

**D/D<sup>a</sup> Juan Luis Gómez Pinchetti SECRETARIO/A DEL DEPARTAMENTO DE  
Biología DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

**CERTIFICA,**

Que el Consejo de Doctores del Departamento en sesión extraordinaria tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada “Influencia de la radiación solar y del amonio sobre la acumulación de sustancias antioxidantes en macroalgas marinas cultivadas en un sistema de biofiltración” presentada por el/la doctorando/a D/D<sup>a</sup> Leyre Güenaga Unzetabarrenechea y dirigida por el Dr. Juan Luis Gómez Pinchetti y el Dr. Félix López Figueroa.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 19 de Mayo de 2011



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Biología

Las Palmas de Gran Canaria a 19 de Mayo de 2011

Programa de doctorado de Gestión de recursos vivos marinos y medioambiente  
Bienio 2001-2003.

Título de la Tesis:

“Influencia de la radiación solar y del amonio sobre la acumulación de sustancias  
antioxidantes en macroalgas marinas cultivadas en un sistema de biofiltración”

Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup> Leyre Güenaga Unzetabarrenechea para obtener el  
grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Dirigida por el Dr. Juan Luis Gómez Pinchetti y el Dr. Félix López Figueroa

**El/la Director/a**

**El/la Director/a**

**El/la Doctorando/a**

## AGRADECIMIENTOS

“Los hombres no se diferencian mucho en cuanto a intelecto -decía el naturalista Charles Darwin- sólo en ahínco y trabajo duro”.

Este trabajo de investigación es la suma del esfuerzo de muchas personas que directa o indirectamente han participado dando ánimos, apoyándome a enfrentar los retos sin miedo, siendo críticos, pero sobre todo ayudándome a levantar tantas veces que me he caído. De manera unánime expreso mi más sincero agradecimiento por todos los consejos que con tanto cariño he recibido a lo largo de todos estos años.

A todos vosotros, que habéis estado a mi lado, GRACIAS.

Al Dr. Guillermo García Reina Blairsy, por abrirme las puertas del Centro de Biotecnología Marina y el apoyo logístico prestado para la realización de este trabajo.

A la financiación recibida de la Fundación BBK para los inicios y del Ministerio de Educación y Ciencia a través del proyecto BIFARO, que ha colaborado en su fin.

A mis directores el Dr. Juan Luis Gómez Pinchetti y el Dr. Félix López Figueroa, por lo más importante, depositar vuestra confianza en mí y creer que este proyecto podía salir adelante. Por transmitirme de manera entusiasta vuestros conocimientos y poner a mi alcance todos los medios posibles. Por ser un ejemplo de tesón y disciplina, de personas que disfrutaran dedicándose a la ciencia. Nunca podré agradecer los suficiente el crecimiento profesional y personal que ha supuesto esta etapa en mi vida.

A los “Buenos días” hacia la perspectiva de un nuevo día, por parte de los pescadores y trabajadores del muelle de Taliarte.

Por supuesto, gracias por adentrarme a Juan Luis, al Grupo de Algología, a los que expreso todo mi cariño, en especial a la época que llamamos  
¡Aquellos Maravillosos Años!

A Sonia, mi compañera de labo y apoyo incondicional. Por implicarte durante tanto tiempo con interés y esfuerzo en este trabajo. Por tu generosidad al compartir conmigo tu experiencia, dedicación y mimo hacia los cultivos de algas, por tantos momentos, ensayos diurnos y nocturnos, trabajo de campo, risas y lágrimas, por las ricas horas de playa, por tu eterna paciencia. Me has enseñado que “Puedes llegar a cualquier parte, siempre que andes lo suficiente”- Lewis Carroll. Agradezco de corazón tus puntos de vista siempre tan enriquecedores y correcciones en la fase de elaboración del manuscrito. Por inculcarme el sentido de las cosas bien hechas. A Flo guapo, por los brincos de alegría contagiosa. Por tantos ratos de Skype desde tu nueva etapa.

Gracias Amiga. Eres maravillosa.

Estoy muy agradecida por los consejos, conocimiento, ánimos y cariño recibidos de Antera todos estos años. A Raquel, por pintar los días de color. A Fernando, por ayudarme con su eterna sonrisa a escapar de tantos obstáculos que surgían con los equipos y en los invernaderos. A Elena, siempre dispuesta a escucharme, por todas tus atenciones expresadas siempre desde el cariño. A Emilio, por involucrarte en la taxonomía de este trabajo, por las imágenes. Gracias a Mayalen, Amiga, tu estancia en el centro supuso el empuje definitivo, por tu asesoramiento en los protocolos y por compartir conmigo tu amplia experiencia en el campo de los antioxidantes. Por las cenas gastronómicas que preparaba Nacho y tertulias al son de buena música. A Yolanda, por tu disponibilidad, por esos desayunos tan ricos. Ana, gracias por contagiarme en mis finales tu frescura y entusiasmo de los comienzos.

Eres el gran relevo. Nere Eneko, beti laguntza emateko prest, eskerrik asko.

¡Realmente pasamos instantes entrañables e inolvidables en Algología!

Gracias a la hospitalidad con la que he sido recibida en la Universidad de Málaga de la mano de Félix y la aportación tan importante que han supuesto a este trabajo, los

experimentos desarrollados durante mis estancias en el laboratorio CIMES y en los laboratorios del SCAI en colaboración con el Grupo de Fotobiología. Recibiendo el conocimiento y experiencia con tanta dedicación del Dr. Pepe Aguilera, de la Dra. Natalie Korbee y del Dr. Roberto Abdala. Gracias por vuestros numerosos consejos y ánimos. Agradezco al Dr. Luisjo Alemán del Departamento de Química y su equipo el asesoramiento metodológico e interpretativo en los análisis infrarrojos. A Paqui.

Cristina, Celia, Maria Eugenia, Rosa y Bea gracias por guiarme en vuestros laboratorios, facilitarme con tanto cariño las estancias y las comidas al sol de Málaga.

Gracias al Dr. Erwan Ar Gall de la Universidad de Brest por su interés y colaboración en la identificación de los fenoles.

En la última etapa, en el Departamento de Biología de la facultad de Ciencias del Mar, he tenido la gran suerte de recibir el apoyo, asesoramiento y buenos ratos brindados por Andrea, Miguel, Edna, Javi, Isa, Pep, Fede, Minerva. Claire, gracias por estar ahí. Gracias a Rafa y Pili, Pascual, Nandi y Javier, Carmen Mari, José y Pedro. A Carmen. De corazón, gracias a todos por vuestra amabilidad y por hacerme sentir en casa.

Che, Dra. Galmozzi, por tu amistad, tus balances, esos mails y sms cargados de sabios consejos siempre en el momento justo.

Pero sobre todo, por no marcharte nunca de mi lado.

Belinda, mi amiga del alma, que haría yo sin ti! "Cuando tu corazón está centrado en un punto, entonces nada es imposible para ti"- Buda. Gracias por mantener la calma y recordarme la parte positiva en el camino. Antonio, por ser tan buen amigo.

Urda y Gemma, gracias amigos por rescatarme una y otra vez, por estar conmigo en todos los "marrones" como dice Urda.

A Cori, por tu amistad, por tu arranque y apoyo constante. "El mundo entero se aparta cuando ve pasar a alguien que sabe a donde va" decía el autor de "El principito", Antoine de Saint-Exupéry. Así eres tú.

Boni, mil gracias por tu aportación en el diseño de la portada.

A Belén, por ser como eres.

A mis amigas de siempre, Myriam, Edurne, Maria, Aina, Rebeca, Isabella, Esther, Maya, mujeres fuertes que no se rinden ante nada, emprendedoras de grandes aventuras, flexibles, cariñosas, pero por encima de todo Amigas.

A Nana, mi madre canaria, por tantas conversaciones a la orilla del mar.

Por la fuerza, ejemplo de lucha y coraje que representas para mí.

A Jacinto, por ponerle la mejor banda sonora a todos estos momentos vividos, por ser mi hombro y apoyo en momentos de flaqueza, pero sobre todo por transmitirme la virtud de la nobleza y lealtad por encima de cualquier circunstancia.

A toda mi familia,

aume eta atxitxe siempre en mi corazón, a mi amama, por tu dulzura, por ser el mejor ejemplo a tus 100 años, a mis tíos y primos, a Miri, mi hermana pequeña.

A Carlos, Maria y la Niña, mi familia de Las Palmas.

A Voyou de mis amores, "Ser como tú, surcando el infinito, tigre de luz"- Soseki.

A mis padres, las personas más importantes de mi vida, por guiarme en el buen camino y cuidar de mí siempre con tanto cariño,

por darme la oportunidad de recibir una buena educación, por inculcarme el sentido del deber y la virtud de la constancia por ser el mejor cobijo ante mi fragilidad

por apoyar esta elección siempre,

"Serás libre, no cuando tus días no tengan preocupaciones, ni tus noches penas o necesidades, sino cuando todo ello aprisione tu vida y sin embargo tú logres sobrevolar desnuda y sin ataduras".

## INDICE

---

<b>Lista de abreviaturas y símbolos</b>	i
<b>Resumen</b>	ii
<b>Introducción</b>	

1.1. Consideraciones generales	1
1.2. Las macroalgas como recurso para la obtención de sustancias funcionales y bioactivas	5
1.3. Función de los antioxidantes en las algas	13
1.3.1. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes	13
1.3.2. Metodología para determinar actividad antioxidante	26
1.4. Cultivo de macroalgas en sistemas intensivos. Biofiltración de aguas residuales	27
1.4.1. Generalidades de los sistemas de cultivo de macroalgas	27
1.4.2. Acuicultura integrada: sistemas de cultivo multitróficos (IMTA)	28
1.4.3. Valoración y aplicaciones de la biomasa obtenida en sistemas IMTA	35
1.5. Bibliografía	37

### **Capítulo I. Actividad antioxidante en macroalgas recolectadas en el sistema intermareal**

1.1. Introducción	57
1.2. Objetivos	61
1.3. Material y métodos	62
1.3.1. Material biológico	62
1.3.1.1. Recolección de las especies	62
1.3.1.2. Descripción de las especies	64
1.3.2. Preparación de los extractos	67
1.3.3. Determinación de la actividad antioxidante	69
1.3.3.1. Estudio de la actividad antirradical (Ensayo DPPH)	69
1.3.3.2. Poder reductor	70
1.3.4. Determinación de compuestos fenólicos totales	71
1.3.5. Extracción y cuantificación de pigmentos	72
1.3.5.1. Obtención de los extractos	72
1.3.5.2. Determinación de pigmentos liposolubles	73
1.3.5.3. Determinación de pigmentos hidrosolubles	74
1.3.6. Determinación de la relación peso seco/peso fresco	74
1.3.7. Análisis de carbono y nitrógeno	75
1.3.8. Análisis estadístico	75
1.4. Resultados	75
1.4.1. Determinación de la actividad antioxidante	75
1.4.1.1. Ensayo DPPH	75
1.4.1.2. Poder reductor	79
1.4.2. Estudio de los componentes antioxidantes de las algas	80
1.4.2.1. Determinación de compuestos fenólicos totales	80
1.4.2.2. Cuantificación de pigmentos	81
1.4.2.2.1. Pigmentos liposolubles: clorofila a, b, carotenoides	81
1.4.2.2.2. Pigmentos hidrosolubles: ficoeritrina	82
1.4.3. Correlaciones entre la actividad antioxidante detectada y las sustancias cuantificadas	82
1.4.5. Relación carbono y nitrógeno	85
1.5. Discusión	86
1.6. Bibliografía	94

### **Capítulo II. Actividad antioxidante en macroalgas cultivadas en un sistema de biofiltración con alta disponibilidad de nitrógeno**

2.1. Introducción	105
-------------------	-----

2.2. Objetivos	109
2.3. Material y métodos	110
2.3.1. Material biológico	110
2.3.1.1. Especies cultivadas	110
2.3.2. Condiciones de cultivo	110
2.3.2.1. Sistema de biofiltración	110
2.3.2.2. Sistemas de cultivo de macroalgas y diseño experimental	112
2.3.2.3. Biofiltración de N-amonio	114
2.3.2.3.1. Análisis de amonio	114
2.3.2.3.2. Tasas de biofiltración y velocidad de absorción de amonio	115
2.3.3. Determinación de la actividad antioxidante (Capítulo I)	
2.3.3.1. Estudio de la actividad antirradical (Ensayo DPPH)	
2.3.3.2. Poder reductor	
2.3.4. Determinación de compuestos fenólicos totales (Capítulo I)	
2.3.5. Extracción y cuantificación de pigmentos	
2.3.5.1. Obtención de los extractos	
2.3.5.2. Determinación de pigmentos liposolubles	
2.3.5.3. Determinación de pigmentos hidrosolubles	
2.3.6. Análisis de carbono y nitrógeno	
2.3.7. Análisis estadístico	116
2.4. Resultados	116
2.4.1. Respuesta de las especies ensayadas a las condiciones de cultivo	116
2.4.2. Estudio de biofiltración de las especies	118
2.4.3. Determinación de la actividad antioxidante	120
2.4.3.1. Ensayo DPPH	120
2.4.3.2. Poder reductor	123
2.4.4. Estudio de los componentes antioxidantes de las algas	124
2.4.4.1. Determinación de compuestos fenólicos totales	124
2.4.4.2. Cuantificación de pigmentos	125
2.4.4.2.1. Pigmentos liposolubles: Clorofila a, b y carotenoides	125
2.4.4.2.2. Pigmentos hidrosolubles: ficoeritrina	126
2.4.5. Correlaciones entre la actividad antioxidante detectada y las sustancias cuantificadas	127
2.4.6. Relación carbono y nitrógeno	129
2.5. Discusión	131
2.6. Bibliografía	137

**Capítulo III. Cultivo intensivo de *Halopithys incurva* en sistemas de biofiltración. Efecto del aporte de nutrientes y la irradiancia y calidad espectral sobre la actividad antioxidante**

3.1. Introducción	147
3.2. Objetivos	153
3.3. Material y métodos	155
3.3.1. Material biológico	155
3.3.2. Sistema de cultivo y cosechado	155
3.3.3. Diseños experimentales para el cultivo de <i>Halopithys incurva</i>	156
3.3.4. Determinación de la producción y la tasa de crecimiento	160
3.3.5. Biofiltración de amonio y fosfato	160
3.3.6. Medidas de radiación y otros parámetros de interés	161
3.3.7. Determinación del rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm)	161
3.3.8. Determinación del contenido en ficoeritrina	161
3.3.9. Determinación del contenido de carbono y nitrógeno interno	164
3.3.10. Evaluación de la actividad antioxidante	165
3.3.10.1. Estudio de la actividad antirradical (Ensayo DPPH)	
3.3.10.2. Ensayo ferrilmioglobina/ ABTS	165
3.3.10.3. Ensayo de decoloración de beta-caroteno	166

3.3.10.4. Ensayo de secuestro de radical superóxido ( $O_2^- \cdot$ )	167
3.3.11. Análisis estadístico	
3.4. Resultados	168
3.3.1. Cultivo de <i>Halopithys incurva</i> en tanques SCT con adición de N-amonio por pulsos	168
3.3.2. Cultivo de <i>Halopithys incurva</i> en tanques distribuidos en cascada	169
3.3.3. Co-cultivo de <i>Halopithys incurva</i> y <i>Jania adhaerens</i>	172
3.3.4. Evaluación de la actividad antioxidante	176
3.5. Discusión	179
3.6. Bibliografía	192
<b>Capítulo IV. Caracterización de la actividad antioxidante en <i>Halopithys incurva</i>: polifenoles, micosporinas y polisacáridos</b>	
4.1. Introducción	203
4.2. Objetivos	209
4.3. Material y métodos	210
4.3.1. Material biológico y diseño experimental	210
4.3.2. Preparación de los extractos para el estudio de fenoles	211
4.3.3. Extracción, fraccionamiento y purificación de polisacáridos ácidos	212
4.3.4. Extracción y análisis de MAAs	214
4.3.5. Cuantificación de polifenoles	
4.3.6. Caracterización de polifenoles	215
4.3.7. Caracterización de los polisacáridos	216
4.3.8. Análisis estadístico	217
4.4. Resultados	218
4.4.1. Cuantificación de fenoles totales	218
4.4.2. Identificación y caracterización de polifenoles	218
4.4.3. Contenido en polisacáridos ácidos	222
4.4.4. Análisis Infrarrojo de polisacáridos ácidos	224
4.4.5. Composición de aminoácidos tipo micosporina (MAAs)	227
4.4.6. Análisis de correlación	230
4.5. Discusión	231
4.6. Bibliografía	240
<b>Discusión general</b>	243
<b>Conclusiones</b>	255

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

---

.	Indica decimal en sustitución a “,”	<b>IMTA:</b>	Sistemas de cultivos mutitróficos
<b>ABTS<sup>+</sup>:</b>	Radical catión del ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin sulfónico	<b>MAAs:</b>	Aminoácidos tipo micospolina
<b>ABTS:</b>	Ácido 2, 2'-diazino-di-(3-etilbenzotiazolín) sulfónico	<b>METOH</b>	Extracto metanólico
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>N:</b>	Nitrógeno
<b>AMTI:</b>	Acuicultura Multi-Trófica Integrada	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:</b>	Amonio
<b>ANOVA:</b>	Análisis de la varianza	<b>NADH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico	<b>NADP<sup>+</sup>:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
<b>ATP:</b>	Adenosina trifosfato	<b>NBT</b>	Azul de nitro tetrazolio
<b>BHA:</b>	Butil hidroxianisol	<b>NO•:</b>	Radical óxido nítrico
<b>BHT:</b>	Butil hidroxitolueno	<b>NO<sub>2</sub>•:</b>	Radical dióxido de nitrógeno
<b>C:</b>	Carbono	<b>NUE:</b>	Eficiencia de eliminación de amonio
<b>CAT:</b>	Catalasa	<b>NUR:</b>	Tasa de asimilación de amonio
<b>C:N :</b>	Relación entre el contenido interno de carbono y nitrógeno	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b>	Superóxido
<b>CSIC</b>	Consejo superior de investigaciones científicas	<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub>:</b>	Oxígeno singlete
<b>Cla:</b>	Clorofila a	<b>-OH:</b>	Grupo hidroxilo
<b>C1b:</b>	Clorofila b	<b>PSI:</b>	Fotosistema I
<b>DPPH•:</b>	Radical 1,1-difenil-2-picril hidrazilo	<b>PSII:</b>	Fotosistema II
<b>DPPH:</b>	1,1-difenil-2-picril hidrazilo	<b>PA:</b>	Polisacáridos ácidos
<b>E-320:</b>	Butil hidroxianisol	<b>PAR:</b>	Radiación fotosintéticamente activa
<b>E-321:</b>	Butil hidroxitolueno	<b>PF:</b>	Peso fresco
<b>EC50:</b>	Concentración inhibitoria del 50 %	<b>PS:</b>	Peso seco
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminopentaácetico	<b>PSs</b>	Polisacáridos sulfatados
<b>EROs:</b>	Especies reactivas del oxígeno	<b>PVPP:</b>	Polivinilpirrolidona
<b>ETOH50</b>	Extracto hidroalcohólico	<b>RL:</b>	Radicales libres
<b>FAO:</b>	Food and Agriculture Organization	<b>RNM</b>	Resonancia nuclear magnética
<b>FC:</b>	Folin Ciocalteu	<b>RO•:</b>	Radical alcoxilo
<b>FT-IR:</b>	Fourier transform infrared spectroscopy	<b>ROO•:</b>	Radical peroxilo
<b>F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>:</b>	Rendimiento cuántico óptimo	<b>ROOH:</b>	Hidroperóxido
<b>GPX:</b>	Glutación peroxidase	<b>SIDA:</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>GR:</b>	Glutación reductasa	<b>SD:</b>	Desviación típica
<b>GSH:</b>	Glutación reducido	<b>SOD:</b>	Superóxido dismutasa
<b>GSSG:</b>	Glutación oxidado	<b>VCEAC:</b>	Actividad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico
<b>GTP:</b>	Transaminasa glutámico pirúvica	<b>VPEAC:</b>	Actividad antioxidante en equivalentes de pirogalol
<b>H<sup>+</sup>:</b>	Protón	<b>UI:</b>	Unidades internacionales
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Peróxido de hidrógeno	<b>UV:</b>	Ultravioleta
<b>HOO•:</b>	Radical hidroperoxilo	<b>UVA:</b>	Ultravioleta A
<b>HPLC:</b>	High Performance Liquid Chromatography	<b>UVB:</b>	Ultravioleta B
<b>I+D:</b>	Investigación y desarrollo	<b>UV-VIS:</b>	Ultravioleta -Visible

### RESUMEN

El presente trabajo aborda el estudio de la acumulación de sustancias antioxidantes en macroalgas tanto recolectadas del medio natural como cultivadas, de forma intensiva, en un sistema de biofiltración de efluentes provenientes del cultivo de peces (IMTA). Se analizaron los efectos de las condiciones de cultivo, principalmente relacionadas con la radiación solar y el aporte de nutrientes, sobre el crecimiento y la calidad de la biomasa de las diferentes especies producidas. La biomasa obtenida de las diferentes fuentes y condiciones de cultivo fue utilizada en la preparación y caracterización de extractos para la evaluación de la actividad antioxidante mediante el uso de modelos experimentales *in vitro*.

Los experimentos iniciales (Capítulos I y II), fueron realizados con especies de macroalgas de las Divisiones Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta, recolectadas en la zona intermareal de la costa de la isla de Gran Canaria (Islas Canarias, España) y cultivadas bajo condiciones de invernadero y alto aporte de N-amonio. Los extractos metanólicos (METOH) e hidroalcohólicos (ETOH50) obtenidos presentaban la habilidad de donar protones, característica de los compuestos antioxidantes, tal y como fue determinado por los ensayos del DPPH y del poder reductor. Las mayores actividades, superiores al 90% de barrido de radical libre, se detectaron en el alga roja *Halopithys incurva* y en las pardas *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina*. Los valores obtenidos por el método del poder reductor, indicaron la mayor actividad en *H. incurva*, con una actividad equivalente a  $53.15 \mu\text{g AA mg}^{-1}$ . Al expresar el % de barrido de radicales libres como EC50 (índice de oxidación), *C. abies-marina* (en ambos tipos de extractos) y el alga verde *Caulerpa racemosa* (en extractos ETOH50) exhibieron las mayores actividades, con EC50 de  $1.97 \pm 0.03$ ,  $2.03 \pm 0.01$  y  $1.88 \pm 0.03 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  respectivamente. Otras especies de algas pardas, *F. spiralis* y rojas, *H. incurva* y *Laurencia majuscula*, exhibieron valores de EC50 cercanos a los anteriores ( $2.21 \pm 0.02$ ;  $2.47 \pm 0.01$  y  $2.48 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectivamente).

Bajo las condiciones de cultivo ensayadas con este primer grupo de especies, durante un periodo experimental de un mes con aporte continuo de N-amonio, se observaron variaciones en los valores de acumulación de sustancias tanto de naturaleza liposoluble (clorofila *a* y carotenoides) e hidrosoluble (polifenoles y ficoeritrina) que fueron relacionadas directamente con la actividad antioxidante de los extractos, especialmente los polifenoles. La relación C:N disminuyó en algas

cultivadas de efluentes de peces respecto al de las algas recolectadas de la naturaleza, especialmente por el incremento de nitrógeno interno ya que el carbono interno apenas presentó cambios. Este resultado confirma el efecto que la disponibilidad de nitrógeno tiene sobre la calidad de la biomasa. En estas condiciones, el alga verde *Ulva rigida* mostró el mayor aumento en la concentración de clorofila a (81%) y carotenoides (85%). El aumento más significativo en el contenido de ficoeritrina se observó en *H. incurva* que aumentó un 92% su concentración.

En cuanto al contenido en compuestos fenólicos de las algas recolectadas *H. incurva* mostró los valores más altos (4.9% del peso seco), mientras que los valores mínimos fueron observados en *Grateloupia dichotoma* (0.7% del peso seco). Tras un mes bajo las condiciones de cultivo, el contenido en compuestos fenólicos totales varió significativamente, llegando a disminuir un 27% en *H. incurva*, 28% en *C. abies-marina* y 63% en *F. spiralis*. El análisis estadístico reveló que los factores (especies, naturaleza, cultivo y tipo de solvente para la extracción) afectan de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en los resultados de la actividad antioxidante de los extractos. Además, las correlaciones establecidas entre los diferentes resultados indicaron que la actividad antioxidante en las especies de macroalgas ensayadas está directamente relacionada con el contenido en polifenoles.

*Halopithys incurva* resultó un alga muy interesante por su elevada actividad antioxidante tanto en el medio natural como en condiciones de cultivo y su alto contenido en polifenoles. Se desconoce referencia alguna sobre el cultivo de esta especie en tanques ni en efluentes de peces. El éxito de su cultivo bajo estas condiciones es de interés ya que permite garantizar biomasa para la obtención de sustancias bioactivas de interés (polifenoles). Así en los capítulos III y IV, se aborda en el estudio más detallado sobre la acuicultura de *H. incurva* bajo diferentes condiciones: adición de amonio en forma de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (a modo de pulsos) o como efluentes de peces (variación diaria), volumen y tipo de tanques (distintas relaciones S:V), densidad de inóculo (g/l), época del año, cultivo en tanques en cascada (dos biofiltros secuenciales), cocultivo con el alga roja epífita *Jania adhaerens*, distintas tasas de renovación y efecto de la radiación solar (algas crecidas dentro de un invernadero que reduce la radiación PAR y UVA y filtra completamente la radiación UVB versus tanques expuestos a radiación solar en exterior). Se analizaron la tasas de crecimiento, rendimiento de la biomasa o producción, capacidad de biofiltración expresada como eficiencia de biofiltración del N-amonio (NUE) y tasa de incorporación de N-amonio (NUR), calidad de la biomasa (acumulación de pigmentos, polifenoles y relaciones C:N) y la capacidad antioxidante de la biomasa producida mediante los

ensayos DPPH y ABTS<sup>+</sup>. Los rendimientos de biomasa y tasas de biofiltración más altos se consiguieron con doble biofiltro en tanques conectados en cascada (18-21 g PS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) y en condiciones de alta irradiación (PAR+UV) en cocultivo con *Jania adhaerens*, con valores de rendimiento de biomasa de la combinación *H.incurva*-*J.adhaerens* de 54.5 g PS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> mostrando valores de biofiltración de amonio (NUE) del 100 % y con tasas de asimilación (NUR) de 4.41±0.03 g N m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Los porcentajes de inhibición antirradical fueron mayores en el ensayo DPPH que en el ABTS<sup>+</sup>. La actividades detectadas por ambos métodos fueron superiores en los extractos de *H. incurva* cultivada tras cuatro semanas bajo radiación PAR y aporte de N-amonio. La concentración de fenoles en estos extractos alcanzó valores máximos de 62.2 mg g<sup>-1</sup> PS. Del análisis cromatográfico para su caracterización, realizado por HPLC, pudo concluirse que la actividad antioxidante de *H. incurva*, está relacionada, al menos parcialmente, con la presencia del pirogalol (24.9 mg g<sup>-1</sup> PS). La acumulación de polisacáridos ácidos (PA) fue observada a los 42 días (bajo condiciones PAR+UV) aumentando significativamente, un 59.1%, respecto al día 7 de cultivo. Sin embargo, los espectros analizados mediante FT-IR no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de cultivo (p<0.05). El análisis del contenido e identificación de amino ácidos tipo micosporina (MAAs) mostró un comportamiento antagonista de las concentraciones de shinorine y porphyra-334 en presencia de N-amonio existiendo una correlación negativa entre ambas. En ausencia de este nutriente y presencia de radiación UV son las concentraciones de palythine y porphyra-334 las que muestran una correlación negativa, produciéndose un aumento de la concentración de palythine en detrimento de la porphyra-334.

Se concluye que el alga *H. incurva* es un excelente candidato para el cultivo en efluentes de piscifactorías ya sea en doble biofiltro (dos tanques conectados en cascada) y especialmente en cocultivo con *Jania adhaerens*. Presenta una alta capacidad de biofiltración y acumula en la biomasa compuestos bioactivos de interés como compuestos nitrogenados: aminoácidos tipo micosporina (fotoprotectores frente a la radiación UV con capacidad antioxidante) y compuestos carbonados: polisacáridos ácidos con potente actividad inmunoestimuladora. Además los compuestos polifenólicos se correlacionan con una alta actividad antioxidante.

## SUMMARY

The following work relates to the study of the accumulation of antioxidant substances in seaweeds. Seaweed species were collected from their natural environment as well as cultivated, under controlled conditions, in a biofilter system for fish aquaculture effluents remediation (IMTA). The effect of growth conditions (solar radiation and nutrient supply) was analysed in terms of growth and final quality of the biomass for every assayed species. Biomass was utilized to prepare extracts and evaluate their antioxidant activity through *in vitro* experimental models.

The former experiments (Chapter I and II), were carried out with seaweed species collected from the intertidal of Gran Canaria (Canary Islands, Spain) and belonging to the Division Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta. Those species were cultivated in greenhouse under high supply of ammonium-N. According to the DPPH and reducing power assays, both the methanolic extracts (METOH) and the hydroalcoholic extracts (ETOH50) showed the ability to donate protons, a typical characteristic of antioxidant compounds. The red alga *Halopithys incurva* and the brown algae *Fucus spiralis* and *Cystoseira abies-marina* showed the highest activity with more than 90 % of the free radical scavenging. *H. incurva* also registered the highest activity ( $53.15 \mu\text{g AA mg}^{-1}$ ) according to the reducing power method. When expressing the percentage of free radical scavenging activity as the oxidation index (EC50), *C. abies-marina* (both types of extract) and the green algae *Caulerpa racemosa* (ETOH50 extract) presented the highest activities, with EC50 attaining  $1.97 \pm 0.03$ ,  $2.03 \pm 0.01$  and  $1.88 \pm 0.03 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  respectively. Similar EC50 values were reached by the brown alga *F. spiralis* ( $2.21 \pm 0.02 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) and the red algae *H. incurva*  $2.47 \pm 0.01$  and *Laurencia majuscula* ( $2.48 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

After one month of continuous supply of ammonium-N to the cultures, the different species modified the pattern of accumulation of liposoluble (chlorophyll a and carotenoids) and hydrosoluble (phycoerythrin and polyphenols) substances. The antioxidant activity of their extracts related directly to the accumulation of those substances, in particular to the phenolic compounds. The C:N ratio of the seaweed cultivated in a fish tank effluent decreased with respect to the seaweed collected from the natural environment. The decrease on the C:N ratio was only related to the increase in the internal N content, since the internal C remained unchanged. This result confirmed the effect of the N availability in the cultures on the final quality of the biomass. Under those conditions, the green algae *Ulva rigida* increased the concentration of chlorophyll a (81%) and carotenoids (85%). *H. incurva* showed the

largest increase (92%) on the concentration of phycoerythrin, above any other species tested.

The phenolic compounds were higher in those algae collected from the environment, with *H. incurva* showing the highest values (4.9% dry weight) and *Grateloupia dichotoma* for the lowest values (0.7% dry weight). After one month of cultivation, the content of total phenolic compounds decreased significantly in *H. incurva* (27%), *C. abies-marina* (28%) and *F. spiralis* (63%). Statistical analysis revealed that various factors (species, collection, culture and type of solvent for the extraction) affect significantly ( $p < 0.05$ ) the antioxidant activity of the extracts. Furthermore, the results revealed a direct correlation between the antioxidant activity of the species tested and the content in polyphenols.

*H. incurva* was an interesting algae due to the large content in polyphenols and the high antioxidant activity showed when collected from the environment and also when harvested from controlled cultures. To our knowledge there is no reference on the cultivation of this species, and particularly not on the cultivation based on fish tank effluents. For this reason, the success attained in the cultivation of this species is remarkable as it ensures the supply of a biomass rich in bioactive substances such as the polyphenols. Consequently, chapters III y IV refer to the detailed study of the aquaculture of *H. incurva* under different culture conditions, namely the supply strategy of ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (with pulses or with a daily variation resembling the fish tank effluent), volume and type of tanks (different S:V ratio), density of inoculation (g/l), season, cascade arrangement of the tanks (with two sequential biofilters), co-cultivation with a red epiphytic algae *Jania adhaerens*, different dilution rates and the effect of solar radiation (with natural sun radiation or under a greenhouse that reduces the PAR and UVA radiation and blocks the UVB). The performance of the cultures was analysed in terms of growth rate, biomass productivity or yield, biofiltration capacity expressed in terms of ammonium removal efficiency (NUE) and ammonium uptake rate (NUR), biomass quality (accumulation of pigments, polyphenols and C:N ratio) and the antioxidant capacity of the obtained biomass according to the DPPH and ABTS<sup>+</sup> assays. The highest yields ( $18\text{-}21 \text{ g DW m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) and biofiltration capacity were attained with double filtering-cascade arrangement of the tanks, high irradiating (PAR+UV) conditions and with co-cultivation of *Jania adhaerens*. The overall (*H.incurva*-*J.adhaerens*) biomass of the system was  $54.5 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , with an ammonium removal (NUE) of 100% and ammonium uptake (NUR) of  $4.41 \pm 0.03 \text{ g N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . The percentage of free radical inhibition was higher in the DPPH assay than in the ABTS<sup>+</sup> assay. *H. incurva* cultured for a month under low radiation and low ammonium supply showed

higher phenolic concentrations ( $62.2 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ) in their extracts and higher antioxidant activities according to both methods. Chromatographic characterization of the extract through HPLC analyses concluded that the antioxidant activity in *H. incurva*, is mainly related to the presence of pirogalol ( $24.9 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ). The accumulation of acid polysaccharides (AP) increased significantly (59.1 %) after 42 days under PAR+UV irradiation, as compared to the accumulation measured after 7 days of culture. Nevertheless, the spectrum analysed by FT-IR did not show significant differences ( $p < 0.05$ ) between the different cultivation treatments. The identification and quantification of micosporine-like amino acids (MAAs) demonstrated a negative correlation between shinorine and porphyra-334 concentrations in the presence of N-ammonium. In the absence of this nutrient (under UV radiation) however, a decrease in the concentration of porphyra-334 resulted in an increase in the concentration of palythine, showing a negative correlation between those molecules.

In conclusion, *Halopithys incurva* is an excellent candidate to treat the wastewater from fish aquaculture factories. The algae could be cultivated as a double biofilter (with two tanks arranged in cascade system) along with *Jania adhaerens* in coculture system. Besides with the high biofiltering capacity, this algae accumulates interesting bioactive compounds. Among the nitrogenated molecules it accumulates micopsorine-type amino acids, which due to the antioxidant capacity could photo-protect from UV radiation. Among the carbon containing molecules the acid polysaccharides confer a strong immunostimulating activity. Finally, polyphenolic compounds are strongly related to the antioxidant activity.

## **INTRODUCCIÓN**

---

## 1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

El manejo sustentable de los recursos naturales junto con la necesidad de obtención de nuevas fuentes de materia prima ha despertado en la actualidad un creciente interés por la optimización y mejora de las técnicas de cultivo de los vegetales marinos, ya que éstos constituyen una fuente importante de recursos, no sólo por su utilización directa, sino por la cantidad de productos derivados que se obtienen a partir de ellos. Además, el cultivo de algas ofrece servicios medioambientales como es el caso de la depuración y biofiltración de efluentes. El cultivo de macroalgas tiene varios siglos de antigüedad en las culturas orientales (Tseng y Fei, 1987), pero la mayoría de las especies de macroalgas de interés industrial han sido explotadas fundamentalmente a partir de sus poblaciones naturales. Ha sido en los últimos 50 años cuando se han establecido las bases científicas para el desarrollo de la Agronomía Marina, tanto en Oriente como en otros lugares del mundo (Santelices, 1989). Más recientemente se han desarrollado las bases de la Acuicultura Multi-trófica Integrada (AMTI) que consiste en la incorporación de especies de diferentes niveles tróficos en el mismo sistema de cultivo. Estos sistemas han sido propuestos como alternativa para prácticas acuícolas respetuosas con el medioambiente buscando alcanzar una aproximación a un ecosistema en equilibrio reduciendo así los impactos negativos sobre el medio costero (Chopin et al., 2001). De esta forma, se logra la conversión de nutrientes particulados y solubles que se originan a partir del metabolismo de los organismos alimentados y sus desechos, en biomasa de organismos biofiltradores, reduciendo así los procesos de eutrofización a los que pueda dar lugar el vertido de este tipo de residuos (FAO, 2008). En este tipo de sistemas las macroalgas juegan un papel importante, actuando como auténticas “trampas” de nutrientes disueltos en los sistemas de biofiltración, donde además se genera biomasa de interés a bajo coste con la posibilidad de modificar las características de las especies tanto desde un punto de vista morfológico como fitoquímico mediante su cultivo controlado. La selección de la especie de macroalga a utilizar como biofiltro depende de dos aspectos fundamentales: el interés comercial de su biomasa o de los productos derivados de ella y su capacidad fisiológica para crecer en las condiciones de cultivo con niveles altos de nutrientes, especialmente amonio (Buschmann et al., 2001; Chopin et al., 2001).

El objetivo del estudio que se plantea es doble, por un lado se busca identificar macroalgas como fuente de moléculas antioxidantes y, por otro el responder con eficiencia a los requerimientos que exige el cultivo en base a las ventajas que ofrece la

acuicultura multi-trófica integrada generando así biomasa de alto valor añadido a bajo coste. Esto permitirá desarrollar futuros estudios para responder a la demanda actual de manera que la obtención de los productos derivados de las algas no se realice con un alto coste ambiental sino al contrario, reduciendo el impacto ambiental al biofiltrar los nutrientes vertidos en el medio costero por diversas actividades humanas (acuicultura, plantas depuradoras de agua y actividades ganaderas entre otras). Hace algunos años, el término antioxidante se asociaba automáticamente con compuestos tales como la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina E (tocoferoles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ) y eventualmente con la vitamina A y su precursor de origen vegetal, el  $\beta$ -caroteno (Auroma, 1998; Wang y Quinn, 1999; Young y Lowe, 2001). Sin embargo, en los últimos tiempos este concepto se ha extendido a una serie de sustancias que se encuentran dentro de un grupo fitoquímicamente conocido como los “polifenoles”. En realidad, hace mucho tiempo que se reconoce en el entorno científico a estos “nuevos” antioxidantes como responsables en gran medida de una enorme variedad de propiedades biológicas atribuidas desde siempre a frutas, verduras y plantas, o productos obtenidos a partir de las mismas. Entre estas propiedades destacan la capacidad antioxidante y su posible efecto en la prevención de diferentes enfermedades crónicas que incluyen en su origen el estrés oxidativo (Rice-Evans, 2001). El mercado de los antioxidantes funcionales aumenta año tras año y según un informe reciente, la presión de los consumidores y la legislación revisada están causando un cambio en las tendencias a su utilización. Desde el año 2000 al 2009, el mercado total de antioxidantes en Europa creció apenas un 1.7%, mientras que los antioxidantes naturales han experimentado una tasa de crecimiento anual del 35% ([http:// www.frost.com](http://www.frost.com)).

Para que este crecimiento sea sostenible, es muy importante desarrollar herramientas que permitan distinguir los productos que son verdaderamente efectivos como antioxidantes, es decir que estén bio-disponibles y cuyo mecanismo de acción farmacológico esté claramente dilucidado. Por ello, existe un interés por la búsqueda de especies vegetales cuyo alto contenido en antioxidantes (o fito-complejo antioxidante) signifique un aporte en el tratamiento y prevención de patologías ligadas a la oxidación de moléculas biológicas. Esto último está avalado por la gran cantidad de información generada por los estudios en el vino, el té verde, y diferentes frutas ricas en antocianos y carotenoides principalmente (Frankel et al., 1993; Halliwell, 1996; Wang et al., 1997; Rietveld y Wiseman, 2003). Los avances tanto en la investigación básica como en la investigación clínica, han conducido a una comprensión más profunda de los mecanismos producidos por la toxicidad del oxígeno y han permitido

entender que ésta constituye un problema de una envergadura muy superior a la que se le atribuía hace unos años. Esto se debe al enorme abanico de actividades demostradas que se atribuyen a las propiedades antioxidantes y a su capacidad de captar radicales libres (Heim et al., 2002).

