando que la estirpe mutante es una buena candidata para procesos de producción de carotenoides en exterior.

2.7. Continuación de la investigación.

Los resultados producidos en esta Tesis, junto a los generados por otros trabajos del grupo de investigación, dieron lugar al interés del Grupo Empresarial Rafael Morales por la producción masiva de cultivos de microalgas y su enriquecimiento en carotenoides, antioxidantes de valor comercial. Del interés mutuo del Grupo Empresarial y nuestro grupo de investigación en la materia, surgió la colaboración que actualmente permite operar una planta experimental con sistemas de fotobiorreactores agitados por palas y tubulares, con el objetivo de aplicar los conocimientos desarrollados por el grupo a la producción masiva de carotenoides.

Para tal fin, uno de los objetivos planteados para continuar los trabajos realizados en esta Tesis, es evaluar la productividad de *Dunaliella* EMS para la obtención de cultivos masivos (primera etapa) y para su enriquecimiento en carotenoides (segunda etapa), en fotobiorreactores tubulares (ver imagen) de la planta experimental donde, en principio, podrían esperarse rendimientos de las concentraciones intracelulares de carotenoides superiores a los observados en sistemas abiertos.



Fotobiorreactores tubulares de 400 l instalados en la planta piloto experimental ubicada en el Centro para la Investigación del Cultivo de Especies Marinas (CICEM - "Agua del Pino").

3. INFLUENCIA DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE EL DESARROLLO DE CULTIVOS DE FRESA.

Tras los estudios del grupo en relación al papel estimulador de la radiación UV-A sobre el crecimiento de microalgas, se planteó la posibilidad de cambiar el organismo objeto de la investigación, manteniendo una estrategia experimental diseñada para desarrollar la misma idea que subyace en los trabajos. En consecuencia, se decide apostar por iniciar estudios en esta misma línea, dada la importancia socioeconómica que el cultivo de fresa tiene en nuestra región.

Cabe mencionar, además, que se parte de la base de que tanto las algas verdes como las plantas terrestres pertenecen al mismo clado¹ (Viridiplantae), de modo que las conclusiones básicas que se establezcan a una escala inferior (la que constituyen las microalgas, utilizadas como organismo modelo) pudieran ser extrapoladas a individuos superiores (como es el caso de la planta de fresa, perteneciente a la división Spermatophyta; plantas vasculares con semillas).

A continuación, en los siguientes apartados, se mostrarán los resultados más relevantes que se han obtenido después de desarrollar dos campañas freseras completas (2004/2005 y 2005/2006). La estrategia experimental desarrollada a lo largo de estos dos años (ver Materiales y Métodos) ha consistido en aplicar distintos materiales plásticos de cobertura caracterizados por transmitir y/o atenuar ciertas regiones del rango ultravioleta del espectro solar incidente (280 – 400 nm), y determinar, a lo largo de la campaña, parámetros de productividad de la planta y de la calidad nutricional del fruto. A modo de recordatorio, las características de los filtros empleados en estos trabajos con cultivos de fresa se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Filtros empleados en los estudios con fresa.

Filtro	Tratamiento	Características
Plástico EVA	Control Gorofres	Empleado comúnmente en microtúneles. 70% de transmisividad para la región UV (280 – 400 nm)
Ultraplan-295	Control	Alta transparencia UV-PAR (80%) con atenuación de parte de UV-B (280-295 nm)
Folex-320	PAR + UV-A	Atenuación de la región UV-B (280 – 315 nm)
Ultraplan-395	PAR	Atenuación completa de la región UV (280 – 400 nm)

3.1. Efectos sobre la productividad: campaña 2004/2005 y 2005/2006.

3.1.1. Campaña 2004/2005.

Durante la campaña 2004/2005, los trabajos se desarrollaron en una parcela ubicada en la Finca “Las Madres” que la empresa colaboradora S.A.T. Gorofres cedió desinteresadamente al grupo para la realización del estudio. A lo largo de esta primera campaña se analizó el comportamiento productivo de

¹Clado: Cada una de las ramas del árbol filogenético que se propone para agrupar a los seres vivos. Por tanto, un clado se interpreta como un conjunto de especies emparentadas, es decir, con un antepasado común.

plantones de la variedad 'Camarosa' (*Fragaria x ananassa* Duch.). En esta primera experimentación no se contó con datos de producción de los plantones que permanecieron cubiertos con el plástico que habitualmente utilizan los agricultores de la zona. Debido a esto, se consideró como cultivo control aquel tramo de plantas cubierto con un filtro (Ultraphan-295) que prácticamente deja pasar el 80% de la radiación solar total y que atenúa levemente las longitudes de onda pertenecientes al rango 280 – 300 nm (parte del UV-B).

El 10 de marzo del año 2005 se sustituyeron los plásticos habituales empleados inicialmente para forzar el cultivo de fresa (tunelillo EVA de 75 μ ; 300 galgas) por unos filtros con unas características ópticas concretas. Cada tramo de plantas cubierto con un tipo de filtro es considerado un tratamiento diferente, donde la única modificación realizada es la cubierta de forzado, no alterando otras variables del cultivo como el régimen nutricional o el resto prácticas agrícolas (ver Materiales y Métodos e Introducción).

Durante las dos primeras cosechas, se recolectaron todos los frutos maduros, eliminando, antes de realizar la primera recogida, todos los frutos existentes para establecer un punto "cero" de partida, coincidiendo con la sustitución del material de cubierta ya mencionado. En la Tabla 31 se muestran los datos de producción total por planta y cosecha (cos), expresada ésta en términos de gramos y número de frutos.

Tabla 31. Producción total por planta y cosecha ($\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}\cdot\text{cos}^{-1}$ y $\text{frutos}\cdot\text{planta}^{-1}\cdot\text{cos}^{-1}$) obtenida tras acumular las dos primeras cosechas en función de cada tratamiento aplicado al cultivo de la variedad 'Camarosa'.

Tratamiento	$\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}\cdot\text{cos}^{-1}$	$\text{Frutos}\cdot\text{planta}^{-1}\cdot\text{cos}^{-1}$
Control	128.78	5.5
PAR + UV-A	114.30	4.6
PAR	137.34	5.45

De la Tabla 31 se infiere cómo al principio de la campaña el tratamiento que retiene toda la radiación ultravioleta (PAR) ofrece un rendimiento por planta y cosecha levemente superior al observado en el control y algo superior si se compara con el tratamiento PAR + UV-A. En este período de la campaña (hasta final de marzo) tiene lugar la producción de fresa extra-precoz, por lo que los rendimientos alcanzados en esta fecha son de suma importancia para el balance económico de la campaña debido al alto precio que alcanza la fruta en los mercados.

Posteriormente, en lo que restaba de campaña se llevaron a cabo cinco recolecciones más. Durante cada una de estas cinco cosechas restantes, se recolectaron frutos maduros e inmaduros que presentaban una largura mínima superior a 3 cm. Además, dado que al existir en cada tratamiento una doble hilera de plantas influida por la orientación, se diferenciaron dos lados: el que queda perpendicular al sur (cuyas plantas muestran un mayor desarrollo) y el que queda perpendicular al norte (zona más sombría y de menor desarrollo). La Tabla 32 muestra los datos de producción total por planta y cosecha (cos), expresada ésta en términos de gramos y número de frutos, durante las mencionadas cosechas, en función del tratamiento y la orientación.

Tabla 32. Producción total por planta y cosecha ($\text{g planta}^{-1} \cdot \text{cos}^{-1}$ y $\text{frutos planta}^{-1} \cdot \text{cos}^{-1}$) obtenida tras acumular el resto de cosechas realizadas en función del tratamiento y la orientación.

Frutos maduros	$\text{g-planta}^{-1} \cdot \text{cos}^{-1}$			$\text{Frutos-planta}^{-1} \cdot \text{cos}^{-1}$		
	Sur	Norte	Total	Sur	Norte	Total
Control	148.19	98.74	123.46	8.5	6.2	7.3
PAR + UV-A	62.67	60.98	61.82	3.7	3.6	3.6
PAR	115.98	93.37	104.67	6.1	5.5	5.8

Frutos inmaduros	$\text{g-planta}^{-1} \cdot \text{cos}^{-1}$			$\text{Frutos-planta}^{-1} \cdot \text{cos}^{-1}$		
	Sur	Norte	Total	Sur	Norte	Total
Control	57.75	24.40	41.97	5.1	2.6	3.8
PAR + UV-A	54.05	19.20	36.62	4.9	1.7	3.3
PAR	49.87	26.60	38.23	4.6	2.7	3.6

Por otro lado, analizando los rendimientos obtenidos en la producción de frutos maduros e inmaduros por planta y cosecha, las diferencias entre el tratamiento PAR y el control se minimizaron e incluso cambiaron de sentido durante el resto de la campaña (Tabla 32), llegando el tratamiento control a superar mínimamente el rendimiento observado bajo el tratamiento PAR en ambos casos (frutos maduros y no maduros). En este sentido, considerando la campaña en su totalidad, las diferencias entre ambos tratamientos se compensaron. En contraposición, la tendencia productiva del tratamiento PAR + UV-A (ausencia de UV-B) sigue siendo sensiblemente inferior a la mostrada por el resto.

La Figura 74 muestra cómo se distribuyó la producción por planta, expresada en gramos, en función del tratamiento y la orientación, habiendo considerado para ello las últimas cinco cosechas. Dicha Figura expone con claridad cómo la fila de plantas perpendicular al Sur, al recibir más radiación, presentó una mayor productividad que la fila opuesta, es decir, la enfrentada al Norte. Esta tendencia se observó bajo todos los tratamientos y para ambos conjuntos de frutos (maduros y no maduros). Por otro lado, hacia el final de la campaña, las diferencias observadas entre ambas orientaciones disminuyeron (datos no mostrados), debido posiblemente a la menor productividad por planta (Verdier 1987) y la mayor altura solar, propias de finales de mayo-mes de junio.

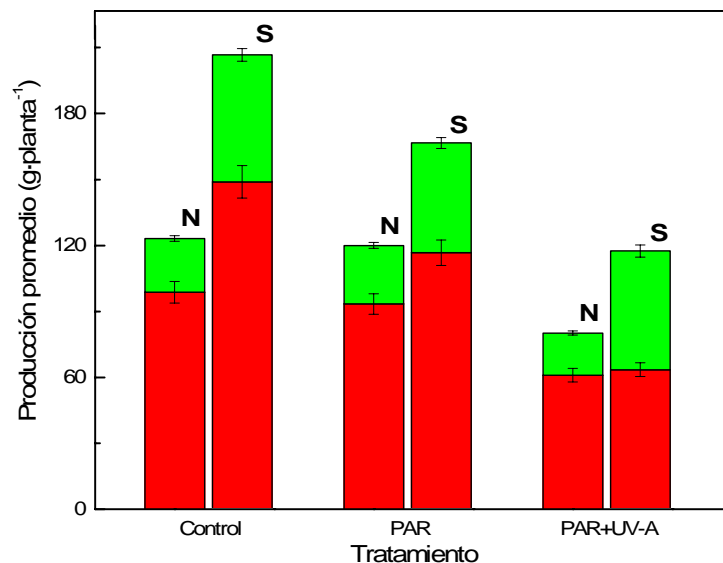


Figura 74. Producción promedio acumulada de frutos maduros (rojo) e inmaduros (verde) en función del tratamiento y la orientación de las plantas.

La Tabla 33 muestra el peso promedio de los frutos recolectados en función del tratamiento, computando todas las recolecciones realizadas durante la campaña 2004/2005.

Tabla 33. Peso promedio de frutos maduros y no maduros recolectados durante la campaña 2004/2005 en función del tratamiento y la orientación.

Tratamiento	g·(fruto maduro) ⁻¹	g·(fruto inmaduro) ⁻¹
Control	18.96	10.49
PAR + UV-A	20.32	10.27
PAR	20.53	10.91

Los datos mostrados en la Tabla 33 denotan un ligero aumento del peso promedio de los frutos recolectados bajo los tratamientos que retienen parte o toda la radiación ultravioleta (PAR y PAR + UV-A). Este hecho se relaciona con la menor producción de frutos por planta y cosecha observada en estos mismos tratamientos en comparación con el control.

Respecto al conjunto de frutos inmaduros recolectados, tras realizar un análisis global del peso promedio del fruto y del número promedio de frutos producidos por planta y cosecha, apenas se observaron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, analizando datos parciales de la mitad de campaña (datos desglosados no mostrados), el peso promedio de los frutos inmaduros recolectados fue sensiblemente superior bajo el tratamiento que atenuó la radiación ultravioleta en su totalidad (PAR). Por ejemplo, mientras que el tratamiento control mostró un peso promedio de 11.8 g, en los tratamientos que retuvieron radiación ultravioleta parcialmente (PAR + UV-A) o totalmente (PAR), se alcanzaron valores de 12.1 y 14.4 g, lo que supone un incremento del 2 y 18%, respectivamente. Puesto que los frutos inmaduros se retiraron antes de su estado óptimo de maduración, es posible que hubiese incrementado el peso de las cosechas ya que los tiempos de recolección fueron los mismos para los tres tratamientos.

Hacia el final de la campaña las diferencias en el peso promedio de frutos entre tratamientos se compensaron, lo cual podría tener relación con las condiciones climáticas existentes durante este mes, caracterizadas por una mayor temperatura, dosis de irradiancia y altura solar. Además, un mayor vigor de las plantas desarrolladas bajo los tratamientos PAR y PAR + UV-A podría reducir la cantidad de energía disponible para el desarrollo de los frutos. Estas observaciones serían coherentes con lo publicado para otros cultivos, que en ausencia de UV-B invierten proporcionalmente más energía anabólica en el desarrollo de las partes aéreas de la planta (Kittas et al. 2006).

Algo similar a lo comentado en el párrafo anterior se observó después de analizar, a mitad de campaña, los pesos promedios parciales de los frutos maduros. Así, las plantas desarrolladas en ausencia total de radiación ultravioleta (tratamiento PAR) produjeron frutos con un peso promedio de 20.1 g, mientras que aquellas que lo hicieron en ausencia de radiación UV-B (tratamiento PAR + UV-A) o bajo toda la radiación solar (tratamiento Control), mostraron pesos promedios de 17.8 y 17.2 g, respectivamente. Por lo tanto, el fruto maduro obtenido únicamente con radiaciones PAR pesó, en promedio, un 15% más que el obtenido bajo el tratamiento control (PAR + UV).

La dinámica de producción mostró, como suele ser habitual con carácter general, un máximo a mitad de campaña (abril), a partir del cual se observó en todos los tratamientos una tendencia hacia la producción de frutos de menor peso durante el resto de campaña.

En base a los resultados discutidos anteriormente, la Figura 75 muestra una estimación de la producción de fruta madura, expresada en gramos por planta, para cada uno de los tratamientos.

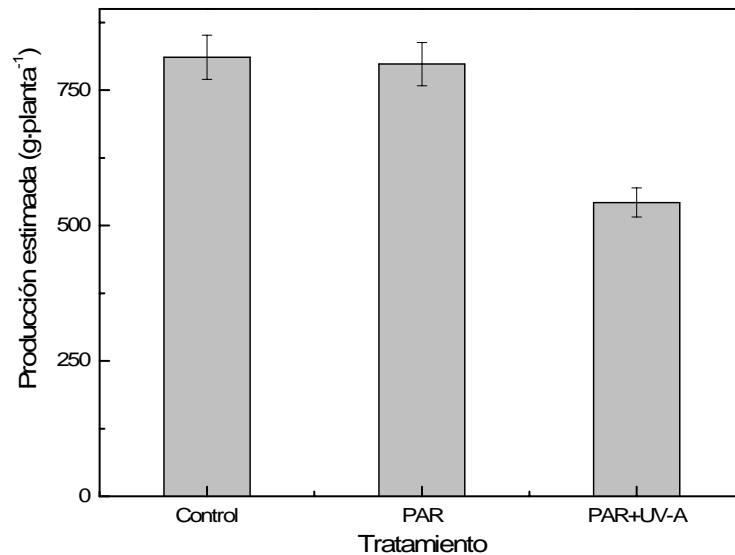


Figura 75. Estimación de la producción total por planta en función del tratamiento aplicado durante la campaña 2004/2005.