Recientemente existe una tendencia dirigida al consumo de productos de origen natural frente a los obtenidos de forma sintética. Por este motivo interesa encontrar fuentes naturales de antioxidantes para ser usados como aditivos alimentarios y cosméticos, que puedan reemplazar total o parcialmente a alternativas sintéticas como el BHT (butilhidroxitolueno), también conocido como E-321, y BHA (butilhidroxianisol) o E-320 (Branen et al., 1975; Ito et al., 1983). El empleo de antióxicantes sintéticos con fines terapéuticos ha sido cuestionada por su comprobada genotoxicidad y actividad carcinogénica (Gordon, 1996). Esto ha llevado a que muchos países de la Unión Europea hayan decidido reemplazarlos por productos más inocuos (Yen et al. 1998; Wichi et al., 1998), aunque éstos tendrían que llegar a ser tan eficaces como los citados y con costes bajos. En este contexto, ha ganado interés la búsqueda y utilización de compuestos antioxidantes de origen natural, ya que se consideran más seguros que los sintéticos pues pueden poseer implícitamente efectos beneficiosos para la salud. Hay así una clara tendencia mundial actual sobre el uso de fuentes naturales para la obtención de fármacos efectivos que prevengan patologías ligadas a la oxidación de moléculas biológicas (Frankel et al., 1993; Raskin et al., 2002).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el Reino Vegetal, siendo parte importante de la dieta tanto humana como animal. El término genérico de polifenoles incluye distintos grupos en relación a su estructura que incluye flavonoides y taninos hidrolizables tales como glucósidos del ácido gálico (Manach, 2004). Constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, y que engloba más de 8.000 compuestos distintos. Sus principales funciones en las células vegetales son: actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y la reproducción, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo excretados como mecanismo de defensa (Zern y Fernández, 2005). Estos compuestos tradicionalmente han sido considerados como anti-nutrientes, debido al efecto adverso de uno de sus componentes mayoritarios, los taninos, sobre la digestibilidad de las proteínas. Sin embargo, los aspectos nutricionales de los polifenoles también son motivo de investigación en la actualidad debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas para la salud humana, en el tratamiento y la prevención del cáncer y las enfermedades

cardiovasculares. Geleijnse y Hollman, (2008) destacan el aporte de las flavononas a los efectos beneficiosos de los polifenoles. Estos investigadores estimaron que mientras una dieta normalmente saludable aportaría unos 100 mg/día de los antioxidantes “tradicionales”, es decir beta-caroteno, vitamina C y E, se podría ingerir alrededor de 1 g/día de flavonoides totales.

El consumo de otra familia de antioxidantes, los carotenoides, está ligado sustancialmente a la disminución de la incidencia de cáncer (Kopas–Lane et al., 1995). Además representan una fuente de provitamina A, no son tóxicos y presentan actividad antioxidante en la propia célula, participando en la desactivación de los radicales libres producidos en el metabolismo celular (Rouseff et al., 1994). En España se comercializa desde abril del 2009, Revidox®, un complemento alimenticio de última generación desarrollado por Actafarma en colaboración con el CSIC, compuesto por un concentrado de activos antioxidantes extraídos de la uva y de la granada y que presenta activadores de las sirtuínas, comúnmente conocidas como “gen de la longevidad”.

Dentro de las fuentes naturales, las algas constituyen opciones para la búsqueda de nuevos productos bioactivos, especialmente antioxidantes, lo que se justifica por diversas razones. Un estudio reciente realizado por investigadores franceses usando una serie de ensayos de antioxidantes que incluyen el DPPH, el poder reductor y el método del  $\beta$ -caroteno sobre extractos de 24 algas encontraron una "relación significativa entre la capacidad antioxidante y el contenido total en fenoles totales, lo que indica que son los compuestos fenólicos los principales contribuyentes de las propiedades antioxidantes de estos vegetales marinos" (Zubia et al., 2009).

Desde un punto de vista más amplio se ha demostrado que las algas son fuente de compuestos bioactivos que tienen un carácter renovable y son fácilmente obtenibles. A esto se suma la posibilidad de su cultivo a bajo coste dentro de un sistema de policultivo integrado (Gómez Pinchetti et al., 2002). A su vez, son considerados en general poco tóxicos (Grabley y Thiericke, 1999). Su alto consumo en los países asiáticos se ha asociado a una variedad de efectos beneficiosos sobre la salud, por ejemplo la reducción de la incidencia de algunos tipos de cáncer (Funahashi et al., 1999, Hiqashi et al., 1999). Ello por tanto sugiere que las algas contienen compuestos biológicamente activos capaces de modular diferentes funciones fisiológicas del organismo.

## **1.2. LAS MACROALGAS COMO RECURSO PARA LA OBTENCIÓN DE SUSTANCIAS FUNCIONALES Y BIOACTIVAS**

Las algas en general, y las macroalgas en particular, son consideradas una importante fuente de sustancias con potencial bioactivo. Entre la gran diversidad de organismos marinos, se consideran una de las mayores fuentes de productos naturales biológicamente activos, ya sean compuestos extraídos del tejido o metabolitos secundarios de distinta naturaleza biológica producidos por los mismos (Fenical, 1982).

En Occidente, en contraste con lo que sucede en los países asiáticos, el uso de las algas aún es reducido, aunque su interés va en aumento debido a las numerosas investigaciones que evidencian sus propiedades para la prevención de diversas patologías, usos terapéuticos, aplicaciones en el campo de la biomedicina, su composición de alto valor nutricional así como la eficiencia del uso de sus extractos en la agricultura (Guiry y Blunden, 1991). Otro campo de interés actual es el de los productos dermocosméticos y relacionados (Radmer, 1996). La búsqueda de nuevos compuestos químicos es de importancia estratégica para estas industrias. Gracias al conocimiento de la diversidad marina, de las peculiaridades que lo caracterizan, así como a los avances en tecnología, en la actualidad, una parte importante de la investigación se desvía y centra en los recursos del mar (Jensen, 1993; Norton et al.; 1996). Concretamente, en los últimos años se han estudiado nuevas fuentes de sustancias naturales, entre ellas organismos marinos, con aproximadamente 300 patentes provenientes de productos naturales marinos entre 1969 y 1999 (Fusetani, 2000). En este sentido, numerosas revisiones señalan a las macroalgas como uno de los principales productores de este tipo de compuestos (Bhakuni y Silva, 1974; Stein y Borden, 1984; Glombitza y Koch, 1989; Hay, 1996; González y Silva, 2001). Los estudios sobre la química de productos naturales marinos han sido dirigidos principalmente al descubrimiento de nuevas sustancias con valor farmacéutico (Figura I.1), bioquímico, bactericida, antiviral, fungicida, antitumoral, antioxidante, antiinflamatorio e insecticida (Blunden y Carabot, 1995). A pesar de que el número de especies de macroalgas estudiadas únicamente alcanza alrededor de un 2% del total de las conocidas, en la actualidad los compuestos químicos caracterizados son aproximadamente 2000, pero solamente en algunos de ellos se ha podido establecer claramente el mecanismo de acción (González y Silva, 2001).



Figura I.1. Diversas aplicaciones de las sustancias extraídas de macroalgas.

La producción de metabolitos secundarios de especial interés por parte de los organismos marinos es fruto de una serie de adaptaciones evolutivas que la presión selectiva ha obligado a adquirir en respuesta a funciones tan importantes como la reproducción o los mecanismos de defensa y protección contra los herbívoros, dando lugar a productos con importantes propiedades biológicas (Hay et al., 1987a, 1987b; Paul et al., 1987; Pereira et al., 1994). Estos metabolitos también están asociados a la disminución de epífitos, inhibiendo el desarrollo de los organismos competidores y patógenos microbianos (Hay, 1996; Vlachos et al., 1997). Además, la composición de los metabolitos secundarios marinos a diferencia de los vegetales terrestres puede ser significativamente modificada en virtud de la disponibilidad de los elementos en agua de mar tanto en el medio marino como en cultivo. Esta diversidad metabólica, que responde a las necesidades especiales de los hábitats marinos, convierte a las algas en una fuente natural de producción de metabolitos secundarios con características estructurales y propiedades ausentes en las formas terrestres. Por tanto, no es de extrañar que produzcan sustancias de diversas características en abundancia, con

mayor o menor eficiencia debido a los mecanismos de adaptación o aclimatación de las macroalgas para utilizar los nutrientes disponibles en el medio (Kanno et al., 1990).

Los trabajos publicados al respecto datan en su mayoría de las tres últimas décadas (Tabla I.1), los resultados publicados permiten afirmar que especies pertenecientes a los Phylum *Chlorophyta*, *Rhodophyta* y *Phaeophyta*, son productoras de sustancias bioactivas. Además muestran que la concentración y actividad de estas sustancias (antibióticas, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales y antivirales entre otras) están directamente influenciadas por la localización geográfica (Hay y Fenical, 1988; Van Alstyne, 1988; Steinberg y Paul, 1990 ; Steinberg y van Altena 1992) y otros factores medioambientales como la salinidad ( Ragan y Glombitza, 1986), disponibilidad de nutrientes (Ilvessalo y Tuomi, 1989), estacionalidad (Ragan y Jensen, 1977; Ragan y Glombitza, 1986) y factores intrínsecos de la planta como el tamaño (Denton et al. 1990), la edad (Pedersen, 1984) y el tipo de tejido (Steinberg, 1984; Steinberg, 1986; Tugwell y Branch, 1989). La actividad antibacteriana puede ser considerada como un indicador de la capacidad del alga marina para sintetizar compuestos bioactivos de interés terapéutico, aunque esta actividad puede depender tanto de la especie como de la extracción eficiente de los diferentes compuestos bioactivos (González et al. 2001, Lima- Filho et al., 2002). Las especies pertenecientes al phylum *Chlorophyta* constituyen un gran grupo de macroalgas de interés farmacológico. Productos provenientes de algunas especies han demostrado propiedades antiinflamatorias o actividad frente al virus del SIDA. Extractos de distinta polaridad de especies de *Ulva*, *Enteromorpha* y *Codium* han sido descritos como antimicrobianos (Ballantine et al., 1987; Febles., 2006). Otra especie que presentó actividad sobre *Staphylococcus aureus* fue *Caulerpa* spp. (Freile et al., 2001), siendo el caulerpín y la caulerpicina los compuestos responsables de dicha actividad sobre las bacterias Gram (+). A partir de *Codium pungniformis* se purificaron polisacáridos con propiedades anticoagulantes, determinándose que ejercen su acción a través de la inhibición de la trombina y la potenciación de antitrombina III. Derivados glicosilados de esteroides obtenidos de *Ulva lactuca* han evidenciado actividad antiinflamatoria en estudios *in vivo*, aunque resta determinar el/los mecanismos de acción para tal efecto. Caulerpenina es un compuesto de naturaleza sesquiterpénica que ha sido aislado de *Caulerpa taxifolia* que presenta propiedades antitumorales debidas a través de la inhibición del ensamblado del microtúbulo y agregación de la tubulina, demostrando potencialidad como agente multifuncional ya que interactúa con la síntesis de ADN y con los mecanismos de transducción de las señales. También algunas especies de algas verdes sintetizan derivados fenólicos halogenados que han evidenciado

propiedades antioxidantes. A partir de *Ulva lactuca* se han aislado bromofenoles y derivados, y se ha determinado actividad bromoperoxidasa. Estudios de otras propiedades biológicas han demostrado que los extractos de *Enteromorpha* inhiben la respuesta a la IgE, por lo que se proponen como potencialmente útiles para el tratamiento de enfermedades alérgicas (Venkata Raman et al., 2004).

Las algas rojas sobresalen como productoras de metabolitos halogenados que pertenecen a un gran número de clases químicas como, cetonas simples, bromofenoles, acetogeninas y terpenos (Fenical, 1975). Este grupo de macroalgas se caracteriza como productora de polisacáridos de extensa aplicación industrial (carragenanos, agaranos), como gelificantes, espesantes y estabilizantes. Los polisacáridos mencionados (y otros como los glucanos y xilanos) han demostrado propiedades farmacológicas interesantes, como son: actividades anticoagulante, antiviral, antibacteriana y antioxidante (Chattopadhyay et al., 2007). También se ha demostrado que los carragenanos y otros polisacáridos sulfatados bloquean las infecciones por el virus del SIDA por distintos mecanismos, efectuándose estudios para ser utilizados por ejemplo en productos de uso vaginal (Pistorius et al., 2004). A partir de especies de algas rojas se han aislado otros metabolitos de distinta naturaleza química con actividad biológica, que los transforma en compuestos potencialmente utilizables. Caben destacar los aminoácidos tipo micosporina, péptidos y proteínas esteroides, terpenos, lípidos y fenoles. Algunos grupos químicos mencionados son importantes porque actúan como captadores de radicales libres (base de la actividad antioxidante) previniendo a las células y tejidos de los efectos negativos provocados por la radiación UV. Otros poseen actividades antiinflamatoria, antibacteriana, antitumoral, antialérgica, inmunomoduladora o antiviral entre otras. En el género *Gigartina*, se identificó un potente inhibidor de la DNA polimerasa y de la HIV transcriptasa reversa tipo 1 (Carlucci et al., 1997). Estudios efectuados con *Jania rubens* permitieron aislar un derivado de los diterpenos bromados con propiedades citotóxicas (Nagwa, 2004). Otro ejemplo lo constituyen la obtención de dihidrotirsiferol, un triterpeno anticancerígeno aislado de la especie *Laurencia viridis* (Zubia et al., 2009b). Por otra parte, los pigmentos denominados ficobiliproteínas, que desarrollan un papel importante en la fotosíntesis, poseen además propiedades antioxidantes con aplicaciones en cosmetología, medicina y en la industria alimentaria (Romay et al., 2003). En algas pardas también se han identificado gran número de sustancias de interés biológico, como son los polisacáridos de importancia diversa: los alginatos, productos gelificantes de gran importancia industrial. En los últimos años se han profundizado los estudios de los fucoidanos producidos por este grupo, ya que en

estos compuestos se han detectado propiedades tales como anticoagulantes, antitrombóticas, antivirales, antitumorales, antimicrobianas (Feldman et al., 1999; Ponce et al.; 2003). Géneros como *Ascophyllum*, *Scytosiphon*, *Fucus* y *Laminaria*, son algunos ejemplos de algas pardas en las que han evidenciado propiedades anticoagulantes debido a los fucanos (Collic et al., 1991). Los fucoidanos también han mostrado propiedades frente a los virus del Herpes y al virus del sida (Anh et al., 2002; Lee et al.; 2004). Además de los compuestos relacionados con los hidratos de carbono, también producen metabolitos de otra naturaleza. Entre ellos, florotaninos, a los que se les ha atribuido capacidad antioxidante más recientemente (Connan et al., 2006). También se han identificado fenoles halogenados; terpenos y otras sustancias con actividad antibacteriana y fucoesteroles con actividad antitumoral.

Tal y como se expone, la biodiversidad de las especies de algas marinas, junto a la diversidad química encontrada en cada especie, constituye un recurso prácticamente ilimitado que puede ser utilizado de forma beneficiosa, para el desarrollo de biofármacos, antibióticos, antioxidantes, antitumorales y antivirales (Tablal.1.)

## Introducción

Tabla I.1. Tabla resumen de las principales actividades biológicas y compuestos identificados en macroalgas pertenecientes al grupo Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta. En los casos que se muestra (-) en la casilla corresponden a sustancias no identificadas.

Actividad	Naturaleza del compuesto/virus inhibido	Origen (phylum, especie)		Referencia
<b>Antibiótica</b>				
	Ácido acrílico	Chlorophyta	<i>Ulva lactuca</i>	Glombitza, 1970; Hornsey y Hide, 1974
	Diterpeno	Chlorophyta	<i>Halimeda copiosa</i>	Fenical y Paul, 1984
	<i>Laurencienine</i> (isoprenoide no cíclico ether)	Rhodophyta	<i>Laurencia obtusa</i>	Caccamese et al., 1980
	-	Rhodophyta	<i>Ceramium nitens</i>	Freile et al., 2004
	-	Rhodophyta	<i>Asparagopsis taxiformis</i>	Ballantine et al., 1987
	<i>Chonalgina</i>	Rhodophyta	<i>Chondria littoralis</i>	Martinez Nadal et al., 1963
	Florotaninos	Phaeophyta	<i>Ecklonia kurome</i>	Nagayama et al., 2002
	<i>Diocetyl phthalate</i>	Phaeophyta	<i>Sargassum wightii</i>	Sastri y Rao, 1995
	Sarganina	Phaeophyta	<i>Sargassum natans</i>	Martinez Nadal et al., 1963
	<i>Crinitol</i>	Phaeophyta	<i>Sargassum tortile</i>	Kubo et al., 1992
<b>Antimicrobiana</b>				
	Ácido acrílico	Chlorophyta	<i>Ulva lactuca</i>	Glombitza, 1970; Biard et al., 1980
	5'hidroxi-iso avrainvilleol	Chlorophyta	<i>Caulerpa spp</i>	Ballantine et al., 1987; Rao y Parekh, 1981; Hornsey y Hide, 1974
	Compuestos bromados	Rhodophyta	<i>Gracilaria corticata</i>	Hornsey y Hide, 1974

	Ácido acrílico	Rhodophyta	<i>Corallina officinalis</i> <i>Hypnea cervicornis</i> ; <i>Halopithys incurva</i> ; <i>Chondrus crispus</i>	Rao y Parekh, 1981; Ballantine et al., 1987; Hornsey y Hide, 1974; Glombitza, 1970
	Lanosol (Ethyl ether)	Rhodophyta	<i>Osmundaria serrata</i>	Barreto y Mayer, 2006
	Acidos grasos	Phaeophyta	<i>Eisenia arborea</i>	Rosell y Srivastava, 1987;
<b>Antioxidante</b>	-	Chlorophyta	<i>Halimeda incrassata</i> <i>Caulerpa racemosa</i> <i>Ulva fastiata</i>	Rivero et al., 2003
	Heteropolisacáridos sulfatados	Chlorophyta	<i>Ulva pertusa</i>	Qi et al.2005
	-	Rhodophyta	<i>Gracilaria caudata</i>	Zubia et al., 2007
	-	Rhodophyta	<i>Laurencia obtusa</i>	Anggadiredja et al. 1997
	Polisacáridos sulfatados	Rhodophyta	<i>Porphyra haitanesis</i>	Zhang et al., 2003
	Fucoxantina clorofila a	Phaeophyta	<i>Laminaria digitata</i> , <i>Himanthalia elongata</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Fucus serratus</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>	Le Tutour et al 1998
	Polisacaridos sulfatados	Phaeophyta	<i>Undaria pinnatifida</i>	Mori et al., 1982
	-		<i>Porphyra tenera</i> , <i>Eisenia bicyclis</i> , <i>Undaria pinnatifida</i> ,	Fujimoto 1990
	-	Phaeophyta	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Connan et al., 2006
<b>Antitumoral</b>				

## Introducción

---

Udoteal (Diterpenoide)	Chlorophyta	<i>Udotea flabellum</i>	Fenical y Paul 1984
Halimedatrial (Diterpenoide)	Chlorophyta	<i>Halimeda sp.</i>	Fenical y Paul 1984
Isorawsonol (Bromofenol)	Chlorophyta	<i>Avrainvillea rawsonii</i>	Nagle et al., 2004
Halomon (Monoterpeno halogenado)	Rhodophyta	<i>Portieria hornemanni</i>	Jaspars 1998; Zubia et al., 2009
Thyrsiferyl 2 3-acetate ( <i>Cyclic ether</i> )	Rhodophyta	<i>Laurencia obtusa</i>	Nagle et al., 2004
Dieckol ( Florotanino)	Phaeophyta	<i>Ecklonia cava</i>	Heo et al., 2009; Jung et al.,2009; Ryu et al.,2009
Fucoidan ( <i>Polisac sulfata</i> )	Phaeophyta	<i>Fucus vesiculosus,</i> <i>Acophyllum nodosum</i>	Wu y Chen., 2006
Cystoseirol monoacetato (Diterpenoide)		<i>Cystoseira myrica</i>	Ayyad et al., 2003
Bifurcadiol (Diterpenoide)		<i>Bifurcaria bifurcata</i>	Zubia et al., 2009
Sargal-1 Chromene		<i>Sargassum tortile</i>	Numata et al., 1992
<b>Antiviral</b>			
Virus inmunodeficiencia felina	Chlorophyta	<i>Caulerpa taxifolia</i>	Nicoletti et al., 1999
Herpes simple virus	Chlorophyta	<i>Gayralia oxysperma</i>	Cassolato et al., 2008
Virus influenza	Rhodophyta	<i>Gigartina stellata, Gracilaria verrucosa, Grateloupia fiendrus crispus, HalopithysLaurencia pinnatifida</i>	Blunde et al., 1981

---

Virus influenza	Phaeophyta	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Bifurcaria bifurcata</i> , <i>Cystoseira ligulata</i> , <i>Himanthalia elongata</i> , <i>Fucus</i> <i>spiralis</i>	Blunde et al., 1981
Herpes simple virus	Phaeophyta	<i>Undaria pinnatifida</i>	Lee et al., 2004

---

### **1.3. FUNCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES EN LAS ALGAS**

#### **1.3.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES**

El estrés oxidativo es una consecuencia inevitable de la vida en una atmósfera rica en oxígeno (Davies, 2000). A diferencia de los organismos anaerobios, que están adaptados para vivir en ausencia de oxígeno, los organismos aerobios requieren de oxígeno para obtener energía química (ATP) esencial para la vida a través de la respiración. La “paradoja del oxígeno” es que representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular, al mismo tiempo que entraña un peligro potencial debido a las características paramagnéticas de este gas, responsable de la formación de intermediarios parcialmente reducidos y dotados de una alta reactividad, conocidos como especies reactivas del oxígeno (EROs). El término EROs (Tabla I.2.) es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres. Las EROs se generan dentro del metabolismo intracelular normal, fundamentalmente en las mitocondrias y los peroxisomas, así como a partir de una gran variedad de sistemas enzimáticos citosólicos. Además, numerosos agentes externos son capaces de generar la formación de EROs en las algas (UV, herbívoros y largos periodos de desecación en la zona intermareal, entre otros). Al estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre prooxidantes y antioxidantes, se le denomina estrés oxidativo (Rodríguez et al., 2001). Este desequilibrio se produce a causa de una excesiva producción de EROs, y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a la producción de un daño celular. Los radicales libres (RL), se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas. Para estabilizarse reaccionaran rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de oxido-reducción. Una especie oxidante es aquella capaz de aceptar electrones de modo que va a generar un desequilibrio electrónico en las moléculas vecinas. Las moléculas alteradas se transforman en radicales libres, creando así una reacción en cadena que causa daños a nivel molecular.

Además de estas fuentes endógenas existen fuentes exógenas de radicales libres tales como condiciones ambientales (luz solar, ozono), farmacológicas y nutricionales (contaminantes y aditivos, entre otros). Para protegerse contra el daño causado por el estrés oxidativo, las células poseen una serie de sistemas de

naturaleza enzimática y no enzimática diseñados para protegerse de la acción de los radicales libres generados en la propia célula que se denominan antioxidantes.

Tabla I.2. Especies reactivas del oxígeno (EROs).

Radicales	No radicales
Superóxido, $O_2^-$	Peróxido de hidrógeno, $H_2O_2$
Hidroxilo, $OH\cdot$	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Peroxilo, $RO_2\cdot$	Ozono, $O_3$
Alcoxilo, $RO\cdot$	Oxígeno singlete, $^1O_2$
Hidroperóxilo, $HO_2\cdot$	Peroxinitrito, $ONOO^-$

Halliwell (1995) definió antioxidante como "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato" (Sies, 1993; Halliwell y Gutteridge, 1995; Halliwell, 1996). Se trata de sustancias de distinta naturaleza, constituidas por una gran diversidad molecular y funcionalidad biológica (Aruoma et al., 2003) para atrapar o neutralizar radicales libres porque ceden un electrón, previniendo así del daño oxidativo. Teóricamente, un compuesto puede actuar como antioxidante de distintas formas: compitiendo por la unión al oxígeno, retardando la iniciación de la oxidación, bloqueando la propagación, inhibiendo catalizadores o estabilizando hidroperóxidos (Valenzuela y Nieto, 1996). Los sistemas de defensa antioxidante descritos hasta el momento en algas son muy variados y actúan a distintos niveles y en diferentes momentos (Figura I.2).

Como organismos fotosintéticos, las algas marinas están expuestas a una combinación de luz y fuertes concentraciones de oxígeno, que inducen a la formación de radicales libres y potentes agentes oxidantes. La ausencia de fotodestrucción de las algas sugiere un mecanismo de protección antioxidante y la existencia de sustancias con capacidad captadora de radicales dentro de su composición (Fujimoto y Kaneda, 1980; Fujimoto, 1990; Matsukawa et al., 1997). El hecho de que las macroalgas estén fijadas al sustrato y no puedan escapar del exceso de radiación solar como el caso de fitoplancton cayendo hacia aguas más profundas, ha promovido el desarrollo de mecanismos de fotoprotección muy eficientes, especialmente en las algas de la zona intermareal.

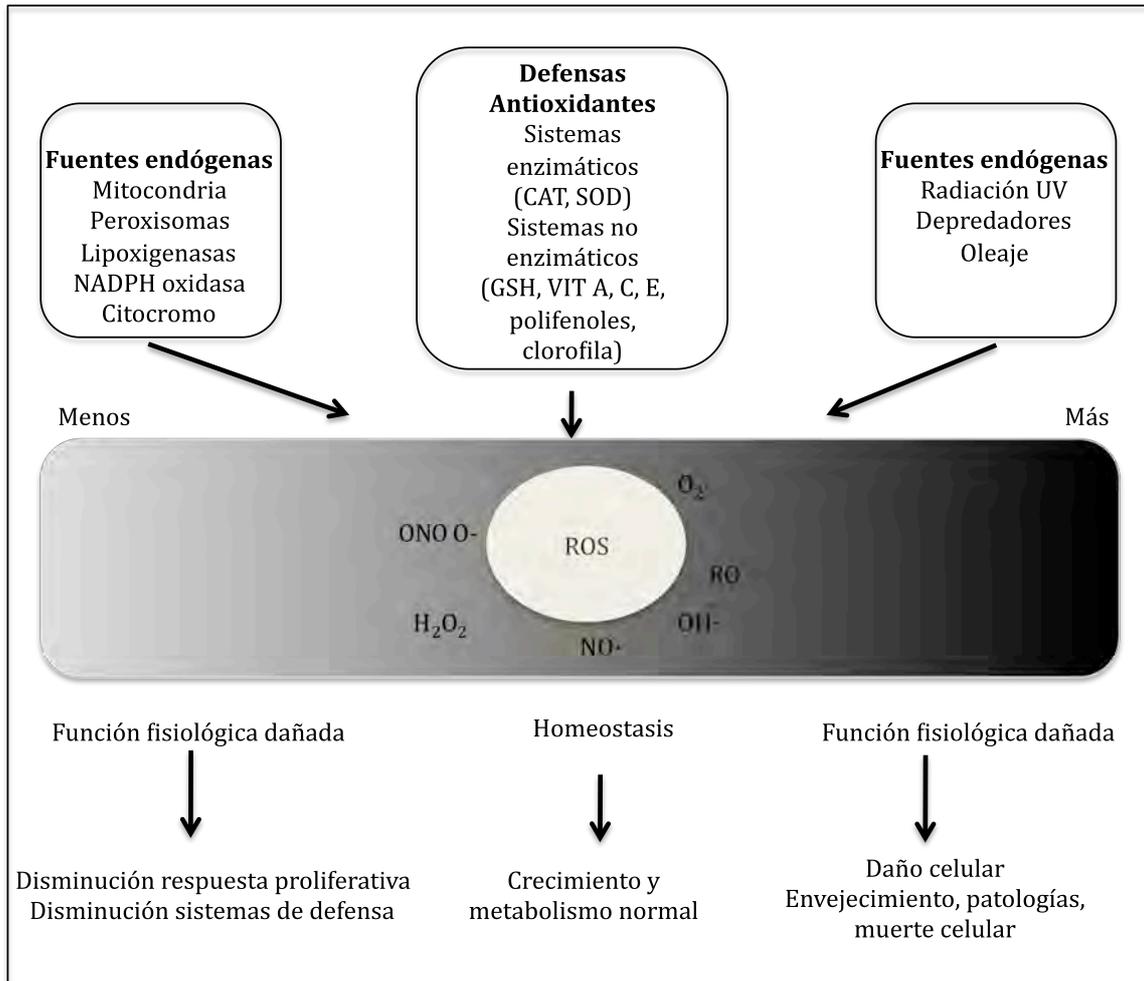


Figura 1.2. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo en macroalgas.

Bajo el punto de vista de la fisiología celular y según su momento de actuación, los antioxidantes pueden ser clasificados primarios, aquellos que impiden la formación de radicales libres. Algunas enzimas intracelulares favorecen la metabolización directa de los oxidantes generados en el metabolismo celular. Es el caso de catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Secundarios, captadores de radicales libres, interrumpen la reacción de propagación de los radicales libres por inactivación (ácido ascórbico, alfa- tocoferol) o desplazan a los radicales libres (carotenoides, glutatión y la mayoría de las enzimas). Y terciarios, también denominados sistemas reparadores, reparan el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que han sido degradadas. Sustancias que tras reaccionar con un radical libre, se oxidan, dando lugar a sustancias relativamente inactivas y evitando que a la vez que otra sustancia sufra oxidación. Esta capacidad se ha descrito en vitamina E, vitamina C y polifenoles.

El principal sistema de defensa contra los radicales libres lo constituyen las proteínas antioxidantes enzimáticas que incluyen la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), (Betteridge 2000; Fang *et al.*, 2002) (Figura I.3; Tabla I.3.). La eficacia de esta triada enzimática reside en una triple acción defensiva al disminuir la producción de las especies oxigénicas e impedir la interacción de estas entre sí, para dar lugar a especies más estables de menor reactividad y evitar la peroxidación de las macromoléculas. Hay otros enzimas importantes que participan en el sistema de defensa, incluidos en las reacciones de la regeneración del Glutatión (GSH), como la GSH reductasa o NADPH-quinona oxidoreductasa. La exposición a altas concentraciones de metales pesados puede ocasionar la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno induciendo la síntesis de enzimas antioxidantes como la catalasa. Se sabe que la catalasa juega un rol importante en la reducción del estrés oxidativo catalizando la oxidación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), por lo que el incremento en la actividad de esta enzima por efecto del cobre sugiere el aumento de la producción de  $H_2O_2$  y un marcado aumento de los niveles de catalasa y otras enzimas. Esto ha sido demostrado en especies de microalgas como *Pavlova viridis* (Valavanidis *et al.*, 2006).

El estudio de las macroalgas como antioxidantes se encuentra estrechamente ligado a su composición química y en la actualidad es un importante campo dentro de las investigaciones con productos naturales por su potencialidad como nuevas fuentes de antioxidantes naturales. En concreto, en la última década son numerosos los trabajos publicados que han puesto de manifiesto el poder antioxidante de las macroalgas, tanto rojas, pardas como verdes y sus extractos. Estos trabajos han demostrado que los extractos de algas marinas presentan actividad antioxidante a través de varios mecanismos de acción; entre estos se encuentran la capacidad atrapadora de radicales libres, la quelación de metales pro-oxidantes, los mecanismos de donación y aceptación de electrones y la capacidad de interrupción de la peroxidación lipídica (Jimenez-Escrig *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002; Fayaz *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Las algas pueden adoptar diferentes estrategias de control del estrés oxidativo relacionadas con los nutrientes (cantidad y disponibilidad). Así con bajas concentraciones de N pueden utilizar ascorbato (p.e., *Mastocarpus stellatus* en el supralitoral), y los que tienen suficiente N, preferentemente utilizan glutatión para controlar el estrés oxidativo (p.e. *Chondrus crispus*) (Collen y Davison, 1999a). Estos autores consideran que la disponibilidad de nitrógeno también influye en el contenido y la actividad de diferentes enzimas antioxidantes. Collen y Davison (1999c) observaron

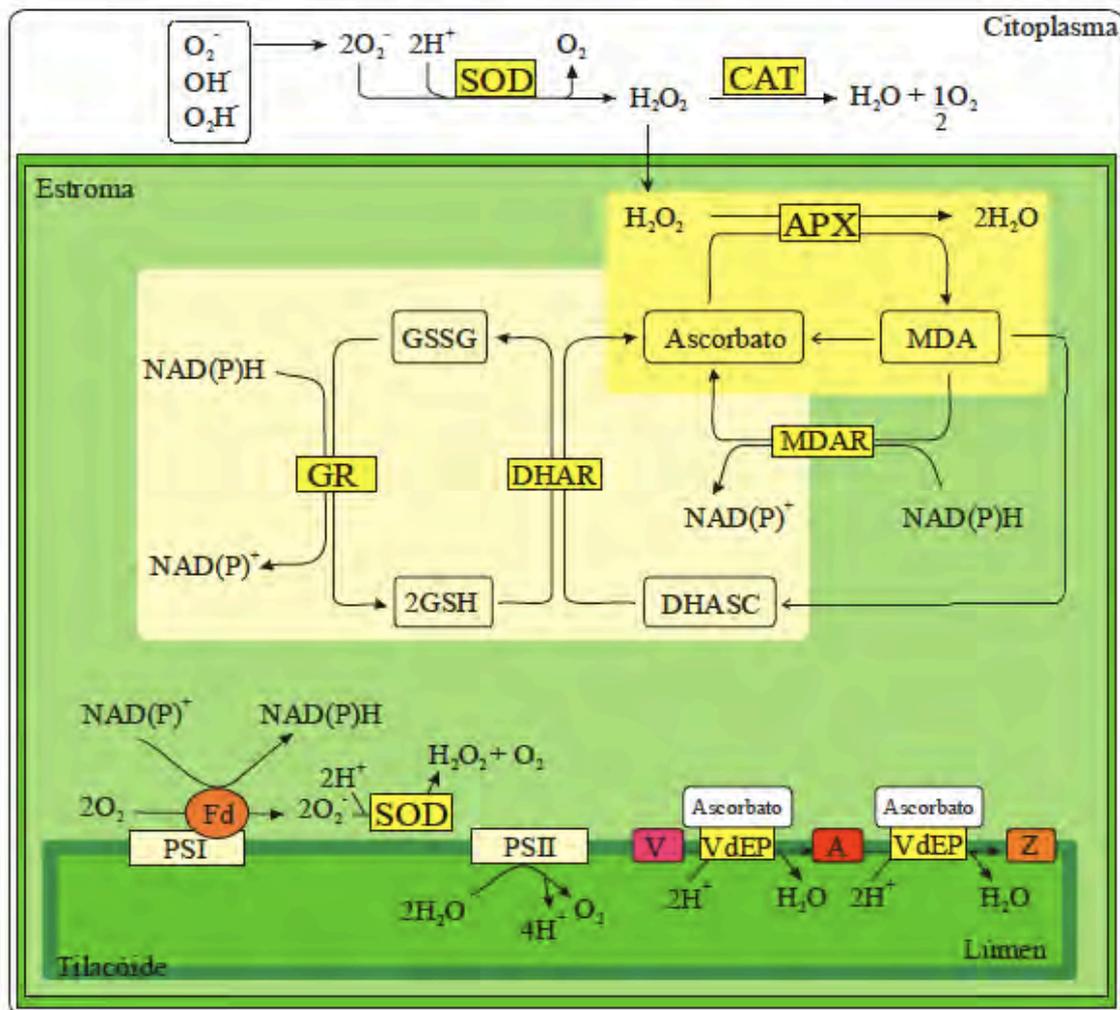


Figura 1.3. Sistemas de enzimas antioxidantes en el interior de una célula con la formación de  $O_2$  fotosintético. Las reacciones tienen lugar dentro de los cloroplastos (la región con el fondo verde) en la porción del estroma, en el interior del lumen tilacoide y también en la región citoplasmática. El ciclo ascorbato-glutación se indica con un fondo amarillo. SOD, superóxido dismutasa, APX, ascorbato peroxidasa, MDA, monodehidroascorbato; MDAR, reductasa monodehidroascorbato; DHASC, dehidroascorbato; Dhar, reductasa dehidroascorbato, GSSG, el glutatión oxidado, GSH, glutatión reducido, los recursos genéticos, glutatión reductasa, PSI, fotosistema I, Fd, ferredoxina; PSII, fotosistema II, V, violaxanthin; A, anteraxanthin; Z, zeaxantina, VdEP, violaxanthin de-epoxidasa (Bonomi, 2010).

que los valores en la relación glutatión:ascorbato de algas pardas del género *Fucus* fueron bajos en respuesta a la adaptación a una situación de limitación de N. Además se observó que el estrés oxidativo en dos especies de algas verdes (*Cladophora glomerata* y *Enteromorpha ahlnneriana*) aumentó el déficit de carbono cuando fueron expuestas a luz de alta intensidad y bajas temperaturas (Choo et al., 2004). Sin embargo, estas especies respondieron de manera diferente aumentando la tolerancia (con una mayor actividad CAT y APX) en el caso de *Cladophora glomerata* o siendo más vulnerable a los daños en el caso de *Enteromorpha ahlnneriana*. Esta segunda

especie también mostró una mayor liberación de  $H_2O_2$  al medio a bajas temperaturas, una estrategia que puede estar relacionada con la posibilidad de evitar la acción de los herbívoros o las especies epífitas (Choo et al., 2004).

El efecto de la radiación UV sobre los sistemas antioxidantes en macroalgas está relacionado directamente con la actividad enzimática (Aguilera et al., 2002). Estos autores encontraron mayor actividad de las enzimas antioxidantes en algas creciendo en las zonas supra- y mesolitoral en comparación con las características del infralitoral. Esta respuesta indica que las algas expuestas a condiciones de estrés tienen un sistema bioquímico de defensa más eficaz. Además, las algas verdes tuvieron mayor actividad de las enzimas antioxidantes y un mayor contenido de el ácido ascórbico que las especies de algas rojas o pardas (Aguilera et al., 2002). Aparte de los mecanismos enzimáticos mencionados, la célula vegetal dispone de un conjunto de sistemas no enzimáticos que permiten regular y contrarrestar la agresión oxidativa (Tabla I.3.). Estos compuestos neutralizan los radicales libres cediendo un electrón y dando lugar a la formación de especies no reactivas.

Para comprender mejor la actividad fisiológica de estos compuestos se debe tener en cuenta que la capacidad antioxidante de los extractos varía en función del grupo del compuesto estudiado y de su solubilidad en la fase acuosa o lipídica. A excepción de las sustancias purificadas, en muchos casos es difícil determinar qué compuestos son los responsables de la actividad antioxidante y en algunos casos ésta puede deberse a un sinergismo entre varios compuestos. Al analizar muchos de los trabajos publicados sobre actividad antioxidante en algas, se puede observar que en la mayoría se emplean extractos crudos. Por otra parte, en la composición química de las algas existen diferentes metabolitos que están relacionados en mayor o menor medida con sus propiedades antioxidantes. De esta manera se hace evidente, que cuando se analiza la actividad antioxidante de un extracto crudo, que pudiera ser explicada por la presencia de una o varias moléculas, a su vez pudiera existir un posible efecto cooperativo o sinérgico entre ellas. Este hecho explicaría los diferentes mecanismos antioxidantes observados para una determinada especie.

Le Tutour et al. (1998) estudiaron la actividad antioxidante y pro-oxidante de varias especies de algas pardas (*Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* y *Ascophyllum nodosum*) aplicando diferentes métodos *in vitro*, así como su contenido en alfa-tocoferoles, afirmando que la actividad antioxidante de los extractos estudiados no se debía sólo al contenido en alfa-tocoferoles, sino principalmente a la acción sinérgica de este compuesto con metabolitos aislados de estas especies. Los compuestos identificados con efecto sinérgico más potentes fueron los pigmentos no

polares, especialmente clorofila a y compuestos liposolubles. Estos resultados, sugieren el uso de los extractos crudos de estas especies sin el empleo de técnicas adicionales de purificación (Le Tutour *et al.* 1998). Otros trabajos, a pesar de no estudiar el efecto sinérgico de los metabolitos constituyentes de las algas, explican las propiedades antioxidantes por la presencia de varias moléculas en conjunto (Santoso *et al.*, 2004). Wang *et al.* (2008) atribuyen la actividad antioxidante de *Laminaria japonica*, al conjunto de compuestos polifenólicos, clorofila a, ácido ascórbico, así como a otras enzimas antioxidantes. Esto evidencia el carácter complejo y los diferentes mecanismos de la actividad antioxidante determinada.

En las algas, al igual que en las células de los vegetales vasculares terrestres, existen varios compuestos, tanto de naturaleza hidrosoluble como liposoluble, que cumplen esta propiedad (Tabla I.3.). Los compuestos liposolubles con actividad antioxidante más estudiados son los carotenoides, clorofila a, vitamina E y metabolitos secundarios como terpenoides y sus derivados. Entre los compuestos hidrosolubles más estudiados están los polifenoles, y son numerosos los trabajos que muestran la capacidad antioxidante de las macroalgas relacionado con el contenido en polifenoles (Zubia *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2001). Estos autores, atribuyen a la presencia de diferentes polifenoles las diferencias en la actividad antioxidante detectada en las especies estudiadas.

### **ANTIOXIDANTES DE NATURALEZA HIDROSOLUBLE**

**Compuestos fenólicos**, generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo, son capaces de sintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés, lo que se conoce como defensa química. Se ha destacado el importante papel fisiológico que juegan los polifenoles en las algas, principalmente en las pardas (Deslandes *et al.*, 2003; Connan *et al.*, 2006). Además de poseer diferentes actividades biológicas siendo su capacidad antioxidante la más importante (Prior *et al.* 1998), presentan una estabilidad mayor que la del ácido ascórbico (Miller y Rice-Evans, 1997). Se clasifican dependiendo de la estructura y clase de subcomponentes fenólicos, dependiendo del número y posición de grupos hidroxilo y la presencia de otros constituyentes. Estos compuestos fitofenólicos se han asociado con la acción antioxidante en sistemas biológicos actuando como captadores de radicales libres (Rice-Evans *et al.*, 1995; Jorgensen *et al.*, 1999).

La efectividad de su capacidad antioxidante va a depender de su estabilidad en los diferentes sistemas, así como también del número y localización de grupos hidroxilo. En muchos estudios *in vitro* los compuestos fenólicos han mostrado alta actividad antioxidante, incluso mayor que la presentada por vitaminas y carotenoides (Vinson et al., 1995, Re et al., 1999;). Muchos de estos trabajos han enfatizado el papel beneficioso de fenoles de plantas superiores en la salud humana y en la acción frente al cáncer (Setchell et al., 1981; Paganda et al., 1999).

Aunque ya se ha indicado que las algas, en general, son una fuente potencial de antioxidantes naturales (Pratt, 1992), diversos estudios han profundizado en el papel que juegan los compuestos fenólicos en relación a la actividad antioxidante (Foti et al., 1994). También se han realizado estudios que demuestran la capacidad de los compuestos fenólicos en el bloqueo de la radiación ultravioleta (UV), inductora de algunos procesos relacionados con la carcinogénesis (Huang y Farraro, 1992). Más concretamente, la actividad química de los polifenoles en términos de sus propiedades como donadores de hidrógeno o agentes donadores de electrones, predicen su potencial para actuar como captadores de radicales libres (antioxidantes) y su acción como antioxidante está relacionada no sólo con su estructura química sino también con su localización (Rice-Evans et al., 1997). Las macroalgas pertenecientes al grupo de algas pardas (Phaeophyta) presentan un alto contenido en compuestos polifenólicos o florotaninos (Ragan y Glombitza, 1986; Van Alstyne, 1988; Steinberg, 1992). La relación de sustancias fenólicas con moléculas de floroglucinol en las algas pardas, se mencionó por primera vez por Crato (1893). La mayoría de los metabolitos secundarios algales se han aislado de especies tropicales (Faulkner, 1992) y hasta los años 90 se consideraba que la producción de las defensas químicas respondía a una interesante pauta biogeográfica. Esta diversidad química concretamente en compuestos fenólicos, presumiblemente es un reflejo de la mayor actividad herbívora de los trópicos (Gaines y Lubchenco, 1982). Sin embargo estudios posteriores han demostrado que las concentraciones de compuestos fenólicos en algas pardas de latitudes templadas son sustancialmente superiores a las cuantificadas en especies similares de latitudes tropicales (Steinberg, 1992). Muchas algas pardas en Australia y Nueva Zelanda tienen 2 y 3 veces mayor contenido en compuestos fenólicos que especies similares del Pacífico Norte (Steinberg 1989, 1992). Estes y Steinberg (1988) sugirieron que estas diferencias entre las dos regiones están relacionadas con los diferentes perfiles de presión herbívora siendo mayor en el Pacífico Sur lo que permitió que las algas pardas desarrollaran altos contenidos en polifenoles.

Paralelamente (Targett et al., 1992) muestran que algas pardas tropicales de los órdenes Fucales y Dictyotales presentan niveles tan altos como los encontrados en zonas templadas. Las diferencias en el nivel de polifenoles en algas pardas a nivel mundial no se puede explicar únicamente por la variación latitudinal y la presión herbívora. A este respecto se ha demostrado que los polifenoles actúan con mayores actividades específicas que las sugeridas inicialmente (Hagerman y Butler, 1991; Ayres et al., 1997). Así, la reactividad de los polifenoles es afectada por el medio químico de los sistemas digestivos de los herbívoros (Hay y Steinberg 1992; Appel, 1993; Boettcher and Targett, 1993; Targett et al., 1995) y la variación espacio-temporal junto con otros parámetros (nutrientes, irradiancia, diferenciación en el talo) que afectan a los niveles de florotaninos (Arnold et al., 1995; Cronin y Hay, 1996; Peckol et al., 1996). En este último sentido, tratando de entender estas variaciones intraespecíficas, diferentes estudios han demostrado que un incremento de la radiación UV induce a cambios en la producción de polifenoles en el alga parda *Ascophyllum nodosum* (Pavia et al., 1997; Pavia et al., 1999; Pavia y Brock, 2000). Según estos resultados los florotaninos pueden actuar como pantalla frente a los efectos dañinos de la radiación UV. Incluso aunque la absorción máxima de los florotaninos sea a una longitud de onda entre 260 y 280 nm, menor que la radiación UV incidente. Abdala et al. (2003) demostraron que los polifenoles en el alga parda *Cystoseira tamariscifolia* presentan una variación estacional con valores máximos en los periodos de mayor radiación solar (primavera -verano), pero también presentan ciclos de variación diario con máximos en las horas centrales del día excepto en verano donde el contenido cae al mediodía como consecuencia de una mayor excreción al medio. La disponibilidad de nutrientes es otro factor ambiental al que se encuentran comúnmente sometidas las algas que influye en el contenido de florotaninos (Amsler y Fairhead, 2006).

**Ficobiliproteínas**, son los principales pigmentos accesorios captadores de la energía luminosa en algas rojas y cianobacterias. Se ha encontrado que c-ficocianina presenta actividad antioxidante con una marcada actividad antiinflamatoria y neuroprotectora (Romay et al., 2003). Es por esto que han despertado interés en relación a una posible utilización para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas causadas por el estrés oxidativo (Alzheimer, Parkinson), tratamiento de las úlceras gástricas y el cáncer de colon. La administración de

Tabla I.3. Tabla resumen de las defensas antioxidantes enzimáticas y compuestos antioxidantes de las algas, similares a las encontradas en los vegetales terrestres, aisladas a partir de extractos tanto lipofílicos como hidrofílicos (Le Tutour et al., 1998; Algorithme 52, 2000; Naguib, 2000).

SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN ALGAS			
		Proceso	Especie
ENZIMÁTICOS	<b>Superóxido dismutasa</b>	Produce la dismutación del superóxido y genera H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	<i>Fucus, Cystoseira, Sargassum, Ulva</i>
	<b>Catalasa</b>	Reduce el peróxido de hidrógeno a H <sub>2</sub> O y O <sub>2</sub> . Localizada principalmente en los peroxisomas.	<i>Porphyra sp, Scytosiphon lomentaria</i>
	<b>Glutación peroxidasa</b>	Cataliza la transformación de peróxidos orgánicos y de hidrógeno a expensas de la transformación de glutación reducido (GSH) en su forma oxidada (GSSG).	<i>Porphyra</i>
	<b>GSSG reductasa</b>	Regenera la forma reducida del glutación y los equivalentes de reducción los proporciona el NADPH.	<i>Porphyra</i>
	<b>Compuestos fenólicos</b>	Atrapan especies reactivas de oxígeno debido a su propiedad como donadores de electrones. La efectividad de su capacidad antioxidante va a depender del número y localización de grupos hidroxilo.	<i>Eisenia bicyclis, Fucus spiralis, Ascophyllum nodosum, Cystoseira tamariscifolia, Ecklonia kurome</i>
	<b>Clorofila y derivados</b>	Actúa como captador de radicales libres y tiene la capacidad de actuar sinérgicamente con el tocoferol	<i>Enteromorpha sp., Eisenia bicyclis</i>
	<b>Polisacáridos</b>	Muchos de ellos con grupos sulfatos con demostradas propiedades como atrapadores de radicales libres.	<i>Porphyra, Ulva, Ecklonia, Laminaria japonica</i>
NO ENZIMÁTICOS	<b>Fosfolípidos</b>	El principal agente antioxidante es el fosfatil inositol. Muestra efecto sinérgico junto a la vitamina E.	<i>Porphyra tenera, Eisenia bicyclis Fucus spp, Ascophyllum</i>
	<b>Ficobiliproteínas</b>	La bilina funciona como captador de radicales libres.	<i>Porphyra, Phormidium, Spirulina</i>
	<b>Vitamina C</b>	Reduce directamente radicales libres y genera el radical ascorbato, que desaparece vía transformación en ascorbato y deshidroascorbato.	<i>Fucus spp, Ascophyllum, Chondrus crispus</i>
	<b>Vitamina E</b>	Secuestra radicales peróxido, lo que impide la reacción de propagación, oxidándose a radical α-tocoferilo y finalmente, a la forma quinónica	<i>Fucus spp, Ascophyllum nodosum, Laminaria digitata, Palmaria palmata</i>
	<b>Carotenoides</b>	Interacciona con especies excitadas y exhibe una buena actividad bloqueante de radicales a bajas presiones de O <sub>2</sub>	<i>Cystoseira abies-marina, Laminaria digitata, Chondrus crispus</i>
	<b>Micosporinas</b>	La capacidad de actuar como captador de radicales libres	<i>Porphyra</i>
	<b>Glutación</b>	El balance GSH/GSSG influye en el funcionamiento del sistema GSH peroxidasa/GSSG reductasa	<i>Ulva fastiata Enteromorpha spp</i>

ficoeritrina en ratas diabéticas aumento la situación general antioxidante por el

aumento de bilirrubina, superóxido dismutasa, catalasa, las concentraciones de glutatión peroxidada y los antioxidantes no enzimáticos del sistema (Soni et al., 2009). Recientemente un nuevo trabajo ha sugerido que la proteína de ficoeritrina es fácilmente digerida para liberar el compuesto ficoeritrobilina durante el proceso de la digestión gastrointestinal en mamíferos, el cual mostró la capacidad de captación de radicales peróxidos, concluyendo que diversas actividades terapéuticas de la ficoeritrina parecen estar asociados con el compuesto ficoeritrobilina (Yabuta et al., 2010).

**Amino ácidos tipo micosporina (MAAs)**, diversos estudios sugieren una función fotoprotectora para los MAAs ya que poseen alta capacidad de absorción de la radiación UV y capacidad de actuar como antioxidante (Dunlap & Yamamoto, 1995; Nakayama, 1999; de la Coba et al., 2009) aunque son muchas las funciones que se les ha atribuido a este tipo de metabolitos como osmolito orgánico (Portwich y García-Pichel, 1999), precursor de algunos pigmentos (Price y Forrest, 1969; Shibata, 1969), papel reproductor en algunos organismos, etc. El papel fotoprotector frente a la radiación UV es el más aceptado y el más documentado (Wood, 1989; García-Pichel et al 1993; Post y Larkum, 1993; Lesser, 1996; Neale et al., 1998; Sinha et al., 2000; Misonou et al., 2003), especialmente por su capacidad para absorber longitudes de onda corta unido a su alta fotoestabilidad tanto *in vivo* (Adams y Shick, 2001) como *in vitro* (Conde et al., 2000, 2004). Algunos autores también han descrito el papel antioxidante de la micosporina-glicina en ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica (Dunlap y Yamamoto, 1995; Nakayama et al., 1999) y como secuestrador de radicales  $^1O_2$  generados bajo la acción de ciertos fotosensibilizadores (Suh et al., 2003). En la actualidad la actividad antioxidante de las imino-MAAs está escasamente investigada y, los pocos trabajos que existen, valoran la capacidad antioxidante de los extractos algales (Dunlap y Yamamoto, 1995; De la Coba et al., 2009) o de una mezcla de MAAs (Kim et al., 2001). La capacidad antioxidante en medio acuoso o lipídico de imino-MAAs como tales, es decir, purificadas o aisladas en un alto grado de pureza no se conoce, al igual que tampoco su comportamiento a nivel de secuestro de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno.

**Polisacáridos**, las algas marinas tienen un alto contenido de polisacáridos, muchos de ellos con grupos sulfatos con demostradas propiedades como atrapadores de radicales libres y antioxidantes para la prevención del daño oxidativo en organismos vivos (Qi et al., 2005). Las algas rojas se caracterizan por tener principalmente

galactanos: agar y carragenatos (Painter, 1983; Craigie, 1990). El agar es un biopolímero con una amplia variedad de aplicaciones en los alimentos, la biotecnología y la medicina, principalmente como agente gelificante (Usov *et al.*, 2002). El agar químicamente está constituido por fracciones polisacáridas de agarosa y la agarpectina. La agarosa es el componente principal del mismo, presenta alrededor del 70% del total. Tanto la agarosa como la agarpectina tienen la misma estructura básica constituida por unidades alternas de galactosa y 3,6-anhidrogactosa, ambas en forma piranosa. Las unidades se enlazan por uniones  $\alpha$ L(1→3) y  $\beta$ D (1→4), también en forma alternada (Araki, 1966). La heterogeneidad en esta estructura proviene de la sustitución con sulfato de hemiesteres, ésteres de metilo y cetales piruvato en varias posiciones. A diferencia de la agarosa, la agarpectina posee un alto contenido en sulfato y piruvato (Lahaye *et al.*, 1985; Armisen y Galatas, 1987). La variación en posición y el grado de influencia de sustitución con grupos sulfato produce geles de menor fuerza, es decir, geles más suaves. Las algas pertenecientes a los órdenes Gracilariales (*Gracilaria*, *Gracilariopsis* y *Hydropuntia*) y *Gelidiales* (*Gelidium*, *Pterocladia* y *Gelidiella*) son un claro ejemplo de productoras de agar, tal y como lo demuestra la industria de hidrocoloides creada en países como EEUU y Chile, donde se comercializa principalmente como materia prima para la producción como agente gelificante (McHugh, 1991; Armisen, 1995). Las algas pertenecientes al orden Gigartinales (*Gigartina*, *Kappaphycus*, *Euchema* e *Hypnea*) se caracterizan por contener principalmente carragenatos. Estos constituyen toda una familia química de polisacáridos complejos derivados de la galactosa, los cuales presentan un esqueleto lineal de unidades alternantes de  $\beta$ -D-galactopiranosas unido glicosídicamente a través de las posiciones 1 y 3 y uno de  $\alpha$ -D-galactopiranosas unido a través de las posiciones 1 y 4 (Painter, 1983). Estos polímeros presentan al contrario que otros ficocoloides un alto contenido en sales y sulfatos. Se clasifican en familias de acuerdo al grado y patrón de sulfatación de las unidades de galactosa. La familia *kappa*- se caracteriza por la gran cantidad de grupos sulfatos (20-24% frente al 4-6% del agar). Algunas algas rojas contienen polisacáridos estructuralmente híbridos (Bellion *et al.*, 1981; Correa-Díaz *et al.*, 1990). Un ejemplo es el de las algas *Corallina pilulifera* y *Georgiella confluens* de donde se han obtenido xilogalactanos denominados agaranos (Usov *et al.*, 1997; Kolender y Matulewicz, 2002). Diferentes autores han demostrado que los polisacáridos sulfatados de las algas, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria japonica* y *Porphyra haitanensis* entre otros, presentan una fuerte actividad antioxidante, que se atribuye a su capacidad atrapadora de ERO (Hu *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2001).

## ANTIOXIDANTES DE NATURALEZA LIPOSOLUBLE

**Carotenoides**, existen más de seiscientos tipos de carotenoides, de los cuales cerca de 50 son precursores de la vitamina A o retinol. Los carotenoides se dividen en dos grupos: los carotenos y las xantofilas. Los carotenos como el  $\alpha$  o  $\beta$ -carotenos o el licopeno contienen solo átomos de carbono e hidrógeno, mientras que las xantofilas como la luteína tienen al menos un átomo de oxígeno en su estructura. Los carotenoides y en particular los 4-oxo derivados tales como la astaxantina son los responsables de actuar como neutralizadores de radicales libres y de otras especies reactivas del oxígeno (Olmedilla et al. 2001). Son eficientes antioxidantes contra el oxígeno singlete y los radicales peróxido, contribuyendo de este modo al sistema de defensa lipofílico de los organismos. La especie *Laurencia obtusa* (Orden Ceramiales) posee un contenido en carotenos que la hacen una fuente importante de antioxidantes, al igual la microalga verde *Dunaliella salina*. Esta microalga, en condiciones de alta irradiación y alta salinidad, produce importantes cantidades de  $\beta$ -caroteno, pigmento que le da la característica coloración rojiza y que tiene un alto poder antioxidante. Sin embargo, la astaxantina producida por otra microalga verde, *Haematococcus pluvialis*, posee una actividad antioxidante diez veces superior a la del  $\beta$ -caroteno producido por *Dunaliella salina*. La astaxantina protege contra los efectos de los rayos UV, generación de manchas en la piel y cánceres quimioinducidos entre otros (Tanaka, 1994).

**Clorofila y sus derivados**, contenidos en la fracción de los lípidos neutros son capaces de actuar como antioxidantes en oscuridad, aunque a la luz participan en la fotosíntesis (Endo et al., 1985). La feofitina a y la pirofeofitina a han sido identificados como responsables de la actividad antioxidante del alga verde *Enteromorpha* y del alga parda *Eisenia bicyclis*, respectivamente (Nishibori y Namiki, 1988). Estos compuestos muestran un efecto sinérgico con la vitamina E.

### 1.3.2. METODOLOGÍA PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para analizar los antioxidantes presentes en cualquier material vegetal, se utilizan gran diversidad de metodologías. Las características esenciales de cualquier prueba de

evaluación de capacidad antioxidante son: un sustrato adecuado con el cual pueda ser determinada la inhibición de la oxidación, un indicador de oxidación (radical libre) y una adecuada medición del punto final del proceso de oxidación, que puede llevarse a cabo por métodos químicos, instrumentales o sensoriales (Arnao et al., 1999; Robards et al 1999). Actualmente existen diversos métodos para evaluar actividad antioxidante (Cintra et al., 2001) ya sean *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto o extracto, consiste en determinar la actividad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical mediante la pérdida de color que ocurre de forma proporcional con la concentración (Arena et al., 2001). No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. Estos métodos deben ser rápidos, reproducibles y requerir pequeñas cantidades de compuestos químicos por analizar, además de no estar influenciados por las propiedades físicas de estos compuestos (Marco, 1968).

Uno de los métodos más frecuentes utilizados para la evaluación de la actividad antioxidante es el método DPPH basado en la capacidad del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) para reaccionar con donadores de Hidrógeno. El radical DPPH tiene un máximo de absorbancia a 517 nm y genera un producto incoloro cuando captura un antioxidante. De esta forma, se mide la disminución de la absorbancia de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidantes con grupos OH activos donadores de H capaces de capturar radicales libres. El método se ha aplicado a la determinación de la actividad antiradicalaria en diversos trabajos de microalgas y macroalgas (Matsukawa et al., 1998; Zubia et al., 2007) así como en plantas terrestres y alimentos como frutas, hortalizas, vinos (Cano et al., 1998) entre otros.

Un ensayo ampliamente utilizado es el de la ferrilmioglobina/ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (Miller et al., 1993). En este método, el producto de oxidación del ABTS, el catión-radical de larga vida  $ABTS^{\cdot+}$ , se presenta como un herramienta válida para determinar la actividad antioxidante de antioxidantes donadores de hidrógeno (capturadores de radicales en fase acuosa) y antioxidantes rompedores de cadena (capturadores de radicales peróxido lipídicos). El radical  $ABTS^{\cdot+}$  se genera mediante la interacción del ABTS con la especie radicalaria ferrilmioglobina, generada por la activación de la metmioglobina en presencia de peróxido de hidrógeno. En este método, se mide el tiempo que tarda el radical ABTS en ser oxidado hasta el radical estable  $ABTS^{\cdot+}$  en presencia de compuestos antioxidantes

como los polifenoles que retarden dicha oxidación o bien disminuyan la absorbancia de la disolución por captura del radical. La absorbancia se mide a 734 nm , longitud de onda en la que el radical coloreado presenta su máximo. Otros métodos igualmente empleados para medir la actividad antioxidante son el ensayo FRAP (Ferric reducing antioxidant power) (Benzie y Strain, 1996) el cual mide la capacidad de reducción de la sustancia testada. El color resultante de la reacción se mide a 593 nm. El método de decoloración del beta-caroteno (Velioglu et al., 1998) también es ampliamente utilizado para medir actividad antioxidante en sustancias lipofílicas. La técnica se fundamenta en la capacidad de diversos extractos de disminuir la decoloración oxidativa del betacaroteno en una emulsión ácida de betacaroteno/linoleico. Así como el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Cao et al., 1997) y el método de atrapamiento de aniones superóxido (Marklund y Marklund, 1974). Este último se basa en la inhibición de la reducción de un compuesto coloreado (normalmente una sal de tetrazoilo) por el radical superóxido. En general, cabe mencionar que la capacidad antioxidante de un extracto no viene dada sólo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en el que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre si pudiendo ocurrir efectos sinérgicos o inhibitorios (Prior et al., 2005).

### **1.4.CULTIVO DE MACROALGAS EN SISTEMAS INTENSIVOS. BIOFILTRACIÓN DE AGUAS RESIDUALES**

#### **1.4.1. GENERALIDADES DE LOS SISTEMAS DE CULTIVO DE MACROALGAS**

El uso de macroalgas como fuente de sustancias antioxidantes para la industria exige contar con biomasa de una forma sostenible. La recolección a partir de poblaciones naturales ha sido hasta el momento la fuente principal de biomasa, principalmente con algas pardas y rojas, empleadas de forma importante en la industria de los ficocoloides (*Laminaria sp.*, *Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Gelidium* y *Pterocladia*, entre otras). Las nuevas fuentes de biomasa proceden en los últimos años del desarrollo de los sistemas de cultivo de algas tanto en el mar como en sistemas de cultivo en tierra firme. Entre otros objetivos, estos sistemas de cultivo han sido propuestos como sistemas eficaces para reducir los problemas de eutrofización causados directamente por la acuicultura animal (Chopin et al., 2001; van Rijn, 1995).

El término *maricultura*, aplicado a macroalgas, define la acción de cultivar macroalgas en ambientes artificiales, principalmente en tierra y enriquecidos por la

adición de nutrientes, con el objetivo de incrementar la producción de biomasa por unidad de área bajo condiciones controladas o semicontroladas (Chapman y Chapman 1980). Los sistemas de cultivos desarrollados con este objetivo son relativamente recientes, y fueron iniciados por diversos grupos de investigación en Canadá (Neish et al., 1977) y en los Estados Unidos (Ryther et al., 1978). En función de la densidad, los sistemas de cultivo se clasifican en *extensivos*, establecidos sobre grandes superficies con densidades de biomasa reducidas, e *intensivos*, donde en recipientes de capacidad reducida (fotobiorreactores, tanques o "raceways") se cultivan macroalgas a altas densidades. En función de la fuente de irradiación los sistemas se clasifican en sistemas "*outdoor*" o *exteriores*, con irradiación natural directa, e "*indoor*" o *interiores*, generalmente instalados en cámaras de cultivo con irradiación artificial. La gran mayoría de los sistemas intensivos, instalados en zonas costeras, requieren de sistemas de bombeo de agua de mar. En función del aporte de agua a la unidad de cultivo los sistemas se clasifican en *abiertos*, con renovación constante de agua, y *semi-cerrados*, que precisan de recambios periódicos de agua, aprovechándose dichos cambios para el enriquecimiento del medio con nutrientes. La cantidad de nutrientes que se aportan al medio es uno de los principales factores a considerar en el desarrollo de estos sistemas. Además del carbono inorgánico, aportado principalmente por los sistemas de aireación, es necesaria la adición de nitrógeno y fósforo, que son los elementos limitantes más importantes y esenciales para satisfacer los requerimientos fisiológicos de las algas (Lobban et al., 1985). La eficiencia de estos sistemas se basa en los aspectos técnicos de diseño y operación (Bidwell et al., 1985), además de la elección de la especie que por sus características biológicas se adapte mejor a los sistemas y que por su importancia económica haga rentable su producción.

#### **1.4.2. ACUICULTURA INTEGRADA: SISTEMAS DE CULTIVO MULTITRÓFICOS (IMTA)**

La liberación de nutrientes al medio, procedentes de los restos de pienso no consumido y excreciones, derivados de las actividades de la acuicultura supone uno de los principales inconvenientes para lograr la sostenibilidad medioambiental de esta industria. En las actividades acuícolas intensivas y semi-intensivas tan sólo el 30% del alimento suministrado es retenido en forma de biomasa por las especies cultivadas, por lo que el 70% restante es descargado al medio en las aguas residuales, bien como materia particulada, bien de forma disuelta sobretudo en forma de N-amonio ( $\text{N-NH}_4^+$ )

y P-fosfatos ( $P-PO_3^{2-}$ ) (Porter et al., 1987; Troell et al., 1999; Neori y Shpigel, 1999; Neori et al., 2000; Schuenhoff et al., 2003).

Esta descarga de nutrientes ocasiona un gran impacto sobre el medio acuático favoreciendo los procesos de eutrofización en zonas costeras (Ackefors y Enell, 1990) por la elevada carga de nitrógeno, fósforo y materia orgánica de los efluentes (Chopin et al., 2001; Troell et al., 2003; Neori et al., 2004). La Directiva Marco de Aguas (Directiva 2000/60/CE) restringe los límites permitidos para la concentración de nutrientes en la descarga de efluentes procedentes de la Acuicultura por lo que se hace necesaria la búsqueda de alternativas sostenibles que disminuyan los impactos de las actividades acuícolas sobre el medio ambiente y en concreto sobre los ecosistemas marinos receptores de los efluentes. De forma común se establece la práctica *“la dilución es la solución”* siendo el vertido al medio de aguas no tratadas de forma frecuente más la regla que la excepción (Troell et al., 2003). La conversión, y no la dilución, es una de las soluciones que se plantea en los denominados sistemas integrados multitróficos (Figura I.4). El desarrollo y diseño de estos sistemas IMTA se basa en principios ecológicos para conseguir la máxima efectividad en términos de flujo de materia y energía (Troell et al., 1999), ya que los residuos generados por una de las unidades, p.e. los tanques de peces o crustáceos, sirven como fuente de alimento y nutrientes para otros niveles de la cadena trófica (Tabla I.4). La finalidad es conseguir tasas de reciclaje y biofiltración de nutrientes que reducen considerablemente el impacto medioambiental al tiempo que incrementan la producción de diferentes cultivos con posible interés comercial (Shpigel et al., 1999). La utilización de macroalgas en estos sistemas supone la mejora considerable de la calidad de los efluentes en cuanto a materia inorgánica disuelta se refiere, ya que durante las horas de luz, a través de su metabolismo, se consumen amonio (fundamentalmente para la síntesis de proteínas) y  $CO_2$ , se produce  $O_2$  y se eleva el pH del medio. El amonio constituye la fracción más importante del nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en los efluentes de piscifactorías (aproximadamente el 90% del NID), pudiendo alcanzar concentraciones superiores a  $450 \mu M$  (Neori et al., 1998). El nitrógeno inorgánico procedente de efluentes de piscifactorías puede ser asimilado eficientemente por diferentes especies de macroalgas. Los primeros trabajos que describen la posibilidad de utilizar macroalgas marinas para la depuración de efluentes de piscifactorías se publicaron al final de la década de los años setenta (De Boer & Ryther, 1977; Fralick, 1979). En estos estudios se demostró que algas de los géneros *Gracilaria* y *Ulva* mostraban altas capacidades de biofiltración (Harlin et al., 1979).

Así el alga verde *Ulva rigida* puede filtrar hasta el 90% del  $\text{NH}_4^+$  a flujos de  $2 \text{ g N m}^{-2} \text{ día}^{-1}$  y un 60-70% a flujos de  $8 \text{ g N m}^{-2} \text{ día}^{-1}$  (Cohen y Neori, 1991). En estudios más recientes otros géneros de macroalgas (*Gracilariopsis*, *Palmaria*, *Hypnea*, *Chondrus*, *Porphyra*, *Kappaphycus* y *Laminaria*) cultivados en los sistemas de policultivo han demostrado ser biofiltros eficientes de los efluentes ricos en nutrientes y bajo diferentes condiciones y factores (Troell et al., 2003). Neori et al. (1996) describieron un sistema integrado con recirculación de agua entre un cultivo de peces y algas con resultados óptimos en la depuración de nitrógeno y fósforo. Especies de algas rojas como *Gracilaria cornea* e *Hypnea spinella*, cultivadas de forma sostenible durante periodos superiores a dos años muestran alta capacidad de biofiltración de amonio superior al 50-70 % (Gómez Pinchetti et al., 2002).

En trabajos recientes (Gómez-Pinchetti et al., 2002), de un screening realizado entre un total de 17 especies de macroalgas rojas (Rhodophytas) y verdes (Chlorophytas) se obtuvieron resultados positivos en cuanto a adaptación al sistema de cultivo, producción, crecimiento y biofiltración con especies de algas rojas de morfologías similares a *Gracilaria* e *Hypnea*, resultados similares a los obtenidos previamente en algas verdes del género *Ulva* (Jiménez del Río et al., 1995, 1996).

## Introducción

Tabla I.4. Revisión de sistemas de policultivo integrados descritos en la literatura reciente, incluyendo los resultados más significativos en cuanto a biofiltración (NUE).

<b>Especies Macroalga – Animal</b>	<b>Sistema</b>	<b>NUE (%)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Gracilaria chilensis</i> – <i>Isacia conteptionis</i> ; <i>Crassostrea gigas</i> ; <i>Loxechinus albus</i>	Tanques	Altos niveles de biofiltración	Chow et al., 2001
<i>Gracilaria edulis</i> – <i>Penaeus japonicus</i> ; <i>Saccostrea commercialis</i>	Tanques escala laboratorio	2-76	Jones et al., 2001
<i>Gracilaria edulis</i> - <i>Penaeus japonicus</i> ; <i>Saccostrea commercialis</i>	Raceways con recirculación	Problemas sedimentación	Jones et al., 2002
<i>Ulva rotundata</i> ; <i>Enteromorpha intestinalis</i> ; <i>Gracilaria gracilis</i> – <i>Dicentrarchus labrax</i>	Tanques	Altas tasas de asimilación de amonio	Hernández et al., 2002
<i>Gracilaria parvispora</i> – <i>Chanos chanos</i>	Tanques	Alta producción	Nagler et al., 2003
<i>Ulva lactuca</i> – Abalone; seabream	Tanques outdoor en cascada / recirculación parcial	Alta producción / alta biofiltración	Neori et al., 2003
<i>Ulva rigida</i> – <i>Dicentrarchus labrax</i> ; <i>Sparus aurata</i>	Tanques – Laguna	Biofiltración baja; crecimiento estacional	Porrello et al., 2003
<i>Ulva lactuca</i> – <i>Haliotis discus</i> ; <i>Paracentrotus lividus</i> ; <i>Sparus aurata</i>	Tanques outdoor en cascada / recirculación parcial	Alta producción / alta biofiltración / alta estabilidad del sistema	Schuenhoff et al., 2003
<i>Palmaria mollis</i> – <i>Haliotis discus hannai</i>	Tanques – co-cultivo	Alta biofiltración – alto crecimiento	Demetropoulos y Langdon, 2004b
<i>Ulva rigida</i> – No indicado	En laboratorio / flujo continuo	Alta biofiltración	Bartoli et al., 2005
<i>Porphyra</i> spp. – Virtual	Matraces escala laboratorio	Alta biofiltración en efluentes moderados	Carmona et al., 2006

<i>Chondrus crispus; Gracilaria bursa pastoris; Palmaria palmata – Dicentrarchus labrax; Scophthalmus maximus</i>	Tanques outdoor; cascada	Alta biofiltración y crecimiento estacional	Matos et al., 2006
<i>Kappaphysuc alvarezii – Litopenaeus vannamei</i>	Co-cultivo en jaulas flotantes	Crecimiento normal	Lombardi et al., 2006
<i>Gracilaria sp.; Rizhopora sp. (mangle) – Crassostrea iredalei; langostino</i>	Estanques	Alta biofiltración	Shimoda et al., 2006
<i>Ulva pertusa - Apostichopus japonicus</i>	Sistema a escala comercial de recirculación en flujo discontinuo	Efectividad de eliminación de nitrógeno >60 %	Wang et al., 2007
<i>Ulva pertusa - Pagrus major</i>	Sistema de poli-cultivo integrado	Peces con mejor color	Hirata et al., 2007
<i>Kappaphycus spp. – Chanos chanos</i>	Acuarios	Biofiltración media	Rodrigueza y Montaña, 2007
<i>Codium fragile – Virtual</i>	Escala laboratorio	Alta biofiltración; estacional	Kang et al., 2008
<i>Kappaphycus alvarezii – Trachinotus carolinus</i>	Tanques con recirculación	Alta biofiltración; baja tasa de crecimiento	Hayashi et al., 2008
<i>Ulva lactuca - Haliotis midae</i>	Sistema de recirculación	Optimizar tasa de recirculación	Robertson-Andersson et al., 2008
<i>Porphyra yezoensis – No indicado</i>	Redes en mar abierto	Alta biofiltración y producción	He et al., 2008
<i>Macrocystis; Gracilaria – Salmón</i>	Lineas; mar abierto	Alta biofiltración; alto crecimiento	Buschmann et al., 2008
<i>Ulva clathrata – No indicado</i>	A escala piloto; flujo de agua (continuo y estacionario)	Buena candidata; ciclo vital corto	Copertino, 2009
<i>Gracilaria caudata - Litopenaeus vabbamei</i>	Laguna, cajas y redes	Biofiltración media; crecimiento bajo	Marinho-Soriano et al., 2009

## Introducción

---

<i>Gracilaria lemaneiformis</i> - <i>Chlamys farreri</i>	Sistema de acuicultura multi-trófica integrada	Biofiltración y producción de biomasa	Mao et al., 2009
<i>Asparagopsis armata</i> ; <i>Ulva rigida</i> – No indicado	Tanques	Alta biofiltración amonio; altas producciones	Mata et al., 2010
<i>Ulva clathrata</i> – <i>Litopenaeus vabbamei</i>	Tanques outdoor – co-cultivo	Beneficio crecimiento langostinos	Cruz-Suárez et al., 2010
<i>Gracilaria</i> ; <i>Laminaria</i> - <i>Lateolabra japonicus</i> ; <i>Pseudosciaena crocea</i>	Jaulas flotantes	Estrategia biorremediación	Jiang et al., 2010

---

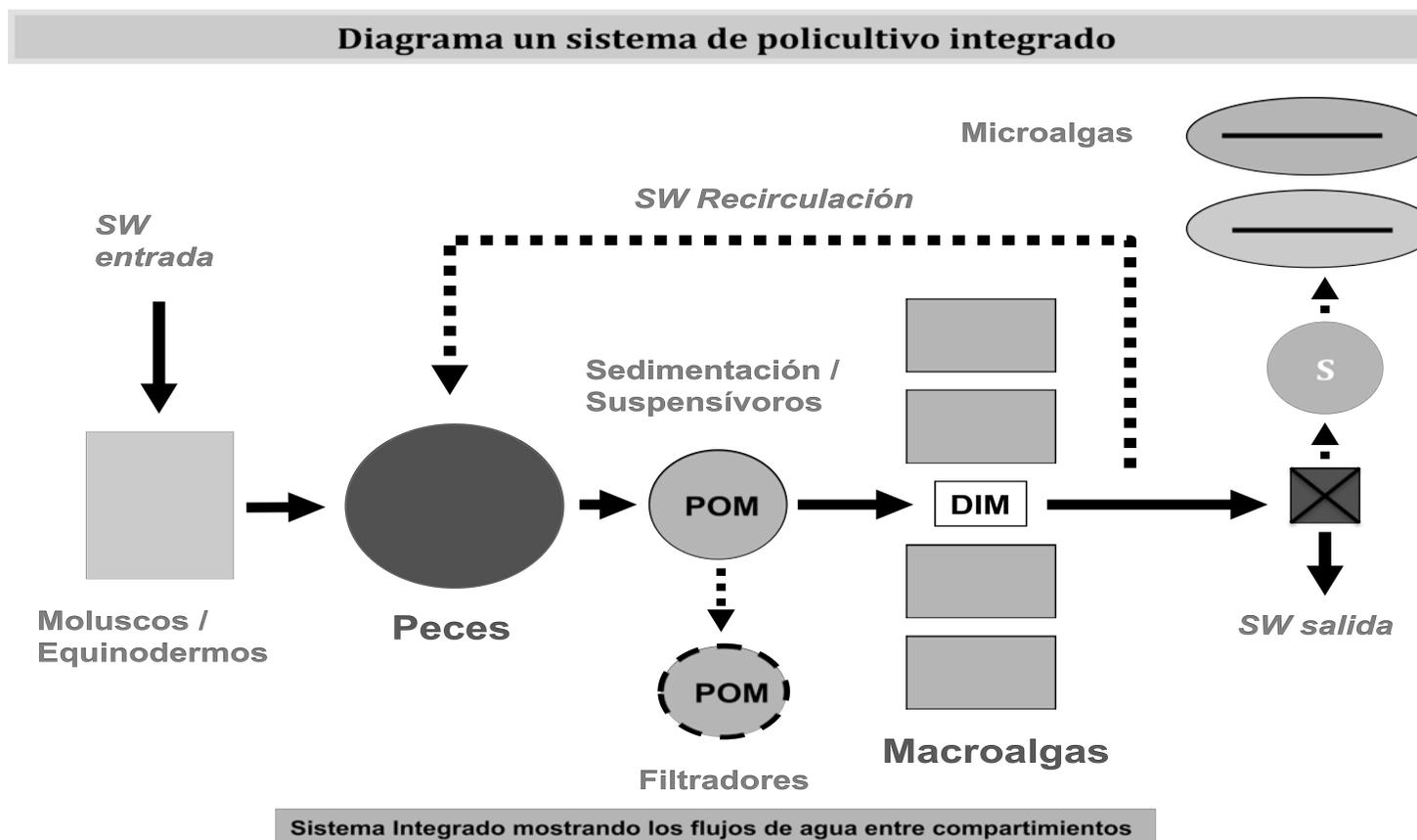


Figura I.4. Esquema general de un sistema integrado a escala piloto en el que se incluyen diferentes niveles tróficos 1. Bomba que impulsa el agua de mar. 2 y 3. Tanques de peces. 4. Flujo entrada en los tanques de macroalgas. 5. Invernadero 1. 6. Invernadero 2. SW entrada: entrada de agua de mar, SW salida: salida de agua de mar, S: sedimentación POM: materia orgánica particulada, DIM: materia inorgánica disuelta.

### 1.4.3. VALORACIÓN Y APLICACIONES DE LA BIOMASA OBTENIDA EN SISTEMAS IMTA

Se han propuesto diversas aplicaciones para la biomasa de macroalgas (Tabla I.5) producida en sistemas de acuicultura integrada tales como su uso para alimento de peces, la preparación de biofertilizantes de uso agrícola o la obtención de sustancias de interés comercial (Schramm, 1991a, 1991b ; Neori et al., 1998, 2000, 2004) como biliproteínas, utilizadas como marcadores de fluorescencia (Luiten et al., 2003), polisacáridos, de aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica (Indergaard y Østgaard, 1991) o los amino ácidos tipo micoporina (MAAs), de gran interés debido a sus propiedades fotoprotectoras y antioxidantes (Figueroa et al., 2008).

Tabla I.5. Revisión de las diferentes aplicaciones de la biomasa de algas producida en sistemas de acuicultura integrada.