**Estos datos no son comparables con valores de referencia sobre la producción total registrada en campo durante esta campaña ya que no se contabilizaron todas las cosechas existentes entre febrero y junio, y además, se eliminaron frutos inmaduros, lo que dificulta conocer la producción real. Así pues, la figura se elabora a partir de los datos de las cosechas realizadas en este estudio.*

La estimación realizada en la Figura anterior muestra una disminución considerable del peso total recolectado por planta bajo el tratamiento que retuvo radiación UV-B. Sin embargo, los valores que ofrece el tratamiento control y aquel que sólo dejó pasar radiación visible (PAR) son similares. Sin llegar a ser concluyentes, estos resultados parecen resaltar la idea de la contribución relevante de la radiación UV-B, al menos para la productividad de la variedad 'Camarosa', si se quieren obtener buenos rendimientos. Los estudios existentes en la literatura acerca del efecto de niveles ambientales de la radiación UV sobre la productividad de cultivos de fresa son muy escasos, aunque sí se encuentran trabajos referidos a otros cultivos agrícolas como el maíz (Pal et al. 1997; Correia et al. 1998; 2005), el trigo (Yao et al. 2006; 2007), el tomate (Bacci et al. 1999; Devanand et al. 2006) o la lechuga (Krizek et al. 2006), entre otros. Estos estudios no conducen a una evidencia clara acerca de los efectos que la presencia de niveles ambientales de radiación ultravioleta provoca sobre la productividad. En este sentido, Kakani et al. (2003) apunta que, de los numerosos estudios revisados que trataron de evaluar el efecto de la radiación UV-B potenciada sobre la productividad de diferentes cultivos, casi la mitad mostró efectos negativos, otra parte similar no mostró cambios y una pequeña parte indicó aumentos en la productividad. Asimismo, señala que existe una amplia variabilidad específica respecto a la sensibilidad frente a la radiación UV-

B, como también se pone de manifiesto en estudios de otros autores con otros cultivos distintos al de fresa (Yuan et al. 2000; Li et al. 2002; Zu et al. 2004).

El análisis de la anchura y largura (mm) de los frutos maduros mostró, en promedio, un mayor tamaño de frutos recolectados bajo el tratamiento PAR en comparación con el control, lo cual se correlaciona bien con lo observado en la Tabla 33 en relación al peso promedio, no detectándose diferencias entre el control y el tratamiento PAR + UV-A.

En resumen, tras el análisis de los datos correspondientes a la campaña 2004/2005, los resultados parecen indicar una tendencia hacia la producción de frutos algo más grandes cuando las plantas se cultivan en ausencia de radiación UV y, especialmente, en el momento de mayor productividad (abril). Sin embargo, esto no se ve reflejado en las estimaciones de producción total por planta, ya que el número de frutos recolectado en ausencia de radiación UV es algo inferior al observado en el control. Finalmente, las plantas del tratamiento que atenúa la radiación UV-B (PAR + UV-A) muestran los peores rendimientos, lo que podría sugerir la implicación de la parte más energética del espectro ultravioleta en la actividad anabólica conducente a la producción del fruto en la variedad 'Camarosa'. El balance espectral de la radiación PAR, UV-A y UV-B se ha mostrado como una variable importante en la determinación de la sensibilidad de las plantas en estudios de campo. En presencia de UV-B, altos niveles de radiación PAR y UV-A mitigan los posibles efectos dañinos de la radiación UV-B (Krizek 2004).

3.1.2. Campaña 2005/2006.

La experimentación de campo se desarrolló en una parcela ubicada en la Finca "Peguerillas" que la empresa colaboradora S.A.T. Gorofres cedió desinteresadamente al grupo para realizar las investigaciones que requería este estudio. En esta segunda campaña, se analizó el comportamiento productivo de plantones de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) de la variedad 'Camarosa' y 'Ventana'.

Durante la campaña, y a modo de control, se contó con datos de producción de plantones de ambas variedades que permanecieron cubiertos con el plástico habitual que utilizan los agricultores de la zona (tunelillo EVA). El resto de tratamientos ensayados fueron los empleados en la campaña anterior. Por lo tanto, en las Figuras y Tablas que se exponen a continuación, se denominará 'Control Gorofres' al tratamiento con el plástico habitual empleado por los agricultores de la zona. El tratamiento 'Control' presentó el mismo filtro que ya ha sido descrito en el apartado anterior (campaña 2004/2005), es decir, aquel que deja pasar el 80% de la radiación solar total, atenuando una mínima parte de UV-B (280-295 nm).

Al igual que en la campaña anterior, las labores agrícolas a las que se sometió el cultivo, necesarias para el correcto desarrollo del mismo y los tiempos en que éstas se realizaron, fueron marcados por un agricultor con experiencia (más detalles en Material y Métodos e Introducción).

En el cuadro 1 se presenta la ficha del cultivo, en la que se describen las principales características del mismo durante el desarrollo de la experimentación.

Cuadro 1. Ficha de cultivo correspondiente a las variedades 'Camarosa' y 'Ventana' estudiadas durante la campaña 2005/2006.

Ensayo	Variedad 'Camarosa'	Variedad 'Ventana'
Lugar	Peguerillas (Ctra. Huelva – Gibrleón)	
Coordenadas	37° 20' N – 6° 56' W	
Período de ensayo	Noviembre 05'/Mayo 06'	
Parcela	20 plantas (4 m ²)	
Tipo de cultivo	Convencional en suelo	
Suelo	Arenoso	
Filas de plantas	1	
Anchura de lomos	50 cm	
Acolchado	PE negro	
Marquilla	Cada 30 cm	
Desinfección de plantas	No	
Fecha de plantación	03/11/2005	*Mediados de octubre
Tipo de estructura	Microtúnel	
Cubierta	EVA 300 galgas (Control Gorofres)	
Instalación	01/12/2005	
Fecha de retirada	Abril 2006	
Comienzo de recolección	14/03/2006	
Final de recolección	22/05/2006	
Nº de recolecciones	9	

*Todas las plantas de la variedad 'Ventana' fueron transplantadas desde otra finca que posee Gorofres. La fecha de plantación en la finca experimental es coincidente con la de 'Camarosa'.

A continuación se presentan los resultados más relevantes obtenidos en esta segunda campaña sobre la productividad de las plantas, dependiendo de la variedad y el tratamiento aplicado. Se analizarán y discutirán los distintos parámetros relativos a la productividad.

Peso promedio total

La Figura 76 muestra el peso promedio total recolectado por planta a lo largo de la campaña en función de los tratamientos aplicados.

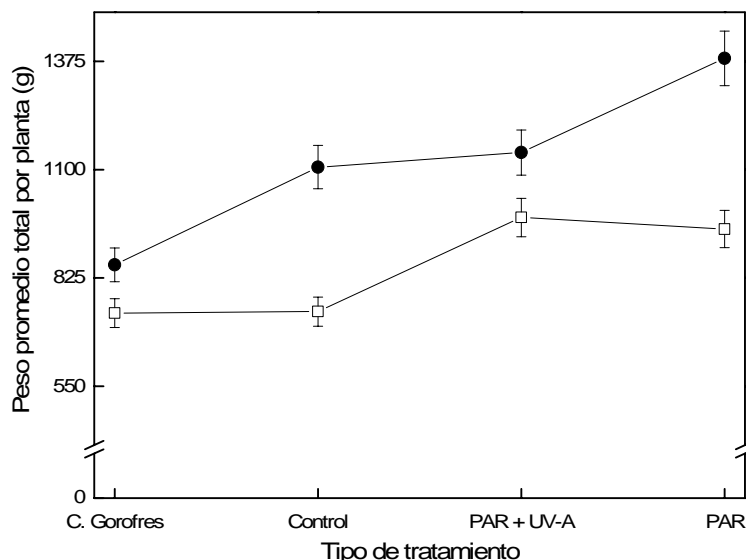


Figura 76. Productividad total promediada por planta que se alcanzó en la finca experimental "Peguerillas" durante la campaña 2005/2006 en función del tratamiento aplicado y de la variedad: 'Camarosa' (-●-) y 'Ventana' (-□-).

Un primer análisis de la Figura 76 revela que la ausencia de radiación UV en general, y de UV-B, en particular, favorecen un aumento de la productividad de ambas variedades, si bien parece que la sensibilidad de cada una de las variedades respecto a la radiación UV-B es algo distinta si comparamos sus productividades con las obtenidas en ausencia de radiación UV total (tratamiento PAR). Mientras que en el caso de 'Ventana' parece que la ausencia de radiación UV-B estimula la producción, en 'Camarosa', ésta es sensiblemente inferior a la alcanzada bajo el tratamiento PAR.

Si estos resultados se desglosan por meses, se obtiene la Figura 77, que muestra la dinámica de producción a lo largo de los meses de marzo, abril y mayo que, como se observa, no es homogénea a lo largo de la campaña.

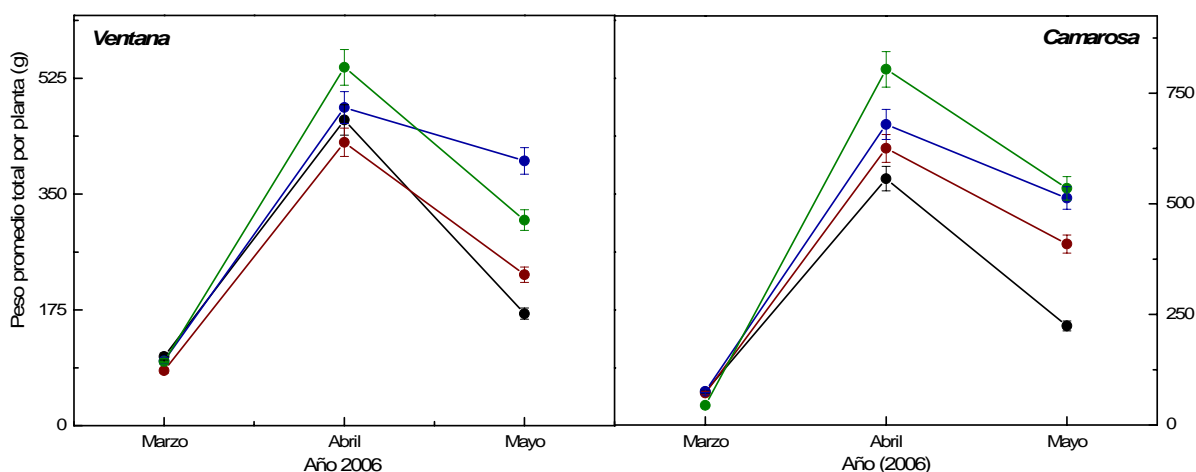


Figura 77. Productividad promedio total por planta desglosada por meses en función de la variedad ('Ventana' y 'Camarosa') y del tratamiento aplicado (PAR, -●-; PAR + UV-A, -●-; Control, -●-; C. Gorofres, -●-)

El pico de producción se da a lo largo del mes de abril y en ambos casos, la máxima producción se alcanza bajo el tratamiento en ausencia de radiación

UV. Además, la variedad 'Ventana' muestra unos registros algo inferiores en comparación con los obtenidos para la variedad 'Camarosa', aproximadamente un 35% menos de peso recolectado.

Promedio de frutos

La Figura 78 muestra el promedio de frutos recolectados a lo largo de la campaña para cada uno de los tratamientos ensayados.

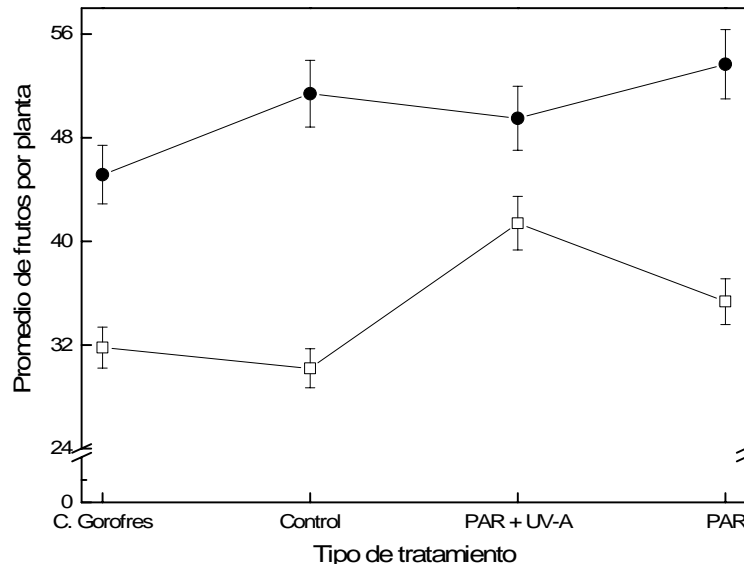


Figura 78. Producción promedio de frutos maduros durante la campaña 2005/2006 en función de la variedad ('Camarosa', - ● -; 'Ventana', - □ -) y del tratamiento aplicado.

De la Figura 78 se desprende que el patrón de producción de frutos, en función del tratamiento, es diferente en las dos variedades de fresa ensayadas durante la campaña y, en buena lógica, es paralelo a la evolución del peso promedio observada para cada variedad y tratamiento en la Figura 77. Mientras que en el caso de 'Camarosa' la ausencia de radiación UV-B parece retener la producción de frutos, en los plantones pertenecientes a la variedad 'Ventana' dicha radiación parece favorecer un incremento de la producción cercano al 25%, respecto a los valores observados en los controles.

El número máximo de frutos por planta (54) se obtiene bajo el tratamiento PAR aplicado a la variedad 'Camarosa'. Otro hecho destacable de la Figura 78 es la similitud de la producción de frutos por planta obtenida en cada uno de los dos controles para la variedad 'Ventana', y, por el contrario, las diferencias existentes en los controles de la variedad 'Camarosa'. En este sentido, parece necesario analizar con más profundidad el posible efecto que puede ocasionar la mayor transparencia del Control respecto al Control Gorofres en 'Camarosa'. Además, a tenor de los resultados obtenidos en ambas variedades para el tratamiento PAR + UV-A (ausencia de UV-B), es probable que exista una respuesta diferencial de ambas variedades frente a la ausencia de radiación UV-B y frente a las dosis de radiación total que reciben durante su desarrollo. Los resultados mostrados redundan en la idea del papel relevante de la radiación UV-B en la estimulación de la productividad de la variedad 'Camarosa'.

El desglose por meses de los datos de producción promedio de frutos por planta, según la variedad y el tratamiento considerado, se expone en la Figura 79. Al igual que ocurre al estudiar la evolución del peso promedio total a lo largo de la campaña (Figura 77), el promedio del número de frutos recogido por planta varía según el momento de la campaña y el tratamiento aplicado.

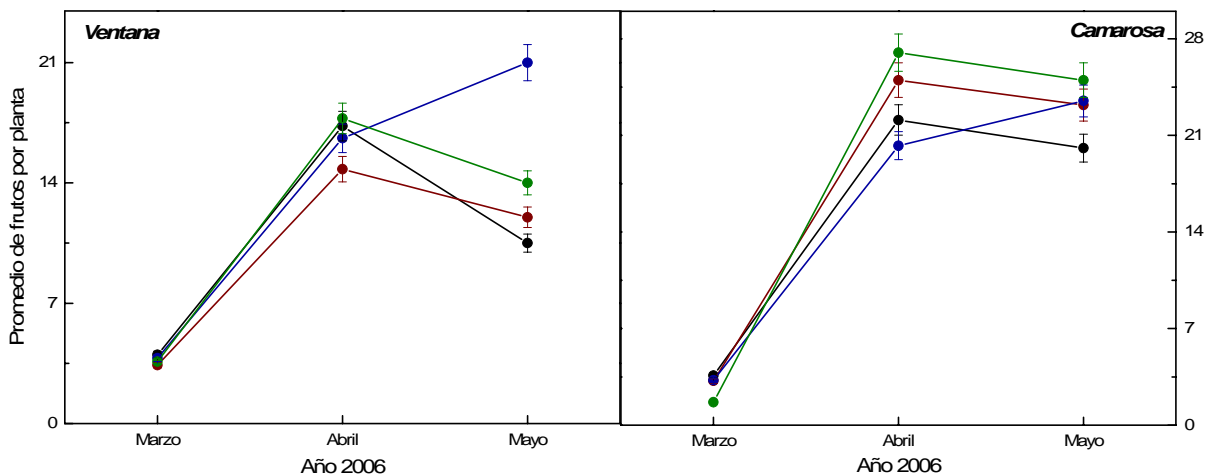


Figura 79. Productividad promedio de frutos por planta de los meses de marzo, abril y mayo en función de la variedad ('Ventana' y 'Camarosa') y del tratamiento aplicado (PAR, - ● - ; PAR + UV-A, - ● - ; Control, - ● - ; C. Gorofres; - ● - ; C. Gorofres)

En general, la máxima producción de frutos en ambas variedades tuvo lugar en el mes de abril y bajo todos los tratamientos, con excepción de lo observado en 'Ventana' bajo el plástico que atenúa radiación UV-B, donde el pico de máxima producción se detectó en el mes de mayo. En ausencia de la parte más energética del espectro de radiación ultravioleta se observó una diferente sensibilidad en ambas variedades que se refleja en las curvas azules de esta Figura, con dos matices diferenciados; mientras que en 'Ventana' parece que la productividad "explota" al final de la campaña, en 'Camarosa' tiene lugar una recuperación de la productividad en el mes de mayo debido posiblemente a una ralentización del proceso de maduración del fruto (Tsormpatsidis et al. 2007), ya que durante el mes de abril el promedio de frutos que se encontraban en el estado óptimo de recolección era el más bajo de todos los tratamientos.