Macroalga cultivada en biofiltro	Aplicación biomasa algas	Referencia
<i>Gracilaria chilensis</i>	Valoración agar	Chow et al., 2001
<i>Ulva lactuca</i>	Alimento abalón y erizo	Schuenhoff et al., 2003
<i>Palmaria mollis</i>	Alimento abalón	Demetropoulos y Langdon, 2004b
<i>Chondrus crispus; Gracilaria bursa pastoris; Palmaria palmata</i>	Adición piensos	Matos et al., 2006
<i>Ulva pertusa</i>	Alimento para los adultos de erizo	Wang et al., 2007
<i>Ulva pertusa</i>	Procesada para alimento de peces	Hirata et al., 2007
<i>Kappaphycus spp.</i>	Valoración carragenato	Rodrigueza y Montaña, 2007
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Valoración carragenato	Hayashi et al., 2008
<i>Ulva lactuca</i>	Alimento abalón	Robertson-Andersson et al., 2008
<i>Macrocystis; Gracilaria</i>	Alimento abalón	Buschmann et al., 2008
<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	Uso no especificado; valoración de agar	Mao et al., 2009
<i>Gracilaria; Laminaria</i>	Biorremediación	Jiang et al., 2010

## Introducción

---

Teniendo en cuenta que en los últimos años, algunos de los proyectos de investigación desarrollados en el Centro de Biotecnología Marina (ULPGC), en colaboración con el Grupo de Fotobiología (UMA), han estado orientados al efecto que la dinámica del aporte de nutrientes (principalmente N-amonio y P-fosfato y su relación con el metabolismo del carbono) y otros parámetros tienen sobre la biomasa cultivada de forma intensiva y algunos de sus productos, p.e. polisacáridos o aminoácidos tipo micosporina (MAA's); la valoración de lípidos y sus componentes (p.e. triglicéridos y ácidos grasos) y la posibilidad de su modificación a través de los cambios en las condiciones de cultivo, fueron considerados como un objetivo interesante a la hora de plantear el presente trabajo.

### 1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Ackefors, H. and Enell, M. 1990. Discharge of nutrients from Swedish fish farming to adjacent sea areas. *Ambio* 19(1): 28–35.
- Adams, N.L. and Shick J.M. 2001. Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology* 138: 267-280.
- Aguilera, J., Bischof, K., Karsten, U., Hanelt, D. 2002. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence Systems against high light stress. *Marine Biology* 140: 1087–1095.
- Amsler, C.D. and Fairhead V.A. 2006. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances. Botanical Research* 43: 1-91.
- Anggadiredja, J., Andyani, R., and Hayati, M. 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtuse* (Rhodophyta) from Seribu Islands. *J. Appl. Phycol* 9: 477-479.
- Ahn MJ, Yoon KD, Kim CY. 2002. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and antiviral activity of Korean seaweed extracts. *J Appl Phycol* 14: 325 – 329.
- Appel, H.M. 1993. Phenolics in ecological interactions - the importance of oxidation. *J Chem. Ecol.* 19: 1521-1552.
- Araki, C. 1966. Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 5: 3–17.
- Arena, E.; Fallico, B.; Maccarone, E. 2001. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.*, 74, 423-427.
- Armisen, R. 1995. World-wide use and importance of Gracilaria. *Journal of Applied Phycology* 7: 231-243
- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M., 1999. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Res.* 31:589-596.
- Arnold, E., Leinen, M., King, J., 1995. Paleoenvironmental variation based on the mineralogy and rock-magnetic properties of sediments from sites 885 and 886. In: Rea, D.K., Basov, I.A., Scholl, D.W., Allan, J.F. Eds.(1995). *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, 145: College Station, TX (Ocean Drilling Program), 231–245 p.
- Aruoma, O.I., Deiana, M., Jenner, A., Halliwell, B., Harpakash, K., Banni, S., Corongiu, F.P., Dessi, M.A., Aeschbach, R. 1998. Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46: 5181-5187
- Aruoma, O.I., Bahorun, T., Jen L.S. 2003. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutat. Res.* 23(544): 203-215.
- Ayres, M., Barthem, R., Lima-Ayres D., Albernaz A., da Silveira, R., Santos, R. y Queiroz, H. 1997. Mamirauá: un proyecto de preservación de la biodiversidad de la varzea amazónica, pp. 55-64. En: Fang, Bodmer. T.R., Aquino, R. y Valqui, M (eds). *Manejo de fauna silvestre en la amazonia*. La Paz, Bolivia: UNAP, University of Florida, UNDP/GEF, Instituto de Ecología,

## Introducción

---

- Ballantine, D.L., Gerwick, W.H., Velez, S.M., Alexander, E., Guevara, P. 1987. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia*, 151/152: 463-469.
- Barreto, M., Meyer, J.J.M. (2006). Isolation and antimicrobial activity of a lanosol derivative from *Osmundaria serrata* (Rhodophyta) and a visual exploration of its biofilm covering. *S. Afr. J. Bot.* 72: 521–528.
- Bartoli, M., Nizzoli, D., Vezzulli, L., Naldi, M., Viaroli, P. and Fabiano, M. 2005. *Ulva* harvesting in a phytotreatment pond: implication for dissolved oxygen and nutrients net daily balances. *Hydrobiol.* 550,199-209.
- Bellion, C., Hamer, G.K., and Yaphe, W. 1981. Analysis of Kappaiota hybrid carrageenans with kappa-carrageenan, iota-carrageen and <sup>13</sup>C NMR. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 10: 379-384.
- Benzie, I.F.F. and Strain J.J. 1996. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239:70-76.
- Ben-Aziz, A., Grossman, S., Ascarelli, I. and Budowski, P.1970. Linoleate oxidation induced by lipoxygenase and heme proteins: a direct spectrophotometric assay. *Analytical Biochem.* 34: 88-100.
- Bhakuni, D and Silva, M.1974. Biodynamic substances from marine flora. *Bot. Mar* 27(1): 40-51.
- Biard, J.F., Verbist, J.F., Floch, R., Letourneux, Y. 1980. Epoxyelegantolone et elegantediol, deux nouveaux diterpenes de *Bifurcaria bifurcata* Ross (Cystoseiracees). *Tetrahedron Letters.* 21: 1849–1852.
- Bidwell, R.G., McLachlan, J. and Lloyd, D.H. 1985. Tank cultivation of Irish moss. *Chondrus crispus* Stackh. *Bot. Marina* 28: 93-97
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Blunden, G., Farnham, W. F., Jephson, N., Barwell, C. J., Fenn, R. H. and Plunkett, B. A. 1981. The composition of maërl beds of economic interest in Northern Britain, Cornwall and Ireland. *Xth Int. Seaweed Symp.* 10: 651-656.
- Blunden, G. and Carabot, A. 1995. Biologically-active compounds from marine organisms. 25 p. (Mimeo).
- Blunden, G. 1993. Marine algae as sources of biologically active compounds. *Interdiscip. Sci.Rev.* 18:73-80
- Boettcher, A.A., Target, N.M. 1993. Role of polyphenolic molecular size in reduction of assimilation efficiency in *Xiphister mucosus*. *Ecology* 74, 891–903.
- Barufi J.B, 2010. Fotoproteção em *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): uma abordagem fisiológica e molecular. Tesis doctoral. Universidad de São Paulo. Brasil
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated Hydroxytoluene, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52(2): 59-63.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 28: 25-30.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. 1984. B-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569-573.

## Introducción

---

- Buschmann, A., M., Troell, M. and Kautsky, N. 2001. Integrated algal farming: A review. *Cahiers de Biologie Marine*, 42:83-90.
- Buschmann, A.H., T. Chopin, A. Neori, C. Halling, M. Troell, M. C. Hernández-González, C. Aranda 2008a. Ecological engineering in aquaculture: towards a better waste management in Western World mariculture. In: Jorgensen, S.E. and Fath. B. (Eds.). *Encyclopedia of Ecology*. Amsterdam: Elsevier. 3120 p.
- Buschmann, A.H., Varela, D.A., Hernández-González, M.C., Huovinen P. 2008b. Opportunities and challenges for the development of an integrated seaweed-based aquaculture activity in Chile: determining the physiological capabilities of *Macrocystis* and *Gracilaria* as biofilters. *J. Appl. Phycol.* 20: 571–577.
- Caccamese, S., Azzolina, R., Funari, G., Cormaci, M and Grasso, S. 1980. Antimicrobial and antiviral activities of extracts from Mediterranean algae. *Bot. Mar.* 23: 285 - 288.
- Cahyana, A. H., Shuto, Y. and Kinoshita, Y. 1992. Pyropheophytin as an antioxidative substance from marine alga, *Arame (Eisenia bicyclis)*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(10): 1533-1535.
- Cano, A.; La Torre, M.I., León; B., Young, K.r., Roque, J. and Arakaki, M. 1998. Estudio comparativo de la flora vascular de los principales humedales de la zona costera del departamento de Lima, Perú. En: Cano, A. y Young, K.R. (Eds.) *Los Pantanos de Villa: Biología y Conservación*. (Serie de Divulgación, Museo de Historia Natural-UNMSM 11) p. 181-190.
- Cao, J., Usami, S., and Dong, C. 1997. Development of a side-view chamber for studying cell-surface adhesion under flow conditions. *Ann. Biomed. Eng.* 25: 573–580.
- Carlucci, M.J., Pujol, C.A., Ciancia, M., Nosedá, M.D., Matulewicz, M.C., Damonte, E.B. and Cerezo, A.S. 1997. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 20:97–105.
- Carmona, R., Kraemer, G.P., Yarish, C. 2006. Exploring Northeast American and Asian species of *Porphyra* for use in an integrated finfish-algal aquaculture system. *Aquaculture*. 252: 54–65.
- Carvalho, L y N. Roque .2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Química Nova*, 23(6):757-763.
- Cassolato, J.E.F., M.D. Nosedá, C.A. Pujol, F.M. Pellizzari, E.B. Damonte, M.E.R. Duarte, 2008. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carbohyd. Res.* 343: 3085-3095.
- CEVA. 2000. Dossier les algues, source d'antioxisants. *Algorithme* 52, 4
- Chapman, V.J. and Chapman, D.J. 1980. *Seaweeds and their uses*. London y New York: Chapman & Hall. pp. 1-334.
- Chattopadhyay, S., Tracy, E., Liang, P., Robledo, O., Rose-John, S., Baumann, H. 2007. Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells. *J Biol Chem.* 282:3014–3026
- Chen G., Zeng G., Tu X., Niu C., Huang G., y Jiang W. 2006. Application of a by-product of *Lentinus edodes* to the bioremediation of chromate contaminated water. *Journal of Hazardous Materials*. 135: 249-255.

- Choo, K. S., Pedersen, M. Snoeijis, P. 2004. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlnneriana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 298:111–23.
- Chopin, T., Buschmann A.H., Halling C., Troell M., Kautsky N., Neori A., Kraemer G.P., Zertuche-Gonzalez J. A., Yarish C. and Neefus C. 2001. Integrated seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *J. Phycol.* 37: 975-986.
- Chow, F., Macchiavello, J., Santa-Cruz, S., Fonck, E., Olivares, J. 2001. Utilization of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta; Gracilariaceae) as a biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, oysters, and sea urchins. *J World Aquacul Soc.*, 32:215-220
- Cintra, R.M. G.; Mancini-Filho, J. 2001. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. *Nutrire*, 22, 49-62.
- Cohen, I. and A. Neori. 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fish pond effluents. 1. Ammonia uptake kinetics and nitrogen content. *Bot. Mar.*, 34:475-482.
- Collen J. y Davison, I. 1999a. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 35(1), 62-69.
- Collen, J. y Davison, I., 1999b. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant Cell and Environment*, 22(9): 1143-1151.
- Colliec S., A. M. Fischer, J. Tapon-Brethaudiere, C. Boisson, P. Durand y J. Jozefonvicz. 1991. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thrombosis Research*, 64: 143-154.
- Connan, S., F. Delisle, E. Deslandes and E.A. Gall. 2006. Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot. Mar.*, 49: 39-46.
- Conde FR, MS Churio and CM Previtali 2000. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 56: 139-144.
- Conde FR, Churio, M.S., Previtali, C.M. 2004. The deactivation pathways of the excited-states of the mycosporine-like amino acids shinorine and porphyra-334 in aqueous solution. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 3: 960-967.
- Copertino, 2009. Photophysiology of a Turf Algal Community: Integrated Responses to Ambient Light and Standing Biomass. *J. Phycol.*, 45:324-336.
- Correa-Díaz, F., R. Aguilar-Rosas and L.E. Aguilar-Rosas. 1990. Infrared analysis of eleven carrageenophytes from Baja California, Mexico. *Hydrobiologia*, 204/205: 609–614.
- Craigie, J. 1990. Cell walls. In: Sheath, R.G., Cole, K. M. (eds.). *The Biology of Red Algae*. Cambridge Univ. Press, New York: 221-257
- Crato, E. 1893. Über die Hansteen'schen Fucosankörner. *Ber.deutsch.bot.Ges.*11:235-241.
- Cronin, G., M.E. Hay. 1996. Induction of seaweed chemical defenses by amphipod grazing. *Ecology*, 77: 2287-2301.
- Cruz-Suárez, L.E., León, A., Peña-Rodríguez, A., Rodríguez-Peña, G., Moll B., Ricque-Marie, D. 2010. Shrimp/*Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301: 64-68.
- Davies, K. J. A., and Ursini, F. 1995. *The Oxygen Paradox*. Padova, Italy: CLEUP University

Pres. ISBN 88-7178-374-3,

- De-Boer, J., Ryther, J. 1977. Potential yields from a waste recycling algal mariculture system. In: R.W. Krauss (ed.). *The Marine Plant Biomass of the Pacific Northwest Coast, Oregon*: Oregon State University Press, pp. 231-248.
- De la Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F.L., de Gálvez, M.V., Herrera, E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J. Appl. Phycol.*, 21: 161–169.
- Demetropoulos, C.L., Langdon, C.J., 2004b. Enhanced production of Pacific dulse (*Palmaria mollis*) for coculture with abalone in a land-based system: effects of stocking density, light, salinity, and temperature. *Aquaculture*, 235: 471–488.
- Denton, A., A. R. O. Chapman, and J. Markham. 1990. Size-specific concentrations of phlorotannins (anti-herbivore compounds) in three species of *Fucus*. *Marine Ecology Progress Series*, 65:103–104.
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y (2003) Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 8024–8029
- Dunlap, W. C., Yamamoto, Y. 1995. Small molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. - *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B: 105-114.
- Endo Y, Usuki R. y T. Kandena. 1985. Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the auto-oxidation of oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62: 1375-90.
- Estes JA, Steinberg PD .1988. Predation, herbivory, and kelp evolution. *Paleobiology*. 14: 19-36.
- FAO. 2008. *The world State of Fisheries and Aquaculture*. Roma, Italy. Electronic edition <http://fao.org>.
- Faulkner, D. 1984. Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Nat. Prod. Rep.* 1: 251-280.
- Faulkner DJ .1992. Chemical defenses of marine molluscs. In: Paul VJ (ed). *Ecological roles for marine natural products*. Ithaca: Cornell University Press, p 119-163
- Faulkner, D. 1974. Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Nat. Prod. Rep.*, 1: 251-280.
- Fayaz M, Namitha KK, Chidambara Murthy KN, Mahadeva Swamy M, Sarada R, Salma Khanam, Subbarao PV, Ravishankar GA., 2005. Chemical composition, Iron Bioavailability and Antioxidant Activity of *Kappaphycus alvarezzi* (Doty). *J. Agric. Food Chem.*, 53: 792-797.
- Febles, G.; Ruiz, T.E. y Alonso, J. 2006. Papel de los sistemas agroforestales en la mitigación de los procesos de desertificación y sequía. En: *Congreso latinoamericano de Agroforestería*. (2006: Cuba). 117 p.
- Febles, G.; Ruiz, T.E.; Calzadilla, E.; Clavel, N.; Díaz, J. y Toral, O. 2006. Evaluación de especies arbóreas. En: *Congreso latinoamericano para la producción pecuaria sostenible*. Indio Hatuey, (IV: 2006: Cuba). 6 p.
- Feldman MF, Marolda CL, Monteiro MA, Perry MB, Parodi AJ, Valvano MA .1999. The activity of a putative polyisoprenol-linked sugar translocase (Wzx) involved in *Escherichia coli* O

## Introducción

---

- antigen assembly is independent of the chemical structure of the O repeat. *J Biol Chem.*, 274: 35129–35138
- Feldman SC, Reynaldi S, Stortz CA, Cerezo AS and Damonte EB. 1999. Antiviral properties of fucoidan from *Leathesia Difformis*. *Phytomed*, 6: 335-340
- Fenical, W. 1975. Halogenation in the Rhodophyta: a review. *J. Phycol.*, 11: 245-259.
- Fenical, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science*, 215(4535): 923-928.
- Fenical, W and Paul VJ. 1984. Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the family Udoteaceae. *Hydrobiologia*, 116/117: 135–170.
- Figueroa, F.L., Bueno, A., Korbee, N., Santos, R., Mata, L., Schuenhoff, A., 2008. Accumulation of mycosporine-like amino acids in *Asparagopsis armata* grown in tanks with fishpond effluents of gilthead sea bream *Asparus aurata*. *J. World Aquac. Soc.*, 39: 692–699.
- Foti, M., Piatelli, M., Amico, V. and Ruperto, G. (1994) Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae, *J. Photochem. Photobiol.* 26: 159-164
- Fralick, R.A. 1979. The growth of commercially useful seaweeds in a nutrient enriched multipurpose aquaculture system. In: Jensen, A. and Stein, J.R. (eds). *Proc. Int. Seaweed Symp. (IX: 1979: Princenton)*. pp.629-698.
- Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine". *Lancet*, 341: 454-457.
- Freile-Pelegrín Y. y Morales, JL. 2004. Antibacterial activity in marine algae from Yucatan coast, Mexico. *Botanica Marina* 47: 140-146
- Fujimoto, K. 1990. *Antioxidant activity of algal extracts*. In: Akatsuka I. (ed.). *Introduction to Applied Phycology*. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing, pp. 199-208.
- Fujimoto, K., Kaneda, T. 1980. Screening test for antioxygenic compounds from marine algae and fractionation from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46(9): 1125-1130.
- Fujimoto, K., Kaneda, T. 1984. Separation of antioxygenic (antioxidant) compounds from marine algae. *Hydrobiologia*, 116/117: 111-113.
- Fujimoto K, Ohmura H., Kaneda T. 1985. Screening for antioxygenic compounds in marine algae and bromophenols as active principles in a red alga *Polysiphonia urceolata*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51(7): 1139-1143.
- Funahashi H, Imai T, Tanaka Y, Tsukamura K, Hayakawa Y, Kikumori T, Mase T, Itoh T, Nishikawa M, Hayashi H, et al. (1999) Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor in rats. *Jpn J Cancer Res* 90:922–927.
- Fusetani, N. 2000. *Introduction*. In: Fusetani, N. And Basel, Karger, (eds). *Drugs from the sea*. Pp. 1- 5.
- Gaines, S.D. and Lubchenco, J. 1982. A unified approach to marine plant-herbivore interactions. II. Biogeography. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13: 111-38.

## Introducción

---

- García-Pichel F, Wingward, C.E., Castenholz, R.W 1993. Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the Cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 170-176.
- Geleijnse, J.M. and Hollman, PCH 2008. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms?. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88:12-13
- Glombitza, K.W. 1970. Antimicrobial constituents in algae. Quantitative determination of acrylic acid in marine algae. *Planta medica*, 18 : 210-221.
- Glombitza, K and Koch. 1989. *Secondary metabolites of pharmaceutical potencial*. In: Cresswell, R.; T. Rees and Shah (eds). *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Great Britain. 338 pp.
- Goldemberg RL. 1995a. Compounds from the sea. *Drug Cosmetic Ind*, 7: 56-61.
- Gómez-Pinchetti, J.L., Suárez Álvarez, S., Martel Quintana, A., García Reina, G. 2002. Alternative high-value seaweed species as biofilters for the purification of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> enriched fishpond effluents. In: *Algal Biotechnology: a sea of opportunities* (García Guerrero, M., Molina Grima, E., Acien Fernández, F.G., Fernández Sevilla, J.M., Sánchez Pérez, J.A. and Brindley Alias, C., editors), 267. Servicio Publicaciones Universidad de Almería, Almería.
- González, F and Silva M. 2001. *Biodiversidad química de microalgas marinas*. In: Alveal, K and T. Antezana (eds). *Sustentabilidad de la biodiversidad, un problema actual. Bases científico-técnicas, teorizaciones y proyecciones*. Chile. 896 pp.
- Gordon, M. H. 1996. Dietary Antioxidants in Disease Prevention. *Nat. Prod. Rep.*, 13 : 265-273
- Grabley S, Thiericke R. eds. 1999. *Drug discovery from nature*. Berlin :Springer Verlag,
- Guiry, M.D. and Blunden, G. 1991. *Seaweeds Resources*. In *Europe: Uses and Potential*. New York: John Wiley & Sons, West Sussex.
- Hagerman, A.E.; Butler L.G. 1975. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 56(6):801-806.
- Halliwell B 1995. Antioxidant characterization, *Biochem. Pharmacol.* 49:1341.
- Halliwell B., 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*, 55(1): 44-52.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Rad. Biol. Med.*, 18: 125–126.
- Halliwell B. 1996. *Antioxidants*. In: Ziegler EE, Filer LJ Jr., eds. *Present Knowledge in Nutrition*. Washington, DC: ILSI Press. pp. 596–603
- Harlin, M.M., Thorne-Miller, B. and Thursby, B.G. 1979. *Ammonium uptake by Gracilaria sp. (Florideophyceae) and Ulva lactuca (Chlorophyceae) in closed system fish culture*. In: Jensen, A. and Stein, R. (eds). *Proc. Int. Seaweed Symp. (IX: 1979: Princeton)*. pp. 285-293.
- Hay, M. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 200:103-134.
- Hay, M.; Duffy, J., Fenical, W. and Gustafson K. 1987a. Chemical defense against different marine herbivores: are amphipods insect equivalents?. *Ecology*. 68(6):1567-1580.

## Introducción

---

- Hay, M.; Duffy, J., Fenical, W. and Gustafson K. 1987b. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. *Ecology*. 68(6):1581-1591.
- Hayashi, L., Yokoya, N.S., Ostini, S., Pereira, R.T.L., Braga, E.S., Oliveira, E.C., 2008. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). In: integrated cultivation with fishes in recirculating water. *Aquaculture*. 277:185-191
- He, P., Xu, S., Zhang, H., Wen, S., Dai, Y., Lin, S., Yarish, C. 2008. Bioremediation efficiency in the removal of dissolved inorganic nutrients by the red seaweed, *Porphyra yezoensis*, cultivated in the open sea. *Water Res.* 42: 1281-1289.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationship. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13, 572–584.
- Heo S.J, Ko S.C, Cha S.H, Kang D.H, Park H.S, Choi Y.U, Kim D, Jung W.K, Jeon Y.J. 2009. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicol in Vitro*. 23, 1123-1130.
- Hernández I., Martínez-Aragón J.F., Tovar A, Pérez-Lloréns J.L., Vergara J.J., 2002. Biofiltering efficiencies for dissolved ammonium in three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters. *J. Appl. Phycol.* 14, 375–384.
- Hiqashi, Okaj, K., Otani, S., Okai, Y 1999. Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. *Cancer Lett.*, 140, 21-5.
- Hirata, H., Yamauchi, T., Matsuda, M., Yamasaki, S. 2007. A Simple experiment in polyculture: Red Sea Bream (*Pagrus major*) And Ulvales (*Ulva pertusa*). *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*, 6, 425–431.
- Hornsey, I. y D. Hide.1974.The production of antimicrobial compounds by British marine algae I. Antibiotic-producing marine algae. *Br. Phycol. J.*, 9,353-361.
- Hoppe H. 1982. Marine algae: their products and constituents. In: hoppe H. Lovring, T. (eds). *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Berlín: Walter de Gruyter. V. 2.,pp 3-18. ..
- Hu JF, Geng MY, Zhang JT, Jiang HD. 2001. An in vitro study of the structure-activity relations of sulphated polysaccharide from brown algae to its antioxidant effect. *J Asian Nat. Prod. Res.*, 3,353-358.
- Huang M-T., Farraro, T.1992. Phenolic compounds in food and cancer prevention. In: Huang M-T, Ho C-T, Lee CY (eds). *Phenolic compounds in Food and Their effects on health II, antioxidants and cancer prevention*. Chap 2. pp. 8-33.
- Iivessalo, H. and J. Tuomi. 1989. Nutrient availability and accumulation of phenolic compounds in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Mar. Biol.*, 101,105-119
- Indergaard M, Ostgaard K. 1991. Polysaccharides for food and pharmaceutical uses. In: Guiry MD, Blunden G (eds), *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*. New York: Wiley & Sons, pp. 169-183.
- Ito, N., S. Fukushima, A. Hasegawa, M. Shibata & T. Ogiso, 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J. Nat. Cancer Znst.*, 70(2), 343-347.
- Jaspars, M., and Lawton, L.A., 1998. Cyanobacteria as a novel source of pharmaceuticals. *Curr Opin Drug Discovery Develop.*, 1, 77-84.
- Jiang, Z.J., Fang, J.G., Mao, Y.Z., Wang, W., 2010. Eutrophication assessment and bioremediation strategy in a marine fish cage culture area in Nansha Bay, China *J. appl.*

Phycol., 22, 421-426.

Jiménez del Río M, Ramazanov Z, García-Reina G., 1995. Effect of nitrogen supply on photosynthesis and carbonic anhydrase activity in the green seaweed *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Marine Biology*, 123, 687–691.

Jiménez del Río, M., Ramazanov, Z., García-Reina, G. 1996. *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. *Hydrobiologia*, 326-327, 61-66.

Jiménez-Escrig A, Rincón M, Pulido R, Saura-Calixto F. 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5849-53.

Jones, A.B., Dennison, W.C., Preston, N.P., 2001. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. *Aquaculture*, 193, 155–178.

Jones, A.B., Preston, N.P., Dennison, W.C., 2002. The efficiency and condition of oysters and macroalgae used as biological filters of shrimp pond effluent. *Aquaculture Research*, 33, 1-19.

Jorgensen LV, Madsen HL, Thomsen MK, Dragsted LO and Skibsted LH (1999). Regulation of phenolic antioxidants from phenoxyl radicals: An ESR and electrochemical study of antioxidant hierarchy. *Free Radical Research*, 30, 207-220.

Jung,W.K.,Heo, S.J., Jeon, Y.J., Lee, C.M., Park, Y.M., Byun,H.G., Choi, Y.H., Park, S.G., Choi, I.W., 2009. Inhibitory effects andmolecularmechanismof dieckol isolated frommarine brown alga on COX-2 and iNOS in microglial cells. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 4439–4446.

Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extractscontaining phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954–3962.

Kaneda T., Ando H., 1971. Component lipids of purple laver and their antioxygenic activity. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 7, 553-557.

Le Tutour B., 1990. Antioxidative activities of algal extracts, synergistic effect with vitamin E. *Phytochemistry*, 29(12), 3759-3765.

Kang, Y.H., Shin, J.A., Kim, M.S., Chung, I.K., 2008. A preliminary study of the bioremediation potential of *Codium fragile* applied to seaweed integrated multitrophic aquaculture (IMTA) during the summer. *J.Appl. Phycol.*, 20, 183-190.

Kanno N, Aoyagi Y, Imaizumi H. 1990. Determination of rare earth elements in seaweed and seawater samples on the coast in niigata prefecture by icp-ms after solvent extraction. *Analytical sciences*, vol.17.

Kim, C.S., Lim, W.A. Cho, &C. 2001. Mycosporine-like amino acids as the UV sunscreen with oxygen radical scavenging activity. *Buil. Nat’l. Fish. Res. Dev. Inst. Korea*, 60,65-71.

Kolender, A.A. & M.C. Matulewicz. 2002. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. *Carbohydr. Res.*, 337, 57-68

Kopas-Lane, L. M., & Warthesen, J. J. (1995). Carotenoid photostability in raw spinach and carrots during cold storage. *Journal of Food Science*, 60, 773–776.

## Introducción

---

- Kubo I., Himejima M., Tsujimoto K., Muroi H., Ichikawa N. (1992) Antibacterial activity of crinitol and its potentiation. *J. Nat. Products*, 55(6), 780–785.
- Lahaye, M., Álvarez-Cabal Cimadevilla E, Kuhlenkamp, R., Quemener, B., Lognoné, V., Dion, P. 1999. Chemical composition and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (*Ulvales*, *Chlorophyta*). *J Appl. Phycol.*, 11(1), 1-7.
- Lahaye, M., A. Robic, 2007: Structure and functional properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules*. 8(6), 1765-1774.
- Le Tutour B., Benslimane F., Gouleau M.P., Gouygou J.P., Saadan B. & Quemeneur F. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himantalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.*, 10, 121-129.
- Lee, J.B., Hayashi, K., Hashimoto, M., Nakano, T., Hayashi, T. 2004. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chem. Pharm. Bull.* 52:1091–1094
- Lesser, M. P. 1996. Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation: Oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV absorbing compounds in the dinoflagellate, *Prorocentrum micans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* , 132, 287—297.
- Lombardi, J.V., de Almeida-Marques, H.L., Lima-Pereira, R.T., Saleé-Barreto, O.J. & de Paula, E.J., 2006. Cage polyculture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the Philippines seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Aquaculture*, 258, 412-415.
- Li, M.; Hu, C.; Zhu, Q.; Chen, L.; Kong, Z., Liu, Z. 2006. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the macroalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, 62, 565.
- Lim S.N., Cheung P.C.K., Oot V.E.C., Ang P.O. 2002. Evaluation activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3862-3866.
- Lima-Filho J.V.M., A.F.F.U. Carvalho, S.M. Freitas & V.M.M. Melo. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Braz. J. Microbiol.*, 33(4), 311-314
- Lincoln R.A., Strupinski K., Walker J.M. 1991. Bioactive compounds from algae. *Life Chemistry Reports*, 8, 97-183.
- Lobban, C. S., Harrison, P. J., Duncan, M. J. (1985). *The physiological ecology of seaweeds*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Luiten, E.M., Akkerman, I., Koulman, A., Kamermans, P., Reith, H., Barbosa, M.J., Sipkema, D., & Wijffels, R.H., 2003. Realizing the promises of marine biotechnology. *Biomol. Eng.*, 20, 429–439.
- Matsukawa R., Dubinsky Z., Kishimoto E., Masaki K., Masuda Y., Takeuchi T., Chihara M., Yamamoto Y., Niki E. & Karube I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 9, 29-35.
- MANACH, C. et al. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-47.
- Mao, Y.; Yang, H.; Zhou, Y.; Ye, N. & Fang, J., 2009. Potential of the seaweed *Gracilaria lemaneiformis* for integrated multi-trophic aquaculture with scallop *Chlamys farreri* in North China. *J. Appl. Phycol.*, 21, 649–656.
- Marcos, A. 1968. Sobre la existencia de niveles de tránsito entre el Westfaliense D y el

Estefaniense A en el oriente de Asturias. Acta Geol. Hisp., 3(1), 7-14

- Marinho-Soriano, E., Nunes, S.O., Carneiro, M.A.A., & Pereira, D.C., 2009. Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. Biomass and bioenergy 33, 327–331.
- Marklund S., & Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47(3), 469-474
- Martinez – Nadal, N.G., L.V. Rodriguez & C. Casillas 1963. Sarganin and Chonalgin, new antibiotic substances from marine algae from Puerto Rico, Antimicrob Agents and Chemother, 3, 68-72
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S., 2010a. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(1), 217-232.
- Mata, L., Schuenhoff, A. & Santos, R., 2010b. A direct comparison of the performance of the seaweed biofilters, *Asparagopsis armata* and *Ulva rigida*. J. Appl. Phycol. 22, 639-644.
- Matos, J., Costa, S., Rodrigues, A., Pereira, R., & Sousa-Pinto, I., 2006. Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal. Original Research Article. Aquaculture, 252(1), 31-42.
- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T, Chihara M, Yamamoto Y, Niki E, & Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. J. Appl. Phycol., 9, 29-35.
- Matsukawa, M., Ito, M., Hayashi, K., Takahashi, O., Yang, S.Y., & Lim, S.K., 1998. Evaluation of nonmarine bivalves as chronological indices, based on examples from the Lower Cretaceous of East Asia. In: Lucas, S.G., Kirkland, J.I., Estep, J.W. (Eds.), Lower and Middle Cretaceous Terrestrial Ecosystems. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin 14, 125e133.
- McHugh, D.J. 1991. Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds including *Gelidium*. Hydrobiologia, 221, 19-29.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin. Sci. (London) 84:407-412.
- Miller, N. J. & C. A. Rice-Evans, 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidants to the activity of orange and apple fruit juices and black currant drink. Food Chem., 60, 331-337.
- Misonou, T., Saitoh, J., Oshiba, S., Tokitomo, Y., Maegawa, M., Inoue, Y., Hori, H., & Sakurai, T. 2003. UV- absorbing substance in the red alga *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) block thymine photodimer production. Mar. Biotech., 5, 194-200.
- Mori, H., Kamei, H., Nishide, E., Nishizawa, K. 1982. Sugar constituents of some sulfated polysaccharides from the sporophylls of wakame (*Undaria pinnatifida*) and their biological activities. Mar. Algae Pharm. Sci. 2:109–115
- Muñoz A., López A., Cházaro F., Gamillo Y., Otero A., Patiño M., Reguera C., Sabin V., Vecino E. 1992. Drogas del Mar: Sustancias biomédicas de algas marinas. Santiago de Compostela: Universidade. Servicio de Publicacións e Intercambio científico. 188 p.

- Nagai T., Yukimoto T. 2003. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chemistry*, 81, 327-332.
- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., & Nakamura, T., (2002). Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J. Antimicro. Chemother.*, 50, 889-893.
- Nagle, D. G.; Zhou, Y.; Mora, F.; Mohammed, K. A. & Kim, Y. (2004). «Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products». *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1725-1756.
- Nagler, P.L., Glenn, E.P., Nelson, S.G., & Napoleon, S., 2003. Effects of fertilization treatment and stocking density on the growth and production of the economic seaweed *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) in cage culture at Molokai, Hawaii. *Aquaculture*, 219, 379-391.
- Naguib Y.M.A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1150-1154.
- Nagwa A. S, Michael C. B, Peter A. L, David J. Swaine, Richard T, y Colin W. Wright 2004. In-vitro Cytotoxic Activities of the Major Bromophenols of the Red Alga *Polysiphonia lanosa* and Some Novel Synthetic Isomers. *J. Nat. Prod.* 67, 1445-1449
- Nakamura T., Nagayama K., Uchida K. & Tanaka R. 1996. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries science*, 62(6), 923-926.
- Nakayama, R., Tamura, Y., Kikuzaki, H., Nakatani, N. 1999. Antioxidant effect of the Constituents of *Susabinori* (*Porphyra yezoensis*). *JAOCS*, 76, 649-653.
- Neale, P.J., Banaszak, A. T., & Jarriel, C.R. 1998. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *J. Phycol.*, 34, 928-938.
- Neisha, A. C., Shacklock, F., Fox, C. H., Simpson, J. 1977. The cultivation of *Chondrus crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. *Can. J. Bot.*, 55, 2263 - 2271.
- Neori, A., Shpigel, M., & Ben-Ezra, D., 2000. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture*, 186, 279-291.
- Neori, A., 1996. The form of N-supply (ammonia or nitrate) determines the performance of seaweed biofilters integrated with intensive fish culture. *Isr. J. Aquac. Bamidgeh*, 48, 19-27.
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G.P., Halling, C., Shpigel, M., Yarish, C., 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 231, 361-391.
- Neori, A., Ragg, N.L.C., Shpigel, M., 1998. The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within and abalone (*Haliotis tuberculata*) and macroalgae culture system. *Aquaculture Engineering*, 17, 215-239.
- Neori, A., Msuya, F.E., Shauli, L., Schuenhoff, A., Kopel, F., Shpigel, M., 2003. A novel three-stage seaweed (*Ulva lactuca*) biofilter design for integrated Mariculture. *J. Appl. Phycol.* 15, 543-553.
- Neori, A., Shpigel, M., 1999. Algae treat effluents and feed invertebrates in sustainable integrated mariculture. *World Aquac.*, 30, 46-49, 51.

- Nicoletti, E., Della Pietra, F., Calderone, V., Bandecchi, P., Pistello, M., Morelli, I., and Cinelli, F. 1999. Antiviral properties of a crude extract from a green alga *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C. Agardh. *Phytotherapy Research*, 13, 245-247.
- Nishibori, S., Namiki, K. 1988. Antioxidative substances in the green fractions of the lipid of *Aonori* (*Enteromorpha* sp.). *Journal of Home Economics of Japan*, 39, 1173–1178.
- Nishida T., Matsukawa R., Masaki K., Dubinsky Z. & Karube I. 1996. A method for screening potential antioxidant activity. *J. of Biotechnology*, 51, 149-155.
- Norton, T.A., M. Melkonian & R.A. Anderson. 1996. Algal biodiversity. *Phycologia*, 35(4),308-326.
- Numata, A., Kanbara, S., Takahashi, C., Fujiki, R., Yoneda, M., Usami, Y., & Fujita, E., 1992. A cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile* and structures of chromenes. *Phytochemistry*, 31, 1209–1213.
- Olmedilla B, Granado F, Blanco I. 2001. Carotenoides y salud humana. Madrid, España: Fundación Española de Nutrición, pp. 13-15. (Serie Informes. No. 11).
- Paganda G., Miller N., Rice-Evans, C A. 1999. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radical Res.*,30,153-162.
- Painter, T.J. 1983. Algal Polysaccharides. In: G.O. Aspinall (ed.), *The Polysaccharides*. New York: Academic Press Inc., pp. 2-195.
- Paul, V., Littler, M., Littler, D., Fenical, W. 1987. Evidence for chemical defense in tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (Caulerpaceae: Chlorophyta). *J. Chem. Ecol.*,13(5), 1171-1185.
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A. & Aberg, P. 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 157.139-46.
- Pavia, H., Toth, G. & Aberg, P. 1999. Trade-offs between phlorotannin production and annual growth in natural populations of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *J. Ecol.*, 87, 761–71.
- Pavia, H. and Brock, E. 2000. Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 193, 285–294.
- Peckol, P., Krane, J. M. and Yates, J. L. 1996. Interactive effects of inducible defence and resource availability on phlorotannins in the north Atlantic brown alga *Fucus esiculosus*. – *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 138, 209–217.
- Pereira, R.; Teixeira, & Kelecom, A. 1994. Chemical defenses against herbivores in marine algae.1. The brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux from Brazil. *An Acad. Bras. Ci.* 66(2), 229-235.
- Pistorius, Annalie, Janneke van de Wijgert, Mohlatlego Sebola, Barbara Friedland, Evelyn Nagel, Cathleen Bokaba, & Anwar Hoosen. 2004. "Microbicide trials for preventing HIV/AIDS in South Africa: Phase II trial participants' experiences and psychological needs." *Journal of the Social Aspects of HIV/AIDS* 1(2), 78–86.
- Ponce NMA, Pujol CA, Damonte EB, Flores ML, Stortz, CA., 2003. Fucoïdins from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* 338, 153–165.

## Introducción

---

- Porrello, S., Lenzi, M., Persia, E., Tomassetti, P., Finoia, M.G., 2003a. Reduction of aquaculture wastewater eutrophication by phytotreatment ponds system I. Dissolved and particulate nitrogen and phosphorus. *Aquaculture*, 219, 515-529.
- Porrello, S., Lenzi, M., Persia, E., Tomassetti, P., Finoia, M.G., Mercatali, I., 2003b. Reduction of aquaculture wastewater eutrophication by phytotreatment ponds system II. Nitrogen and phosphorus content in macroalgae and sediment. *Aquaculture*, 219, 531-544.
- Porter, C.B., Krom, M.D., Robbins, M.G., Brickell, L., Davidson, A., 1987. Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream (*Sparus aurata*) and its effect on water quality conditions. *Aquaculture*, 66, 287-297.
- Portwich, A., García-Pichel, F. 1999. Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporine in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Arch. Microbiol.*, 172, 187-192.
- Post, A., Larkum, A.W.D. 1993. UV- absorbing pigments, photosynthesis and UV- exposure in Antarctica: comparison of terrestrial and marine algae. *Aquat. Bot.*, 45, 231-243.
- Pratt, D. E. 1992. Natural antioxidants in plant material. In Huang M-T, Ho C-T, Lee CY (eds). Phenolic compounds in Food and Their effects on health II, antioxidants and cancer prevention. Chap 5. ACS Sym, 507, 55-72.
- Price, JH., HS Forrest. 1969. 310 nm absorbance in *Physalia physalis*: distribution of the absorbance and isolation of a 310 nm absorbing compound. *Comparative Biochemistry Physiology*, 30, 879-888
- Prior, R.L.; G. Cao; A. Martin; E. Sofic; J. Mc Ewen; C. O'Brien; N. Lischner R; M. Ehlenfeld; W. Kalt; G. Krewer & M. Mainland, 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2686-2693.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- Qi H., Zhang Q., Zhao T., Chen R., Zhang H., Niu X., Li Z. 2005. Antioxidant activity of different sulfated content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *Int. J. Biol. Macromol.*, 37: 195-199.
- Radmer, R.J. 1996. Algal diversity and commercial algal products. *Bioscience*, 46, 263-271.
- Ragan, M.A. & K.-W. Glombitza, 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phyc. Res.*, 4, 130-241.
- Ragan, M.A. & A. Jensen, 1977. Quantitative studies on brown algal phenolics. I. Estimation of absolute polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 34, 245-258.
- Rao, P.S., Pareekh, K.S. 1981. Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. *Bot. Mar.*, 24, 577-582.
- Raskin, I.; Ribnicky, D.M.; Komarnytsky, S.; Ilic, N.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker, A.; Moreno, D.A.; Ripoll, C.; Yakoby, N.; O'Neal, J.M.; Cornwell, T.; Pastor, I. & Fridlender, B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, 20(12), 522-531.