Mientras que en la variedad 'Ventana' se recolectaron durante el mes de abril en torno a 15 – 18 frutos por planta, independientemente del tratamiento aplicado, en 'Camarosa', esta horquilla se situó alrededor de los 20 – 27 frutos por planta, lo que supone una producción entre un 25 y 35% superior. También se apreció cómo la producción comenzó antes en 'Ventana' (mes de marzo), lo cual es consistente con lo que refleja la bibliografía (Larson y Shaw; patente). De las Figuras 77 y 79 se deduce que los plantones de 'Camarosa' entran en producción más tarde, siendo la variedad 'Ventana' más precoz.

Si bien el comportamiento productivo, a lo largo de la campaña, podría decirse que es análogo en ambas variedades, también es cierto que, en 'Camarosa', en todos los tratamientos excepto en aquel que atenúa radiación UV-B, se observa una clara tendencia a mantener los niveles productivos máximos observados en el mes de abril, mientras que la producción de frutos maduros por planta disminuye en 'Ventana', con claridad, en dicho final de campaña.

Peso promedio del fruto

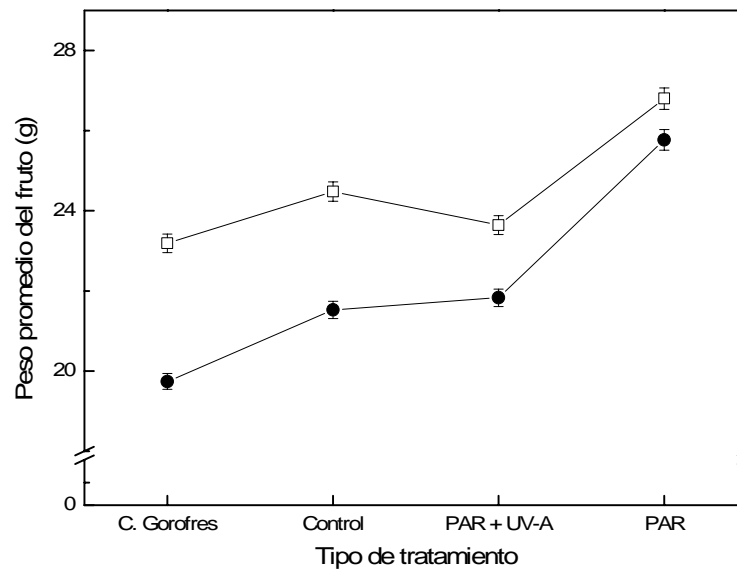


Figura 80. Peso promedio del fruto recolectado durante la campaña 2005/2006 dependiendo de la variedad ('Camarosa', - ● -; 'Ventana', - □ -) y el tipo de tratamiento.

Analizando la evolución del peso promedio del fruto obtenido en función del tratamiento (Figura 80), se encontró la misma tendencia en las dos variedades, siendo más grande el fruto obtenido a partir de la variedad 'Ventana'. Por término medio, éstos fueron, en todos los tratamientos, un 10% más pesados que los recogidos a partir de los plantones de la variedad 'Camarosa'.

Los mayores frutos se obtuvieron a partir del tratamiento que sólo recibió radiación PAR (25 – 28 g por fruto), aunque en general, dentro de cada variedad hubo diferencias del orden del 10% para 'Ventana' y del 20% para 'Camarosa'.

En la Figura 81 se analiza la variación del peso promedio del fruto a lo largo de los meses de la campaña 2005/2006.

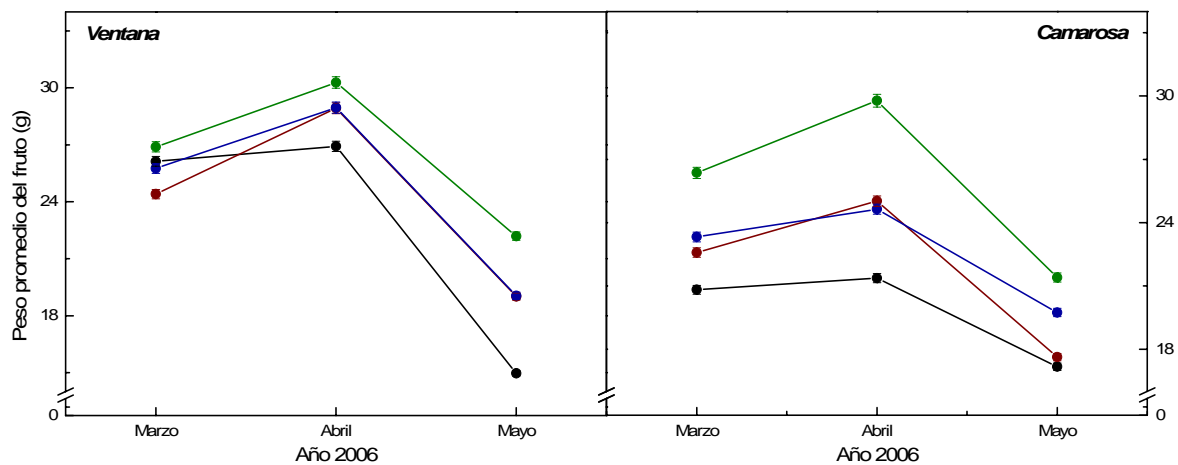


Figura 81. Evolución del peso promedio del fruto recolectado durante los meses de marzo, abril y mayo en función de la variedad ('Ventana' y 'Camarosa') y del tratamiento aplicado (PAR, - ● -; PAR+UV-A, - ■ -; Control, - ● -; C. Gorofres, - ● -)

Analizando la variación del peso promedio de los frutos recolectados a lo largo de los meses, se observa que en la variedad 'Ventana' las diferencias de peso debidas a los distintos tratamientos son menores que en el caso de 'Camarosa' (Figura 81), encontrándose el máximo en torno a mediados de abril (27 – 30 g por fruto) y partiendo desde marzo con buenos pesos (24 – 27 g por fruto). Los frutos más pesados se obtienen bajo el tratamiento que sólo deja pasar radiación PAR. Sin embargo, en 'Camarosa', las diferencias entre tratamientos son mayores, aunque el peso máximo promedio vuelve a alcanzarse en aquellos frutos obtenidos en ausencia total de radiación UV (tratamiento PAR; 30 g por fruto), siendo el rango de pesos recolectados a lo largo de la campaña, a partir de esta variedad, más amplio.

Dimensiones del fruto

La Figura 82 muestra la variación de la anchura y largura promedio de los frutos obtenidos, bajo cada tratamiento, a partir de las dos variedades ensayadas. En concordancia con lo observado en la Figura 80 respecto al peso promedio del fruto, en la Figura 82 se observa cómo los frutos de la variedad 'Ventana' son, en todos los tratamientos, entre un 5 y un 8% más anchos que los de la variedad 'Camarosa' (Figura 82A). En 'Ventana', los frutos obtenidos bajo los tratamientos Control Gorofres, PAR + UV-A (ausencia de UV-B) y PAR presentaron un ancho de alrededor de 36 mm, mientras que, en aquellos frutos procedentes del tratamiento Control, tuvo lugar un acusado descenso de alrededor de un 10%, lo que da lugar a una fresa más alargada.

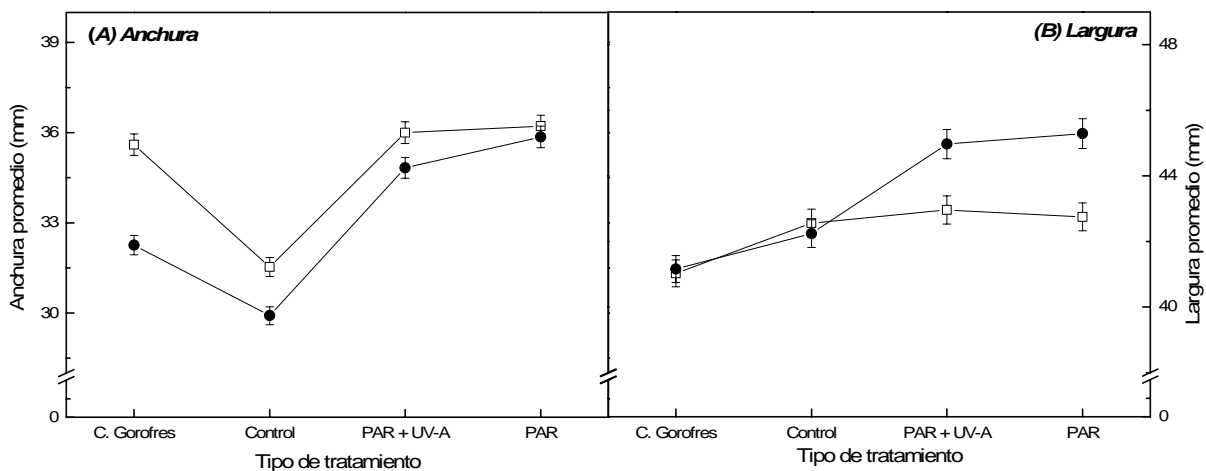


Figura 82. Evolución del promedio de la anchura y largura de los frutos maduros recolectados en función de la variedad ('Camarosa', -●-; 'Ventana', -□-) y el tipo de tratamiento aplicado.

Resulta particularmente interesante la relación tamaño-peso de los frutos de 'Ventana' y 'Camarosa' obtenidos de los tratamientos PAR y PAR + UV-A (en definitiva, en ausencia de radiación UV). Los frutos de la variedad 'Ventana' así obtenidos son más pesados (Figura 80), pero menos largos (Figura 82B) e igual de anchos (Figura 82A) que los obtenidos de 'Camarosa' bajo los mismos tratamientos. Este hecho indica que los frutos de 'Ventana' son más densos o, dicho de otro modo, que la cavidad interna es superior en 'Camarosa'.

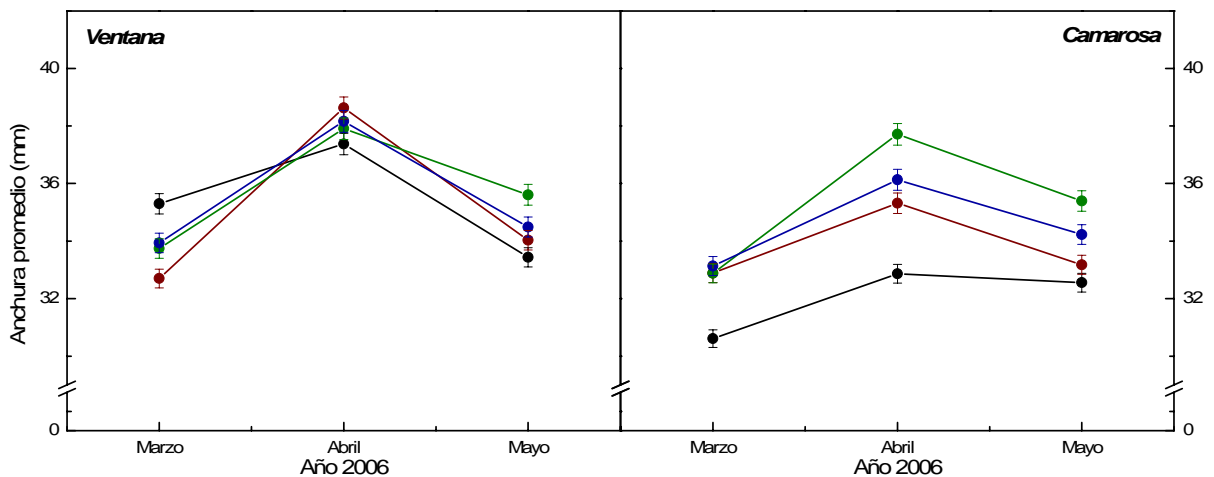


Figura 83. Evolución de la anchura promedio de los frutos maduros recolectados en función de la variedad ('Ventana' y 'Camarosa') y el tipo de tratamiento aplicado (PAR, - ● -; PAR + UV-A, - ● -; Control, - ● -; C. Gorofres, - ● -).

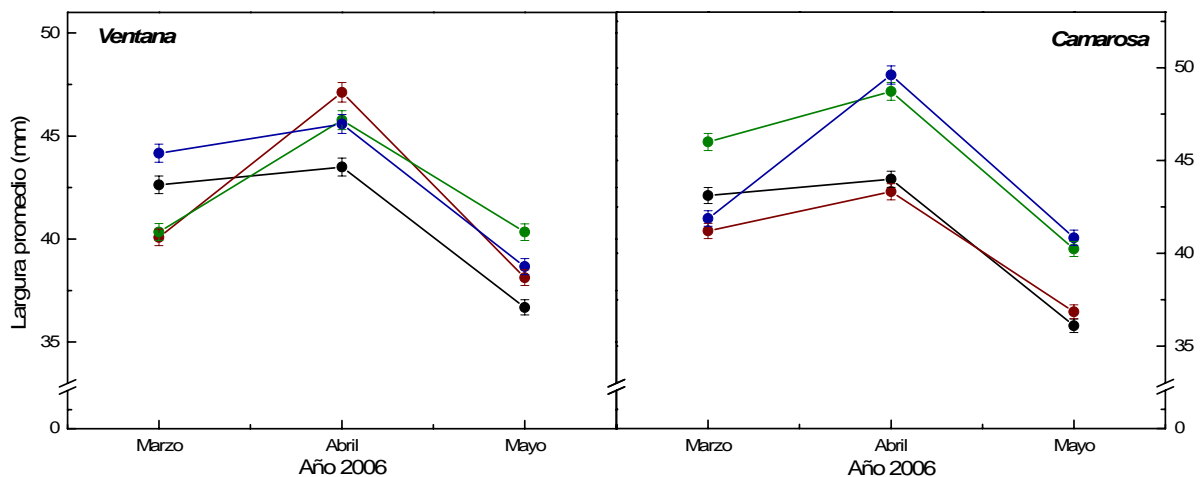


Figura 84. Evolución de la largura promedio de los frutos maduros recolectados en función de la variedad ('Ventana' y 'Camarosa') y el tipo de tratamiento aplicado (PAR, - ● -; PAR + UV-A, - ● -; Control, - ● -; C. Gorofres, - ● -).

El desglose por meses de los datos de anchura y largura de los frutos de ambas variedades, representado en las Figuras 83 y 84, muestra cómo varía su tamaño, recolectándose frutos más grandes durante el mes de abril, existiendo, para todos los tratamientos, una variación promedio de la largura de los frutos de aproximadamente un cm a lo largo de la campaña.

Calibre promedio de los frutos

En la Figura 85 se representa el calibre promedio de los frutos obtenido para cada variedad y en función del tratamiento aplicado. Previamente se estableció una clasificación de categorías en función de la anchura de los frutos:

- Calibre A $\Rightarrow \varnothing \leq 35$ mm
- Calibre B $\Rightarrow 35$ mm $< \varnothing \leq 45$ mm
- Calibre C $\Rightarrow 45$ mm $< \varnothing \leq 55$ mm
- Calibre D $\Rightarrow \varnothing > 55$ mm

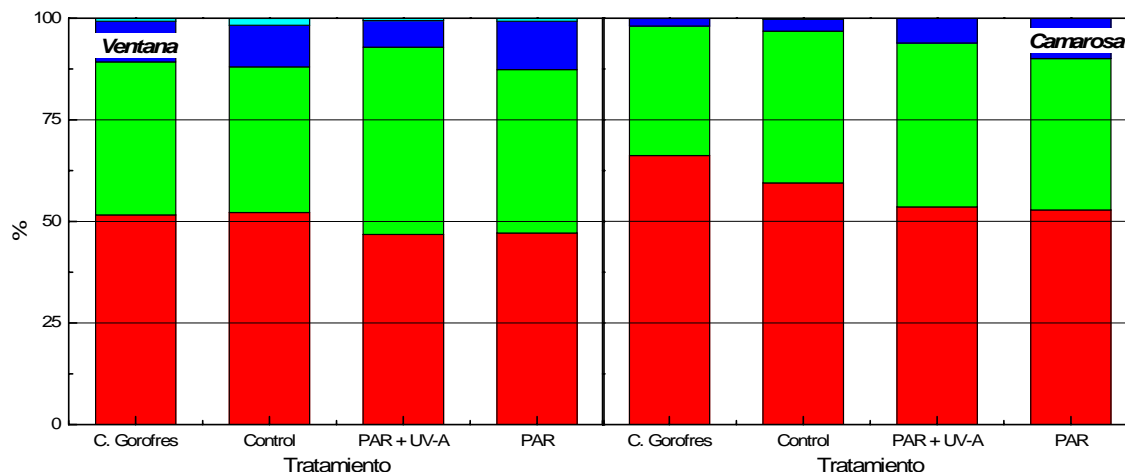


Figura 85. Distribución de calibres (rojo, A; verde, B; azul, C; y cian, D) en función del tratamiento aplicado a las variedades 'Ventana' y 'Camarosa' considerando toda la campaña 2005/2006.