## Introducción

---

- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1231-1237.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free. Radical. Res.*, 23, 375-383.
- Rice-Evans C, Miller NJ, & Papanga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci. Rev.*, 2(4), 152-159.
- Rice-Evans, C. 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8, 797-807.
- Rietveld, A. & S. Wiseman, 2003. Antioxidant effects of tea: Evidence from human clinical trials. *J. Nutr.*, 133, 3285S-3292S
- Rivero, A., F. Balloux, & S. A., West. 2003. Testing for epistasis between deleterious mutations in parasitoid wasp. *Evolution*, 57, 1698–1703.
- Robards, K.; P.D. Prenzler; G. Tucker; P. Swatsitang and W. Glover, 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Robertson-Andersson, D., Potgieter, M., Hansen, J., Bolton, J., Troell, M., Anderson, R., Halling, C. & Probyn, T., 2008. Integrated seaweed cultivation on an abalone farm in South Africa. *Journal of Applied Phycology*, 20, 579-595.
- Rock C L., Jacob R J., Bowen PE. 1996. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J.am. Diet. Assoc.*, 96, 693-702.
- Rodríguez, R. J., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L. Buhler, D. R. 2001. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 39(5), 437-445
- Rodriguez, M.R.C. Montaña, M.N.E., 2007. Bioremediation potential of three carrageenophytes cultivated in tanks with seawater from fish farms. *J. Appl. Phycol.*, 19, 755-762.
- Romay, C., González, R., Ledón, N., Ramirez, D. Rimbau, V. 2003. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 4, 207-216.
- Rosell, K.-G. & L. M., Srivastava. 1987. Fatty acids as anti-microbial substances in brown algae. *Hydrobiologia*, 151/152, 471-475.
- Rouseff, R.L., Nagy, S. 1994. Health and nutritional benefits of citrus fruit components. *Food Technol.* 48:125-132.
- Ryther, J.H., DeBoer, J.A.; Lapointe, B.E. 1978. Cultivation of seaweeds for hydrocolloids, waste treatment and biomass for energy conversion. *En. Procc. 9<sup>th</sup> International Seaweed Symposium*. A. Jensen & J.R. Stein (Eds). Princenton, Science Press. Pp 1-16.
- Ryu, B., Qian, Z.J., Kim, M.M., Nam, K.W. , Kim, S.K. 2009. Anti-photoaging activity and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) by marine red alga, *Corallina pilulifera* methanol extract. *Radiat. Phys. Chem.*, 78, 98–105.
- Santoso, J., Y. Yoshie and T. Suzuki, 2004. Polyphenolic compounds from seaweeds: Distribution and their antioxidative effect. *Dev. Food Sci.*, 42, 169–178
- Sastry V.M.V.S, Rao G.R.K. 1995. Dioctyl phthalate and antibacterial compound from marine

## Introducción

---

- brown alga *Sargassum wightii*. J. Appl. Phycol., 7, 185-186
- Schramm, W. 1991a. Cultivation of unattached seaweeds. pp. 378-408. In Guiry & Blunden, 1991, q.v.
- Schramm, W. 1991b. Seaweeds for wastewater treatment and recycling of nutrients. pp. 149-168. In Guiry & Blunden, 1991, q.v.
- Schuenhoff, A., Shpigel, M., Lupatsch, I., Ashkenazi, A., Msuya, F.E., Neori, A., 2003. A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. Aquaculture, 221, 167-181.
- Setchell K D., Lawson, A M., Borriello S P. Harkness R., Gordon H., Morgan DM. 1981. Lignan formation in man-microbial involvement and possible roles in relation to cancer. Lancet. 2, 4-7
- Setchell, K.D.R., Lawson, A.M., Borriello, S.P., Harkness, R., Gordon, H., Morgan, D.M.L., Kirk, D.N., Adlercreutz, H., Anderson, L.C. 1981. Lignan formation in man-microbial involvement and possible roles in relation to cancer. The Lancet, 318, 4-7.
- Shibata, K. 1969. Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living in the Great Barrier Reef. Plant & Cell Physiology, 10, 325-335.
- Shimoda, T., Suryati, E., Ahmad, T., 2006. Evaluation in a Shrimp Aquaculture System Using Mangroves, Oysters, and Seaweed as Biofilters Based on the Concentrations of Nutrients and Chlorophyll a., T.Shimoda JARQ., 40(2), 189-193.
- Shpigel, M., Ragg, N. L., Lupatsch, I., Neori, A. 1999. Protein content determines the nutritional value of the seaweed *Ulva lactuca* L. for the abalone *Haliotis tuberculata* L. and *H. discus hannai* Ino. Journal of Shellfish Research, 18, 227-233.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. European Journal of Biochemistry, 215, 213-219.
- Sinha RP., M Klisch., A., Gröniger, DP., Häder 2000. Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea*-effects of UV and heat. Environmental and Experimental Botany, 43, 33-43.
- Stein, J., Borden,C. 1984. Causative and beneficial algae in human disease conditions: a review. Phycologia, 23(4), 485-501.).
- Steinberg, P. D. 1989. Biogeographic variation in brown algal polyphenolics and other secondary metabolites: comparison between temperate Australasia and North America. Oecologia, 78, 373 382.
- Steinberg, P. D. 1992. Geographical variation in the interaction between marine herbivores and brown algal secondary metabolites. In: V. J., Paul, ed. Ecological Roles for Marine Secondary Metabolites. Ithaca, New Yor: Comstock Publishing Associates, pp. 51 92.
- Steinberg, P. D. 1986. Chemical defenses and the susceptibility of tropical marine brown algae to herbivores. Oecologia, 69, 628 630.
- Steinberg, P. D. & Paul, V. J. 1990. Fish feeding and chemical defenses of tropical brown algae in Western Australia. Mar. Ecol. Prog. Ser., 58, 253 259.
- Steinberg, P. D. & I. Van Altna. 1992. Tolerance of marine invertebrate herbivores to brown algal phlorotannins in temperate Australasia. Ecol. Monog., 62, 189 222.
- Suh H.J., H.W, Lee & J., Jung 2003. Mycosporine glycine protects biological systems against

## Introducción

---

- photodynamic damage by quenching singlet oxygen with a high efficiency. *Photochemistry and Photobiology*, 78, 109-113.
- Targett, N. M., L. D. Coen, A. A. Boettcher & C. E. Tanner. 1992. Biogeographic comparisons of marine algal polyphenols: evidence against latitudinal trend. *Oecologia*, 89, 464-470.
- Targett, N. M., Boettcher, A. A., Targett, T. E. & Vrolijk, N. H. 1995. Tropical marine herbivore assimilation of phenolic rich plants. *Oecologia*, 103, 170-179.
- Troell, M., Rönnbäck, P., Halling, C., Kautsky, N. & Buschmann, A. 1999. Ecological engineering in aquaculture: use of seaweeds for removing nutrients from intensive mariculture. *J. Appl. Phycol.*, 11, 89-97.
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A.H., Kautsky, N. & Yarish, C. 2003. Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture*, 226, 69-90.
- Tseng, C.K. & Fei, X.G., 1987. Macroalgal commercialization in the Orient. *Hydrobiologia*, 151/152, 167-172.
- Tsuchihashi, H., Kigoshi M., Iwatsuki M. & Niki E. 1995. Action of  $\beta$ -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323(1), 137-147.
- Tsuda, T., Makino Y., Kato H., Osawa T. & Kawakishi S. 1993. Screening for antioxidative activity of edible pulses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1606-1608.
- Tugwell, S. & Branch, G. M., 1989, Differential polyphenolic distribution among tissues in the kelps *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida*, and *Macrocystis angustifolia* in relation to plant defense theory. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129, 219-230.
- Ueda, T., Armstrong, D. 1996. Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in the mammalian eye. *Ophthalmic Res.*, 28(3), 184-192
- Usov, A. I., Bilan, M. I. Shashkov, A. S. 1997. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). *Carbohydr. Res.*, 303, 93-102.
- Usov AI, Velde F., van de, Knutsen, SH, Rollem, HS, & Cerezo, AS 2002.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends Food Sci.*, 13, 73-92 .
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64, 178.
- Valenzuela, A., Nieto, S. 1996. "Natural and synthetic antioxidants: food quality protectors".- *Grasas & Aceites*, 47, 186-196.
- Van Alstyne, K.L. 1988. Herbivore grazing increases polyphenolic defenses in the intertidal brown alga *Fucus distichus*. *Ecology*, 69(6), 55-663.
- van Rijn, J. 1995. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture- A review. *Aquaculture* 139:181-201.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural Food & Chemistry*, 46, 4113-4117.

## Introducción

---

- Vidal, A., Motidome, M., Tanae, M., Fallarero, A. Brandao, L. Mancini, J., Lapa, A.J. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum*. Rev. Bras. Cienc. Farm., 37(3), 373-382.
- Vinson JA, Dabbagh, YA, Serry, MM., Jang, J. (1995). Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, Are Powerful Antioxidants Using an *in vitro* Oxidation Model for Heart Disease. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2800–2802.
- Vlachos, V., Critchley., Von Holy, A. 1997. Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine algae. South African Journal of Science, 93, 328-332.
- Wang, H., Chiu, L. C. M., Ooi, V. E. C. & Ang, P. O. 2008. Sea- weed polysaccharides with anticancer potential. Bot. Mar., 51, 313-319
- Wang P., Chang Y., Yu J., Li C. Xu, C. 2007. Acute peristome edema disease in juvenile and adult sea cucumbers *Apostichopus japonicus* (Selenka) reared in North China. Journal of Invertebrate Pathology, 96,11–17.
- Wang, X. J., Huang, A., Mukherjee, C. Cao, J., Lutkenhaus. 1997. Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP and FtsA. J. Bacteriol, 179,5551-5559.
- Wang, X., Quinn, P.J., 1999. Vitamin E and its function in membranes. Prog. Lipid Res., 38, 309-336.
- Wichi, C. M., Kendall, C. W. C., Stamp, D., Medline, A., Archer, M. C., & Bruce, W. R. 1998. Thermally oxidized dietary fat on colon carcinogenesis in rodents. Nutrition and Cancer, 30, 69–73.
- Wood, W. 1989. Photoadaptive responses of the tropical red alga *Eucheuma strictum* Schmitz (Gigartinales) to ultraviolet radiation. Aquatic Botanic, 33, 41-51.
- Xue, C., Fang, Y., & Lin, H., 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. J. Appl. Phycol., 13, 67–70.
- Yamamoto, Y., Niki E. Kamiya Y. 1982. Oxidation of lipids. I. Quantitative determination of the oxidation of methyl linoleate and methyl linolenate. Bull. Chem. Soc. Jpn., 55,1548-1550.
- Yan, X.J., Li X.C., Zhou, C.X. Fan X. 1996. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. Journal of Applied Phycology, 8, 201-203
- Yan, X., Chuda Y., Suzuki M., Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. Biosci. Biotechnol. Biochem., 63(3), 605-607.
- Yan, X., Nagata T., Fan, X. 1998. Antioxydative activities in some seaweeds. Plant Foods for Human Nutrition, 52, 253-262.
- Yen, GC, Chen, HW, Duh PD 1998. Extraction and identification of an antioxidative component from *Jue Mingzi* (*Cassia tora* L.). J. Agric. Food Chem., 46, 820-824.
- Young, A.J., G.M. Lowe 2001 Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arc. Biochem. Bioph.,385, 20-27.
- Yutaka H. 1995. Promoter for biological hyaluronic acid synthesis, composition externally applied to the skin and use thereof. European Patent Application, 0531978A2.
- Zern, T.L., Fernández, M.L. 2005. Cardioprotective Effects of Dietary Polyphenols. The J of Nutr., 5, 2291-2294.

## Introducción

---

- Zhang, Q, Yu, P, Li, Z, Zhang, H, Xu, Z. Li, P. 2003. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*. J. Appl. Phycol., 15,305–310 .
- Zubia, M., Robledo, D., Freile-Pelegri, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatán Peninsula, Mexico. J. Appl. Phycol., 19, 449–458.
- Zubia, M., Payri, C., Deslandes, E. 2008. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). J. Appl. Phycol., 20, 1033–1043
- Zubia, M., Fabre, MS., Kerjean, V., Le, Lann K., Stiger-Pouvreau V., Fauchon, M., Deslandes, E. 2009. Antioxidant and antitumor activities of some Phaeophyta from Brittany Coasts. Food Chem., 116, 693-701.



## **CAPITULO I**

---

### **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MACROALGAS RECOLECTADAS EN EL SISTEMA INTERMAREAL**

## 1.1. INTRODUCCIÓN

Las macroalgas del sistema intermareal se localizan en zonas de alta exposición a la radiación solar, alto hidrodinamismo y altas concentraciones de oxígeno. A su vez, compiten por uno o varios recursos a veces limitados como son el sustrato (Steneck, 1986), los nutrientes (Rosenberg y Ramus, 1982) y la luz (Cousins y Hutchins, 1983). La influencia de estos factores del medio pueden variar el estatus antioxidante en las algas y favorecer la generación de radicales libres y otros agentes oxidantes fuertes (Rozema et al., 2002). Los productores primarios y los procesos físico-químicos contribuyen a fijar el 50% del CO<sub>2</sub> emitido a la atmósfera. Las macroalgas y angiospermas marinas a pesar de estar sólo en las aguas costeras contribuyen con el 10% del total del carbono fijado y el resto se atribuye al fitoplancton (Dawes, 1986; Behrenfeld et al., 2006). Además de su importancia como productores primarios, las macroalgas son ecológicamente importantes porque constituyen el habitat de numerosos organismos y muchas de ellas son explotadas comercialmente (Chapman, 1980; Dawes, 1986; Buschmann, 1990).

Las macroalgas se encuentran distribuidas a lo largo de la costa desde la zona intermareal a la submareal (aproximadamente 150 m). Para facilitar el estudio de las franjas o cinturas de vegetación existentes en una rasa eulitoral, existe una terminología basada fundamentalmente en la altura de mareas. Así se denomina, piso sublitoral a aquel que queda permanentemente bajo la superficie del mar, el eulitoral queda comprendido entre las pleamar y bajamar máximas (emergido 2 veces al día) y supralitoral a la franja costera que queda por encima del nivel máximo de pleamar, donde generalmente alcanza la salpicadura de las olas (Haroun et al., 2003). De esta forma, los organismos bentónicos que están presentes en la rasa de mareas (eulitoral) se agrupan en bandas más o menos horizontales o bien quedan en el interior de los charcos durante la bajamar. En este sentido, las distintas especies de macroalgas forman cinturas de vegetación, con colores distintivos, colocándose en el nivel adecuado a sus exigencias fisiológicas y ecológicas, prueba de ello fueron las zonas de muestreo de este trabajo (Fig.1.1.).

En una misma localidad costera se producen cambios ambientales muy bruscos, debido fundamentalmente a la acción de las mareas y a las variaciones de la radiación solar (ver Tabla 1.1.). Pero la distribución en franjas no se debe sólo a los requerimientos de luz, sino además a los altos niveles de nutrientes que vienen del

continente y que se depositan en los sustratos someros (Dawes, 1986; Thomas et al., 1987).

Tabla 1.1. Factores ambientales que afectan a las macroalgas en una rasa eulitoral.

FACTOR AMBIENTAL	GRADIENTE
Viento/ Desecación	Mayor en eulitoral y tendencia a disminuir dentro del sublitoral
Luminosidad	Más intenso en el eulitoral superior
Temperatura	Más intenso en el eulitoral superior
Tipo sustrato	Basáltico, pumítico, callaos, rodolitos, etc.
Desecación	Más intenso en el eulitoral superior
Salinidad	Mayor en el eulitoral superior, cambios bruscos dentro de charcos
Concentración de nutrientes	Cambios bruscos dentro de charcos
Contaminantes	Mayor en el eulitoral superior y medio
Exposición oleaje	Mayor en el eulitoral superior
Predación	Más intenso hacia el eulitoral inferior y sublitoral
Competencia/epifitismo	Más intenso hacia el eulitoral inferior y sublitoral
Herbivoría	Más intenso hacia el eulitoral inferior y sublitoral

Las macroalgas son capaces de absorber grandes cantidades de nitrógeno (N), fósforo (P) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), producen grandes cantidades de oxígeno, y en consecuencia, reducen los procesos de eutrofización. Todos estos factores ambientales no sólo afectan al crecimiento de las algas marinas, también tienen una influencia significativa sobre otros componentes bioquímicos, tales como la pigmentación, la síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes y el sistema de defensa antioxidante (Figuerola et al., 1995; Vincent et al., 2006) entre otros. Los procesos metabólicos básicos de todos los organismos que utilizan oxígeno pueden producir especies reactivas del oxígeno (EROs), estimándose que entre el 2 y el 5 % del oxígeno total consumido se convierte en EROs (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, entre otros) pudiendo ser el origen del daño celular. En términos generales, se asume que la fuente endógena generadora de EROS más importante en la mayoría de las células es la mitocondria (Halliwell y Gutteridge, 1989), cuya principal función es generar energía, siendo la cadena de transporte electrónico el último eslabón de la combustión de los nutrientes para la obtención de energía en forma de ATP. Los peroxisomas, orgánulos responsables de la degradación de ácidos grasos, también pueden originar la formación de radicales libres, produciendo como subproducto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es degradado por la enzima catalasa. Otras fuentes representativas de esta producción son la activación de células fagocitarias y la autooxidación de compuestos de carbono

reducido como son aminoácidos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que dan lugar también a la formación de  $O_2^-$  y óxido nítrico (NO) y de  $O_2^-$  respectivamente, junto con la activación catalítica de diversos enzimas del metabolismo intermediario como la lipoxigenasa, xantina oxidasa y aldehído oxidasa entre otros. Además de los mecanismos oxidativos propios de las células, existen factores de origen exógeno que pueden incrementar el daño oxidativo. En el caso de las algas marinas destacan la radiación UV como principal fuente de EROs y la concentración de ciertos metales pesados (Aguilera et al., 2002; Bischof et al., 2002; Pinto et al., 2003).

En situación patológica o de estrés se incrementan sustancialmente estas especies químicas, provocando una alteración orgánica conocida como estrés oxidativo. Si bien las macroalgas soportan multitudinarios factores endógenos y exógenos de estrés oxidativo, también poseen numerosos sistemas de defensa antioxidante regulables, enzimáticos y no enzimáticos (Fujimoto, 1990). Se sugiere que la ausencia de daño oxidativo en los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) estructurales de las membranas tilacoidales, a pesar de la proximidad del oxígeno producido durante la fotosíntesis, y su estabilidad frente a determinadas condiciones adversas, se deben a los fuertes sistemas antioxidantes que han desarrollado en respuesta a las condiciones altamente oxidativas en que viven (Burrit et al., 2002; Matsukawa et al., 1997). Esto a su vez pudiera condicionar junto con otros factores de estrés como son los predadores a la biosíntesis de metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes. Las EROs pueden atacar directamente los lípidos de las membranas o iniciar un proceso autocatalítico más dañino: la peroxidación lipídica tal y como se ha indicado anteriormente, y en este sentido, otro elemento a favor que presentan las algas marinas es su bajo contenido lipídico (Aruoma et al., 2003).

Los compuestos identificados en las algas implicados en la actividad antioxidante tal y como muestran numerosos trabajos principalmente son, la clorofila y derivados, carotenoides, vitaminas E y C, la fucoxantina, enzimas, aminoácidos tipo micosporina, polisacáridos y polifenoles, siendo éstos últimos compuestos de naturaleza fenólica (ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, y taninos entre otros) los más reconocidos por su actividad antioxidante (Dunlap et al., 1995; Nishida et al., 1996; Anggadiredja et al., 1997; Le Tutour, 1998; Algorythme, 2000; Xue et al., 2001; Jiménez-Escrig et al., 2001; Huang et al., 2005; Zubia et al., 2007; De la Coba et al., 2009). Los niveles de estos compuestos están presentes en cantidades variables en función del phylum y son influenciados principalmente por factores medioambientales o en algunos casos por la situación biogeográfica.



Figura 1.1. Imágenes de macroalgas recogidas en dos zonas de muestreo: Playa de Jinámar y Hoya del Pozo.

En relación a los aspectos tecnológicos relacionados con la obtención de los extractos (destilación molecular, extracción con fluidos supercríticos, el uso de ultrasonidos) y solventes utilizados para la valoración de la capacidad antioxidante en vegetales es variable en funciones de los distintos autores (Nakatani et al., 1984; Albu et al., 2004). En el campo de las algas, en la gran mayoría de trabajos se emplean extractos crudos. Una vez obtenidos los extractos, y como criterio general, las características esenciales de cualquier prueba de evaluación de capacidad antioxidante son: un sustrato adecuado en el cual pueda ser monitoreada la inhibición de la oxidación, un indicador de oxidación (radical libre) y una adecuada medición del punto final de oxidación, que puede llevarse a cabo por métodos químicos, instrumentales o sensoriales (Arnao et al., 1999; Robards et al., 1999). Actualmente existen diversos métodos para evaluar actividad antioxidante (Brand-Williamset al., 1995; Antolovich et al., 2002) ya sean *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto o extracto, consiste en determinar la actividad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración (Arena et al. 2001; Moyer et al., 2002). No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*.

## 1.2. OBJETIVOS

El propósito del presente capítulo se centra en el estudio de la actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de algas marinas del litoral canario de las divisiones Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta. Los ensayos realizados han sido valoraciones primarias directas, ya que buscamos una actividad bioespecífica en un gran número de extractos de macroalgas, lo que conlleva los siguientes planteamientos experimentales:

- Evaluación cuantitativa de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos e hidroalcohólicos obtenidos a partir de algas marinas del litoral canario mediante (1) el método de DPPH obteniendo así el porcentaje de barrido de radicales libres de los extractos y, (2) el ensayo del poder reductor.
- Determinar el contenido cuantitativo de polifenoles en las diferentes especies de macroalgas recolectadas de la naturaleza.
- Valoración del contenido en pigmentos lipofílicos (clorofila y carotenoides totales) e hidrofílicos (ficoeritrina).
- Estudio de la relación carbono nitrógeno de las especies recolectadas de su medio natural.
- Análisis de la correlación entre la actividad antioxidante detectada mediante los métodos de barrido de radicales libres y poder reductor y el contenido de las sustancias cuantificadas (polifenoles y pigmentos liposolubles e hidrosolubles).

### HIPÓTESIS

**La actividad antioxidante de las algas se relaciona con el gradiente batimétrico en el sistema intermareal , esperando más actividad en las algas sometidas a mayor estrés (alta radiación solar tanto PAR como UV , elevadas temperaturas, desecación, mayor hidrodinamismo o mayor presión herbívora).**

### 1.3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

##### 1.3.1.1. Recolección de las especies

Las especies de macroalgas estudiadas fueron recolectadas de poblaciones naturales en varios puntos de las zonas Norte (N) y Este (E) del litoral de la isla de Gran Canaria (Fig. 1.2., Tabla 1.2). El criterio de selección de las especies se basó en su disponibilidad anual y su abundante presencia en las zonas de recogida.

Tabla 1.2. Especies de macroalgas estudiadas, lugar de localización, coordenadas así como la rasa eulitoral donde se recolectaron, (Abrev, abreviatura).

Especies	Abrev	Lugar de recolección	Coordenadas	Rasa eulitoral
<b>CHLOROPHYCEAE</b>				
Bryopsidales <i>Codium intertextum</i> Collins et Hervey	<i>Ci</i>	Hoya del Pozo(E)	28° 00' 00.92" N 15° 22' 29.70" O	Eulitoral medio
<i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskål) J. Agardh	<i>Cr</i>	Ojos de Garza (E)	27° 57' 05.98" N 15° 22' 50.48" O	Eulitoral inferior
Ulvales <i>Ulva rigida</i> C. Agardh	<i>Ur</i>	Hoya del Pozo(E)	28° 00' 00.92" N 15° 22' 29.70" O	Eulitoral medio
<b>RHODOPHYCEAE</b>				
Gelidiales <i>Pterocladia capillacea</i> (S.G.Gmelin) Santelices et Hommersand	<i>Pc</i>	Hoya del Pozo(E)	28° 00' 00.92" N 15° 22' 29.70" O	Eulitoral medio
Gigartinales <i>Hypnea spinella</i> C. Agardh Kützting	<i>Hs</i>	Hoya del Pozo(E)	28° 00' 00.92" N 15° 22' 29.70" O	Eulitoral medio
Cryptonemiales <i>Grateloupia dichotoma</i> J. Agardh	<i>Gd</i>	Hoya del Pozo(E)	28° 00' 00.92" N 15° 22' 29.70" O	Eulitoral medio
Ceramiales <i>Halopithys incurva</i> (Hudson) Batters	<i>Hi</i>	Playa de Jimanar (E)	28° 01' 57.57" N 15° 23' 52.18" O	Eulitoral inferior
<i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas	<i>Lm</i>	La Furnia (N)	28° 09' 30.21" N 15° 40' 06.76" O	Eulitoral inferior
<b>PHAEOPHYCEAE</b>				
Fucales <i>Fucus spiralis</i> Linnaeus	<i>Fs</i>	Hoya del Pozo (E)	28° 00' 00.92" N 15° 22' 29.70" O	Eulitoral superior
<i>Cystoseira abies-marina</i> (S.Gmelin) C. Agardh	<i>Ca</i>	Arinaga (E)	27° 51' 19.83" N 15° 23' 32.23" O	Eulitoral superior

Los muestreos se realizaron el mes de agosto del año 2004, procurando recolectar el talo entero en buen estado (incluyendo la parte de fijación al sustrato en los casos posibles). La recolección de todas las especies del sistema intermareal, se

llevó a cabo durante la primera bajamar del día a las 7:30 de la mañana, con el fin de que no estuvieran afectadas por factores como alta irradiación y desecación. Se recolectaron un total de diez especies, tres pertenecientes al phylum de las Chlorophytas, cinco pertenecientes al Phylum de las Rhodophytas y 2 al phylum de las Phaeophytas.

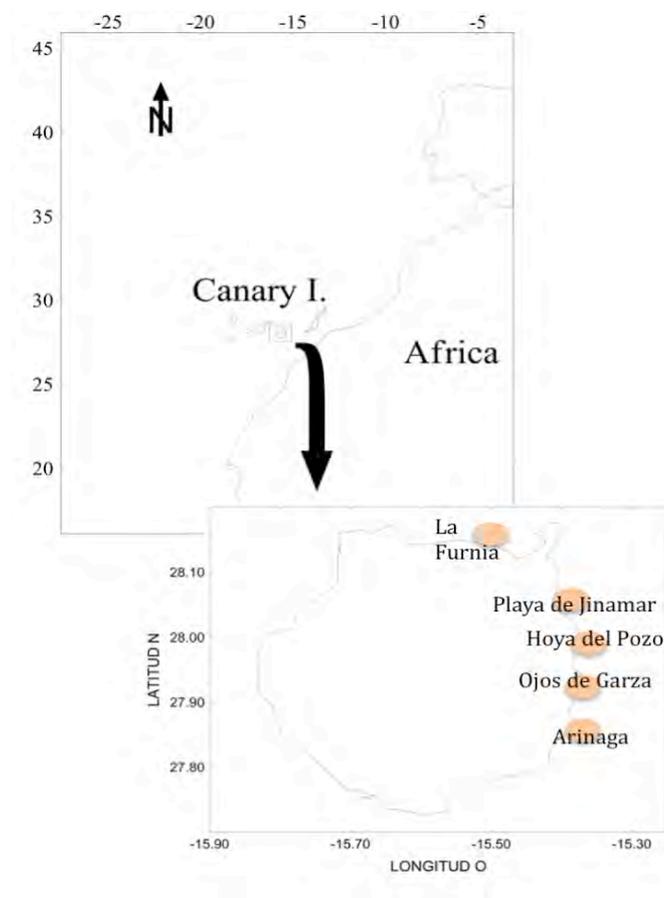


Figura 1.2. Situación geográfica de las Islas Canarias y puntos de muestreo en la isla de Gran Canaria.

A continuación se transportaron hasta el laboratorio en una nevera en oscuridad, donde se procedió a su limpieza, principalmente de epífitos y arena. Tras la identificación taxonómica de las especies, una parte de la biomasa se inoculó para iniciar el proceso de adaptación y posterior cultivo mientras que el resto de la biomasa

se utilizó para análisis tanto en fresco como en seco. En este último caso, la biomasa fue congelada para su posterior liofilización.

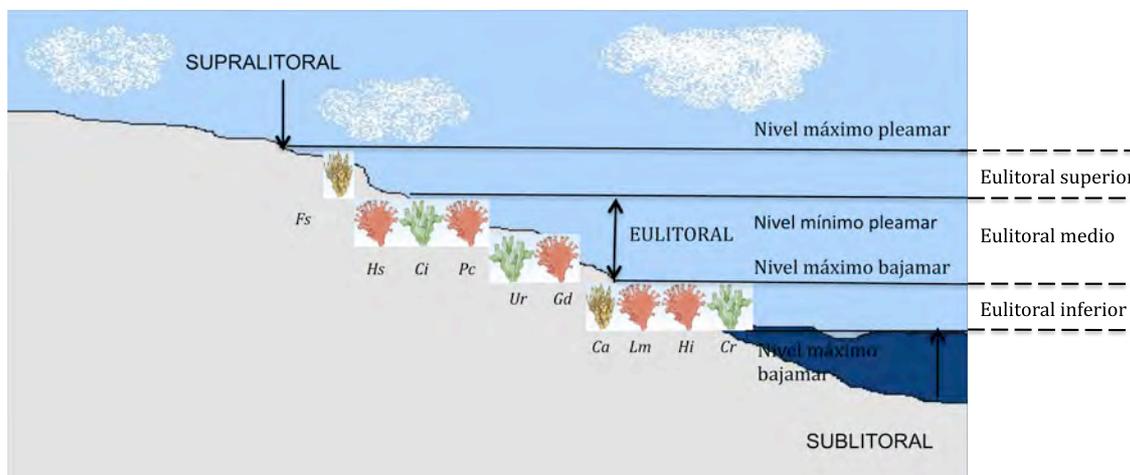


Figura 1.3. Representación esquemática de una rasa eulitoral, en la cual se ha situado el lugar de recogida de las especies estudiadas. Siendo, *Fs*: *Fucus spiralis*, *Hs*: *Hypnea spinella*, *Ci*: *Codium intertextum*, *Pc*: *Pterocladia capillacea*, *Ur*: *Ulva rigida*, *Gd*: *Grateloupia dichotoma*, *Ca*: *Cystoseira abies-marina*, *Lm*: *Laurencia majuscula*, *Hi*: *Halopithys incurva*, *Cr*: *Caulerpa racemosa*

### 1.3.1.2. Descripción de las especies

A continuación se muestra una breve clasificación y una descripción de las características vegetativas y hábitat de las especies (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Descripción taxonómica, vegetativa, habitat e imagen de las especies estudiadas en este trabajo. (Haroun et al., 2003; Mshigeni y Chapman,1987; Cremades et al., 1998).

Género y especie	División	Orden	Familia	Características vegetativas y habitat	Imagen
<i>Ulva rigida</i>	Chlorophyta	Ulvales	Ulvaceae	Alga de color verde oscuro, se caracteriza por presentar talos laminares, de forma orbicular o alargada, con la base gruesa, cartilaginosa y coriácea, en su margen posee abundantes denticulaciones. Se caracteriza por presentar un crecimiento parenquimatoso. Frecuente en el eulitoral y presente en el sublitoral. Abundante en lugares eutrofizados, indicadora de exceso de compuestos nitrogenados.	
<i>Codium intertextum</i>		Bryopsidales	Codiaceae	Talo costroso, de color verde oscuro, de 3-10 mm de grosor, adherido al sustrato pero con márgenes libres, de consistencia compacta y con crestas cerebriiformes a modo de excrecencias orbiculares. Cubre grandes extensiones rocosas y paredes verticales de ambientes poco iluminados.	
<i>Caulerpa racemosa</i>		Bryopsidales	Caulerpaceae	Talo con ejes postrados y ramas erectas ramificadas, con estolón bien desarrollado hasta 3mm de diámetro; de color verde se fija al sustrato por numerosos rizoides. Existen variedades y formas para Caulerpa racemosa (Caulerpa racemosa var. peltata (J.V.Larouroux) Eubank ; Caulerpa racemosa var. cylindracea (Solder) Weber van Bosse. Se distinguen por las ramulas, la primera presenta reducidas a pequeños discos y la segunda clavadas.	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Rhodophyta	Gelidiales	Gelidiaceae	Talo erecto,ramificado, de morfología variable y hasta 290cm de longitud; de color rojo oscuro, fijo al sustrato. El talo está compuesto por numerosos ejes y ramificación opuesta. Este taxon, de morfología variable en ocasiones puede confundirse con especies de Gelidium con quien comparte situaciones fotófilas en el límite de la marea. También en charcos del nivel inferior del eulitoral.	

Capítulo I

<b><i>Grateloupia dichotoma</i></b>	<b><i>Phaeophyta</i></b>	Cryptonemiales	Cryptonemiaceae	Aplanada con talo erecto de un color rojo pardo de contorno lauceolado, con proliferaciones e irregularmente dicótomas. Las dicotomías apicales son divergentes. Las divisiones basales son más anchas que las apicales. Su estructura es multiaxial y presenta una textura mucilaginoso pero firme. Crece en grietas y paredes del sublitoral.	
<b><i>Hypnea spinella</i></b>		Gigartinales	Hypneaceae	Las algas son tupidas o copetudas. Talo flexible, ejes abundantes e irregularmente ramificados, cilindricos de 1 a 2mm de diámetro frecuentemente con aspecto cervicorne. Ramas y rámulas siempre subcilíndricas., de color claro en la desecación. En charcos del eulitoral y primeros metros del sublitoral.	
<b><i>Halopithys incurva</i></b>		Ceramiales	Rodhomelaceae	Se trata de un alga de consistencia cartilaginosa y frágil, que forma matas muy características, de color rojo oscuro casi negro. Talo de 10-20 cm de longitud. Constituido por ejes cilíndricos, de 1mm de diámetro, provisto de ramas secundarias cortas, del mismo grosor y encurvadas en forma de báculo en el ápice. Se caracteriza por su olor fuerte y peculiar. Sobre sustrato rocoso o pedregoso formando poblaciones densas.	
<b><i>Laurencia majuscula</i></b>		Ceramiales	Rodhomelaceae	Talo erecto, ramificado de 5-7 cm, de color rosado a rojizo, presenta coloración verdosa en algunas partes del talo, principalmente en ápices y partes terminales. Se fija al sustrato por un disco basal; ramificación irregularmente alterna, a veces espiralada, con densa ramificación de último orden. En el litoral inferior y sublitoral.	
<b><i>Fucus spiralis</i></b>		Fucales	Fucaceae	Talo acintado, ramificado dicotómicamente, con nervio patente fijo al sustrato por un disco cónico de 5-25 cm de alto de color marrón oscuro. En sus talos presentan unos abultamientos generalmente terminales (receptáculos) y en su interior desarrollan las células encargadas de la reproducción. Se caracteriza por su ciclo de vida monogenético, es decir, sólo tiene una generación aparente. Forma una franja bien definida en el eulitoral superior.	
<b><i>Cytoseira abies-marina</i></b>	Fucales	Cystoseiraceae	Talo cespitoso, espiniscente, ramificado de hasta 50 cm de alto. De color amarillento, sin disco basal de fijación pero con estirpe rastrero marrón, flexible, con ramificaciones recurvadas. Se extiende formando densas praderas desde el comienzo de sublitoral hasta los 8-10m.		

### 1.3.2. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS

El material limpio y fresco se secó entre pliegos de papel para eliminar el exceso de humedad antes de preparar los extractos (Rao y Parekh, 1981). Para cada extracto se utilizaron 10 g de peso fresco de alga, empleando piezas de talo enteras. Los talos se trocearon y trituraron en un mortero con 150 ml de solvente orgánico metanol puro (extractos metanólicos) y etanol 50%(extractos hidroalcohólicos), en cámara fría y a continuación fueron macerados en recipientes de vidrio forrados con papel de plata en un baño termostático (Grant Instruments Ltd SS40-2). El proceso se llevó a cabo en oscuridad, a  $38 \pm 2$  ° C de temperatura y con agitación constante, durante 3 horas (Fig. 1.5.). Transcurrido este tiempo, los extractos fueron filtrados por una malla de 50 micras y a continuación se centrifugaron (Beckman GS-15 R) durante 10 min a 4 °Ca 4000 rpm.

Por último el sobrenadante obtenido fue concentrado en un rotavapora una temperatura constante de 38°C (Büchi R-210 conectado a una bomba de vacío Büchi V-700) (Fig.1.4.) hasta llegar a una concentración 1:10. Finalmente los extractos obtenidos fueron almacenados en frascos de color ámbar en un congelador a -20 ° C hasta su utilización en los análisis correspondientes.



Figura 1.4. Equipo utilizado para preparar los extractos, Rotavapor Büchi V-700 y extractos obtenidos de *Halopithys incurva*.

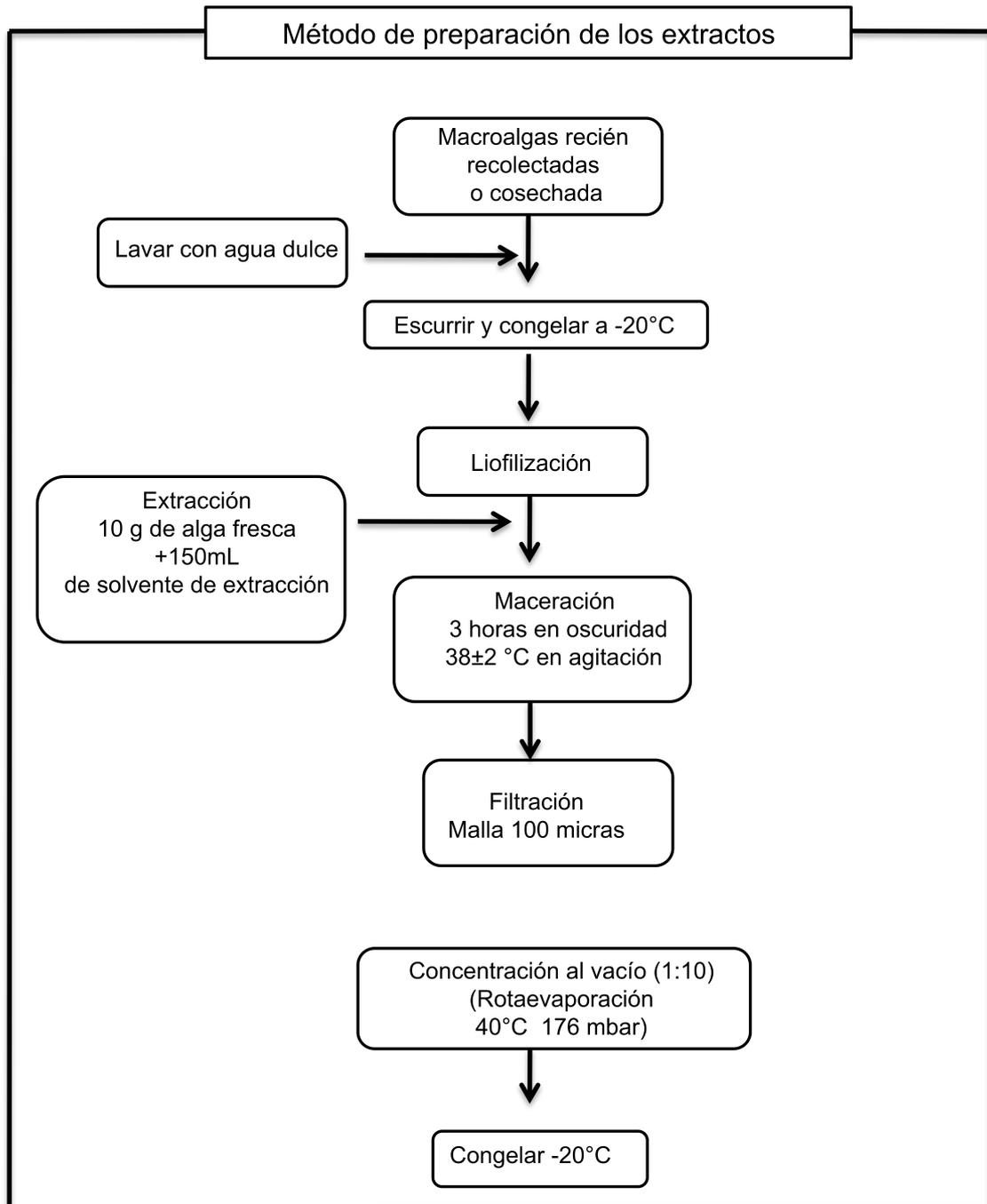
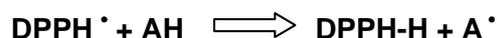


Figura 1.5. Esquema del procedimiento de preparación de extractos

### 1.3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### 1.3.3.1. Estudio de la actividad antiradical (Ensayo DPPH)

El DPPH• o 1,1-difenil-2-picrilhidracil es un radical libre estable aceptante de hidrógeno. Los compuestos antioxidantes presentes en los extractos de alga que pueden donar un hidrógeno reducirán el DPPH. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antiradical se muestra con la siguiente ecuación:



Donde **AH** es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción de oxidación en cadena. El nuevo radical formado **A•** puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). La reacción entre el DPPH• y un compuesto depende de la conformación estructural del mismo, por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son indicativas. El radical DPPH tiene una coloración púrpura con un máximo de absorbancia a 517 nm y genera un producto amarillo pudiendo llegar a incoloro cuando una molécula antioxidante reacciona con el radical proporcionándole átomos de hidrógeno o electrones.

#### Protocolo

El barrido de radicales libres de los extractos de macroalgas se determinó utilizando el método basado en la reducción del radical libre estable DPPH, según el método de Blois (1958) tal y como se detalla a continuación (Fig. 1.6.). Se preparó una solución de DPPH (0.36mM) en metanol al 90% y a continuación se le añadieron 300µl del extracto de macroalgas. Antes de la lectura de absorbancia 517nm se utilizó un periodo de incubación de 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Todas las pruebas y análisis se realizaron por triplicado. Como referencia, se emplearon cinco los compuestos antioxidantes comerciales BHT, la vitamina E, ácido ascórbico, floroglucinol y el propil galato proporcionados por Sigma. El porcentaje de radicales libres atrapados por los extractos de las algas o inhibición de DPPH se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = (1 - (\text{absorbancia (muestra)} / \text{absorbancia (control)})) * 100$$

Con los porcentajes de inhibición y la concentración se calculó la concentración inhibitoria del 50% (EC 50), expresada como  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de los extractos y de los antioxidantes comerciales ácido ascórbico y propil galato (1-0.1 mM).

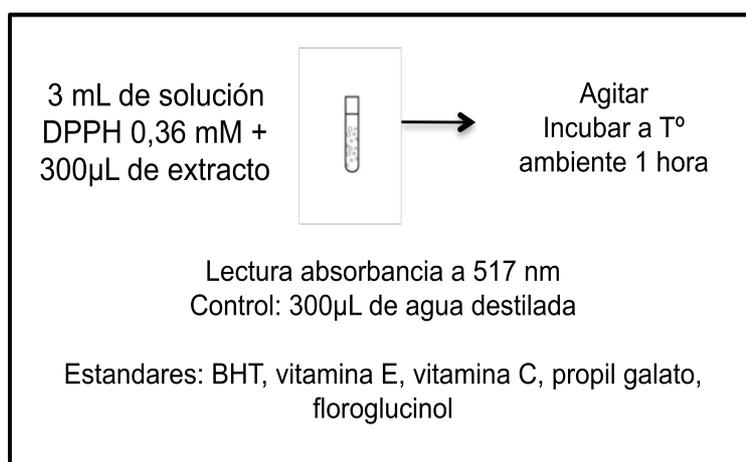


Figura 1.6. Protocolo del Ensayo DPPH.

### 1.3.3.2. Poder reductor

La determinación del poder reductor permite estudiar la capacidad que tienen ciertas biomoléculas de actuar como donadores de electrones (y protones) en reacciones metabólicas de óxido-reducción. El poder reductor se fundamenta en la reducción del ferricianuro a ferrocianuro y en la posterior formación del ferricianuro ferrico en medio ácido. El método se basa en la capacidad de una sustancia antioxidante para reducir mediante la formación de un complejo azul. El aumento de la absorbancia de la mezcla de reacción a 700nm indica un aumento del poder reductor.

#### Protocolo

La determinación del poder reductor de los extractos se realizó según Yen y Chen (1995) con algunas modificaciones (Fig. 1.7.). Se homogeneizaron 1 ml de la muestra a analizar con 2.5 ml de tampón fosfato 0.2 M, pH 6.6 y 2.5 ml ferricianuro potásico 1%. A continuación se incubó la mezcla de reacción a 50 °C durante 30 minutos, en un baño termostático. Transcurrido este tiempo y un vez alcanzada la temperatura ambiente, se añadieron 2.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) y

se centrifugó la mezcla a 3000 rpm durante 10 min. Por último, se homogeneizaron 2.5 ml del sobrenadante con 2.5 ml de agua destilada y 0.5 ml de cloruro férrico 0.1%. La absorbancia fue medida a 700 nm. Como estándar se utilizó ácido ascórbico (AA). La actividad reductora de los extractos se expresó como equivalentes de ácido ascórbico mediante una curva de calibración.

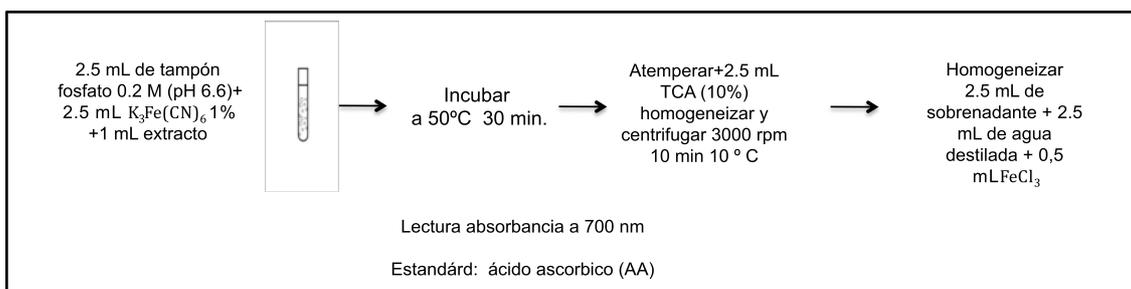


Figura 1.7. Protocolo del método del poder reductor.

### 1.3.4.DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La determinación del contenido en polifenoles se realizó en extractos hidroalcohólicos de las diez especies mediante el método colorimétrico de Folin- Ciocalteu (1927). El reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con los ciclos aromáticos de los compuestos fenólicos. En presencia de compuestos fenólicos y tras la reacción, produce una coloración azul cuya absorbancia se mide al espectrofotómetro a 700 nm. Los extractos de macroalgas (100 $\mu$ l) se diluyeron en 650  $\mu$ l de agua destilada. A continuación se añadieron 50  $\mu$ l de reactivo de Folin- Ciocalteu y  $Na_2CO_3$  4% (p/v). La reacción se mantuvo a 70°C con agitación durante 10 min. Antes de la lectura a 700nm se esperó a que enfriaran y se homogeneizaron las muestras. La concentración del extracto en compuestos fenólicos totales se determinó a continuación en comparación con una curva patrón de floroglucinol (0 a 20  $\mu$ l.ml<sup>-1</sup>) y se expresó en porcentaje de masa seca (Fig. 1.8.).

El contenido de polifenoles se determinó también utilizando este método, pero tratando previamente las muestras con el polímero insoluble PVPP que se une específicamente a los compuestos polifenólicos disueltos en medio ácido, quedando la mayoría de los fenoles simples en solución (Yates y Peckol, 1993). Este tratamiento proporciona un medio para medir con exactitud la concentración de polifenoles, ya que el reactivo Folin-Ciocalteu reacciona con otros compuestos además de los polifenoles, como son aminoácidos y proteínas. Por tanto midiendo la concentración de polifenoles

por el método colorimétrico Folin-Ciocalteuantes y después del tratamiento con PVPP se obtiene la concentración de polifenoles por diferencia.

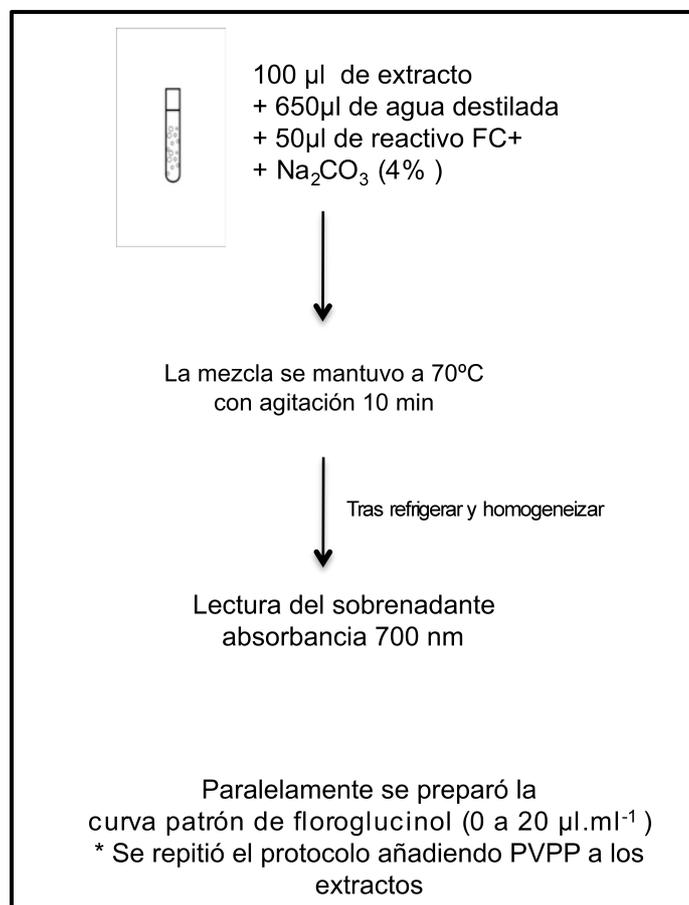


Figura 1.8. Protocolo del método Folin-Ciocalteu.

### 1.3.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS

#### 1.3.5.1. Obtención de los extractos

La extracción de clorofila a, b (dependiendo de la especie) y carotenoides se realizó homogeneizando 0.1 g de tejido en 4 ml de metanol 100%. El extracto se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min y se cuantificó el sobrenadante espectrofotométricamente. Se prepararon extractos por triplicado para cada especie (Fig. 1.9.).

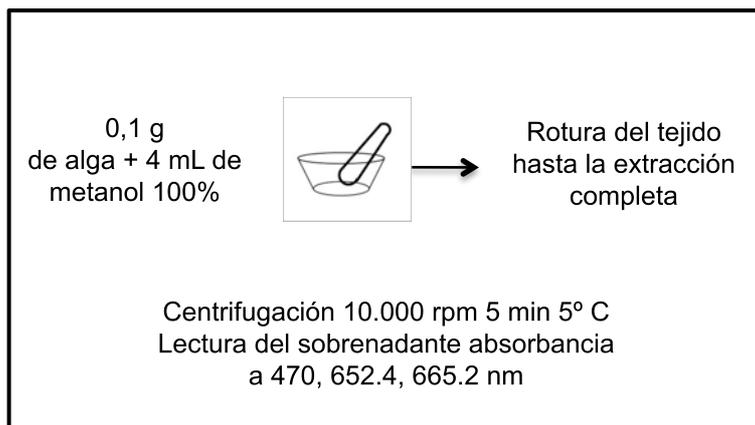


Figura 1.9. Protocolo de la cuantificación de pigmentos liposolubles.

La preparación de extractos para medir la concentración de ficoeritrina se realizó homogeneizando 0.1 g de tejido en 3 ml de tampón fosfato (pH 6.0). El extracto se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min y se cuantificó el sobrenadante espectrofotométricamente. Se prepararon extractos por triplicado para cada especie (Fig. 1.10.).

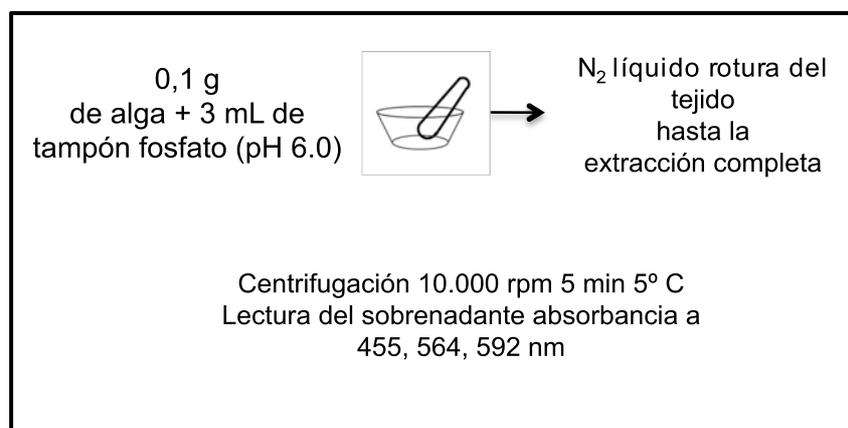


Figura 1.10. Protocolo de la cuantificación de pigmentos hidrosolubles.

### 1.3.5.2. Determinación de pigmentos liposolubles

La concentración de clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides de las algas verdes se calculó de acuerdo a las ecuaciones de Wellburn (1983):

$$C_{la} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4}$$

$$C_{lb} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2}$$

$$C_{x+c} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 1.63 C_{la} - 104.96 C_{lb}) / 221$$

Donde  $C_{x+c}$  representa los carotenoides totales y  $A_{470}$ ,  $A_{652.4}$  y  $A_{665.2}$  es la absorbancia a 470, 652.4 y 665.2 nm respectivamente.

Para determinar la concentración de clorofila *a*, *b* y carotenoides normalizada a peso fresco se aplicó la siguiente ecuación:

$$Cl a (\mu g \cdot g \text{ PS}^{-1}) = (\mu g \text{ Cl } a \cdot mL^{-1}) \cdot V \text{ (ml)} \cdot p(g \text{ PS}^{-1})$$

$$Cl b (\mu g \cdot g \text{ PS}^{-1}) = (\mu g \text{ Cl } b \cdot mL^{-1}) \cdot V \text{ (ml)} \cdot p(g \text{ PS}^{-1})$$

$$C (\mu g \cdot g \text{ PS}^{-1}) = (\mu g C_{x+c} \cdot mL^{-1}) \cdot V \text{ (ml)} \cdot p(g \text{ PS}^{-1})$$

Donde *V* es el volumen del extracto y *p* es el peso de tejido utilizado.

### 1.3.5.3. Determinación de pigmentos hidrosolubles

La concentración de ficoeritrina (FE) se calculó de acuerdo a las ecuaciones de Sven Beer y Eshell (1985):

$$FE \text{ (mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \cdot 0.2] \cdot 0.12$$

Donde  $A_{455}$ ,  $A_{564}$  y  $A_{592}$  es la absorbancia a 455, 564 y 592 nm respectivamente.

Para determinar la concentración de ficoeritrina (FE) normalizada a peso fresco se aplicó la siguiente ecuación:

$$(\text{mg FE} \cdot \text{g PS}^{-1}) = (\mu g \text{ FE} \cdot \text{mL}^{-1}) \cdot V \text{ (ml)} \cdot p(g \text{ PS}^{-1})$$

Donde *V* es el volumen del extracto y *p* es el peso de tejido utilizado para el análisis.

### 1.3.6. DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN PESO SECO/PESO FRESCO

Para la determinación la relación PS/PF o contenido en humedad de las algas, primero se le eliminó el exceso de agua con ayuda de papel de filtro, se pesaron y se secaron en estufa a una temperatura de 90° C hasta obtener un peso seco constante, (ver Tabla 1.4.).

Tabla 1.4. Relación peso seco-peso fresco de las especies de macroalgas estudiadas.

Especie	PS/PF
<i>Ulva rigida</i>	0,15
<i>Caulerpa racimosa</i>	0,06
<i>Codium intertextum</i>	0,11
<i>Pterocladia capillacea</i>	0,32
<i>Hypnea spinella</i>	0,15
<i>Grateloupia dichotoma</i>	0,23
<i>Halopithys incurva</i>	0,23
<i>Laurencia majuscula</i>	0,10
<i>Fucus spiralis</i>	0,20
<i>Cystoseira abies marina</i>	0,18

### **1.3.7. ANÁLISIS DE CARBONO Y NITRÓGENO**

El N total y C total de las especies de macroalgas previamente liofilizadas se determinó por combustión mediante un analizador CHN (Perkin Elmer 2400 CHN Elemental Analyzer). La técnica consistió en pesar una muestra en cápsulas de estaño, sellarla e introducirla en una cámara de reacción la cual trabaja con un exceso de oxígeno. A 960°C aproximadamente se mineralizó el material.

### **1.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los valores representados corresponden a valores medios±desviación estandard de las réplicas realizadas para cada ensayo. Se realizó un contraste de medias mediante una prueba de análisis de varianzas (ANOVA). Algunos resultados además se analizaron aplicando la comparación de medias mediante en test de Tukey B. El nivel de significación fue del 95% ( $\alpha=0.05$ ) en todos los casos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS para MAC OS X.

## **1.4. RESULTADOS**

### **1.4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

#### **1.4.1.1. Ensayo DPPH**

Los valores de % de barrido del radical libre en el conjunto de los extractos oscilaron entre un máximo de 93.02% para el extracto metanólico de *H.incurva* y un mínimo de 13.2% para el extracto hidroalcohólico de *H.spinella*, sin incluir los extractos metanólicos de *U.rigida*, *H.spinella* y *G.dichotoma* para los que no se detectó actividad. Las mayores actividades antioxidantes, superiores al 90% de barrido y significativamente superiores al resto de los extractos ensayados ( $p<0.05$ , según el test Tukey B), se detectaron en el alga roja *H.incurva* y en las pardas *F.spiralis* y *C.abies-marina*, siendo los valores de las actividades detectadas independientemente de la polaridad del solvente empleado. Dentro de las especies de algas rojas todos los extractos hidroalcohólicos mostraron actividad antioxidante, con valores máximos para *H.incurva* (93%), seguidos de *Grateloupia dichotoma* y *Pterocladia capillacea* (49% y 40% respectivamente) y mínimos para *H.spinella* (15%). Sin embargo, sólo se detectó actividad en los extractos metanólicos de las especies *P.capillacea* y *H.incurva*, siendo la actividad de ésta última (90%) casi cinco veces superior.

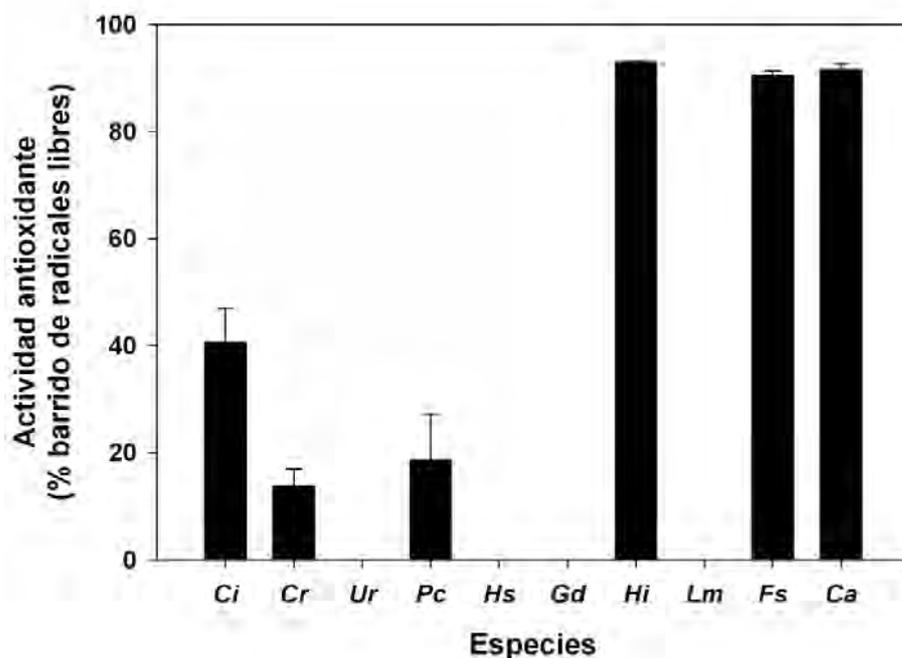


Figura 1.11. Actividad antioxidante (% barrido del radical libre ) detectado en extractos metanólicos de macroalgas (media  $\pm$  desv, n=3). Las especies se representan mediante las siguientes iniciales, Ci: *Codium intertextum*, Cr: *Caulerpa racemosa* Ur: *Ulva rígida*, Pc: *Pterocladia capillacea*, Hs: *Hypnea spinella*, Gd: *Grateloupia dichotoma*, Hi : *Halopithys incurva*, Lm: *Laurencia majuscula*, Fs : *Fucus spiralis*, Ca: *Cystoseira abies-marina*.

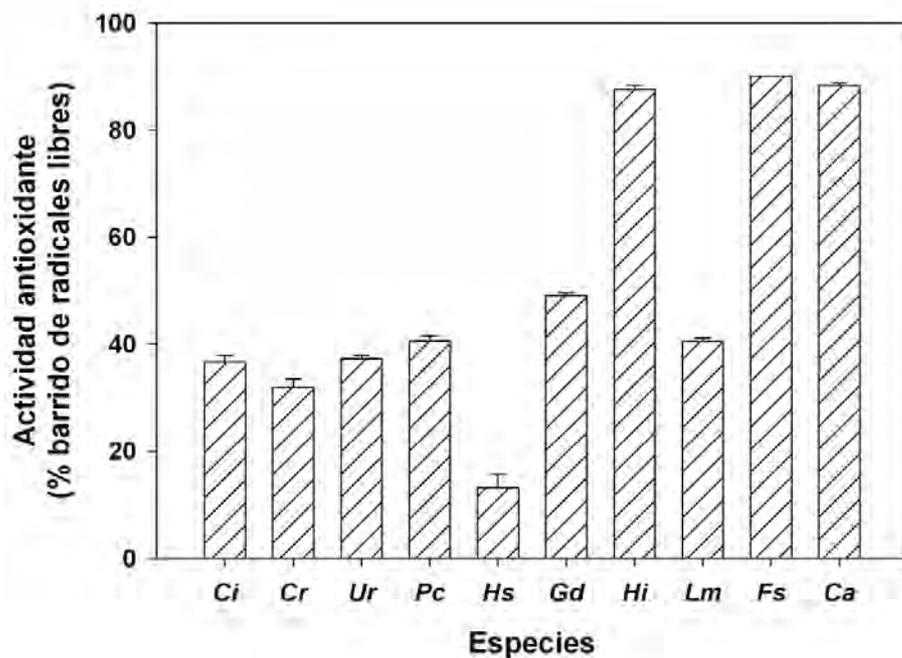


Figura 1.12. Actividad antioxidante (% barrido del radical libre ) detectado en extractos hidroalcohólicos de macroalgas (media  $\pm$  desv, n=3). Las especies se representan mediante las siguientes iniciales, Ci: *Codium intertextum*, Cr: *Caulerpa racemosa* Ur: *Ulva rígida*, Pc: *Pterocladia capillacea*, Hs: *Hypnea spinella*, Gd: *Grateloupia dichotoma*, Hi : *Halopithys incurva*, Lm: *Laurencia majuscula*, Fs : *Fucus spiralis*, Ca: *Cystoseira abies-marina*.

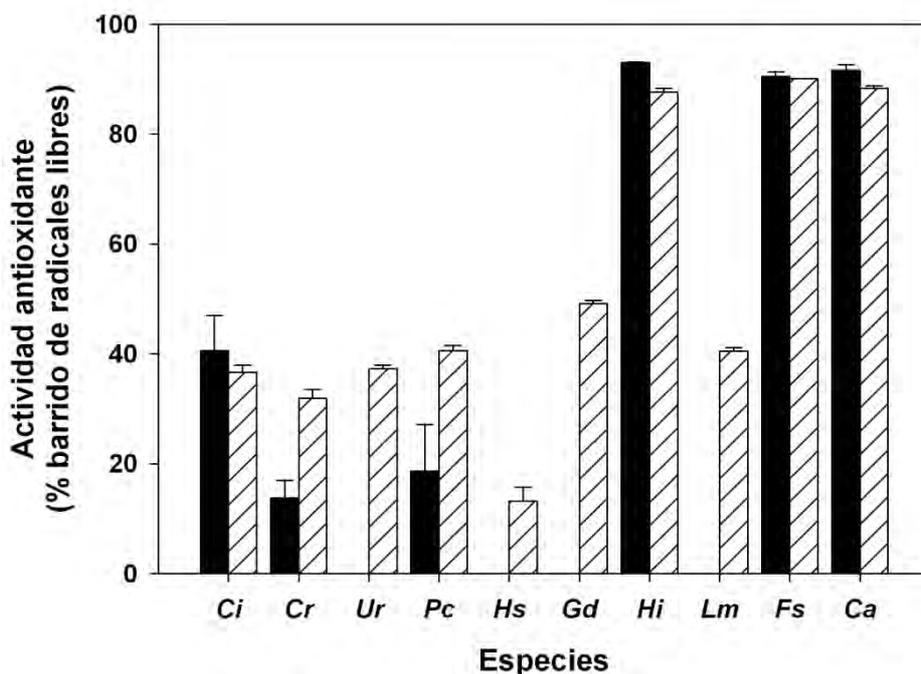


Figura 1.13. Comparativa entre la actividad antioxidante (% barrido del radical libre) detectados sobre el radical libre DPPH• de los extractos metanólicos (■) e hidroalcohólicos (▨) de macroalgas (media ± desv, n=3). Las especies se representan mediante las siguientes iniciales, Ci: *Codium intertextum*, Cr: *Caulerpa racemosa* Ur: *Ulva rígida*, Pc: *Pterocladia capillacea*, Hs: *Hypnea spinella*, Gd: *Grateloupia dichotoma*, Hi: *Halopithys incurva*, Lm: *Laurencia majuscula*, Fs: *Fucus spiralis*, Ca: *Cystoseira abies-marina*.

En los extractos metanólicos de las especies pertenecientes a la división Chlorophyta sólo se encontró actividad en extractos de *Codium intertextum* (40%) y *Caulerpa racemosa* (12%), mientras en el caso de los extractos hidroalcohólicos las tres especies mostraron una actividad similar, cercana al 40%. La actividad antioxidante de los antioxidantes comerciales propilo galato, vitamina E, vitamina C, BHT y floroglucinol también se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Estos resultados (Fig.1.14) mostraron que el propilo galato y el ácido ascórbico tienen una alta actividad 95.68% y 96.44 % respectivamente, equivalente a la encontrada para las especies *H. incurva*, *F. spiralis* y *C. abies-marina*, seguido de el floroglucinol, 69.34%. En cambio la vitamina E y el antioxidante comercial BHT muestran valores más bajos, 37.73% y 28.7 % respectivamente. Los valores de actividad antioxidante medidos en estos dos compuestos comerciales son similares o incluso inferiores a los detectados en los extractos hidroalcohólicos de la mayoría de las especies analizadas.

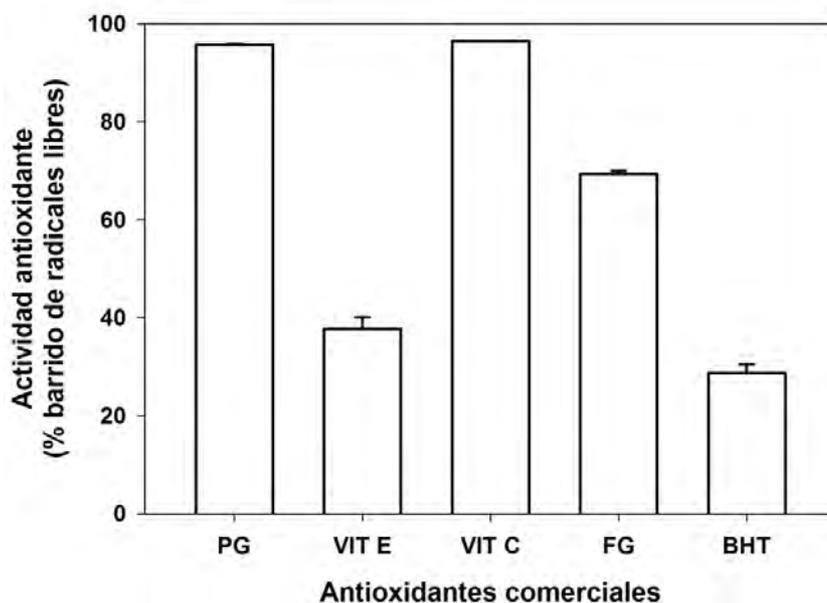


Figura 1.14. Barrido de radicales libres (%) de antioxidantes comerciales (media  $\pm$  desv, n=3) propilo galato (PG), vitamina E (VIT E), ácido ascórbico (VIT C), floriglucinol (FG), (BHT) sobre el radical DPPH.

La actividad del barrido del radical DPPH, expresada como EC50 (mg·ml<sup>-1</sup>), en especies pertenecientes a los phylum Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta mostraron también diferencias significativas entre los distintos extractos (p<0.05). *Cystoseira abies-marina* (en ambos extractos) y *Caulerpa racemosa* (en extracto ETOH 50%) exhibieron la mayor actividad con una EC50 muy baja 1.97  $\pm$  0.03, 2.03  $\pm$  0.01 y 1.88  $\pm$  0.03 mg·ml<sup>-1</sup> respectivamente. Seguido de los extractos de *F. spiralis* 2.21  $\pm$  0.02 y 2.22  $\pm$  0.00 mg·ml<sup>-1</sup> respectivamente.

Tabla 1.5. Resultados de la capacidad antioxidante expresados como EC50 (mg·ml<sup>-1</sup>) de los extractos de especies de macroalgas metanólicas (METOH) e hidroalcohólicas (ETOH 50%) (media  $\pm$  desv, n=3). Las letras indican las diferencias significativas (p<0.05, ANOVA, test de Tukey B).

Especies	EC50 (mg·ml <sup>-1</sup> )	
	Extracto METOH	Extracto ETOH 50%
<i>C. intertextum</i>	2.75 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	3.00 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
<i>C. racemosa</i>	4.64 $\pm$ 0.91 <sup>c</sup>	<b>1.88 <math>\pm</math> 0.03<sup>a</sup></b>
<i>U. rígida</i>	-	4.02 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>
<i>P. capillacea</i>	19.27 $\pm$ 7.10 <sup>d</sup>	7.90 $\pm$ 0.04 <sup>e</sup>
<i>H. spinella</i>	-	11.68 $\pm$ 1.19 <sup>f</sup>
<i>G. dichotoma</i>	-	4.69 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
<i>H. incurva</i>	<b>2.47 <math>\pm</math> 0.01<sup>b</sup></b>	2.62 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
<i>L. majuscula</i>	-	2.48 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
<i>F. spiralis</i>	<b>2.21 <math>\pm</math> 0.02<sup>b</sup></b>	2.22 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
<i>C. abies-marina</i>	<b>1.97 <math>\pm</math> 0.03<sup>a</sup></b>	2.03 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>

Los extractos de las especies rojas *H.incurva* (en ambos extractos) y *L. majuscula* exhibieron también una alta actividad de barrido de radicales libres  $2.47 \pm 0.01$ ,  $2.62 \pm 0.02$  y  $2.48 \pm 0.01$  mg·ml<sup>-1</sup> respectivamente. Los antioxidantes comerciales mostraron una actividad significativamente superior ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B) que las especies de algas. Con valores de EC50 muy baja, en el caso del ácido ascórbico  $0.06 \pm 0.01$  mg·ml<sup>-1</sup> seguido del propil galato  $0.15 \pm 0.19$  mg·ml<sup>-1</sup>. ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B).

#### 1.4.1.2. Poder reductor

En la Tabla 1.6. se presenta, de modo resumido, los valores de poder reductor obtenidos para de las especies estudiadas en los diferentes extractos preparados, metanólicos e hidroalcohólicos, referidos a equivalentes de ácido ascórbico.

Los resultados muestran las mayores actividades antioxidantes, evaluadas mediante el método poder reductor, corresponden a los extractos hidroalcohólicos de *H. incurva*, con una actividad equivalente a  $53.15 \mu\text{g AA mg}^{-1}$ . Estos valores son significativamente superiores a los encontrados para las especies pardas *C. abies marina* y *Fucus spiralis*, cuyas actividades fueron un 53% y un 63% menores respectivamente.

Tabla 1.6. Resultados obtenidos mediante el método poder reductor en los extractos (metanólicos e hidroalcohólicos) correspondientes a las especies estudiadas (media  $\pm$  desv, n=3). Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B).

Especies	Poder reductor ( $\mu\text{g AA mg}^{-1}$ )	
	Metanólicos	Hidroalcohólicos
<i>C. intertextum</i>	$0.28 \pm 0.01^a$	$3.04 \pm 0.09^d$
<i>C. racemosa</i>	$1.53 \pm 0.01^c$	$3.77 \pm 0.09^d$
<i>U. rigida</i>	$1.40 \pm 0.10^c$	$5.31 \pm 0.04^e$
<i>P. capillacea</i>	$0.37 \pm 0.04^b$	$1.03 \pm 0.01^a$
<i>H. spinella</i>	$0.39 \pm 0.06^b$	$1.25 \pm 0.01^a$
<i>G. dichotoma</i>	$0.19 \pm 0.01^a$	$2.49 \pm 0.02^c$
<i>H.incurva</i>	<b><math>24.28 \pm 0.024^f</math></b>	<b><math>53.15 \pm 1.68^h</math></b>
<i>L. majuscula</i>	$1.69 \pm 0.07^c$	$1.74 \pm 0.01^b$
<i>F. spiralis</i>	$4.12 \pm 0.45^e$	<b><math>19.82 \pm 0.42^f</math></b>
<i>C. abies-marina</i>	$2.72 \pm 0.28^d$	<b><math>24.80 \pm 0.25^g</math></b>

La actividad antioxidante detectada en los extractos hidroalcohólicos del resto de las especies fue muy baja comparada con los valores mencionados, con valores máximos de  $5.31 \mu\text{g AA mg}^{-1}$  de equivalentes del AA para la especie *U.rigida* (Tabla

1.6). Los extractos metanólicos de *C. intertextum* y *G. Dichotoma* resultaron ser significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ). En los extractos metanólicos el patrón de actividad fue similar al de extractos hidroalcohólicos, aunque los valores encontrados fueron significativamente inferiores, encontrando máximos de  $24.28 \mu\text{g mg}^{-1}$  equivalente al AA para *H. incurva*, seguidos de 4.12 y 2.72 para *F. spiralis* y *C. abies-marina*, respectivamente.

## 1.4.2. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES ANTIOXIDANTES DE LAS ALGAS

### 1.4.2.1. Determinación de compuestos fenólicos totales

Los resultados anteriores (1.3.1), dieron pie a la búsqueda de los componentes de los extractos posiblemente responsables de las propiedades antioxidantes detectadas. Así, este ensayo muestra que las diez especies estudiadas en los ensayos de actividad antioxidante, mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el contenido de compuestos fenólicos totales mediante el método Folin-Ciocalteu. De todas las especies estudiadas *Halopithys incurva* presentó el contenido más alto en compuestos fenólicos totales, 4.86 % de su peso seco, mientras que los valores más bajos entre las especies recolectadas se observaron en *Grateloupia dichotoma* 0.73 % (Tabla 1.7.).

Tabla 1.7. Contenido de polifenoles totales valorado mediante el método FC y con el tratamiento PVPP ambos valorados mediante el método FC en los extractos de las diez especies de macroalgas expresado como % de peso seco y expresado(–)no detectado (media  $\pm$  desv,  $n=3$ ). Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B).

Especies	Compuestos fenólicos totales (% peso seco)	Compuestos fenólicos totales (% peso seco) PVPP
<i>C.intertextum</i>	$1.10 \pm 0.01^c$	-
<i>C.racemosa</i>	<b><math>2.26 \pm 0.04^e</math></b>	-
<i>U.rigida</i>	$1.07 \pm 0.00^c$	-
<i>P.capillacea</i>	$0.84 \pm 0.00^b$	-
<i>H.spinella</i>	$0.75 \pm 0.00^a$	-
<i>G.dichotoma</i>	$0.73 \pm 0.02^a$	-
<i>H.incurva</i>	<b><math>4.86 \pm 0.00^h</math></b>	<b><math>1.46 \pm 0.00^a</math></b>
<i>L.majuscula</i>	$1.52 \pm 0.01^d$	-
<i>F.spiralis</i>	<b><math>3.07 \pm 0.00^f</math></b>	<b><math>2.19 \pm 0.00^b</math></b>
<i>C.abies-marina</i>	<b><math>3.90 \pm 0.00^g</math></b>	<b><math>3.15 \pm 0.00^c</math></b>

También destacan los valores encontrados en las especies pardas *F.spiralis* y *C.abies-marina*,  $3.07 \pm 0.00$  y  $3.90 \pm 0.00$  % de peso seco respectivamente. Entre las especies de algas verdes *C.racemosa* presentó el contenido más alto  $2.26 \pm 0.04$  % de peso seco. Al añadir PVPP a los extractos, sólo en las especies pardas (*Fucus* y *Cystoseira*) y una especie roja (*Halopithys*) se detectó contenido en compuestos fenólicos. Siendo la especie parda *Cystoseira abies-marina* la que mostró el contenido más alto en polifenoles aplicando el tratamiento con PVPP, 3.15% de su peso seco.

#### 1.4.2.2. Cuantificación de pigmentos

##### 1.4.2.2.1. Pigmentos liposolubles: Clorofila a, b y carotenoides

La cuantificación de los pigmentos liposolubles, clorofila a, b y carotenoides totales, expresados como  $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$  (Tabla 1.8). Las cuales presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), siendo las algas pardas las que destacan con mayor concentración de clorofila a y carotenoides totales. La concentración máxima de clorofila a entre todas las especies recolectadas fue en *Cystoseira abies marina*  $0.13 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$  mientras que la concentración más baja se detectó en la especie verde *Caulerpa racemosa*  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ . Las algas rojas presentaron valores máximos de  $0.12 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$  y mínimos de  $0.02 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$  éste último correspondiente a *Pterocladia capillacea* y *Laurencia majuscula*.

Tabla 1.8. Contenido de pigmentos liposolubles, clorofilas y carotenoides, expresados como  $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$  en las diez especies de macroalgas (media  $\pm$  desv, n=3). Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B).