La Figura 85 revela que los frutos de la variedad 'Ventana' presentan un calibre algo mayor que los de la variedad 'Camarosa', algo que ya se puso de manifiesto en la Figura 81. En aquellos tratamientos en los que se modificó la radiación UV incidente (tratamientos PAR y PAR + UV-A) se obtuvo el porcentaje más alto de frutos de mayor calibre, tanto en 'Camarosa' como en 'Ventana', de forma más clara en ésta última, especialmente bajo el tratamiento PAR + UV-A (ausencia de UV-B).

La Tabla 34 resume las principales diferencias relativas, es decir, respecto al tratamiento Control Gorofres, encontradas tras analizar los parámetros de productividad de las variedades 'Ventana' y 'Camarosa'.

Tabla 34. Diferencias relativas, respecto al tratamiento 'Control Gorofres', encontradas en los principales parámetros de productividad de las variedades 'Camarosa' y 'Ventana' durante la campaña 2005/2006.

Parámetro	Variedad 'Ventana'			Variedad 'Camarosa'		
	Control	PAR + UV-A	PAR	Control	PAR + UV-A	PAR
<i>Peso recolectado por planta</i>	+0.5	+33.01	+28.99	+28.97	+33.27	+61.20
<i>Frutos recolectados por planta</i>	-5.03	+30.19	+11.16	+13.84	+9.63	+18.86
<i>Peso del fruto</i>	+5.56	+1.91	+15.56	+9.06	+10.6	+30.54
<i>Anchura del fruto</i>	-11.43	+1.12	+1.74	-7.28	+7.97	+11.16
<i>Largura del fruto</i>	+3.73	+4.70	+4.19	+2.62	+9.26	+10.03

Recapitulando, en la Tabla 35 se muestran, de manera sintética, las tendencias observadas que se derivan del análisis de los resultados obtenidos.

Tabla 35. Tendencias observadas tras el análisis de productividad.

Parámetro	Variedad	
	'Camarosa'	'Ventana'
Productividad (peso recolectado x planta)	Claramente mayor en ausencia total de radiación UV Más productividad en abril	Mayor tanto en ausencia de UV-B como de UV total
Nº frutos x planta	Mayor en ausencia total de radiación UV	Mayor en ausencia de UV-B
Peso medio del fruto	Mayor en ausencia total de radiación UV	
Tamaño del fruto	En general, algo mayor en ausencia de radiación UV, especialmente en 'Camarosa'. El fruto de 'Ventana' es más denso. Superior en abril	

3.2. Efectos sobre la calidad nutricional del fruto: campaña 2005/2006.

En los siguientes subapartados se exponen los resultados más relevantes obtenidos en relación al análisis de los principales parámetros nutricionales del fruto de fresa. De manera análoga a como se han tratado los datos relativos a la productividad, se muestran promedios totales, pertenecientes a toda la campaña, y parciales, desglosados por meses. Durante la experimentación se han analizado los siguientes parámetros nutricionales: el total de sólidos solubles del zumo de fresa, el contenido total de carbohidratos, fenoles y antocianos, y la actividad antioxidante de los extractos de fruta.

3.2.1. Total de sólidos solubles.

Los resultados del análisis del total de sólidos solubles presentes en los frutos recolectados se muestran en la Figura 86.

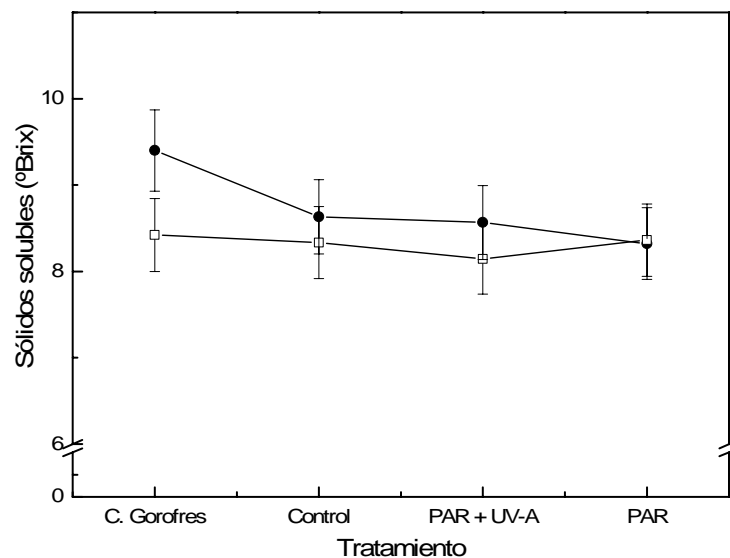


Figura 86. Promedio del total de sólidos solubles del fruto recolectado durante la campaña 2005/2006 dependiendo de la variedad ('Camarosa', - ● -; 'Ventana', - □ -) y el tipo de tratamiento.

De la Figura se desprende que ninguna de las dos variedades muestra variación en los sólidos solubles del fruto, independientemente del tratamiento impuesto, a excepción de los frutos obtenidos a partir de 'Camarosa' en el tratamiento Control Gorofres, cuyo puré de fresa rindió un valor máximo de 9.6 °Brix. Posiblemente, la menor cantidad de fruta recolectada en dicho tratamiento podría haber influido en una maduración más completa, dando origen, por tanto, a un incremento del contenido de sólidos solubles. Por tanto, en sucesivas campañas, habría que confirmar si existe una influencia del tratamiento aplicado sobre el contenido en sólidos solubles (estimación del contenido total de azúcares; ver Materiales y Métodos) y si una menor recolección a lo largo de la campaña podría tener relación con este hecho.

En general, los valores están dentro del rango que suelen ofrecer las fresas de estas variedades; incluso son, en el caso de 'Ventana', ligeramente superiores si se comparan con los datos obtenidos por la R.A.E.A. en esa misma campaña, esto es, 9.06 para 'Camarosa' y 7.62 para 'Ventana' (Fresas 2006).

A lo largo de la campaña y para cada tratamiento, en ambas variedades se observó una tendencia ascendente en las sucesivas cosechas, siendo este incremento de los grados °Brix más acusado en la variedad 'Camarosa'.

3.2.2. Contenido de carbohidratos.

También se determinó el contenido de carbohidratos totales en los frutos de fresa recolectados. Los resultados globales bajo cada tratamiento se muestran en la Figura 87. En términos generales, según se observa en la Figura, toda la fruta recolectada presentó un contenido de carbohidratos entre el 5 y el 6% del peso fresco. Estos valores se encuentran dentro del rango habitual para esta fruta, entre un 5 y un 10% de azúcares (un 7% según la Universidad de Illinois), si bien se encuentran en el extremo inferior. Las variedades 'Korona' y 'EISanta' cultivadas en otras latitudes y bajo distintas salinidades presentan entre un 3 y un 6% (Keutgen y Pawelzik 2007).

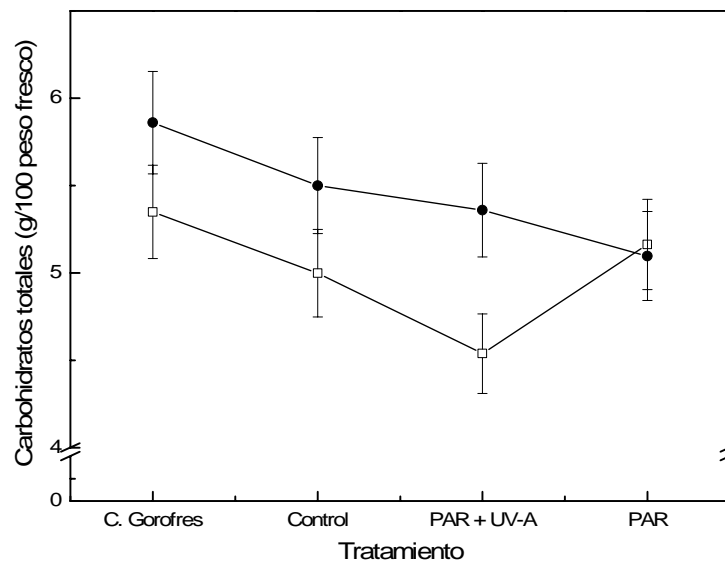


Figura 87. Contenido promedio de carbohidratos totales en fresas recolectadas durante la campaña 2005/2006 en función de la variedad ('Camarosa', - ● -; 'Ventana', - □ -) y el tipo de tratamiento.

Los contenidos en carbohidratos más altos se alcanzaron en los frutos de 'Camarosa' bajo el tratamiento Control Gorofres (5.8 g/100 g), lo que es coherente con lo observado en la Figura 86 relativa a los °Brix. Asimismo, a lo largo de la campaña, hubo una tendencia creciente en el contenido en carbohidratos en todos los tratamientos, siendo ésta más moderada en 'Camarosa'. 'Ventana' sufre un notable incremento en abril, para luego volver a alcanzar unos niveles cercanos al 5% al final de la campaña (datos no mostrados).

3.2.3. Contenido de compuestos fenólicos totales.

Como ya se adelantó en la Introducción de esta Tesis, los compuestos fenólicos presentan un carácter antioxidante, aumentando así el valor saludable de la fresa.

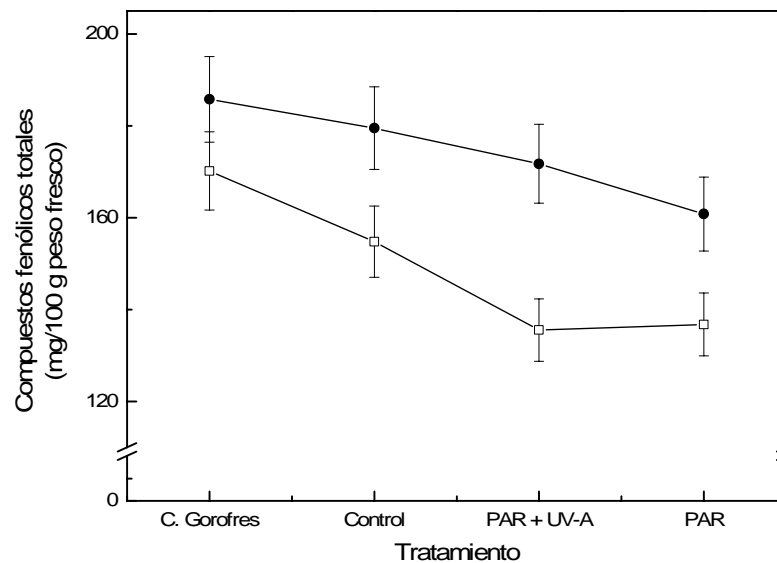


Figura 88. Contenido promedio de compuestos fenólicos totales de las fresas recolectadas durante la campaña 2005/2006 en función de la variedad ('Camarosa', -●-; 'Ventana', -□-) y el tipo de tratamiento.

Los datos relativos a los compuestos fenólicos totales cuantificados en el fruto de fresa que se presentan en la Figura 88 muestran diferencias significativas entre los tratamientos que no reciben radiación UV y los controles. Esto es coherente con lo publicado en la literatura, ya que la síntesis de compuestos fenólicos en plantas y frutos supone una adaptación al exceso de luz y a incrementos en la radiación ultravioleta (García-Macías et al. 2007; Tsormpatsidis et al. 2008). Las dos últimas Figuras revelan que la radiación UV favorece paralelamente la mayor acumulación de carbohidratos y compuestos fenólicos en el fruto de fresa, si bien cuantitativamente no son variaciones relevantes. La radiación UV-B estimularía la síntesis de compuestos fenólicos como una de las respuestas antioxidantes de la fresa (Huyskens-Keil et al. 2007). La síntesis de los polifenoles, como se explicó en la Introducción, requiere eritrosa-4P como sustrato (Tovar 2001), lo cual justificaría el mayor contenido en carbohidratos, derivado de un aumento de la concentración de fructosa (Arnold et al. 2004; Hilal et al. 2004). Comparando tratamientos, en 'Ventana' parece existir una mayor sensibilidad frente a la presencia de radiación ultravioleta, ya que en su ausencia se detecta una considerable disminución del contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, en la variedad 'Camarosa', a pesar de que todos los tratamientos presentaron una mayor abundancia en este tipo de

compuestos, la disminución de los mismos en ausencia de radiación UV fue moderadamente menor.

3.2.4. Contenido de antocianos totales.

La Figura 89 muestra la evolución del contenido de antocianos totales presentes en frutos de fresa, en función del tipo de tratamiento y la variedad considerada. Los datos, obtenidos en base al método del pH diferencial (ver Materiales y Métodos), están referidos al antociano mayoritario, es decir, la pelargonidina-3-glucósido.

En general, el contenido de antocianos totales estuvo comprendido entre los 25 y 45 mg/100 g peso fresco, contribuyendo al total de polifenoles en torno a un 20-25%. Estos valores son normales si se comparan con los que figuran en da Silva et al. (2007), si bien, hay que tener en cuenta que la acumulación de antocianos varía en función de la campaña y de la variedad (entre otros factores), como así lo han mostrado diversos autores (Aherne y O'Brien 2002; Skupien y Oszmianski 2004; Wicklund et al. 2005). Además, cabe mencionar la escasa información nutricional que, en relación a la acumulación de antocianos, existe sobre estas variedades de fresa ('Camarosa' y 'Ventana').

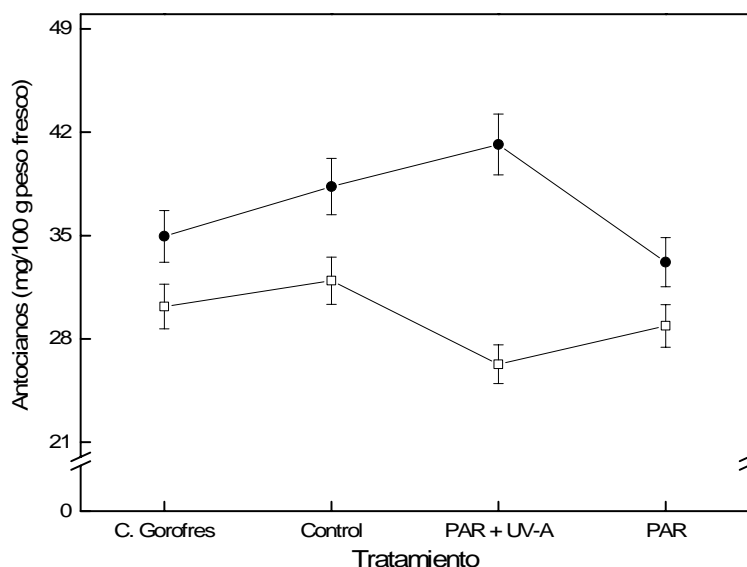


Figura 89. Contenido promedio de antocianos totales de las fresas recolectadas durante la campaña 2005/2006 en función de la variedad ('Camarosa', - ● -; 'Ventana', - □ -) y el tipo de tratamiento.

Del mismo modo, se analizaron en HPLC (Figura 90) extractos de fresa de las dos variedades para los distintos tratamientos, con el objetivo de cuantificar los pigmentos antocianos presentes y validar los resultados obtenidos mediante la técnica espectrofotométrica.

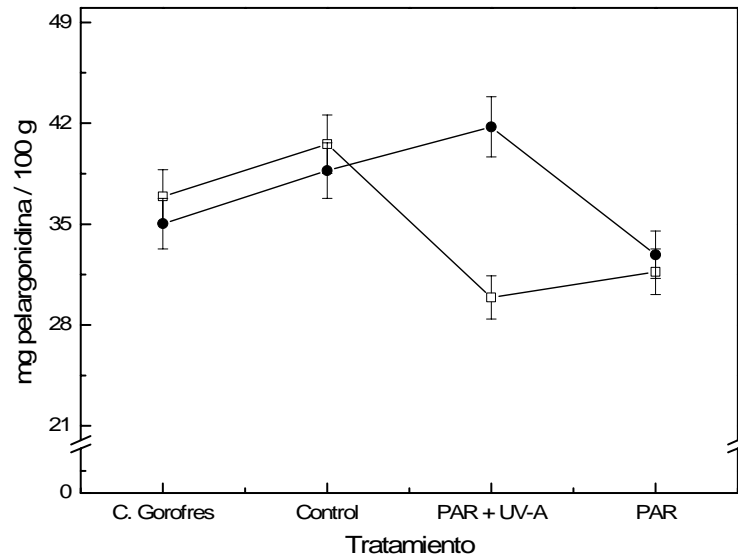


Figura 90. Contenido promedio de antocianos totales (referido a Pelargonidina 3-glucósido) de las fresas recolectadas durante la campaña 2005/2006 en función de la variedad ('Camarosa', - ● - ; 'Ventana', - □ -) y el tipo de tratamiento.