Especies	Cl a ( $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	Cl b ( $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	Carotenoides totales ( $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )
<i>C.intertextum</i>	$0.02 \pm 0.01^a$	$0.01 \pm 0.00^a$	$0.01 \pm 0.00^a$
<i>C.racemosa</i>	$0.01 \pm 0.00^a$	$0.03 \pm 0.00^b$	-
<i>U.rígida</i>	$0.05 \pm 0.00^b$	<b><math>0.03 \pm 0.00^b</math></b>	$0.01 \pm 0.00^a$
<i>P.capillacea</i>	$0.12 \pm 0.01^d$		$0.03 \pm 0.00^b$
<i>H.spinella</i>	$0.05 \pm 0.00^b$		$0.01 \pm 0.00^a$
<i>G.dichotoma</i>	$0.07 \pm 0.00^c$		$0.01 \pm 0.00^a$
<i>H.incurva</i>	$0.08 \pm 0.00^c$		$0.03 \pm 0.00^b$
<i>L.majuscula</i>	$0.02 \pm 0.00^a$		$0.01 \pm 0.00^a$
<i>F.spiralis</i>	<b><math>0.11 \pm 0.00^d</math></b>		<b><math>0.05 \pm 0.00^c</math></b>
<i>C.abies-marina</i>	<b><math>0.13 \pm 0.00^d</math></b>		<b><math>0.05 \pm 0.00^c</math></b>

iendo las algas pardas las que destacan con mayor concentración de clorofila a. Y en la misma línea se muestran los carotenoides totales, en general bastante bajas a excepción de las especies pardas nuevamente, donde se detectaron valores de 0.05 mg·g PS<sup>-1</sup> en ambas, *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina*. Siendo además significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

#### 1.4.2.2. Pigmentos hidrosolubles: ficoeritrina

Los niveles de ficoeritrina extraídos y cuantificados exclusivamente en algas rojas muestran diferencias significativas (Tabla 1.9). Se observa una clara diferencia entre las cinco especies analizadas ( $p < 0.05$ ). La especie que destacó por su mayor contenido es *Pterocladia capillacea* con un valor de 0.08 mg·g PS<sup>-1</sup> significativamente superior al resto de las especies. Mientras que las concentraciones significativamente más bajas ( $p < 0.05$ ), fueron detectadas en orden decreciente *Grateloupia dichotoma*, *Halopithys incurva*, e *Hypnea spinella*, siendo 0.04mg · g PS<sup>-1</sup>, 0.03mg · g PS<sup>-1</sup> y 0.02 mg · g PS<sup>-1</sup> respectivamente.

Tabla 1.9. Contenido de ficoeritrina (media  $\pm$  desv, n=3) en las especies de macroalgas rojas expresado como mg·g PS<sup>-1</sup>. Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B).

Especies	FE ( mg · g PS <sup>-1</sup> )
<i>Pterocladia capillacea</i>	<b>0.13 <math>\pm</math> 0.00<sup>c</sup></b>
<i>Hypnea spinella</i>	0.02 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
<i>Grateloupia dichotoma</i>	0.04 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
<i>Halopithys incurva</i>	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
<i>Laurencia majuscula</i>	0.08 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>

#### 1.4.3. CORRELACIONES ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DETECTADA Y LAS SUSTANCIAS CUANTIFICADAS

En la Tabla 1.10. se muestran los resultados del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) obtenido entre la actividad antioxidante detectada mediante el ensayo DPPH y el poder reductor con el contenido en fenoles totales así como en pigmentos liposolubles e hidrosolubles de las especies de macroalgas ensayadas.

Tabla 1.10. Resultados de  $R^2$  de las correlaciones realizadas, entre la actividad antioxidante detectada mediante el ensayo DPPH en (%) y el método del poder reductor ( $\mu\text{g AA mg}^{-1}$ ) y los polifenoles valorados mediante dos métodos y pigmentos liposolubles (clorofila a y carotenoides totales) e hidrosolubles (ficoeritrina).

Biomoléculas	REGRESION LINEAL ( $R^2$ )			
	Ensayo DPPH (% Barrido radicales libres)		Poder reductor ( $\mu\text{g AA mg}^{-1}$ )	
	Extracto METOH	Extracto ETOH50	Extracto METOH	Extracto ETOH50
Clorofilas ( $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	0.347	0.443	0.032	0.173
Carotenoides ( $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	<b>0.696</b>	0.157	0.085	0.327
Ficoeritrina ( $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	0.041	0.010	0.129	0.145
Polifenoles (%)	<b>0.771</b>	<b>0.718</b>	0.606	<b>0.857</b>
Polifenoles PVPP (%)	<b>0.796</b>	<b>0.785</b>	0.131	0.462

Tanto la correlación entre la actividad antioxidante de los extractos metanólicos e hidroalcohólicos obtenida con el método del DPPH con el contenido en polifenoles (sin y con PVPP) mostraron una buena correlación ( $R^2 = 0.771$ ) y ( $R^2 = 0.718$ ) sin el tratamiento PVPP y ( $R^2 = 0.796$ ) y ( $R^2 = 0.785$ ) con el tratamiento PVPP respectivamente.

Sin embargo, el análisis de correlación realizado entre el método del poder reductor mostró la mejor correlación polifenoles sin tratamiento PVPP extracto hidroalcohólico ( $R^2 = 0.857$ ) pero el resto de las correlaciones realizadas con la actividad antioxidante detectada mediante este método fueron muy bajas. Concretamente, se obtuvieron en la actividad antioxidante detectada en los extractos metanólicos con clorofila ( $R^2 = 0.347$ ), con carotenoides ( $R^2 = 0.696$ ), con el contenido en ficoeritrina ( $R^2 = 0.121$ ), y con el contenido en polifenoles con el tratamiento PVPP ( $R^2 = 0.131$ ).

En la actividad antioxidante detectada en los extractos hidroalcohólicos con clorofilas ( $R^2 = 0.167$ ), con carotenoides ( $R^2 = 0.189$ ), con el contenido en ficoeritrina ( $R^2 = 0.159$ ), y con el contenido en polifenoles con el tratamiento PVPP ( $R^2 = 0.462$ ). Los resultados de las correlaciones entre la actividad antioxidante detectada mediante el ensayo DPPH y el contenido en clorofilas y carotenoides fueron significativos, siendo en extractos metanólicos ( $R^2 = 0.482$ ) y ( $R^2 = 0.629$ ) respectivamente y en hidroalcohólicos ( $R^2 = 0.485$ ) y ( $R^2 = 0.616$ ) respectivamente. El análisis de correlación con el contenido en ficoeritrina fue casi insignificante con ambos extractos, con valores de ( $R^2 = 0.144$ ) en los metanólicos y ( $R^2 = 0.035$ ) en los hidroalcohólicos.

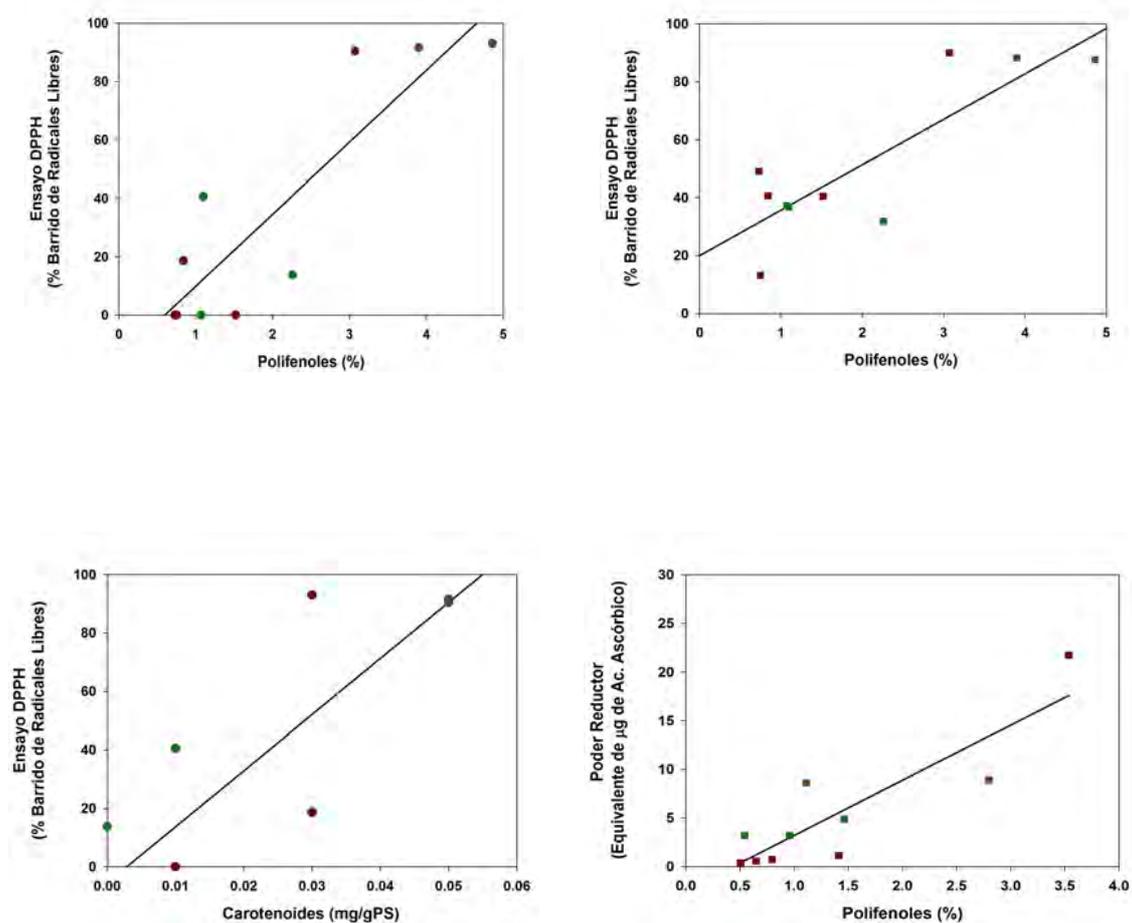


Figura 1.15. Representación gráfica de los análisis de correlación más significativos entre la actividad antioxidante detectada mediante el ensayo DPPH con extractos metanólicos (●Clorofitas●Rodofitas●Feofitas) y con extractos hidroalcohólicos (■Clorofitas■Rodofitas ■Feofitas) y el contenido en polifenoles (% peso seco) ( $R^2=0.771$ ) y ( $R^2=0.718$ ) respectivamente. La correlación con el contenido en carotenoides ( $R^2=0.629$ ) también fue alta. El análisis de correlación más significativo entre la actividad antioxidante detectada mediante el poder reductor exhibió con extractos hidroalcohólicos (■Clorofitas■Rodofitas ■Feofitas) y al contenido en polifenoles (% peso seco) ( $R^2=0.857$ ).

### 1.4.5. RELACIÓN CARBONO Y NITRÓGENO

Los resultados de los análisis en relación al contenido C:N de las diez especies se muestran en la Figura 1.19. mostrando diferencias significativas tanto entre los tres phylum como dentro de cada uno de ellos ( $p < 0.05$ ). El contenido de N ( $\text{mg N} \cdot \text{g PS}^{-1}$ ) mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) dependiente del phylum. Las variaciones en el contenido de carbono fueron significativamente notorias en el caso de *Fucus spiralis*.

Entre las algas verdes *Ulva rigida* es la que muestra mayor contenido de relación C/N siendo éste de 15.63 %. *Codium intertextum* y *Caulerpa racemosa* muestran valores de 12.24 y 11.10% respectivamente. Entre las algas rojas la relación C:N máxima se detectó en *Laurencia majuscula* y la mínima en *Halopithys incurva* siendo estos valores de 11.34 y 8.65 % respectivamente. Entre las algas pardas, se observó una mayor relación respecto a los datos anteriores, en *Fucus spiralis* de 18.64 respecto a la relación C/N encontrada en 17.29 *Cystoseira abies-marina*.

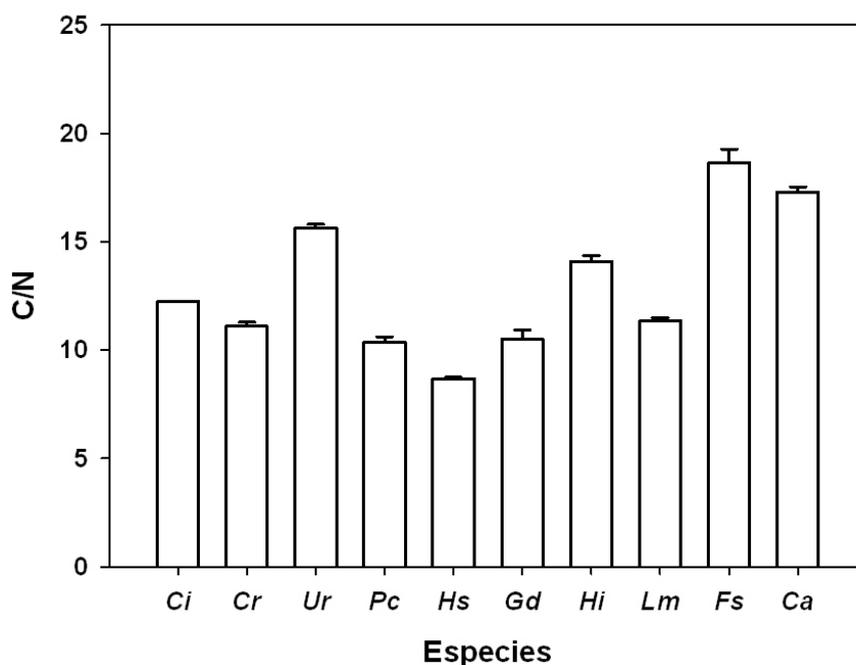


Figura 1.19. Relación C/N en las diez especies de macroalgas estudiadas (media  $\pm$  desv,  $n=3$ ).

Tabla 1.11. Contenido en N ( $\text{mg N} \cdot \text{g PS}^{-1}$ ) y en C ( $\text{mg C} \cdot \text{g PS}^{-1}$ ) en las de macroalgas estudiadas (media  $\pm$  desv, n=3).

Especies	( $\text{mg N} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	( $\text{mg C} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )
<i>C.intertextum</i>	22.14 $\pm$ 0.76	270.93 $\pm$ 9.50
<i>C.racemosa</i>	19.81 $\pm$ 0.41	219.86 $\pm$ 6.06
<i>U.rigida</i>	17.27 $\pm$ 0.13	269.99 $\pm$ 1.19
<i>P.capillacea</i>	28.75 $\pm$ 3.00	297.71 $\pm$ 26.14
<i>H.spinella</i>	26.65 $\pm$ 0.82	231.74 $\pm$ 4.84
<i>G.dichotoma</i>	29.33 $\pm$ 1.63	289.24 $\pm$ 2.64
<i>H.incurva</i>	19.72 $\pm$ 0.05	277.67 $\pm$ 5.61
<i>H.incurva</i>	19.65 $\pm$ 0.81	222.80 $\pm$ 6.62
<i>F.spiralis</i>	17.44 $\pm$ 0.47	324.81 $\pm$ 4.84
<i>C.abies-marina</i>	15.29 $\pm$ 0.36	264.35 $\pm$ 8.35

## 1.5. DISCUSIÓN

El análisis realizado con el objeto de evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos e hidroalcohólicos de las 10 especies de macroalgas fue realizada mediante dos métodos. Primero, utilizando una solución metanólica del radical libre estable DPPH, el cual presenta la ventaja de ser inalterado por ciertas reacciones como la quelación de iones metálicos y la inhibición enzimática provocadas por algunas sustancias presentes en matrices complejas (Amarowicz *et al.*, 2004) y permite estudiar compuestos hidrosolubles y liposolubles. Mediante una segunda metodología se puede determinar el potencial antioxidante fundamentado en la reducción del ferricianuro a ferrocianuro y en la posterior formación de ferrocianuro férrico denominado método del poder reductor. Estos resultados sugieren que hay diferencias significativas entre las especies representativas de los phylum estudiados, Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta, además estas las diferencias encontradas están influenciadas por el solvente de extracción. Mientras que todos los extractos hidroalcohólicos de las algas mostraron actividad en el ensayo de barrido de radicales libres mediante el ensayo DPPH, sólo seis mostraron en extracto metanólico. El alga roja *Halophytis incurva* y las algas pardas *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina*, según estos resultados son las que mayor actividad antioxidante muestran en ambos tipos de extracto y metodología aplicada. Los resultados del poder reductor muestran nuevamente mayores actividades en las especies mencionadas, con una diferencia significativa respecto a las demás. En general, la literatura muestra diferencias

significativas en la actividad antioxidante detectada en los tres phylum. Al expresar % de barrido de radicales libres como EC50 (también llamado índice de oxidación) *Cystoseira abies-marina* (en ambos extractos) y *Caulerpa racemosa* (en extracto ETOH 50%) exhibieron la mayor actividad con una EC50 muy baja  $1.97 \pm 0.03$ ,  $2.03 \pm 0.01$  y  $1.88 \pm 0.03$  mg·ml<sup>-1</sup> respectivamente. En estudios anteriores los extractos de *Caulerpa cupressoides* y *Caulerpa paspaloides* exhibieron actividades con el DPPH inferiores a nuestros resultados ( $6.17 \pm 0.10$ ,  $6.35 \pm 0.15$  y  $7.36 \pm 0.16$  mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) (Zubia *et al.*, 2007). Los extractos de *F. spiralis* mostraron un EC50 de  $2.21 \pm 0.02$  y  $2.22 \pm 0.00$  mg·ml<sup>-1</sup> respectivamente. Los extractos de las especies rojas (Orden Ceramiales) *H.incurva* (en ambos extractos) y *L. majuscula* exhibieron también una alta actividad de barrido de radicales libres  $2.47 \pm 0.01$ ,  $2.62 \pm 0.02$  y  $2.48 \pm 0.01$  mg·ml<sup>-1</sup> respectivamente. Los antioxidantes comerciales expresados como % de barrido de radicales libres, mostraron que el propilo galato y el ácido ascórbico tienen una alta actividad 95.68 % y 96.44 % respectivamente, equivalente a la encontrada para las especies *H. incurva*, *F. spiralis* y *C. abies-marina*, seguido de el floroglucinol, 69.34%. En cambio la vitamina E y el antioxidante commercial BHT muestran valores más bajos, 37.73% y 28.7 % respectivamente. Los valores de actividad antioxidante medidos en estos dos compuestos comerciales son similares o incluso inferiores a los detectados en los extractos hidroalcohólicos de la mayoría de las especies analizadas. En cambio al expresar la actividad en el radical DPPH como EC50, exhibieron actividades más altas  $0.06 \pm 0.01$  mg·ml<sup>-1</sup> el ácido ascórbico seguido del propil galato  $0.15 \pm 0.19$  mg·ml<sup>-1</sup>. Estudios previos han reportado una alta actividad antioxidante en el género *Halimeda* (Al Fallarero *et al.*, 2003) y *Caulerpa* (Santoso *et al.*, 2004; Cavas y Yurdakoc 2005). Entre las rojas destacan los géneros (*Polysiphonia*, *Heterosiphonia*, y *Bryothamnion*) pertenecientes al Orden Ceramiales los resultados expresados como EC50, *Brongniartella byssoides* ( $0.14 \pm 0.01$  mg ml<sup>-1</sup>) y *Polysiphonia lanosa* ( $2.71 \pm 0.01$  mg ml<sup>-1</sup>) y una especie perteneciente al orden Gigartinales, *Furcellaria fastigiata* ( $1.39 \pm 0.04$  mg ml<sup>-1</sup>) (Zubia *et al.*, 2009). Entre las pardas géneros pertenecientes al Orden de las Fucales (*Cystoseira*, *Fucus*, *Sargassum*) (Yan *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005; Zubia *et al.*, 2007). Avalado por otros trabajos dirigidos a evaluar el potencial antioxidante de extractos de algas (Matsukawa *et al.*, 1997; Le Tutour *et al.*, 1998), se confirma que el tipo de extracto y proceso de extracción influye en su composición y en consecuencia también en sus propiedades. La preparación de los extractos varía según los autores, aunque todos comparten una metodología básica. Tal y como se indica en el apartado de material y métodos los extractos estudiados se han llevado a cabo empleando muestras de homogenizados

de piezas de talo enteras liofilizadas y se han preparado con solventes de diferente polaridad. La liofilización es uno de los procedimientos más fiables para mantener las propiedades en un tejido, ya que durante el secado la temperatura puede afectar a la estabilidad de los compuestos activos debido a la degradación química y enzimática, por volatilización o por descomposición térmica. Además este segundo mecanismo puede afectar la reducción del contenido en polifenoles de los extractos (Larrauri et al., 1997). Las algas marinas, especialmente las algas comestibles, se deshidratan tradicionalmente al sol o secado al aire. Por lo general, el secado a alta temperatura (como el horno de secado) causa la degradación física y las pérdidas de compuestos volátiles en el material vegetal. Es por ello, que a pesar del coste económico la liofilización parece conservar de manera eficiente compuestos termosensibles (Wong y Cheung, 2001). Durante la extracción y concentración también se tuvo en cuenta este parámetro ya que incluso los fenoles pueden reaccionar con otros componentes impidiendo su extracción (Prior y Cao, 1999). Los extractos preparados en metanol, son utilizados ya que han demostrado alta actividad antioxidante en muchas algas especies (Yan et al., 1999). Pero el estudio de los extractos etanólicos y acuosos es más interesantes, debido a su inocuidad, y porque los solventes apolares son los que mayor rendimiento en polifenoles ofrecen (Moure *et al.*, 2001). En este sentido, nuestros resultados en cuanto a las diferencias encontradas entre extractos metanólicos e hidroalcohólicos respecto a su actividad antioxidante coinciden con observaciones previas de otros autores indicando que esta diferencia en la polaridad afecta a la actividad antioxidante (Marinova y Yanishlieva 1997; Duffy y Power, 2001). Rupérez et al., (2002) prepararon diferentes extractos de *Fucus vesiculosus* y encontraron diferencias significativas en cuanto a su capacidad antioxidante. Pero por otro lado se hace complicado comparar la actividad antioxidante detectada en las diferentes macroalgas estudiadas con anterioridad, porque cada autor utiliza protocolos de extracción diferente lo que dificulta las comparaciones (Zubia et al., 2007). Además la cualidad de los extractos así como la capacidad antioxidante que muestran no sólo depende del tipo de extracción y características específicas de la especie sino también de la situación geográficas, condiciones fisiológicas de donde proceden las muestras, tal y como han señalado algunos autores al confirmar que la desecación causa estrés oxidativo en trabajos realizados con las macroalgas *Fucus spp.*, *Mastocarpus stellatus* y *Chondrus crispus* (Collen y Davison 1999a), y la especie *Stictophonia arbuscula* (Burrit et al., 2002). En relación al contenido en compuestos fenólicos de las algas pertenecientes a las divisiones Rhodophyta, Phaeophyta y Chorofita oscila generalmente entre 0 y 5% del peso seco, aunque hay estudios que

muestran niveles de hasta 20-30% para las algas pertenecientes a la división Phaeophyta (Ragan y Jensen, 1977; Geiselman, 1980; Anderson y Velimirov, 1982; Steinberg, 1985, 1986; Ragan y Glombitza, 1986; Conan et al.; 2006; Zubia et al., 2007). En general los valores obtenidos en este trabajo son comparables a los de las algas pardas clasificadas como pobres en compuestos fenólicos (0-2% del peso seco) (Steinberg y Paul, 1990; Targett et al., 1992; Winter y Estes, 1992), sin incluir el resultado obtenido en el caso de *Halopithys incurva*, *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina*. En un trabajo recientemente publicado (Zubia et al., 2009), cuatro especies pertenecientes al orden Ceramiales, destacan por el mayor contenido en polifenoles dentro de un screening realizado entre 24 especies de algas rojas. *Aglaothamnion pseudobyssoides*, *Polysiphonia lanosa*, *Brongniartella byssoides* y *Heterosiphonia plumosa* 5.73%, 3.64%, 3.45% y 3.29%, respectivamente. Estos datos son muy similares a los detectados en nuestro trabajo en la especie perteneciente al mismo orden, *Halopithys incurva* (4.86 % de su peso seco). Además estas especies exhiben una alta actividad, relación similar a la detectada en nuestros resultados. El nivel de fenoles totales en *Fucus spiralis* fue menor, 3.07 % en peso seco, respecto al valor encontrado por Denton et al., 1990 para esta misma especie 8.14%. recolectada en Nova Scotia (Canadá). Sin embargo, ejemplares de *Cystoseira abies-marina* de la isla de Gran Canaria pero de diferente zona presentaron un contenido medio menor 0.5% según Granado (1996), que el obtenido en nuestro trabajo siendo este valor de 3.90 % de peso seco los valores para éste género van desde 0.3% en *C. trinodis* del norte australiano (Steinberg y Paul, 1990) hasta 4.4% en *C. osmundacea* de California (Steinberg, 1985). Las diferencias entre el contenido en compuestos fenólicos totales de las especies analizadas en este trabajo y las especies estudiadas por otros autores pueden deberse a la existencia de una variación biogeográfica en la producción de estos compuestos (Steinberg, 1989). Es importante señalar, que las macroalgas con mayor contenido en polifenoles se recolectaron en el eulitoral inferior (*Halopithys incurva*), caracterizado por los mayor predación, herbivoría y competencia/epifitismo, y en la franja litoral superior (*Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina*), donde la desecación, temperatura y radiación solar son mayores. Todos estos factores ambientales, son los que se han identificado como propicios para inducir el contenido de estos compuestos (Geiselman y McConell, 1981; Pavia et al., 1997). Mientras que el resto de las especies se recolectaron en su mayoría en el eulitoral medio, franja en la que estos factores no predominan habitualmente. El contenido de polifenoles con el tratamiento PVPP proporcionó un método más específico de medir la concentración de fenoles. Basado en la capacidad de florotaninos para enlazar con polivinilpirrolidona

(PVPP) ya que el reactivo Folin-Ciocalteu reacciona con otros compuestos además de los polifenoles, como son aminoácidos y proteínas. De esta manera los fenoles que son capaces de interactuar con los enlaces peptídicos se puede quitar de la muestra solución. La diferencia entre la primera y la segunda medida es equivalente al contenido de compuestos fenólicos capaz de unirse al PVPP. Por tanto midiendo la concentración de polifenoles por el método colorimétrico Folin-Ciocalteu antes y después del tratamiento con PVPP se obtiene la concentración de polifenoles por diferencia. Los resultados mostraron diferencias significativas tras el análisis de fenoles con dicho tratamiento. Disminuyendo un 70 % del contenido en el caso de *Halopithys incurva* y en *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina* un 30 y 20 % respectivamente el contenido en fenoles totales. Tras el tratamiento con PVPP, el resto de las especies no mostraron contenido en fenoles totales. Parys et al. (2007), detectan resultados similares en un estudio realizado con *Fucus* y *Ascophyllum*, en los cuales cuantificaron sin tratamiento PVPP un contenido en florotaninos de 15.88 y 13.49 % respectivamente y tras el tratamiento un menor contenido de compuestos fenólicos en dichos extractos con un contenido de 10.18 y 7.85%, respectivamente. Es decir disminuyó el contenido en florotaninos un 35 y un 42 % con tratamiento PVPP. El estudio de pigmentos liposolubles (clorofila a y b y carotenoides totales) e hidrosolubles (ficoeritina) determinó que el contenido varía dependiendo de la especie, y hubo notables diferencias interespecíficas entre las Chlorophytas (*Caulerpa* mostró una concentración muy baja en los tres pigmentos cuantificados). El contenido de clorofila a fue similar en las especies verdes y rojas, encontrando diferencias significativas respecto a las pardas. El contenido más alto de carotenoides totales se determinó en *Cystoseira abies-marina* y la menor en nuevamente en *Caulerpa racemosa*. En general, las algas pardas son las que mostraron las mayores concentraciones en clorofila a y carotenoides. Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores (Dere et al., 1998). Los pigmentos fotosintéticos son sustancias que su función es absorber la luz visible. Los diferentes pigmentos absorben luz de longitudes de onda diferentes, además de llevar a cabo principalmente la fotosíntesis, pero además se les ha atribuido un papel en la defensa antioxidante de las algas. Las macroalgas que se estudiaron están expuestas a las variaciones en la radiación solar UVA y UVB, y temperatura, factores que pueden alterar el contenido de pigmentos fotosintéticos (Döhler et al., 1997; Figueroa et al., 1997; Flores Moya et al., 1998) incluso algunas de ellas fueron recogidas de charcos (*Codium intertextum*, *Ulva rigida*, *Pterocladia capillacea*, *Grateloupia dichotoma*, *Laurencia majuscula*) que están naturalmente expuestos a irradiancias solares extremas

(Figuroa et al.,1997, Figuroa y Gomez, 2001, Bischof et al., 2006). El contenido en pigmentos además está condicionado por la limitación de nutrientes (Lapointe et al.,1976; Hanisak, 1983). La clorofila se encuentra en los cloroplastos formando compuestos insolubles. Debido a la variedad de las estructuras de la pared celular de estas diez especies, la homogeneización y una extracción completa con metanol facilitó el aislamiento de los pigmentos. Los carotenoides son pigmentos accesorios que se encuentran en cantidades variables entre los grupos de algas (Grung et al.,1992). Se ha sugerido que funcionan como pigmento accesorio transfiriendo la energía y oxígeno (Frank et al., 1994). Vechetel et al.,(1992) determinaron que los pigmentos carotenoides fueron los pigmentos fotosintéticos más importantes, y que protegen a la clorofila y la membrana tilacoidal de los daños de la energía absorbida en la oxidación. El aumento observado en el contenido en carotenoides responde a una respuesta típica de las algas pardas debido a las altas irradiaciones a las que está sometidas en el sistema intermareal comportamiento descrito con anterioridad en la especie *Sphacelaria* (Brown y Richardson, 1968) y en las especies *Ascophyllum* y *Fucus* (Ramus et al.,1977). El nivel de pigmentos está influenciado por factores limitantes como son la alta irradiación, periodos de desecación, la falta de nitrógeno y de limitación de nutrientes. Entre todas las especies de los tres grupos de algas, el orden del contenido en clorofila a y carotenoides fue el siguiente: Phaeophyta>Rhodophyta>Chlorophyta. En cuanto al contenido en pigmento hidrosoluble, ficoeritrina, excepto el detectado en *Laurencia majuscula* fue significativamente más bajo. La producción de este pigmento accesorio está estrechamente relacionado con la disponibilidad de nutrientes nitrógeno concretamente y han sido propuestas como reservas de N (Figuroa, 2006; Talarico, 2000). Las concentraciones de nutrientes inorgánicos en las aguas superficiales varían con la localización geográfica y en las concentraciones regiones tropicales puede ser baja (en los límites de detección) durante todo el año. En las regiones templadas, las concentraciones suelen ser máxima durante el otoño y el invierno y la mínima entre finales de primavera y verano (coincidiendo con el muestreo de nuestro estudio). Algunos ecosistemas están limitados por un nutriente en un determinado momento del año. Éstas variaciones se han observado en el contenido de N de macroalgas por numerosos trabajos (Chapman y Craigie, 1977; Lapointe, 1987; Peckol et al., 1994). Por otro lado, las poblaciones naturales de algas marinas pueden obtener nutrientes de otras fuentes distintas de la columna de agua, por ejemplo, material particulado en su superficie (Schaffelke, 1999) o la excreción de los animales (por ejemplo, Taylor y Rees, 1998). Está descrito que las algas marinas probablemente tiene un rango óptimo de

temperaturas sobre la cual se produce las mayores captaciones y tasas, y es probable que disminuya por debajo de este rango (Wheeler y Srivastava, 1984). Se ha demostrado que la concentración de pigmentos responde al resultados de los cambios en las concentraciones de las distintas formas orgánicas e inorgánicas de N (Bird et al., 1982; Horrocks, 1993). Se encontró que las algas situadas en el intermareal (por ejemplo, *Fucus*) se desecan durante una alta exposición solar al bajar la marea, y su tasa de absorción de N fue varias veces superior a lo normal durante la primera hora de la inmersión durante la marea (Thomas y Turpin, 1980), aunque este fenómeno no fue observado en la disponibilidad de fosfato (Hurd y Dring, 1991).

La relación C:N es una variable que responde al almacenamiento de nitrógeno y puede indicar la limitación de nitrógeno (Hanisak, 1983; Ryther y Dunstan, 1971) y ampliamente utilizado para evaluar el estado fisiológico de las macroalgas (Hanisak, 1990; Duarte 1992; Vergara et al., 1993). Los resultados de la relación C:N detectados en las especies no se vieron afectados significativamente por la estructura del talo tal y como apuntan algunos autores (Dhargalkar et al., 1987; Gómez y Westermeier, 1995). Nuestros resultados muestran que la relación C:N van desde 8:1 a 18: 1, es decir en algunos casos está por debajo del índice señalado (10: 1 y 70: 1) para las plantas bentónicas (Fenchel y Jørgensen, 1977), como fue en el caso de *Hynea spinella* (8.6%). Esta relación en macroalgas aumenta durante los períodos de limitación de N, nuestra observación de que las macroalgas del intermareal tienen una baja disponibilidad de nitrógeno y se refleja con los valores altos de la relación C:N detectados en general. Los contenidos en carbono total de las especies *Caulerpa racemosa*, *Ulva rigida* y *Fucus spiralis* fueron similares a los obtenidos en otras especies de los mismos géneros por otros autores, el resto de las especies mostraron contenidos menores en general (Atkinson y Smith, 1983). El contenido en nitrógeno de las algas generalmente oscila entre un 1 y 7 % de su peso seco (Ito y Hori, 1989). Los valores de nitrógeno de las especies estudiadas estuvieron comprendidos entre 1.5 y 2.9 %, aunque algunas de las especies analizadas mostraron mayor contenido que el publicado por otros autores para los mismos géneros así *Codium intertextum* dio un valor mayor (2.2%) que *C. fragile* (1.38%) (Nicotri, 1980) en cambio *Ulva* da un contenido menor (1.7 %) que el señalado anteriormente 3.9 % (Granado, 1996). En lo referente a las algas rojas, los valores de nitrógeno detectados fueron entorno al 2.5 %, siendo el valor más alto en *G. dichotoma* y *P. capillaceae* (2.9 %) seguido de *H. musciformis* (2.7%). En cuanto a las algas pardas, diferentes especies de *Cystoseira* dan un amplio rango de valores para el contenido en nitrógeno desde 1.4 hasta 5.2 % (Atkinson y Smith, 1983). El resultado detectado en este estudio se encuentra en el

límite inferior de este rango (1.5 %), en *Fucus spiralis* se detectó un valor también inferior (1.7 %) al obtenido por otros autores, 4.4 % (Granado, 1996).

Por lo tanto, puede concluirse que las condiciones ambientales, y las propiedades físico-químicas del agua de mar son los factores más importantes que afectan al contenido de estos compuestos y es importante la elección del solvente extractivo para la cuantificación en función de la estructura de la pared celular. Al analizar el análisis de correlación entre los valores de concentración de pigmentos liposolubles e hidrosolubles, así como los polifenoles analizados con los distintos tratamientos con la capacidad antioxidante detectada mediante ambos métodos ya mencionados, nos encontramos con datos muy diferentes. Y deducimos, que la correlación detectada entre el ensayo DPPH y concentración de polifenoles (con y sin PVPP), el resultado más positivo, significa que a mayor concentración de polifenoles mayor es la actividad antioxidante de la muestra. La estructura química de los polifenoles es especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante (donador de hidrógeno o electrones, o atrapador de radicales libres). Esto significa que a mayor concentración de polifenoles mayor es la actividad los extractos. La importancia que tienen los componentes fenólicos como sustancias responsables de las propiedades antioxidantes de extractos de algas ha sido relacionado anteriormente (Matanjun et al., 2008; Zubia et al., 2009). En resumen, todos estos trabajos sugieren que en la composición química de las algas existen diferentes sustancias, algunas de las cuales han sido valoradas en este análisis, que están relacionadas en mayor o menor medida con sus propiedades antioxidantes. De esta manera se hace evidente, que cuando se analiza la actividad antioxidante de un extracto crudo, que pudiera ser explicada por la presencia de una o varias moléculas, a su vez pudiera existir un posible efecto cooperativo o sinérgico entre ellas (Le Tutouret et al., 1990; Santoso et al., 2004; Wang et al., 2008). Este hecho explicaría los diferentes mecanismos antioxidantes observados para una determinada alga. Otros autores, aunque no han estudiado el efecto sinérgico de los metabolitos constituyentes de las algas, explican las propiedades antioxidantes por la presencia de varias moléculas en conjunto. Fallarero et al., 2003., estudiaron las propiedades antioxidantes de un extracto acuoso de *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) MA Howe y algunos de sus componentes polifenólicos en células hipotálamicas de ratones GT1-7. Los resultados de estas investigaciones muestran que la disminución estadísticamente significativa en la actividad antioxidante de los extractos estudiados se correlacionan con una disminución estadísticamente significativa en el contenido total de polifenoles. Esto sugiere la importancia de estas moléculas como posibles responsables de la actividad antioxidante de los extractos en

el barrido de radicales libres. Estos resultados unido a nuestro trabajo, motivaron la repetición del estudio en las mismas algas cultivadas bajo un sistema de policultivo integrado.

## 1.6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, J., Bischof, K., Karsten, U., Hanelt, D., Wiencke, C., 2002a. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord: II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Mar. Biol.* 140, 1087- 1095.
- Aguilera, J., Dummermuth, A.L.K.U., Schriek, R., Wiencke, C., 2002b. Enzymatic defences against photo-oxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. *Polar Biol.* 25, 432 - 441
- Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J., 2004. Potential for the use of Ultrasound in the Extraction of Antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the Food and Pharmaceutical Indust. *Ultrasonic Sonochemistry*, 11, 261.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Moghaddam, P.R., Barl, B., Weil, J.A. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* 84, 551-562.
- Anderson, R.J., Velimirov, B. 1982. An experimental investigation of the palatability of kelp bed algae to the sea urchin *Parechinus angulosus*. *Mar. Ecol.*, Vol. 3, pp. 357-373.
- Anggadiredja, J., Andyani, R., Hayati, M., 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu islands. *Journal of Applied Phycology* 9, 477-479.
- Antololovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.*, 127, 183-198.
- Arena, E., Fallico, B., Maccarone, E. 2001. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.*, 74, 423-427.
- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. 1999. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Res.* 31: 589-596.
- Aruoma, O.I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research.* 523-524: 9-20.
- Atkinson, M.J., Smith, S.V. 1983. C:N:P ratios of benthic marine plants. *Limnol. Oceanogr.* 28, 568-574.
- Behrenfeld, MJ, O'Malley, RT, Siegel, DA, McClain, CR, Sarmiento, JL, Feldman, GC, Milligan, AJ, Falkowski, PG, Letelier, RM, Boss, ES. 2006. Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature* 444:752-755
- Bird, K.T., Habig, C., DeBusk, T. 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *J Phycol* 18:344-348
- Bischof, K., Krabs, G., Wiencke, C., Hanelt, D. 2002. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose -1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of

## Capítulo I

---

- photosynthetic and xanthophylls cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca*. *Planta* 215: 502-509.
- Bischof, K., Gómez, I., Molis, M., Hanelt, D., Karsten, U., Lüder, U., Roleda, M.Y., Zacher, K., Wiencke, C. 2006. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5, 141-166.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C.1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology*, 28:25-30.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 : 1199-1200.
- Brown, T.E., Richardson, F.L. 1968. The effect of growth environment on the physiology of algae: Light intensity. *J. Phycol.*, 4: 38-54.
- Hurd C.L. y Dring M.I. 1991. Desiccation and phosphate uptake by intertidal fucoid algae in relation to zonation. *British Phycological Journal*. 26: 327-333.
- Burritt, D. J., Larkindale, J., Hurd, C. L. 2002. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following dessication. *Planta*, 215, 829–838.
- Buschmann, A. H. 1990. Intertidal macroalgae as refuge and food for Amphipoda in Central Chile. *Aquatic Botany* 36: 237-245.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 28,25-30 .
- Burton, G.W., Ingold, K.U.1984. B-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224 : 569-573.
- Cavas L, Yurdakoc K .2005. A comparative study: Assessment of the antioxidant system in the invasive green alga *Caulerpa racemosa* and some macrophytes from the Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 321(1): 35-41.
- Cahyana, A. H., Shuto, Y. y Kinoshita, Y. 1992. Pyropheophytin a as an antioxidative substance from marine alga, Arame (*Eisenia bicyclis*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(10) : 1533-1535.
- CEVA. 2000. Dossier les algues, source d'antioxisants. *Algorithme* 52, 4.
- Chapman, V.J., Chapman D.J. 1980. *Seaweeds and their uses*. Third ed. Chapman and Hall, London. 497 pág.
- Chapman, A.R.O., Craigie, J.S., 1977. Seasonal growth in *Laminaria longicruris*—relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. *Mar. Biol.* 40, 197–205.
- Chapman, V.J. and Chapman, D.J. 1980. *Seaweeds and their uses*. London y New York: Chapman y Hall. pp. 1-334.
- Collén J, Davidson, I.R. 1999a. Reactive oxygen metabolism in intertidal *Fucus* spp. (*Phaeophyceae*). *Journal of Phycology*;35:62-69.
- Connan, S., F. Delisle, E. Deslandes and E.A. Gall. 2006. Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in *Phaeophyceae* of temperate waters. *Bot. Mar.*, 49: 39-46.
- Cousins, R., Hutchins, M. J. 1983. The relationship between density and mean frond weight in monospecific seaweed stands. *Nature* 302:240–241.