Como puede observarse en la Figura, la evolución de las curvas es muy similar a la mostrada en la Figura 89. Ésta muestra que la ausencia total de radiación UV no favorece la acumulación de antocianos.

Los resultados obtenidos en las Figuras 89 y 90 parecen sugerir, en la línea de lo que los resultados previos de este estudio han venido poniendo de manifiesto, una diferente sensibilidad de ambas variedades frente a la radiación UV-B. Mientras los resultados apuntan la implicación de la radiación UV en la acumulación de antocianos, parece que la presencia de la radiación UV menos energética (UV-A) favorecería dicha acumulación en 'Camarosa' y la más energética (UV-B) lo haría en 'Ventana'. Este hecho vendría a redundar en la idea de que la variedad 'Camarosa' se adapta con mayor facilidad a la presencia de niveles naturales de radiación UV-B, como así demostrarían los resultados expuestos con anterioridad en relación a la productividad del cultivo y a los principales compuestos nutricionales del fruto.

3.2.5. Actividad antioxidante.

La Tabla 36 muestra las actividades antioxidantes máximas iniciales encontradas en función de la variedad y el tratamiento aplicado. Los promedios mostrados se calcularon a partir de las todas las cosechas realizadas a lo largo de la campaña.

Tabla 36. Actividades antioxidantes máximas iniciales mostradas, según el tratamiento, por los extractos de fresa de ambas variedades. Los resultados se expresan en $\mu\text{moles de DPPH consumidos por minuto y mililitro de extracto}$ ($\mu\text{moles min}^{-1} \text{ml}^{-1}$).

Tratamientos	Variedad	
	'Ventana'	'Camarosa'
Control Gorofres	0.121	0.127
Control	0.122	0.119
PAR + UV-A	0.120	0.116
PAR	0.119	0.116

Los promedios mostrados en la Tabla anterior no presentan grandes diferencias. Sin embargo, sí parece apreciarse una ligera tendencia descendente en la actividad máxima en ausencia de radiación ultravioleta (PAR + UV-A y PAR), especialmente en la variedad 'Camarosa'. En este caso, a pesar de que los promedios para toda la campaña minimizaron las diferencias existentes, en determinadas cosechas se observaron cambios más notables en las mencionadas actividades. En tres o cuatro cosechas, los extractos obtenidos a partir de 'Camarosa' bajo tratamientos que modificaron la radiación UV mostraron unas actividades máximas de $0.105 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$, frente a actividades cercanas a $0.130 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ en aquellos pertenecientes a los controles.

A modo de ejemplo, los ensayos realizados con extractos de 'Camarosa' obtenidos a partir de la segunda cosecha de la campaña 2005/2006 se presentan en la Figura 91.

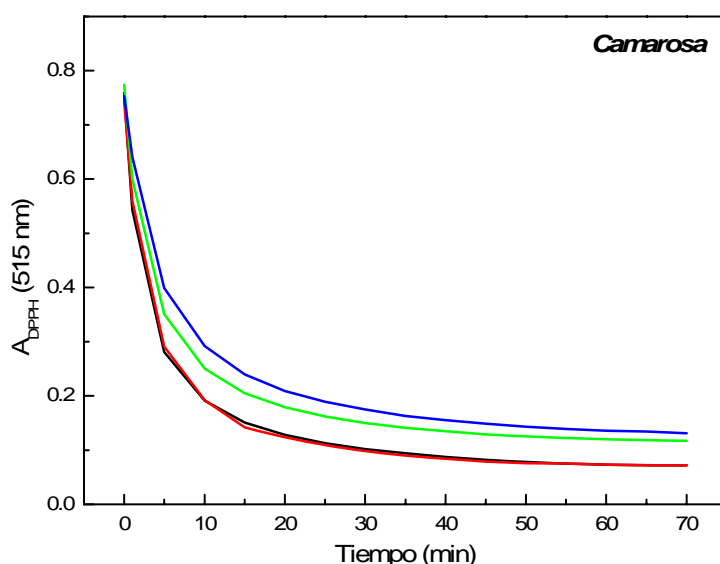


Figura 91. Ensayos de actividad antioxidante realizados con DPPH y extractos de fresa obtenidos durante la 2ª cosecha de la campaña, a partir de la variedad 'Camarosa'. Control Gorofres (---), Control (---), PAR + UV-A (---) y PAR (---).

La Figura muestra cómo la absorbancia del DPPH se estabiliza en torno a 0.12-0.13 en los extractos de fresa de aquellos tratamientos que atenuaron radiación ultravioleta, mientras que los correspondientes a los controles se estabilizaron en 0.07. Cualitativamente, no se apreciaron cambios significativos en la forma de decaer de la curva ni en el tiempo transcurrido hasta que se detectó el cese de la cinética. No hay, por tanto, indicios para pensar en la existencia de un patrón diferente en el conjunto de antioxidantes, en función del tratamiento aplicado, ni en cambios en la afinidad de dichos compuestos por el DPPH. El hecho de que se encontraran diferencias en las absorbancias basales, evidencia una desigual concentración de los compuestos encargados de proporcionar la actividad antioxidante a los extractos objeto de estudio.

Mientras que en los extractos de los controles la actividad antioxidante decae con mayor rapidez, en los extractos que procedían de los tratamientos PAR y PAR + UV-A, la caída observada de la concentración remanente de

DPPH es menor (Figura 92), alcanzando en este caso una concentración de DPPH superior, al final del ensayo.

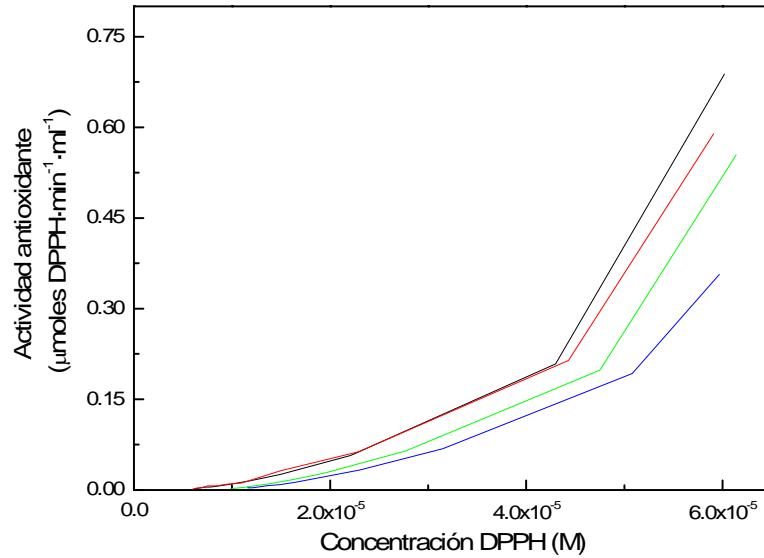


Figura 92. Evolución de la actividad antioxidante encontrada en extractos de fresa obtenidos durante la 2ª cosecha de la campaña, a partir de la variedad 'Camarosa'.

En definitiva, los resultados apuntan que la presencia de radiación UV potencia la capacidad antioxidante de la fresa, aunque, en general, no se han detectado diferencias significativas entre tratamientos, con las excepciones mencionadas. Los resultados obtenidos en estos trabajos serían consistentes con lo publicado por Erkan et al. (2008), que observó relaciones entre la aplicación de radiación UV y aumentos en la capacidad antioxidante de la fresa, así como de las enzimas implicadas en las respuestas antioxidantes.

De todas formas, cabe destacar la complejidad que supone un análisis de este tipo, en cuanto que están bastante descritos los factores que pueden afectar a la capacidad antioxidante de la fresa, entre los que se encuentran variaciones en las condiciones climáticas, las variedades consideradas, el estado de maduración del fruto o las condiciones de almacenamiento (Olsson et al. 2004; Cordenunsi et al. 2005). Por estas razones, se ha de continuar investigando en esta línea.

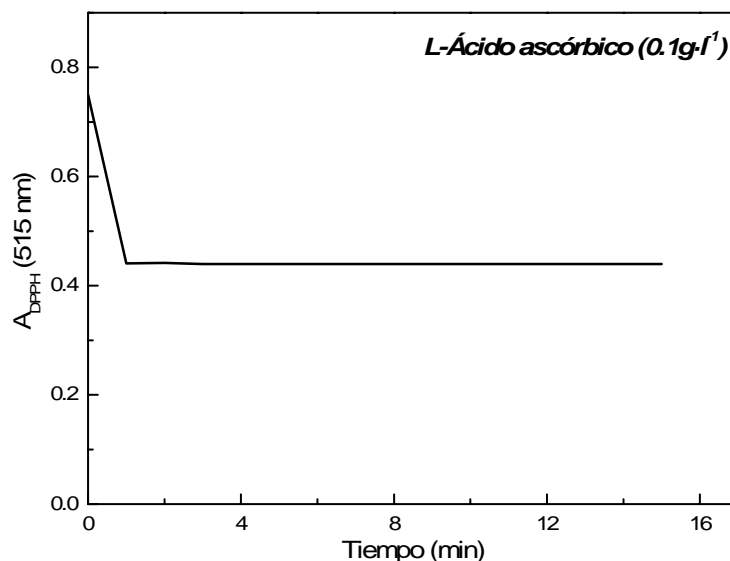


Figura 93. Ensayo de actividad antioxidante realizado con DPPH y solución estándar de L-ácido ascórbico.

Para situar el grado de la capacidad antioxidante ofrecida por los extractos de fresa, del mismo modo se realizaron ensayos con soluciones estándar de L-ácido ascórbico $0.1\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Figura 93).

En general, la capacidad antioxidante equivalente a la del L-ácido ascórbico (AEAC) de los extractos de fresa se situó alrededor de 800 mg AA/100 g de peso fresco. Estos valores son del orden de lo encontrado por Xu et al. (2008) para diversas variedades de cítricos cultivadas en China.

3.3. Continuación de la línea de investigación.

Como ya se comentó a lo largo de la Tesis, la experimentación en campo ha sido posible gracias a la colaboración decidida y desinteresada de la Empresa S.A.T Gorofres. A partir de los resultados obtenidos en las dos campañas objeto de estudio, dicha Empresa manifestó su interés por continuar los trabajos durante al menos una campaña más, ofreciendo para ello al grupo la extensión de cultivo necesaria y haciéndose cargo nuevamente del seguimiento de las plantas y de la aplicación de los tratamientos nutricionales y fitosanitarios correspondientes.

Los resultados obtenidos concitaron el interés de otras partes, finalmente implicadas en los trabajos, concretamente el de tres Empresas vinculadas de distinto modo al sector de la fresa y, de una manera especial, INTA, sin cuya contribución, el desarrollo de los trabajos de esta Tesis y la continuación de los mismos que seguidamente se comenta, habrían resultado inviables.

La implicación de INTA, a través de la ESA de "El Arenosillo", con el proyecto en cuestión, se ha traducido en la financiación, por dicho Organismo dependiente del Ministerio de Defensa, en una beca pre-doctoral por un máximo de 4 años para profundizar en la línea de investigación. En la ESA de INTA se desarrollan, actualmente, todas las tareas analíticas relativas a la caracterización de parámetros moleculares y bioquímicos del fruto, así como la caracterización de las propiedades ópticas de los plásticos empleados y su evolución en el tiempo por exposición permanente a las condiciones radiativas y ambientales de la costa onubense. Los resultados que se obtengan servirán para proponer modificaciones en las composiciones poliméricas de las formulaciones destinadas a la producción de plásticos empleados en el cultivo de especies de alto valor económico para la región andaluza.

En cuanto a las Empresas, de una parte, Reyenvas, S.A., perteneciente al Grupo Armando Álvarez, mayor productor español de plástico agrícola, manifestó su deseo y voluntad de colaboración en la investigación, ofreciendo a nuestro grupo obtener prototipos de plásticos, de formato comercial, con determinadas propiedades ópticas requeridas por nosotros para continuar desarrollando los trabajos en la mencionada línea de investigación. De otra parte, la Empresa Eurosemillas, licenciataria de las variedades de fresa de la Universidad de California, que controla su distribución en los principales países productores del mundo, ofreció al grupo toda la superficie de macrotúnel necesaria para los trabajos y personal técnico cualificado encargado de la planificación de la campaña y la supervisión de los cultivos.

Por último, la Empresa Teleautomat, S.L., del sector de la Ingeniería de Sistemas, ubicada en el parque Tecnológico de Andalucía, manifestó al grupo su interés en participar en un proyecto conjunto de más alcance, en el que los

estudios de productividad y valor nutricional del fruto se completasen, a lo largo de la campaña, con la toma de datos relativos al balance de nutrientes entre suelo y planta, y el establecimiento de modelos empíricos de correlación entre el crecimiento de ésta y su productividad y valor nutricional del fruto, y las condiciones ambientales y nutricionales de cultivo. La Empresa Teleautomat, S.L. y el grupo BIO-214 suscribieron un Convenio de Investigación asociado a un contrato 63/86, mediante el cual la Empresa financia al grupo para el desarrollo de los trabajos en el año 2008.

Tras conversaciones del grupo con las distintas partes, se llegó al acuerdo de continuar los estudios de productividad de la fresa y calidad nutricional del fruto durante, al menos, las campañas 2007/2008 y 2008/2009, la primera en microtúnel y la siguiente en macrotúnel. Para tal fin, Reyervas proporcionó plásticos para microtúnel modificados en sus propiedades ópticas y de las características técnicas necesarias. Reyervas suministró al grupo 7 formulaciones diferentes, según conversaciones previas entre las partes. Además, ya ha facilitado algunos de los plásticos para macrotúnel a ensayar durante la campaña 2008/2009, almacenados actualmente en una nave de distribución que Reyervas posee en el término de Palos de la Frontera. Eurosemillas proporciona actualmente asistencia técnica y superficie de macrotúnel para la próxima campaña. Gorofres ha facilitado la superficie de microtúnel requerida para los trabajos de la campaña 2007/2008.

IV. CONCLUSIONES

Del análisis y discusión de los resultados presentados en este trabajo, se infieren las siguientes conclusiones:

1. En la costa occidental de Huelva, el UVI máximo diario se sitúa en torno a 9 en los meses de verano, aunque puntualmente, y en las horas centrales, pueden alcanzarse valores superiores a 10. Cada año, casi en el 40% de los días se supera un valor alto de dicho índice (> 7). En consecuencia, se recomienda fuertemente tomar las debidas precauciones de fotoprotección para evitar quemaduras solares.
2. Las dosis máximas de radiación ultravioleta para la zona de Huelva, en el intervalo comprendido entre 280 y 400 nm (UV-A y UV-B), se encuentran alrededor de $1.5 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$, mientras que las de PAR, sobre $12 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$. En definitiva, la relación UV_T/PAR oscila entre 0.12 y 0.13 a lo largo del año.
3. El índice de claridad para la región PAR constituye una herramienta útil para analizar la estabilidad meteorológica de una localización concreta. En este sentido, para la región occidental de la costa onubense, el promedio mensual del índice $K_{(\text{PAR})}$ oscila entre 0.12 y 0.36. Los meses más inestables durante el período analizado (2004 – 2006) fueron marzo, abril y octubre.
4. *Dunaliella bardawil* y el mutante *Dunaliella* EMS acumulan mayor concentración de carotenoides que *Dunaliella salina* 184.8. El carotenoide mayoritario en las dos primeras estirpes es β -caroteno, y en la tercera, luteína. Por tanto, *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella* EMS son más adecuadas para el desarrollo de procesos de producción de β -caroteno.
5. La radiación UV-A de baja intensidad ($18 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) adicionada a PAR para la incubación de *Dunaliella* EMS durante largos períodos (2 semanas), estimula la actividad fotosintética de la microalga y la acumulación intracelular de carotenoides, especialmente de β -caroteno, siendo por lo tanto un factor cuya aplicación modulada respecto a PAR permite aumentar la productividad de procesos de obtención de β -caroteno con *Dunaliella* sin pérdida de viabilidad en los cultivos.
6. La radiación UV-B adicionada a PAR para la incubación de *Dunaliella* sólo estimula la carotenogénesis sin alterar significativamente la viabilidad durante un corto período de tiempo (horas), produciendo acumulación de zeaxantina durante dicho período como consecuencia de la respuesta celular (actividad de-epoxidasa del ciclo de las xantofilas) a la acción oxidante de la radiación UV-B impuesta.
7. En cultivos exteriores, el mutante *Dunaliella* EMS muestra un crecimiento más rápido que *Dunaliella bardawil* y *Dunaliella salina* 184.8, así como el mejor producto “concentración de biomasa x contenido en carotenoides”, siendo la microalga más idónea de las estudiadas en este trabajo para abordar estudios de productividad y acumulación de carotenoides en cultivos en exterior. La microalga presenta una capacidad especialmente significativa para la acumulación de β -caroteno, en comparación a las otras estirpes estudiadas.
8. El mutante *Dunaliella* EMS cultivado en exterior presenta mayor crecimiento en ausencia de radiación UV. En particular, el crecimiento con luz PAR limitada a la región de luz azul induce una mayor acumulación celular de carotenoides,

umentando la relación β -caroteno/luteína a medida que el cultivo se hace más denso. *Dunaliella* EMS muestra la mayor acumulación de carotenoides cuando se incuba bajo todo el espectro de radiación UV. La acción oxidante de la radiación UV-B resulta determinante en la estimulación de la acumulación masiva de carotenoides, especialmente en ausencia de nitrógeno inorgánico.

9. Se sugiere una estrategia de gestión óptima de la calidad de luz durante el cultivo de la microalga *Dunaliella* EMS y durante la fase de producción de carotenoides, para obtener los mayores rendimientos posibles. Tal estrategia consiste en operar los cultivos exteriores en modo discontinuo, realizando ciclos de crecimiento y posterior producción de carotenoides. El ciclo de crecimiento comienza al diluir un cultivo crecido. Inicialmente y hasta aproximadamente la mitad de la densidad celular máxima prevista, los cultivos recibirían luz azul transmitida por un filtro adecuado para ello, con el objetivo de estimular el aumento de la concentración celular de carotenoides durante el crecimiento. En un segundo período, hasta alcanzar la máxima densidad celular prevista, se utilizarían filtros que transmitan todo el PAR, con el objetivo de mantener el desarrollo de altas densidades celulares y la ausencia de radiación UV. El ciclo de acumulación de carotenoides se desarrollaría bajo filtros que transmitan PAR con alta relación luz verde/PAR y todo el espectro UV, además de carencia de nitrógeno inorgánico.

10. Los resultados obtenidos en el presente trabajo han permitido iniciar experimentación con cultivos de *Dunaliella* EMS en tanques exteriores de 300 litros de una planta piloto para la producción de biomasa y carotenoides con microalgas.

11. La productividad de la planta de fresa, determinada como peso total recolectado por planta a lo largo de una campaña, en las variedades 'Camarosa' y 'Ventana', es considerablemente mayor cuando el cultivo se produce bajo plásticos que atenúan la radiación UV por completo.

12. La radiación UV produce un aumento cuantificable en la actividad antioxidante de los frutos de ambas variedades de fresa, coherente con el mayor contenido de compuestos fenólicos (antioxidantes) detectado bajo tales condiciones radiativas y, consecuencia de la respuesta de la planta al estrés oxidativo impuesto.

13. Independientemente del tratamiento radiativo aplicado a los cultivos de fresa, tras haber analizado diversos parámetros relativos tanto a la productividad como a la calidad nutricional, en nuestra región, la variedad 'Camarosa' presenta mejores cualidades desde ambos puntos de vista. Sin embargo, la variedad 'Ventana' presenta un fruto más pesado.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Adir, N., Zer, H., Shochat, S. and Ohad, I. (2003) Photoinhibition - a historical perspective. *Photosynth. Res.*, 76 (1-3), 343-370.
- Afaq, F., Adhami, V. and Mukhtar, H. (2005) Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat. Res-Fund. Mol. M.*, 571, 153-173.
- Agrawal, S.B. (1992) Effects of supplemental UV-B radiation on photosynthetic pigment, protein and glutathione contents in green-algae. *Environ. Exp. Bot.*, 32 (2), 137-143.
- Agrawal, S.C. and Pal, U. (2003) Viability of dried vegetative cells or filaments, survivability and/or reproduction under water and light stress, and following heat and UV exposure in some blue-green and green algae. *Folia Microbio.*, 48 (4), 501-509.
- Aguilera, J., Gordillo, F.J.L., Karsten, U., Figueroa, F.L. and Niell, F.X. (2000) Light quality effect on photosynthesis and efficiency of carbon assimilation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *J. Plant Physiol.*, 157 (1), 86-92.
- Aherne, S.A. and O'Brien, N.M. (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18 (1), 75-81.
- Allende, A., Marín, A. Buendía, B., Tomás-Barberán, F.A. and Gil, M.I. (2007) Impact of combined postharvest treatments (UV-C Light, gaseous O₃, superatmospheric O₂ and high CO₂) on bioactive constituents and shelf-life of strawberries. *Postharvest Biol. Technol.*, 46, 201-211.
- Antignus, Y. and Ben-Yakir, D. (2004) Ultraviolet-absorbing barriers, an efficient integrated pest management tool to protect greenhouses from insects and virus diseases. In: Horowitz, A.R. and Ishaaya, I. (eds) *Insect Pest Management*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 319-335.
- Apt, K.A. and Behrens, P.W. (1999) Commercial developments in microalgal biotechnology. *J. Phycol.*, 35, 215-226.
- Arnold, T., Appel, H., Patel, V., Stocum, E., Kavalier, A. and Schulz, J. (2004) Carbohydrate translocation determines the phenolic content of *Populus* foliage: a test of the sink-source model of plant defense. *New Phytol.*, 164 (1), 157-164.
- Arts, I.C. and Hollman, P.C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81(1), 317-325.
- Avron, M. and Ben-Amotz, A. (1992) *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press.
- Bacci, L., Grifoni, D., Sabatini, F. and Zipoli, G. (1999) UV-B radiation causes early ripening and reduction in size of fruits in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Glob. Change Biol.*, 5, 635 – 646.
- Baker, D.L., Krol, E.S., Jacobsen, N. and Liebler, D.C. (1999) Reactions of β -carotene with cigarette smoke oxidants. Identification of carotenoid oxidation products and evaluation of the Prooxidant/ Antioxidant effect. *Chem. Res. Toxicol.*, 12, 535–543.
- Baroli, I. and Melis, A. (1996) Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta*, 198 (4), 640-646.
- Becker, E.W. (1994) *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. Reino Unido.

- Becker, W. (2004) Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (ed) *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Science, UK, pp 312-351. ISBN: 0-632-05953-2.
- Beijerinck, M.W. (1890). Kulturversuche mit Zoochloren, Lichenengonidien und anderen niederen. *Algen. Bot. Ztg.*, 48, 735-785.
- Belay, A. (1993) Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.*, 5, 235-240.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1983) On those factors which determine the massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *D. bardawil*. *Plant Physiol.* 72, 593–597.
- Ben-Amotz, A. (1987) Effects of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *D. bardawil*. *J. Plant Physiol.* 131, 479-487.
- Ben-Amotz, A., Gressel, J. and Avron, M. (1987) Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. *J Phycol.*, 23, 176-181.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A. and Avron, M. (1989) Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol.*, 91, 1040–1043.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1990) The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trens. Biotechnol.* 8, 121-126.
- Ben-Amotz, A. and Shaish, A. (1992) β -Carotene biosynthesis. In: Avron, M. and Ben-Amotz, M. (eds) *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*. BocaRaton:CRCPress, pp 205–216.
- Ben-Amotz, A. (1996) Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 32, 272–275.
- Ben-Amotz, A. (2004) Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products-Major Industrial Species *Dunaliella*. In: Richmond, A. (ed) *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Science, UK, pp 273-281. ISBN: 0-632-05953-2.
- Bendich, A. (1989) Carotenoids and the immune response. *J. Nutr.*, 119,112-115.
- Bickford, P.C., Gould, T., Briederick, L., Chadman, K., Pollock, A., Young, D., Shukitt-Hale, B. and Joseph, J. (2000) Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Res.*, 866, 211-217.
- Bioschof, K., Hanelt, D. and Wiencke, C. (1998) UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Mar. Biol.*, 131, 597-605.
- Bioschof, K., Krabs, G., Wiencke, C. And Hanelt, D. (2002) Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophylls cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta*, 215, 502-509.
- Borowitzka, L.J. and Brown, A.D. (1974) The salt relations of marine and halophilic strains of the unicellular green alga *Dunaliella*. *Arch. Microbiol.*, 96, 37–52.
- Borowitzka, L.J. (1981) Solute accumulation and regulation of cell water activity. In: Pateg, L.G. and Aspinall, D. (eds) *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press, Sydney, pp 97–130.

- Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. and Moulton, T.P. (1984) The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant. *Hydrobiologia*, 116/117, 115-134.
- Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (1988) *Dunaliella*. In: Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (eds) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge, pp 28-59. ISBN: 0-521-32349-5.
- Borowitzka, L.J. and Borowitzka, M.A. (1990) Commercial production of β -carotene by *D. salina* in open ponds. *Bull. Mar. Sci.*, 47 (1), 244-252.
- Borowitzka, M.A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.*, 70, 313-321.
- Borowitzka, M.A. and Siva, C.J. (2007) The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J. Appl. Phycol.*, 19 (5), 567-590.
- Boussiba, S., Fan, L. and Vonshack, A. (1992) Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. *Methods Enzymol.*, 214, 386-391.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol-LEB*, 38, 25 – 30.
- Britton, G. (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.*, 9, 1551-1558.
- Buma, A.G.J., Zemmeling, H.J., Sjollega, K. and Gieskes, W.W.C. (1996) UV-B radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 142, 47-54.
- Burlew, J.S. (1953) *Algal culture. From laboratory to pilot plant*. Carnegie institution of Washington, publication n° 600, Washington.
- Carreño, V., Redondas, A. y Cuevas, E. (2002) Índice UV para la población. España. *Manual basado en la versión inglesa de la Acción COST – 713 “UVB Forecasting”*, Madrid.
- Casal, C., Sorribas, M., Salguero, A., Adame, J.A., Vilaplana, J.M., Bolívar, J.P., de la Morena, B. y Vilchez, C. (2003) Instrumentación e investigación medioambiental en la Estación de Sondeos Atmosféricos de El Arenosillo (Huelva). Libro de Actas CNECA, 255-259.
- Cebula, R.P., Thuillier, G.O., VanHoosier, M.E., Hilsenrath, E., Herse, M., Brueckner, G.E. and Simon, P.C. (1996). Observations of the solar irradiance in the 200 – 350 nm interval during the ATLAS-1 mission: A comparison among three sets of measurements – SSBUV, SOLSPEC and SUSIM. *Geophys. Res. Lett.*, 23, 2289 – 2292.
- Chandrasekhar, S. (1960) *Radiative Transfer*. Dover, New York.
- Chapman, S. (1930) On ozone and atomic oxygen in the upper atmosphere. *Phil. Mag.*, 10, 369.
- Codgell, R.J. and Frank, H.A. (1987) The function of carotenoids in photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 63, 1-17.
- Cohen, Z. (1999) *Chemicals from microalgae*. Taylor & Francis, London.

Coma, J. (1991). Dietary reference values for food energy and nutrients for the United Kingdom. *Report of the panel on dietary reference values Committee on medical aspects of food and nutrition policy*. London: HMSO.

Cordenunsi, B.R., Genovese, M.I., do Nascimento, J.R.O., Hassimotto, N.M.A., dos Santos, R.J. and Lajolo, F.M. (2005) Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chem.*, 91, 113-121.

Correia, C.M., Areal, E.L.V., Torres-Pereira, M.S. and Torres-Pereira, J.M.G. (1998) Intraspecific variation in sensitivity to ultraviolet-B radiation in maize grown under field conditions. I. Growth and morphological aspects. *Field Crop. Res.*, 59, 81-89.

Correia, C.M., Pereira, J.M.M., Coutinho, J.F., Björn, L.O. and Torres-Pereira, J.M.G. (2005) Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: a Mediterranean field study. *Eur. J. Agron.*, 22, 337-347.

da Silva, F.L., Escribano-Bailón, M.T., Alonso, J.J.P., Rivas-Gonzalo, J.C. and Santos-Buelga, C. (2007) Anthocyanin pigments in strawberry. *Food Sci. Technol-Leb.*, 40, 374-382.

Database, U.-N.C. (1998) USDA-NCC Carotenoid Database for US Foods-1998. Available from: www.nal.usdea.gov/fnic/foodcomp/Data/car98/car98.html

Day, T.A. and Neale, P.J. (2002) Effects of UV-B radiation on terrestrial and aquatic primary producers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 33, 371-396.

Del Campo, J.A., García-González, M. and Guerrero, M.G. (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biot.*, 74, 1163-1174.

Demmig-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants. A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1020, 1-24.

Demmig-Adams, B. and Adams, W.W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Phys.*, 43, 599-626.

Demmig-Adams, B. and Adams, W.W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.*, 1 (1), 21-26.

Devanand, L.L., Mukhopadhyay, S. and Krizek, D.T. (2006) Content of total phenolics acids in tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *J. Food Compos. Anal.*, 19, 771-777.

Di Mascio, P., Kaiser, S. and Sies, H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, 274, 532-538.

Di Mascio, P., Murphy, M.E. and Sies, H. (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 194-200.

Di Sarra, A., Cacciani, M., Chamard, P., Cornwall, C., DeLuisi, J.J., Di Iorio, Disterhoff, T.P., Fiocco, G., Fua, D. and Monteleone, F. (2002a) Effects of desert dust and ozone on the ultraviolet irradiance at the Mediterranean island of Lampedusa during PAUR II. *J. Geophys. Res.*, 107 (D18), doi: 10.1029/2000JD000139.

Diffey, B.L. (2002) Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28, 4 - 13.

- Döhler, G. (1985) Effect of UV-B radiation (290–320 nm) on the nitrogen metabolism of several marine diatoms. *J. Plant. Physiol.*, 11, 391–400.
- Döhler, G., Drebes, G. and Lohmann, M. (1997) Effect of UV-A and UV-B radiation on pigments, free amino acids and adenylate content of *Dunaliella tertiolecta*. *J. Photochem. Photobiol.*, 40, 126–131.
- Döhler, G. (1998) Effect of UV radiation on pigments on the Antarctic macroalga *Leptosomia simplex* L. *Photosynthetica*, 35, 473–476.
- Drabkova, M., Admiraal, W. and Marsalek, B. (2007) Combined exposure to hydrogen peroxide and light - Selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *Environ. Sci. Technol.*, 41 (1), 309–314.
- Driscoll, C.M.H. (1992) Solar UV trends and distributions. *Natl. Radiat. Prot. Board Bull.*, 137, 7 – 13.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C. and Ravishankar, G.A. (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends Food Sci. Tech.*, 16, 389–406.
- Dunal, F. (1838) Extrait d'un mémoire sur les algues qui colorent en rouge certains eaux des marais salants méditerranéens. *Ann Sc. Nat. Bot. Ser 2*, 9, 172.
- Durand-Chastel, H., (1980) Production and use of *Spirulina* in Mexico. In: Shelef, G. and Soeder, C.J. (eds) *Algae Biomass*. Elsevier/north Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 51–64.
- Edge, R., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G. (1997) The carotenoids as antioxidants: a review. *J. Photochem. Photobiol.*, 41, 189–200.
- Elad, Y. (1997) Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. *Crop Prot.*, 16, 635–642.
- Enger, S.M., Longnecker, M.P., Chen, M.J., Harper, J.M., Lee, E.R., Frank, H.D. and Haile, R.W. (1996) Dietary intake of specific carotenoids and vitamins A, C, and E, and prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 5, 147–153.
- Environmental Health Criteria 160, 2nd edición (1994). Ultraviolet radiation, *International Programme on Chemical Safety*. Extraído de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc160.htm>.
- Erkan, M., Wang, S.Y. and Wang, C.Y. (2008) Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. *Postharvest Biol. Tec.*, 48, 163–171.
- Eskling, M., Arvidsson, P. and Akerlund, H. (1997) The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plantarum*, 100, 806–816.
- Estupiñán, J.G., Raman, S., Crescenti, G.H., Streicher, J.J. and Barnard, W.F. (1996) Effects of clouds and haze on UV-B radiation. *J. Geophys. Res.*, 101, 16807 – 16816.
- Fioletov, V.E., Kerr, J.B. and Wardle, D.I. (1997) The relationship between total ozone and spectral UV irradiance from Brewer observations and its use for derivation of total ozone from UV measurement. *Geophys. Res. Lett.*, 24, 2997 – 3000.
- Fligge, M. and Solanki, S.K. (2000) The solar spectral irradiance since 1700. *Geophys. Res. Lett.*, 27, 2157 – 2160.

- Folin, C. and Ciocalteau, V. (1927) Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73, 627-650.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plantarum*, 92 (4), 696-717.
- Fröhlich, C., and Brusa, R.W. (1981). Solar radiation and its variation in time. *Sol. Phy.*, 74, 209 – 215.
- Fuleki, T. and Francis, F.J. (1968) Quantitative Methods for Anthocyanins. 2. Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice. *J. Food Science*, 33, 78-83.
- García-Gonzalez, M., Moreno, J., Cañavate, J.P., Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Florencio, F.J. and Guerrero, M.G. (2003) Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *J. Appl. Phycol.*, 15, 177-184.
- García-Macías, P., Ordidge, M., Vysini, E., Waroonphan, S., Battey, N.H., Gordon, M.H., Hadley, P., John, P., Lovegrove, J.A. and Wagstaffe, A. (2007) *J. Agr. Food Chem.*, 55 (25), 10168-10172.
- Ghetti, F., Fuoco, S. and Checcucci, G. (1998) UV-B monochromatic action spectrum for the inhibition of photosynthetic oxygen production in the green alga *Dunaliella salina*. *Photochem. Photobiol.*, 68: 276-280.
- Gil, M. (1990) Introducción al ozono estratosférico: origen, evolución y dinámica estratosférica. *Memorias de la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelona*, 884, 33 – 49.
- Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P. and Taylor, M.A. (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol.*, 26 (3), 139-145.
- Goiffon, J.P., Pierre, P.M. and Emile, M.G. (1999) Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 382, 39-50.
- Goksan, T., Durmaz, Y. and Gokpinar, S. (2003) Effects of light path lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898). *Aquaculture*, 217 (1-4), 431-436.
- Govind, N.S., Amin, A.R. and Modi, V.V. (1982) Stimulation of carotenogenesis in *Blakeslea trispora* by cupric ions. *Phytochemistry*, 21, 1043–1044.
- Grant, R.H. and Heisler, G.M. (2000) Estimation of ultraviolet-B irradiance under variable cloud conditions. *J. Appl. Meteorol.*, 39, 904 – 916.
- Griffiths, M., Sistrom, W.R., Cohenbazire, G. and Stanier, R.Y. (1955) Function of carotenoids in photosynthesis. *Nature*, 176 (4495), 1211-1214.
- Hamburger, C. (1905) Zur Kenntnis der *Dunaliella salina* und einer Amöbe aus Salinenwasser von Cagliari. *Arch. f. Protistenkd*, 6, 111-131.
- Han, T.J., Sinha, R.P. and Hader, D.P. (2003) Effects of intense PAR and UV radiation on photosynthesis, growth and pigmentation in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2 (6), 649-654.

- Handelman, G.J., van Kuijk, F.J.G.M., Chatterjee, A. and Krinsky, N.I. (1991) Characterization of products formed during the autoxidation of β -carotene. *Free Radic. Biol. Med.*, 10, 427–437.
- Hannach, G. and Sigleo, A.C. (1998) Photoinduction of UV-absorbing compounds in six species of marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 174, 207–22.
- Hannum, S.A. (2004) Potential impact of strawberries on human health: A review of the science. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 44, 1-17.
- Harborne, J.B. (1994) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall: London.
- Harvey, W. (1998) Cracking open marine algal's biological reassurance chest. *Biotechnol.*, 6, 488-492.
- Havaux, M., Tardy, F. and Lemoine, Y. (1998) Photosynthetic light-harvesting function of carotenoids in higher-plant leaves exposed to high light irradiances. *Planta*, 252 (2), 242-250.
- Havaux, M., Dall'Osto, L. and Bassi, R. (2007) Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in Arabidopsis leaves and functions independent of binding to PSII antennae(1[C][W]). *Plant Physiol.*, 145 (4), 1506-1520.
- Hayman, E.P., Yokoyama, H., Chichester, C.O. and Simpson, K.L. (1974) Carotenoid biosynthesis in *Rhodotorula glutinis*. *J. Bacteriol.* 120, 1339–1343.
- Hejazi, M. and Wijffels, R.H. (2003) Effect of light intensity on β -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biomol. Eng.*, 20, 171–175.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. (1993) Lancet 342, 1007.
- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Bozida, S.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H. and Katan, M.B. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Ann. Intern. Med.*, 155, 381.
- Hilal, M., Parrado, M.F., Rosa, M., Gallardo, M., Orce, L., Marta, M.E., González, J.A. and Prado, F.E. (2004) Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiation. *Photochem. Photobiol.*, 79, 205-210.
- Horwitz, B.A. (1994) Properties and transduction chains of the UV and blue light photoreceptors. In: Kendrick, K.E. and Kronenberg, G.H.M. (eds) *Photomorphogenesis in plants*. Kluwer, Dordrecht, pp 327–350.
- Huyskens-Keil, S., Eichholz, I., Kroh, L.W. and Rohn, S. (2007) UV-B induced changes of phenol composition and antioxidant activity in black currant fruit (*Ribes nigrum* L.). *J. Appl. Bot-Angew. Bot.*, 81 (2), 140-144.
- Ilyas, M., Pandey, A. and Jaafar, M.S. (2001) Changes to the surface level solar ultraviolet-B radiation due to haze perturbation, *J. Atmos. Chem.*, 40, 111 – 121.
- Im, C.S., Eberhard, S., Huang, K.Y., Beck, C.F. and Grossmann, A.R. (2006) Phototropin involvement in the expression of genes encoding chlorophyll and carotenoid biosynthesis enzymes and LHC apoproteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.*, 48 (1), 1-16.
- Jacobson, M.Z. (2001) Global direct radiative forcing due to multicomponent anthropogenic and natural aerosols. *J. Geophys. Res.*, 106, 1551 – 1568.

Janhke, L.S. (1999) Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 48, 68-74.

Jeon, Y.C., Cho, C.W. and Yun, Y.S. (2005) Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochem. Eng J.*, 27 (2), 127-131.

Jin, E., Lee, C.G. and Polle, J.E.W. (2006) Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology. *J. Microbiol. Biotech.*, 16 (6), 821-831.

Jin, E.S., Feth, B. and Melis, A. (2003) A mutant of the green alga *Dunaliella salina* constitutively accumulates zeaxanthin under all growth conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 115-124.

Johnson, M., Johnson, E., McElroy, R., Speer, H. and Bruff, B. (1968) Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *J. Bacteriol.*, 95, 1461-1468.

Joseph, J.A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N.A., Prior, R.L., Cao, G., Martín, A., Tagliamonte, G. and Bickford, P.C. (1998) Long-term dietary strawberry, spinach or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioural deficits. *J. Neurosci.*, 18, 8047-8055.

Junta de Andalucía (2008) La fresa de Huelva. Consejería de Agricultura y Pesca. ISBN: 978-84-8474-222-7.

Jurd, L. (1972) *Adv. Food Res. Suppl.*, 3, 123.

Kakani, V.G., Reddy, K.R., Zhao, D. and Sailaja, K. (2003) Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agr. Forest Meteorol.*, 120, 191-218.

Kalituho, L., Rech, J. and Jahns, P. (2007) The roles of specific xanthophylls in light utilization. *Planta*, 225 (2), 423-439.

Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K. and Katoh, S. (2004) Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme Microb. Tech.*, 35 (1), 81-86.

Kawaguchi, K. (1980) Microalgae production systems in Asia. In: Shelef, G. and Soeder, C.J. (eds) *Algae Biomass Algae Biomass*. Elsevier/north Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 25-33.

Kennedy, T.A. and Liebler, D.C. (1991) Peroxyl radical oxidation of β -carotene: formation of β -carotene epoxides. *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 290-295.

Keppler, K. and Humpf, H.U. (2005) Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorgan. Med. Chem.*, 13, 5195-5205.

Kerr, J.B. (1997) Observed dependencies of atmospheric UV radiation and trends. In: Zerefos, C.S. and Bais, A.F. (eds) *Solar Ultraviolet Radiation: Modelling, Measurement and Effects*. NATO ASI Series I, 52, 259, Springer - Verlag, Berlin.

Keutgen, A. and Pawelzik, E. (2007) Modifications of taste-relevant compounds in strawberry fruit under NaCl salinity. *Food Chem.*, 105 (4), 1487-1494.

Kim, D.O. and Lee, C.Y. (2004) Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit. Rev. Food Sci.*, 44, 253-273.

- Kirchhoff, V.W.J.H., Silva, A.A., Costa, C.A., Leme, N.P., Pavao, H.G. and Zaratti, F. (2001) UV-B Optical thickness observations of the atmosphere, *J. Geophys. Res.*, 106, 2963 – 2973.
- Knekt, P., Järvinen, R., Reunanen, A. and Maatela, J. (1996) *Br. Med. J.*, 312, 478.
- Kobayashi, M.K., Toshihide, N.M. and Nagai, S. (1992) Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green algae, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 74, 61-63.
- Kochert, G. (1978) Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. In: Hellebust, J.A. and Craigie, J.S. (eds.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press.
- Krinsky, N.I. and Johnson, E.J. (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.*, 26, 259-516.
- Krishna, K.B. and Mohanty, P. (1998) Secondary carotenoid production in green algae. *J. Sci. Ind. Res. India*, 57 (2), 51-63.
- Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M. (1998) Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. *New Red Fire* lettuce. *Physiol. Plantarum*, 103, 1-7.
- Krizek, D.T., Clark, H.D. and Mirecki, R. M. (2005) Spectral properties of selected UV-blocking and UV-transmitting covering materials with application for production of high-value crops in high tunnels. *Photochem. Photobiol.*, 81, 1047-1051.
- Laliberté, G., Olguin, E.J. and de la Noüe, J. (1997) Mass cultivation and wastewater treatment using *Spirulina*. In: Vonshak, A. (ed) *Spirulina platensis: Physiology, Cell Biology and Biotechnology*. Taylor & Francis Ltd, London.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F.A. and Espín, J.C. (2006) The dietary hidrosoluble tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J. Nut. Biochem.*, 17, 611-625.
- Larson, K.D. (1994) Strawberry. In: Schaffer, B. and Andersens, P.C. (eds) *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops*. CRC Press, Inc. 271297.
- Larson, K.D. and Shaw, D.V. Strawberry hybrid variety named Ventana (*Fragaria Ananassa Duch.*). *Patent number: HU200202013-A2*. Univ. California.
- Lebert, M., Schuster, M. and Häder, D.P. (2002). The European Light Dosimeter Network: four years of measurements. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 66, 81 – 87.
- Lee, Y.K. (1997) Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J. Appl. Phycol.*, 9, 403-411.
- León, R., Vila, M., Hernanz, D. and Vílchez, C. (2005) Production of phytoene by herbicide-treated microalgae *Dunaliella bardawil* in two-phase systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 92 (6), 695-701.
- Lerche, W. (1937) Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Arch Protistenk*, 88, 236–268.
- Leong, L.P. and Shui, G. (2002) An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.*, 76, 69-75.

- Li, Y., Zu, Y.Q., Chen, J.J. and Chen, H.Y. (2002) Intraspecific responses in crop growth and yield of 20 soybean cultivars to enhanced ultraviolet-B radiation under field conditions. *Field Crop. Res.*, 78 (1), 1-8.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.*, 148, 350-382.
- Liebler, D.C. and McClure, T.D. (1996) Antioxidant reactions of b-carotene: identification of carotenoid radical adducts. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 8-11.
- Liu, B.H. and Lee, Y.K. (2000) Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.*, 12, 301-307.
- Liu, S.C., McKeen, S.A. and Madronich, S. (1991) Effects of anthropogenic aerosols on biologically active ultraviolet radiation. *Geophys. Res. Lett.*, 18, 2265 – 2268.
- Liu, X., Xu, S. and Woo, K.C. (2004) Solar UV-B radiation on growth, photosynthesis and the xanthophylls cycle in tropical acacias and eucalyptus. *Envir. Exp. Bot.*, 54, 121-130.
- Loeblich, L.A. (1982) Photosynthesis and pigments influenced by light-intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *J. Mar. Biol. Assoc.*, 62, 493-508.
- Longstreth, J., de Gruijil, F.R., Kripke, M.L., Abseck, S., Arnold, F., Slaper, H.I., Velders, G., Takizawa, Y. and van der Leun, J.C. (1998) Health risks. *J. Photoch. Photobio. B.*, 46, 20-39.
- Madronich, S., McKenzie, R.L., Björn, L.O. and Caldwell, M.M. (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J. Photoch. Photobio. B.*, 46, 5 – 19.
- Malanga, G. and Puntarulo, S. (1995) Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plantarum*, 94 (4), 672-679.
- Márquez, J.A. (1986) *La nueva agricultura onubense*. I.D.R., Sevilla 160 pp.
- Martinez, R. (2007) Effects of ultraviolet radiation on protein content, respiratory electron transport system (ETS) activity and superoxide dismutase (SOD) activity of Antarctic plankton. *Polar Biol.*, 30 (9), 1159-1172.
- Masi, A. and Melis, A. (1997) Morphological and molecular changes in the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown under supplemental UV-B radiation: cell characteristics and Photosystem II damage and repair properties. *BBA-Bioenergetics*, 1321 (2), 183-193.
- Massyuk, N.P. (1973) *Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus Dunaliella Teod. and prospects for its potential utilization*. Naukova Dumka, Kiev.
- Masuda, T., Tanaka, A. and Melis, A. (2003) Chlorophyll antenna size adjustments by irradiance in *Dunaliella salina* involve coordinate regulation of chlorophyll a oxygenase (CAO) and Lhcb gene expression. *Plant Mol. Biol.*, 51 (5), 757-771.
- Mathews-Roth, M.M. (1990) Plasma concentration of carotenoids after large doses of beta-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52, 500-501.
- Matsuda, R., Ohashi-Kaneko, K., Fujiwara, K. and Kurata, K. (2007) Analysis of the relationship between blue-light photon flux density and the photosynthetic properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves with regard to the acclimation of photosynthesis to growth irradiance. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 53 (4), 459-465.

- Matsumoto, H., Nakamura, Y., Hirayama, M., Yoshiki, Y. and Okubo, K.J. (2002) *Agric. Food Chem.*, 50, 5034.
- Matsumura, Y. and Ananthaswamy, H.N. (2004) Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 195, 298-308.
- Mayer, B., Kylling, A., Madronich, S. Seckmeyer, G. (1998) Enhanced absorption of UV radiation due to multiple scattering in clouds: Experimental evidence and theoretical explanation. *J. Geophys. Res-Atmos.*, 103 (D23), 31241-31254.
- Mazo, V.K., Gmoshinski, I.V. and Zilova, I.S. (2004) *Spirulina* microalgae in human nutrition., *Vop. Pitaniya*, 73 (1), 45-53.
- McArthur, L.J.B., Fioletov, V.E., Kerr, J.B., McElroy, C.T. and Wardle, D.I. (1999) Derivation of UV-A irradiance from pyranometer measurements. *J. Geophys. Res.*, 104, 30139 – 30151.
- McCartney, E. (1976) *Optics of the atmosphere*, Wiley, New York.
- McIntyre, H.L., Kana, T.M., Anning, T. and Geider, R.J. (2002) Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.*, 38 (1), 17-38.
- McKenzie, R.L., Johnston, P.V., Smale, D., Bodhaine, B.A. and Madronich, S. (2001b) Altitude effects on UV spectral irradiance deduced from measurements at Lauder, New Zealand, and at Mauna Loa Observatory, Hawaii. *J. Geophys. Res.*, 106, 22845 – 22860.
- Mercadante, A. (1999) New carotenoids: recent progress. Invited Lecture 2. *Abstracts of the 12th International Carotenoid Symposium*, Cairns, Australia, July 1999.
- Metting, F.B. (1996) Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.*, 17, 477-489.
- Mil'ko, E.S. (1963) Effect of various environmental factors on pigment production in the alga *Dunaliella salina*. *Mikrobiologiya*, 32, 299–307.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M. and Rice-Evans, C.A. (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.*, 384, 240–242.
- Mitcham, B. and Kader, A. (1995) Methods for determining quality of fresh horticultural commodities. *Perishables Handling newsletter*, University of California at Davis, 1-11.
- Murphy, T.M. (1983) Membranes as targets of radiation ultraviolet. *Physiol. Plantarum*, 58, 381-388.
- New, M.B. (1999) Global aquaculture: current trends and challenges for 21st century. *World Aquacult.*, 3, 8-14.
- Nishino, H. (1998) Cancer prevention by carotenoids. *Mutat. Res.*, 402, 159-163.
- Olaizola, M. (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.*, 20, 459-466.
- Olsson, M.E., Ekvall, J., Gustavsson, K.E., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., Svensson, U., Akesson, B. and Nyman, M.G.L. (2004) Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of cultivar, ripening and storage. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 2490-2498.

- Ong, A.S.H. and Tee, E.S. (1992) Natural sources of carotenoids from plants and oils. *Meth. Enzymol.*, 213, 142-167.
- Oren, A. (2005) A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems*, 1:2.
- Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P. and Abalde, J. (2000) Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *J. Appl. Phycol.*, 12 (3-5), 553-555.
- Orset, S., Young, A.J. (1999) Low temperature-induced synthesis of alpha-carotene in the microalga *Dunaliella salina* (chlorophyta). *J. Phycol.*, 35, 520-527.
- Osinga, R., Tramper, J., Burgess, J.G. and Wijffels, R.H. (1999) Marine Bioprocess Engineering. *Proc. Prog. Ind. Microbiol.*, 35, 1-413.
- Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Björkman, O. and Leegood, R. (1997) Too many photos: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci.*, 2, 119-121.
- Oswald, W.J. (1988) Microalgae and waste-water treatment. In: Borowitzka, MA y Borowitzka LJ, eds.) *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 305-328. ISBN: 0-521-32349-5.
- Pahkala, M., Laurila, A. and Merila, J. (2002) Effects of ultraviolet-B radiation on common frog *Rana temporaria* embryos from along a latitudinal gradient. *Oecología*, 133 (4), 458-465.
- Pal, M., Sharma, A., Abrol, Y.P. and Sengupta, U.K. (1997) Exclusion of UV-B radiation from normal solar spectrum on the growth of mung bean and maize. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 61, 29-34.
- Park, E.K. and Lee, C.G. (2001) Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11 (6), 1024-1030.
- Paul, N.D. and Gwynn-Jones, D. (2005) Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends Ecol. Evol.*, 18 (1), 48-55.
- Pfander, H. (1992) Carotenoids: an overview. *Meth. Enzymol.*, 213, 3-13.
- Phadwal, K. and Singh, P.K. (2003) Effect of nutrient depletion on beta-carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Biores. Technol.* 90, 55-58.
- Pool-Zobel, B.L., Bub, A., Schroder, N. and Rechkemmer, G. (1999) Anthocyanins are potent antioxidants in vitro but do not reduce oxidative DNA damage within human colon cells. *Eur. J. Nutr.*, 38, 227.
- Pulz, O. and Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 635-648.
- R.A.E.A. FRESAS. Campaña 2006. Consejería de Agricultura y Pesca. Depósito Legal: SE 5145-06.
- Raja, R., Hemaiswarya, S. and Rengasamy, R. (2007) exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 517-523.
- Rath, J. and Adhikary, S.P. (2007) Response of the estuarine cyanobacterium *Lyngbya aestuarii* to UV-B radiation. *J. Appl. Phycol.*, 19 (5), 529-536.

- Richmond, A. (1990) Large scale microalgal culture and applications. In: (Round, M. and Chapman, S. (eds) *Progress in Phycological Research*. vol. 7, Biopress Ltd, pp 269-330.
- Richmond, A. (2004) Biological Principles of Mass Cultivation. In: Richmond, A. (ed) *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Science, UK, pp 125-178. ISBN: 0-632-05953-2.
- Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H.K. and Hohn, B. (2000) Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature*, 406 (6791), 98-101.
- Roleda, M.Y., van de Poll, W.H., Hanelt, D. and Wiencke, C. (2004) PAR and UVBR effects on photosynthesis, viability, growth and DNA in different life stages of two coexisting Gigartinales: implications for recruitment and zonation pattern. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 281, 37-50.
- Roncarati, F., Rijstenbil, J.W. and Pistocchi, R. (2008) Photosynthetic performance, oxidative damage and antioxidants in *Cylindrotheca closterium* in response to high irradiance, UVB radiation and salinity. *Mar. Biol.*, 153 (5), 965-973.
- Rozema, J., van de Staij, J., Björn, L.O. and Cadwell, M.M. (1997) UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol. Evol.*, 12, 22-28.
- Rozema, J., Van Geel, B., Björn, L.O., Lean, J. and Madronich, S. (2002) Toward solving the UV puzzle. *Science*, 296, 1621 – 1622.
- Sabburg, J. and Wong, J. (2000) The effect of clouds on enhancing UVB irradiance at the Earth's surface: A one year study. *Geophys. Res. Lett.*, 27, 3337 – 3340.
- Salguero, A. (2006) Bioproducción de carotenoides de interés comercial con la microalga *Dunaliella bardawil*. Tesis Doctoral. Universidad de Huelva.
- Salguero, A., León, R., Mariotti, A., de la Morena, B., Vega, J.M. and Vílchez, C. (2005) UV-A mediated induction of carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* with retention of cell viability. *Appl. Microbiol. Biot.*, 66 (5), 506-511.
- Sánchez, M.P., Jiménez, C. and Figueroa, F.L. (1996) Far-red light inhibits growth but promotes carotenoid accumulation in the green microalga *Dunaliella bardawil*. *Physiol. Plantarum*, 98 (2), 419-423.
- Sandmann, G. (1991) Biosynthesis of cyclic carotenoids: Biochemistry and Molecular Genetics of the reaction sequence. *Physiol. Plant*, 83, 186-193.
- Sandmann, G., Kuhn, M. and Boger, P. (1993) Carotenoids in photosynthesis – protection of D1 degradation in the light. *Photosynth. Res.*, 35 (2), 185-190.
- Schmitz, H.H., Poor, C.L., Wellman, R.B. and Erdman Jr., J.W. (1991) Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. *J. Nutr.*, 121, 1613–1621.
- Schmucki, D.A. and Philipona (2002) Ultraviolet radiation in the Alps: The altitude effect. *Opt. Eng.*, 41, 3090 – 3095.
- Schwander, H., Koepke, P., Kaifel, A. and Seckmeyer, G. (2002) Modifications of spectral UV irradiance by clouds. *J. Geophys. Res.*, 107 (D16), 4296, doi: 10.1029/2001JD001297.
- Scott, M., McCollum, C., Vasil'ev, F., Crozier, C., Espie, G.S., Krol, M., Huner, N.P. and Bruce, D. (2006) Mechanism of the down regulation of photosynthesis by blue light in the cyanobacterium *Synechocystis sp* PCC 6803. *Biochemistry-US*, 45 (29), 8952-8959.

- Seckmeyer, G., Bernhard, G., Mayer, B. and Erb, R. (1996) High accuracy spectroradiometry of solar UV radiation. *Metrología*, 32 (6), 697 – 700.
- Seckmeyer, G., Mayer, B., Bernhard, G., Erb, R., Albold, A., Jäger, H. and Stockwell, W.R. (1997) New maximum UV irradiance levels observed in Central Europe. *Atmos. Environ.*, 31, 2971 – 2976.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Zhang, Y., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H.S. and Heber, D. (2006) Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9329-9339.
- Sethow, R.B. (1974) The wavelengths of sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 3363-3366.
- Shaish, A., Avron, M., Pick, U. and Ben-Amotz, A. (1993) Are active oxygen species involved in induction of β -carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta*, 190, 363-368.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Lu, Z.H. and Kang, C.M. (2008) Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *Int. J. Biol. Res. Sci.*, 4 (1), 8-14.
- Skupien, K. and Oszmianski, J. (2004) Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa Duch.*) growth in northwest Poland. *Eur. Food Res. Technol.*, 219, 66-70.
- Sliney, D.H. and Wolbarsht, M.L. (1980) *Safety with Lasers and Other Optical Sources, A Comprehensive Handbook*. New York: Plenum Press.
- Snodderly, D.M. (1995) Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62, 1448-1461.
- Sobrinho, C., Montero, O. and Lubián, L.M. (2004) UV-B radiation increases cell permeability and damages nitrogen incorporation mechanisms in *Nannochloropsis gaditana*. *Aquat. Sci.*, 66 (4), 421-429.
- Sobrinho, C., Neale, P.J., Montero, O. and Lubián, L.M. (2005) Biological weighting function for xanthophylls de-epoxidation induced by radiation ultraviolet. *Physiol. Plantarum*, 125, 41-51.
- Soter, N.A. (1990). Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. *Semin. Dermatol.*, 9 (1), 11-5.
- Souquet, J.M., Cheynier, V., Sarni-Manchado, P. and Moutounet, M. (1996) Les composés phénoliques du raisin. *J. Int. Sci. Vigne et Vin.*, Hors série, 99-107.
- South, G.R., Whittick, A. (1987) *Introduction to Phycology*. Blackwell Scientific Publication, Canada.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 101 (2), 87-96.
- Tanaka, A. and Melis, A. (1997) Irradiance-dependent changes in the size and composition of the chlorophyll a-b light-harvesting complex in the green alga *Dunaliella salina*. *Plant Cell Physiol.*, 38, 17-24.
- Telfet, A. (2002) What is β -carotene doing in the photo system II reaction centre?. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 357, 1431-1439.

- Teodoresco, E.C. (1905) Organisation et development du *Dunaliella* nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidee. *Bot. Zentralbl. Beih.*, 18, 215–232.
- Thyssen, C., Schlichting, R. and Giersch, C. (2003) The CO₂-concentrating mechanism in the physiological context: lowering the CO₂ supply diminishes culture growth and economises starch utilisation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 213 (4), 629-639.
- Tjahjono, A.E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N. and Nagai, S. (1994) Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol. Lett.* 16, 133–138.
- Tovar, M.J. (2001) Estudio del efecto de la aplicación de diferentes estrategias de riego al olivo (*Olea europaea* L.) de la variedad arbequina sobre la composición del aceite. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida.
- Tsormpatsidis, E., Henbest, R.G.C., Davis, F.J., Battey, N.H., Hadley, P. and Wagstaffe, A. (2007) The effect of UV blocking and UV transparent plastic films on junebearing and everbearing strawberries. Libro de abstracts del 6th North American Strawberry Symposium.
- Tsormpatsidis, E., Henbest, R.G.C., Davis, F.J., Battey, N.H., Hadley, P. and Wagstaffe, A. (2008) *Environ. Exp. Bot.*, 63 (1-3), 232-239.
- Tredici, M.R. (1999) Photobioreactors. In: Flickinger, M.C. and Drew, S.W. (eds) *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. J. Wiley & Sons, New York, pp 395-419.
- Tremblin, G., Cannuel, R., Mouget, J.L., Rech, M. and Robert, J-M. (2000) Change in light quality due to a blue-green pigment, marennine, released in oyster-ponds: effect on growth and photosynthesis in two diatoms, *Haslea ostrearia* and *Skeletonema costatum*. *J. Appl. Phycol.*, 12 (6), 557-566.
- Tsukada, O., Kawahara, T. and Miyachi, S. (1977) Mass culture of *Chlorella* in Asian countries. In: Mitsui, A., Miyachi, S., San Pietro, A. and Tamura, S. (eds) *Biological Solar Energy Conversion*. Academic Press, New York, pp 455-471.
- Tsukida, K., Saiki, K., Takii, T. and Koyama, Y. (1982) Separation and determination of cis/trans- β -carotenes by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 245, 359–364.
- Universidad de Illinois (http://www.urbanext.uiuc.edu/strawberries_sp/nutrition.html)
- Valls, J., Lampreave, M., Nadal, M. y Arola, L. (2000) Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. *Alimentación (Enología) – Equipos y Tecnología*. –119-124.
- van de Poll, W.H., van Leeuwe, M.A., Roggeveld, J. and Buma, A.G.J. (2005) Nutrient limitation and high irradiance acclimation reduce PAR and UV-induced viability loss in the Antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 41 (4), 840-850.
- Vega, J.M., Penacho, A. and León, J. (1992). Asimilación de nitrato en microalgas: Expectativas en el metabolismo del nitrógeno. En: *Interacción planta-microorganismo: biología del nitrógeno*. Editorial Rueda. Madrid, pp 257-278. ISBN: 84-7207-065-4.
- Verdier, M. (1987) El cultivo del fresón en climas templados. Ediciones agrarias. ISBN: 84-86822-00-9.

Villar, R., Laguna, M.R., Calleja, J.M. and Cadavid, I. (1992). Effects of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* extracts on the central nervous system. *Planta Med.*, 58, 405-409.

Vincent, W.F. and Neale, P.J. (2000) Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In: de Mora, S.J., Demers, S. and Vernet, M. (eds) *The effects of UV radiation on marine ecosystems*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp 149–176.

Vinson, J.A., Su, X., Zubik, L. and Bose, P. (2001) Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5315-5321.

von Lintig, J., Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A. and Kleinig, H. (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.*, 12 (3), 625-634.

Wang, G.H., Chen, K., Chen, L.Z., Hu, C., Zhang, D. And Liu, Y. (2008) The involvement of the antioxidant system in protection of desert cyanobacterium *Nostoc* sp. against UV-B radiation and the effects of exogenous antioxidants. *Ecotox. Environ. Safe.*, 69, 150-159.

Wang, M., Tsao, R., Zhang, S., Dong, Z., Yang, R., Gong, J. and Pei, Y. (2006) Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. *Food Chem. Toxicol.*, 44 (9), 1522-1529.

Warburg, O. (1919) Über die Geschwindigkeit der Kohlensäurezusammensetzung in lebenden Zellen. *Biochemische Zeitschrift*, 100, 230-270

Web 1. <http://www.educa.aragob.es/>

Webb, A.R. (1997) Changes in stratospheric ozone concentrations and solar UV levels. *Radiat. Prot. Dosim.*, 72, 207 – 216.

Weihls, P., Webb, A.R., Hutchinson, S.J. and Middleton, G.W. (2000) Measurements of the diffuse UV sky irradiance during broken cloud conditions. *J. Geophys. Res.*, 105, 4937 – 4944.

Wicklund, T., Rosenfeld, H.J., Martinsen, B.K., Sundførb, M.W., Lea, P., Bruun, T., Blomhoff, R. and Haffner, K. (2005) Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 38, 387-391.

WMO (World Meteorological Organization) (1999) Scientific Assessment of Ozone Depletion: 1998, Global Ozone Research and Monitoring Project – *Report N° 44*, World Meteorological Organization, Génova.

Wu, H.Y., Gao, K.S. and Watanabe, T. (2005) Effects of solar ultraviolet radiation on the photochemical efficiency, photosynthetic pigments and biomass production of *Spirulina platensis*. *Prog. Nat. Sc.*, 15, 477-480.

Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y. and Shi, J. (2008) Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chem.*, 106, 545-551.

Yamaoka, Y., Carmona, M.L. and Oota, S. (2004) Growth and carotenoid production of *Thraustochytrium* sp. CHN-1 cultured under superbright red and blue light-emitting diodes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68 (7), 1594-1597.

Yang, Y. and Gao, K.S. (2003) Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.*, 15 (5), 379-389.

- Yao, Y.; Xuan, Z.; Li, Y.; He, Y.; Korpelainen, H.; Li, C. (2006) Effects of ultraviolet-B radiation on crop growth, development, yield and leaf pigment concentration of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) under field conditions. *Eur. J. Agron.*, 25, 215-222.
- Yao, Y., Xuan, Z., He, Y., Lutos, S., Korpelainen, H. and Li, C. (2007) Principal component analysis of intraspecific responses of tartary buckwheat to UV-B radiation under field conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 61 (3), 237-245.
- Young, A., Orset, S. and Tsavalos, A. (1997) Method for carotenoids analysis. In: Pessaraki, M. (ed). *Handbook of photosynthesis*. New York: Marcel Dekker, pp 597-622.
- Young, E.B. and Beardall, J. (2003) Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *J. Phycol.*, 39 (5), 897-905.
- Yu, J., Tang, X.X., Zhang, P.Y., Tian, J.Y. and Dong, S.L. (2005) Physiological and ultrastructural changes of *Chlorella sp* induced by UV-B radiation. *Prog. Nat. Sci.*, 15 (8), 678-683.
- Yuan, L., Yanqun, Z., Haiyan, C., Jianjun, C., Jilong, Y. and Zhide, H. (2000) Intraspecific responses in crop growth and yield of 20 wheat cultivars to enhanced ultraviolet-B radiation under field conditions. *Field Crop. Res.*, 67 (1), 25-33.
- Zaratti, F., Forno, R.N., Fuentes, J.G. and Andrade, M.F. (2003) Erythematically weighted UV variations at two altitude locations, *J. Geophys. Res-Atmos.*, 108 (D9), 4263, doi: 10.1029/2001JD000918.
- Zhang, P.Y., Yu, J. and Tang, X.X. (2005) UV-B radiation suppresses the growth and antioxidant systems of two marine microalgae, *Platymonas subcordiformis* (Wille) Hazen and *Nitzschia closterium* (Ehrenb.) W. Sm. *J. Integr. Plant Biol.*, 47 (6), 683-691.
- Zu, Y.Q., Li, Y., Chen, J.J. and Chen, H.Y. (2004) Intraspecific responses in grain quality of 10 wheat cultivars to enhanced UV-B radiation under field conditions. *J. Photoch. Photobio. B.*, 74 (2-3), 95-100.

ANEXO

Perfiles de temperatura y humedad en la finca experimental.