- Cremades Ugarte, J., Bárbara Criado, I. y Veiga Villar, A.J. 1998. Las Macroalgas Marinas y sus Aplicaciones. Universidad da Coruña. 158pp.
- Dawes, C.J. 1986. Botánica Marina. Noriega-Limusa, México, 676 pp.
- De la Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F.L., de Gálvez, M.V., Herrera, E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like aminoacids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J. Appl. Phycol.* 21, 161-169.
- Denton, A., Chapman, A.R.O, Markham, J.1990. Size-specific concentrations of phlorotannins (anti-herbivore compounds) in three species of *Fucus*. *Mar Ecol Prog Ser* 65: 103-104.
- Dere, S., Gunes, T., Sivaci, R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algal species using different solvents. *Trends journal of Botany.* 22:13.
- Dohler G, Hagmeier E.1997. UV effects on pigments and assimilation of 15N-ammonium and 15N-nitrate by natural marine phytoplankton of the North Sea. *Bot Acta* 110:481-488.
- Dhargalkar, V. K., Reddy, C. R. K. y Deshmukhe, G. V. 1987. Biochemical composition of some benthic marine algae of the Vestfold Hills, Antarctica. *Indian J. Mx. Sci.* 16: 269-271.
- Duarte, C. M. 1992. Nutrient concentration of aquatic plants: Patterns across species. *Limnol. Oceanogr.* 37: 882-889.
- Duffy, C.F. y Power, R.F. 2001. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *Int J of Antimicrobial Agents* 17 : 527-529.
- Dunlap, W.C. y Yamamoto, Y. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Com. Biochem. Physiol.* 112: 105-114.
- Fallarero, A.; Loikkanen, J.J.; Männisto, P.T.; Castañeda, O.; Vidal, A. 2003. Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. *Phytomedicine*, v.10, n.1 p. 39-47.
- Fenchel, T., y Jorgensen, B. B. 1977. Detritus food chains of aquatic ecosystems: The role of bacteria, p. 1-58. In M. Alexander ed., *Advances in microbial ecology*, v. 1. Plenum.
- Figueroa, F.L., Aguilera, J., Jiménez, C., Vergara, J.J., Robles, M.D., Niell, F.X. 1995. Growth pigment synthesis and nitrogen assimilation in the red alga *Porphyra umbilicalis* (L.) Kü tzing (Bangiales, Rhodophyta) under blue and red light. *Sci. Mar.* 59, 9–20.
- Figueroa, F.L., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A., Altamirano, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur in Le Jol. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151, 81–90.
- Figueroa, F.L., y Gómez, I. 2001. Photosynthetic acclimation to solar UV radiation of marine red algae from the warm-temperate coast of southern Spain: A review. *J. Appl. Phycol.* 13: 235-248.
- Figueroa, F.L., Santos, R., Conde-Álvarez, R., Mata, L., Gómez Pinchetti, J.L., Matos, J., Huovinen, P., Schuenhoff, A., Silva, J. 2006. The use of chlorophyll fluorescence for monitoring photosynthetic conditions of two tank cultivated red macroalgae using fishpond effluents. *Bot. Mar.* 49, 275–282.
- Flores-Moya A, Gómez I, Viñegla B, Altamirano M, Pérez-Rodríguez E, Maestre C, Caballero RM, Figueroa FL. 1998. Effects of solar radiation on the endemic Mediterranean red

## Capítulo I

---

- alga *Rissoella verruculosa*: Photosynthetic performance, pigment content and the activities of enzymes related to nutrient uptake. *New Phytol.* 139: 673–683.
- Folin O and Ciocalteu V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 73: 627-650.
- Foti, M., Piattelli, M., Amico, V., Ruberto, G. 1994. Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae. *J. Photochem. Photobiol.*, 26 : 159-164.
- Frank, H Cua, A., Chynwat, V., Young, A, Gosztola, D., Wasielewski, M. 1994. Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynthesis Research* 41, 3, 389-395.
- Fujimoto, K. 1990. Antioxidant activity of algal extracts. *In: Introduction to Applied Phycology*, Akatsuka I. (ed.), SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands. pp. 199-208.
- Fujimoto, K. and Kaneda, T. 1980. Screening test for antioxygenic compounds from marine algae and fractionation from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46(9): 1125-1130.
- Fujimoto, K. and Kaneda, T. 1984. Separation of antioxygenic (antioxidant) compounds from marine algae. *Hydrobiologia*, 116/117: 111-113.
- Fujimoto K, Ohmura H y Kaneda T. 1985. Screening for antioxygenic compounds in marine algae and bromophenols as active principles in a red alga *Polysiphonia urceolata*. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 51(7) : 1139-1143.
- Geiselman, J.A., O.J. McConnell. 1981. Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail *Littorina littorea*. *J. Chem. Ecol.* 7:1115-1133.
- Geiselman, J.A. 1980. Ecology of chemical defenses of algae against the herbivorous snail *Littorina littorea*, in the New England rocky intertidal community. PhD thesis. Woods Hole Oceanographic Institution/Massachusetts Institute of Technology, Woods Hole, Mass.
- Gómez, I., R. Westermeier (1995). Energy contents and organic constituents in Antarctic and south Chilean marine brown algae. *Polar. Biol.* 15:597-602.
- Granado, R.M. 1996. Interacciones algas-hervíboros: efectos disuasivos alimentarios y tóxicos de metabolitos secundarios algales. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Grung, M.F., D'souza, M.L., Borowitzka, M. 1992. Algal Carotenoids 1. Secondary Carotenoids. *J. Appl. Phycol.* 4. 165-171
- Halliwel B., 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*, 55 (1): 44-52.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radicals in Biology and Medicine*, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford.
- Hanisak, M.D. 1983. The Nitrogen Relationships of Marine Macro Algae. In: Carpenter, E.J. and D.G. Capone (Eds.), *Nitrogen in the Marine Environment*. Academic Press, New York, pp: 699-730.
- Haroun, R., Gil-Rodríguez, M.C., Wildpret de la Torre, W. 2003. *Plantas marinas de Canarias*. Canseco Press, Talavera

- Horrocks, J.L. 1993. Tissue nutrient content of *Gracilaria* spp. (Rhodophyta) and water quality of Logan River and southern Moreton Bay. Honours Dissertation, University of Queensland.
- Huang D., Ou B., Prior L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841-1856
- Jiménez-Escrig A., Jiménez-Jiménez I., Pulido R., Saura-Calixto F. 2001. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J Sci Food Agric* 81:530-534
- Kaltaranta J.K. 1992. Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidant compounds. *69(8) : 810-813.*
- Kaneda T., Ando H. 1971. Component lipids of purple laver and their antioxidant activity. *Proc. Int. Seaweed Symp. 7 : 553-557.*
- Kim, Y.C., An, R.B., Yoon, N.Y., Nam, T.J., Choi, J.S. 2005. Hepatoprotective constituents of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on tacrine-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. *Arch. Pharm. Res.* 28, 1376-1380.
- Lapointe, B. E., Williams, L. D. Goldman, J. C., Ryther, R. H. 1976. The mass outdoor culture of macroscopic marine algae. *Aquaculture* 8: 9-22.
- Lapointe, B.E. 1987. Phosphorus -and nitrogen- limited photosynthesis and growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in the Florida Keys: An experimental field study. *Mar. Biol.* 93: 561-568.
- Larrauri, J. A., Ruperez P., Saura-Calixto F. 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1390-1393.
- Le Tutour B. 1990. Antioxidative activities of algal extracts, synergistic effect with vitamin E. *Phytochemistry*, 29(12): 3759-3765.
- Le Tutour B., Benslimane F., Gouleau M.P., Gouygou J.P., Saadan B., Quemeneur F. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himantalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.*, 10: 121-129.
- Lim S.N., Cheung P.C.K., Oot V.E.C., Ang P.O. 2002. Evaluation activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3862-3866.
- Lincoln R.A., Strupinski K., Walker J.M. 1991. Bioactive compounds from algae. *Life Chemistry Reports*, 8 : 97-183.
- Marinova E. M., Yanishlieva N. V. 1997. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chem.* 58, 245-248.
- Matsukawa R., Dubinsky Z., Kishimoto E., Masaki K., Masuda Y., Takeuchi T., Chihara M., Yamamoto Y., Niki E., Karube I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 9 : 29-35.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Jose Nunez, M., Lema, J.M. 2001. Antioxidant activity of extracts from *Gevuina avellana* and *Rosa rubiginosa* defatted seeds. *Food Research International* 34, 103–109.

## Capítulo I

---

- Moyer, R.A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B. and Wrolstad, R.E. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* 50:519-525.
- Mshigeni, K.E. y Chapman, D.J. 1987. The biology, ecology and industrial potential of the economic seaweed, *Sargassum* (Phaeophyta), with special reference to the Indo-Pacific species. University of Dar es Salaam, Dept of Botany/Los Angeles: University of California, Dept. of Biology. 327pp., 29 tables, 3 appendix tables.
- Nagai T., Yukimoto T. 2003. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. *Food Chemistry* 81: 327-332.
- Naguib Y.M.A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.*, 48 : 1150-1154.
- Nakamura T., Nagayama K., Uchida K., Tanaka R. 1996. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries science*, 62(6) : 923-926.
- Nakatani N, Inatani R, Konishi T. 1984. *Antioxidant Compound, Method of Extracting Same from Rosmary and Use of Same* US Pat. 4,450,097.
- Nishida T., Matsukawa R., Masaki K., Dubinsky Z., Karube I. 1996. A method for screening potential antioxidant activity. *J. of Biotechnology*, 51 : 149-155.
- Parys, S., Rosenbaum, A., Kehraus, S., Glombitza, K.W., König, G.M. 2007. Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts. *J. Nat. Prod.* 70, 1865-1870.
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A., Åberg, P. 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar Ecol Prog Ser* 157:139-146.
- Peckol P, DeMeo-Anderson B, Rivers J, Valiela I, Maldonado M, Yates J. 1994. Growth, nutrient uptake capacities and tissue constituents of the macroalgae *Cladophora vagabunda* and *Gracilaria tikvahiae* related to site-specific nitrogen loading rates. *Mar Biol* 121:175-185.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitão, M.A.S, Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae; *J. Phycology*; 39 (6), 1008-1018.
- Prior, R. L., Cao G. 1999. Variability in dietary antioxidant related natural product supplements: The need for methods standardization. *Journal of the American Nutraceutical Association*, Vol. 2, No. 2, 46 -56.
- Ragan, M.A., Glombitza, K.W. 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. In: Round FE, Chapman DJ (eds) *Progress in phycological research*. Biopress, Bristol, pp 129-241.
- Ragan, M.A., Jensen, A. 1977. Quantitative studies on brown algal phenolics. I. Estimation of absolute polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) *Le Jol.* and *Fucus vesiculosus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, vol. 34, pp. 245-258.
- Ramus, J., Lemons, F., Zimmerman, C. 1977. Adaptation of light-harvesting pigments to downwelling light and the consequent photosynthetic performance of the eulittoral rockweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Mar. Biol.* 42: 293
- Rao, P. y Parekh K. 1981. Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. *Bot. Mar.* 24 (11):577-582.

- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4): 152-158.
- Robards, K., P.D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang and W. Glover, 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chem.*, 66: 401-436.
- Rosenberg G, Ramus J.1982.Ecological growth strategies In the seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae):soluble nitrogen and reserve carbohydrate. *Mar Biol* 66:251-259
- Rozema, J., Björn, L.O., Bornman, J.F., Gaberscik, A., Häder, D.-P., Trost, T., Germ, M., Klisch, M.,Gröniger, A., Sinha, R.P., Lebert, M., He, Y.-Y., Buffoni-Hall, R., de Bakker, N.V.J., van deStaaaj, J. and Meijkamp, B.B.2002.The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrialecosystems-an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds.*J. Photochem. Photobiol.* 66: 2-12.
- Rupérez, P., Ahrazem, O., Leal, J.A.2002. Potential antioxidant capacityof sulphated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem* 50:840-845.
- Ryther, J. H., Dunstan, W.M. 1971. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Sci-* 171:1008-1013.
- Santoso, J., Yoshie-Stark, Y., Suzuki, T. 2004. Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. *Fisheries Sci.* 70: 183-188.
- Schaffelke, B. 1999. Short-term nutrient pulses as tools to assess responses of coral reef macroalgae to enhanced nutrient availability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 182: 305-310.
- Steinberg, P. D., Paul, V. J..1990.Fish feeding and chemical defenses of tropical brown algae in Western Australia. *Marine Ecology Progress Series* 58:253-259.
- Steinberg, P.D.1985. Feeding preferences of *Tegula funebris* and chemical defenses of marine brown algae. *Ecol. Monogr.* 55: 333-349.
- Steinberg, P.D. 1986. Chemical defenses and the susceptibility of tropical marine brown algae to herbivores. *Oecologia* 69: 628-630.
- Steinberg, P. D. 1989. Biogeographical variation in brown algal polyphenolics and other secondary metabolites: comparison between temperate Australasia and North America. *Oecologia* 78: 374-383.
- Steneck, R. S. 1986. The ecology of coralline algal crusts: convergent patterns and adaptive strategies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 17:273-303.
- Takamatsu, S., T.W. Hodges, I. Rajbhandari, W.H. Gerwick, M.T. Hamann and D.G. Nagle, 2003. Marine natural products as novel antioxidante prototypes. *J. Nat. Prod.*, 66: 605-608.
- Talarico L., Maranzana, G. 2000. Invited Review - Light and adaptive responses in red macroalgae: an overview. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 56: 1-11.
- Targett, N.M., Coen, L.C., Boettcher, A.A., Tanner, C.E .1992.Biogeographic comparisons of marine algal polyphenolics: evidence against a latitudinal trend. *Oecologia* 89: 464-470
- Taylor, R. B., Rees, T. A. 1998. Excretory products of Mobile epifauna as a nitrogen source for seaweeds. *Limnology and Oceanography* 43, 600-606.
- Thomas, T. E., Harrison, P. J. 1987. Rapid ammonium uptake and nitrogen interactions in five

- intertidal seaweeds grown under field conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 107, 1-8.
- Thomas, T.E., Turpin, D.H. 1980. Adaptations for nutrient uptake in response to desiccation in intertidal algae. *J. Phycol. Suppl. Vol. 16*.
- Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M., Niki, E. 1995. Action of  $\beta$ -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323(1): 137-147.
- Tsuda, T., Makino, Y., Kato, H., Osawa, T., Kawakishi, S. 1993. Screening for antioxidative activity of edible pulses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57 : 1606-1608.
- Vechetel, B.W., Ruppel, H.G. 1992. Lipid bodies in *Eremosphaera viridis* de Bary (Chlorophyceae). *Plant and Cell Phys.* 31, 41-48
- Vergara, J.J., Niell, F.X., Torres, M. 1993. Culture of *Gelidium sesquipedale* \_Clem.. Born. et Thur. in a chemostat system: biomass production and metabolic responses affected by nitrogen flow. *J. Appl. Phycol.* 5, 405-415.
- Vincent, H.K., Bourguignon, C.M., Vincent, K.R., Weltman, A.L., Bryant, M., Taylor, A.G. 2006. Antioxidant supplementation Powers exercise induced oxidative stress in young overweight adults. *Obesity (Silver Spring)*, 14(12): 2224-2235.
- Wheeler, W.N., Srivastava L.M. 1984. Seasonal nitrate physiology of *Macrocystis integrifolia*. *J Exp Mar Biol Ecol* 76:35-50.
- Winter, F.C., Estes. J.A. 1992. Experimental evidence for the effects of polyphenolic compounds from *Dictyoneurum californicum* Ruprecht (Phaeophyta: Laminariales) on feeding rate and growth in the red abalone *Haliotis rufescens*. *J Exp Mar Biol Ecol* 155:263-277.
- Wong, K.H., Cheung, C.K. 2001. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part II. In Vitro protein digestibility and amino acid profiles of proteína concentrates. *Food Chem.*, Amsterdam, v.72, p.11-17.
- Xue, C., Fang, Y., Lin, H., 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *J. Appl. Phycol.* 13: 67-70.
- Yamamoto, Y., Niki, E., Kamiya, Y. 1982. Oxidation of lipids. I. Quantitative determination of the oxidation of methyl linoleate and methyl linolenate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 55 : 1548-1550.
- Yan, X.J., Li, X.C., Zhou, C.X., Fan X. 1996. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. *Journal of Applied Phycology*, 8 : 201-203
- Yan, X., Nagata, T., Fan, X. 1998. Antioxydative activities in some seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52 : 253-262.
- Yan X., Chuda Y., Suzuki M. y Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(3) : 605-607.
- Yates, J. C. and Peckol, P. 1993. Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus vesiculosus*. *Ecology* 74: 1757-1766.
- Yen, G.C., Chen, H.Y. 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 43:27-32
- Yuan, Y.V., Bone D.E., Carrington, M.F. 2005. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chem* 91:485-494

Wellburn, A.R.1994. The Spectral Determination of Chlorophylls A and B, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *J. Plant Phys.* Vol. 144,307-313.

Zubia, M., Robledo, D., Freile-Pelegrin, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl Phycol* 19: 449-458.

Zubia, M., Fabre, MS., Kerjean, V., Le, Lann K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., Deslandes, E. 2009. Antioxidant and antitumor activities of some Phaeophyta from Brittany Coasts. *Food Chem.* 116: 693-701.

## **CAPITULO II**

---

### **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MACROALGAS CULTIVADAS EN UN SISTEMA DE BIOFILTRACIÓN CON ALTA DISPONIBILIDAD DE NITRÓGENO**

## 2.1. INTRODUCCIÓN

Los estudios recientes sobre los compuestos y las propiedades antioxidantes en algas, han sido justificados por el hecho de que parece necesaria su presencia como respuesta o defensa en el medio oxidativo “complejo” en el que habitan (Maschek y Baker, 2008; Athiperumalsami et al., 2010). Tal y como ha sido expuesto en el Capítulo I, son numerosos los trabajos publicados que hacen referencia a la actividad antioxidante de algunas especies de macroalgas en modelos experimentales *in vitro* o *in vivo* bajo múltiples y variadas condiciones medioambientales (Fujimoto, 1990; Matsukawa et al., 1997; Le Tutour et al., 1998; Connan et al., 2007; Zubia et al., 2007; De la Coba et al., 2009). Sin embargo, la utilización de extractos obtenidos a partir de algas cultivadas como fuente de sustancias antioxidantes naturales ha sido escasamente abordada.

Una limitación importante para la obtención y ensayo de productos derivados de las algas es la propia dificultad para la producción sostenible de biomasa con características estables o reproducibles. Esta limitación ha sido superada con el desarrollo de las técnicas para el cultivo de macroalgas en sistemas intensivos bajo un alto grado de control (Bidwell et al., 1985; Friedlander y Levy, 1995). Las condiciones controladas permiten, en algunos casos, dirigir el metabolismo hacia la síntesis de sustancias de interés aplicado, bien asociadas al metabolismo primario (carbohidratos, proteínas o pigmentos), bien asociadas al metabolismo secundario (lípidos, carotenoides y otro tipo de compuestos bioactivos) (Friedlander et al., 1995; Gómez-Pinchetti et al., 1998; Neori et al., 2004).

El cultivo intensivo de macroalgas creciendo de forma libre (sin necesidad de un sustrato) es realizado en tanques en los que se establece un sistema de agitación del medio y la biomasa. En estos sistemas la producción de biomasa por unidad de superficie o volumen cultivado es elevada, en contraste con su principal desventaja, los altos costes de producción relacionados, fundamentalmente, con los elevados costes de bombeo de agua, agitación del medio y en ocasiones el enriquecimiento extra de CO<sub>2</sub> (Friedlander y Levy, 1995). El control de las variables físicas, químicas y biológicas, sus interrelaciones y su efecto sobre la calidad de la biomasa en estos sistemas de cultivo, ha sido ampliamente estudiado a través del desarrollo, hasta la escala comercial, del cultivo de especies de interés industrial, principalmente de los géneros *Gracilaria* y *Chondrus* (Bidwell et al., 1985; Friedlander y Levy, 1995; Braud, 2006). La importancia de factores como el diseño del tanque, el bombeo y movimiento/agitación del agua/medio de cultivo, la irradiación, la temperatura, el

aporte de nutrientes, el carbono inorgánico, la densidad (óptima y máxima) y la competición de especies (crecimiento de epífitos) muestran un efecto directo sobre el principal proceso fisiológico de las algas, la fotosíntesis, y por lo tanto, sobre los valores máximos de producción ( $\text{g Peso Seco m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) y eficacia fotosintética del sistema (porcentaje de conversión de energía luminosa en biomasa). A mayor control de estas variables, mayor posibilidad para el aumento de la producción y modificación de la calidad de la biomasa obtenida (Bidwell et al., 1985; Friedlander y Levy, 1995).

Dentro de un amplio número de posibilidades para el cultivo y la producción de biomasa de interés de forma sostenible, en los sistemas integrados o IMTA, diferentes organismos, que desarrollan procesos diferenciados, son cultivados al mismo tiempo en el mismo espacio/flujo de agua. Los “desechos” producidos por cada unidad independiente se convierten en un recurso aprovechable por un nivel trófico inferior que actúa como biofiltro, estableciéndose así un sistema de producción/biofiltración bien equilibrado (Chopin et al., 2008; Neori, 2008; Troell et al., 2009; Chávez-Crooker y Obreque-Contreras, 2010). Estos planteamientos, basados en una idea inicial de Ryther et al. (1978), combinan la utilización conjunta de diferentes organismos (moluscos, equinodermos, macroalgas y/o microalgas) en la biofiltración de la materia tanto particulada como disuelta producida en los sistemas para la producción de peces o crustáceos. En los efluentes producidos por el cultivo de estos organismos, alimentados con pienso, el amonio constituye la fracción más importante del nitrógeno inorgánico disuelto ( $\text{NID} = \text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ), llegando a constituir hasta el 90% del NID y alcanzando concentraciones superiores a  $450 \mu\text{M}$  (Porter et al. 1987, Neori et al. 1989). Estas formas de nitrógeno (nutriente esencial del metabolismo y generalmente limitante en el medio marino) aportadas por los efluentes y que son canalizadas a través de los tanques de cultivo de macroalgas son metabolizadas en la célula hacia la producción de los aminoácidos, mediante el sistema GS/GOAGT antes de pasar a formar parte de algunos compuestos y moléculas orgánicas constituyentes de la biomasa (Lobban et al. 1985). Su asimilación es regulada principalmente, al igual que para otros nutrientes, por factores físicos como la luz y la temperatura, que aceleran su velocidad de asimilación (Lapointe, 1987; Peckol et al., 1994; Harrison y Hurd, 2001) afectando directamente el crecimiento de la biomasa en los sistemas de cultivo.

Por tanto, la utilización justificada de las macroalgas como biofiltro en estos sistemas de policultivo supone una mejora considerable de la calidad de los efluentes en cuanto a materia inorgánica disuelta se refiere ya que, principalmente durante las horas de luz, se consume amonio y otras formas inorgánicas generadas como los fosfatos (Neori et al. 2003; 2004; Buschmann et al., 2008). Además, a través del

proceso respiratorio los animales cultivados en el sistema generan CO<sub>2</sub> que es consumido a través del proceso fotosintético por las algas, produciéndose O<sub>2</sub> y elevando el pH del medio, con lo que aumentan las posibilidades de recirculación del agua a través del propio sistema (Cahill et al., 2010).

Más recientemente, la idea de los IMTA para el aprovechamiento de los efluentes de la acuicultura intensiva, tanto en los sistemas en tierra como en las cercanías de las jaulas costeras, ha sido modernizada a través de una apropiada selección y diversificación de especies que desarrollan las diferentes funciones dentro del sistema (Shpigel y Friedman, 1990; Neori y Shpigel, 1999, Neori et al., 2001; Chopin et al., 2008), llegando a ser considerada la idea de que las especies producidas pueden, además de mostrar actividad biofiltradora, tener un valor comercial añadido (Neori et al., 2004; Neori, 2008; Nobre et al., 2010). Así, no es de extrañar que en los últimos años haya aumentado de forma significativa el listado de géneros de macroalgas que están siendo cultivadas con éxito, tanto en sistemas de cultivo intensivo como en mar abierto y que presentan algún tipo de valor industrial o biotecnológico, p.e. *Palmaria* (Pang y Lüning, 2004); *Gelidium* (Friedlander, 2008); *Pterocladia* (Gal-Or e Israel, 2004); *Gigartina* (Buschmann et al., 2004); *Hizikia* (Pang et al., 2006); *Codium* (Hwang et al. 2008); *Sargassum* (Pang et al., 2010); *Macrocystis* (Westermeier et al., 2010); o *Porphyra* y *Undaria* en tanques y fotobiorreactores (Zhang et al., 2006; Deng et al., 2008); además de las ya reseñadas y ampliamente estudiadas *Ulva*, *Gracilaria* o *Chondrus*.

A estos ejemplos hay que añadir aquellos géneros y especies de macroalgas que han sido ensayados en sistemas de policultivo combinados peces-algas; crustáceos-algas; moluscos-algas; peces-moluscos-equinodermos-algas, que presentan capacidades de biofiltración significativas, p.e. superiores al 75% en el caso del amonio, además del propio valor añadido; como alimento animal, p.e. *Hypnea* y *Gracilaria* (Viera et al., 2005), *Ulva* (Robertson-Anderson et al., 2008), *Palmaria* (Demetropoulos y Langdon, 2004) y *Porphyra* (He et al., 2008); o como fuente de metabolitos con un mercado en continuo aumento, p.e. *Falkenbergia/Asparagopsis* (Mata et al., 2010), *Kappaphycus* (Hayashi et al., 2008), *Sargassum* (Mai et al., 2010) o *Codium* (Kang et al. 2008).

Algunas especies de los géneros enumerados son capaces, en algunas de las condiciones de crecimiento descritas, de acumular sustancias nitrogenadas que presentan interesantes actividades antioxidantes. Los amino ácidos tipo micosporina (MAAs) se acumulan por la influencia de la radiación UV y en función de la disponibilidad de nitrógeno (Litchman et al., 2002; Korbee et al., 2004; 2005), y actúan

como fotoprotectores además de mostrar una significativa capacidad antioxidante (de la Coba et al., 2009). La acumulación de MAAs en alta disponibilidad de nitrógeno ha sido observada en especies de algas rojas de los géneros *Porphyra*, *Grateloupia* y *Asparagopsis* (Korbee et al. 2005, Huovinen et al., 2006; Figueroa et al., 2008) sirviendo como reservas de nitrógeno que puede ser movilizadas en periodos de carencia de nutrientes. Esta capacidad de actuar como reserva de nitrógeno ha sido igualmente propuesta para otros pigmentos como las biliproteínas (López-Figueroa y Niell, 1991) que también muestran actividad antioxidante (Tierney et al., 2010). Desde el punto de vista aplicado, las MAAs pueden ser utilizadas en la formulación de cremas fotoprotectoras, que actúen como filtros frente a la radiación UV y funcionen a su vez como antioxidantes en la disminución de los efectos causados por los radicales libres (Bandaranayake, 1998; de la Coba et al., 2009).

La respuesta fisiológica y bioquímica a los cambios en la salinidad, o a la disponibilidad y los cambios en la concentración de nitrógeno y fósforo en el medio de especies cultivadas del género *Gracilaria*, afecta a una gran variedad de sustancias que actúan como potentes antioxidantes entre las que se encuentran pigmentos, polisacáridos o enzimas (Kumar et al., 2010). Estos resultados, en combinación con las posibilidades en cuanto al cultivo controlado de macroalgas y su utilización como biofiltro en los sistemas de policultivo integrado, establecen las bases para que la producción de especies con características estables o reproducibles permita la obtención de sustancias de interés de forma sostenible sin depender de los recursos algales naturales.

## 2.2. OBJETIVOS

Motivados por los resultados del capítulo anterior, y partiendo de la premisa del interés suscitado por la búsqueda de nuevos compuestos antioxidantes de origen natural, nos planteamos el estudio de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de macroalgas cultivadas en un sistema de biofiltración con alto aporte de nitrógeno, estableciendo los siguientes objetivos:

- Estudio de la adaptación a un sistema de cultivo intensivo, operando como sistema de biofiltración, de las especies de macroalgas (3 Chlorophytas, 5 Rhodophytas y 2 Phaeophytas) recolectadas de la naturaleza y previamente analizadas en el Capítulo I. Análisis de la capacidad de biofiltración de N-amonio de las especies, canalizando los efluentes producidos en tanques para el cultivo de dorada (*Sparus aurata*) mediante los parámetros NUE (eficiencia de eliminación de amonio), y NUR (tasa de asimilación de amonio).
- Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos e hidroalcohólicos obtenidos a partir de macroalgas cultivadas en el sistema de biofiltración con aporte continuo de nitrógeno mediante los métodos del DPPH y el poder reductor.
- Determinar el contenido cuantitativo de polifenoles, pigmentos lipofílicos (clorofila y carotenoides) e hidrofílicos (ficoeritrina) en el caso de cinco algas rojas analizadas. Y la relación carbono-nitrógeno de las especies cultivadas bajo condiciones de alta disponibilidad de N-amonio. Correlación de la actividad antioxidante detectada, el contenido de las sustancias cuantificadas y la respuesta en el biofiltro.

### HIPÓTESIS

Las macroalgas cultivadas de forma intensiva en un sistema de biofiltración de los efluentes producidos en tanques para el cultivo de peces, con alto contenido en N-amonio, pueden transformar los nutrientes disueltos, causante de la eutrofización de aguas costeras, en biomasa que contenga compuestos con capacidad antioxidante de interés aplicado.

## 2.3. MATERIAL Y METODOS

### 2.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 2.3.1.1. Especies cultivadas

Las especies de macroalgas cultivadas, fueron descritas en el Capítulo I, (Tabla 1.3.) y fueron recolectadas en la misma localización y fecha.

### 2.3.2. CONDICIONES DE CULTIVO

#### 2.3.2.1. Sistema de biofiltración

Durante los últimos años en el Centro de Biotecnología Marina (CBM) de la ULPGC se ha desarrollado un sistema de acuicultura integrada peces-macroalgas a escala de planta piloto.

El sistema se desarrolla en un circuito abierto de agua que fluye a través de los tanques de cultivo de sama dorada (*Sparus aurata*, Sparidae). Las aguas residuales son bombeadas, desde un tanque de decantación donde se elimina la materia particulada, hacia dos invernaderos donde están instalados los sistemas intensivos (fotobiorreactores, tanques y raceways) para el cultivo de algas. Una bomba instalada en el interior del muelle impulsa  $18 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  de agua de mar a través de un sistema de filtración, y de aquí a cinco tanques de almacenamiento con capacidad para 5000 L cada uno. Desde aquí cae por gravedad y de forma continua a dos estanques circulares de  $11 \text{ m}^3$ . Durante el periodo experimental en estos tanques se cultivan aproximadamente 3000 ejemplares de *Sparus aurata* con un peso medio de 80 g a una densidad media de  $5 \text{ kg m}^{-3}$ . La temperatura del agua del sistema de cultivo presentó un rango que varía entre 20 y  $24.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . La tasa de recambio se mantuvo entre  $8\text{-}9 \text{ vol d}^{-1}$ . El flujo de salida de agua de los tanques descarga en un tercer estanque que funciona como tanque de decantación para la eliminación de materia particulada antes de ser bombeada hacia los sistemas de cultivos donde los flujos de agua pueden ser regulados de forma independiente.

Siguiendo las tablas de alimentación, los peces fueron alimentados diariamente dos veces al día, a primera hora de la mañana y a media mañana con pienso comercial de alto contenido en proteínas (Tabla 2.1.).

Tabla 2.1. Composición química del pienso alimenticio utilizado para la alimentación de *Sparus aurata*.

COMPOSICIÓN	
Proteína bruta	46 %
Materia grasa bruta	22 %
Cenizas brutas	11,5 %
Celulosa bruta	1,0 %
Fósforo total	1,3 %
Antioxidantes	Etoxiquina y BHT
Vitamina A	10.000 U.I. /kg
Vitamina D3	1.500 U.I. /Kg
Vitamina E (alfa tocoferol)	150 U.I. /Kg

El siguiente diagrama muestra de forma resumida el flujo de N-amonio a través del sistema desde la entrada de agua en el tanque de peces hasta el sistema de cultivo de macroalgas (Fig.2.1.). Para conseguir concentraciones de nutrientes superiores a las aportadas por el cultivo de peces, se dispuso de un “sistema virtual” que consiste en un depósito que vierte, mediante goteo controlado, cloruro de amonio al tanque de decantación. Esto permitió incrementar de forma controlada la concentración de N-amonio que entraba al sistema.

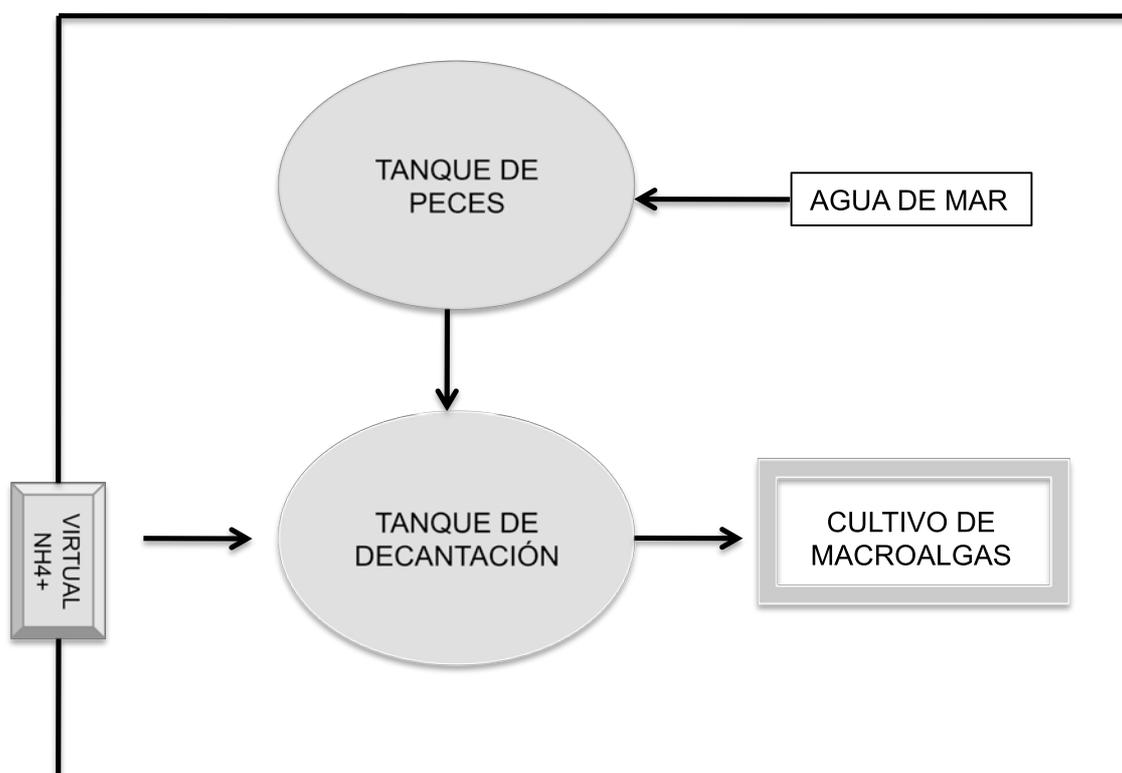


Figura 2.1. Diagrama del flujo de N-amonio en el sistema de biofiltración.

### 2.3.2.2. Sistemas de cultivo de macroalgas y diseño experimental

Para el cultivo de macroalgas a la escala de planta piloto se han utilizado fotobiorreactores de metacrilato (FBR) con volumen de 30 L y superficie de 0,07m<sup>2</sup>. La aireación se inyectó mediante una bomba soplante (SIEMENS Elmo-G) desde la base con el objetivo de crear una turbulencia (Fig. 2.2.) y agitación permanente. La salida de aire por tubos perforados en el fondo de los FBR originó un burbujeo que permitió que las algas crecieran mantenidas en la columna de agua.

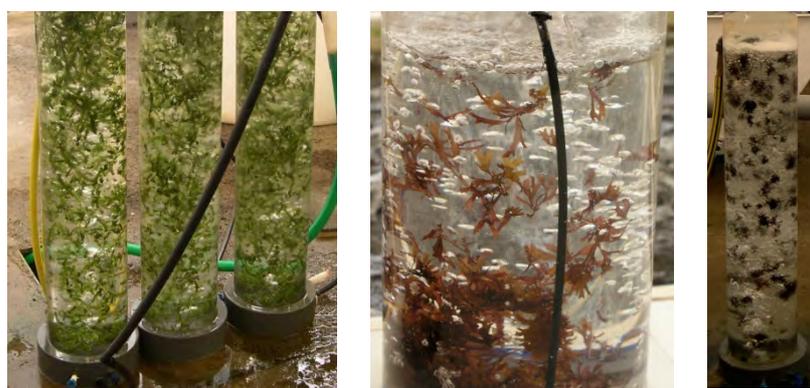


Figura 2.3. Imágenes de tres especies cultivadas en el biofiltro *Caulerpa racemosa*, *Grateloupia dichotoma* y *Laurencia majuscula*.

Los experimentos se llevaron a cabo los meses de Agosto y Septiembre del 2004. Las especies estuvieron en cultivo un total de cuatro semanas con aporte de efluente de piscifactoría en circuito abierto. La densidad de algas al inicio del cultivo fue de 18 g l<sup>-1</sup> y la tasa de renovación de 8.5 vol d<sup>-1</sup>.

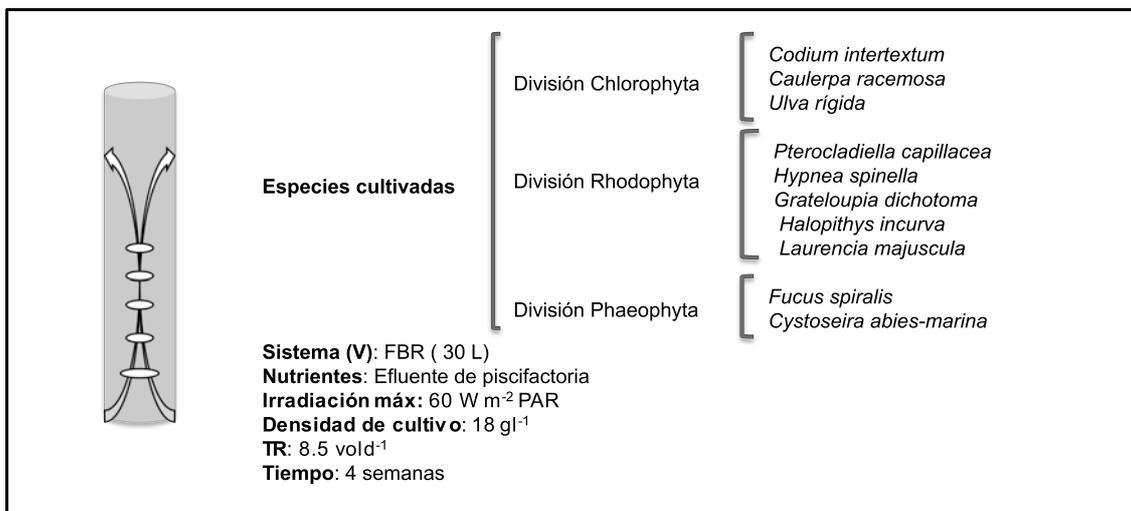


Fig. 2.2. Esquema experimental del FBR condiciones de cultivo.

Las condiciones de luz del sistema de cultivo, determinadas por la localización del cultivo bajo invernadero, recibieron una irradiación máxima de  $60 \text{ W m}^{-2}$  PAR (400-700nm) y radiaciones UV-A y UV-B nulas. Estas medidas de irradiación solar fueron obtenidas mediante el equipo ELDONET (European Light Dosimeter NETWORK) instalado en el CBM (Fig.2.4). Es un radiómetro de banda ancha que mide la radiación solar incidente en tres bandas espectrales: PAR (400 nm – 700 nm), UV-A (315 nm – 400 nm) y UV-B (280 nm – 315 nm). Utiliza una esfera integradora de 10 cm para recoger tanto la radiación directa como indirecta cuya apertura está protegida por una esfera de cuarzo. El software WinDose 2000 integra las medidas de radiación ( $\text{W m}^{-2}$ ) a lo largo del tiempo y las almacena en un fichero de datos diario.



Figura 2.4. Equipo de trabajo con el cual se midió la irradiación solar recibida en las diferentes localizaciones de los cultivos de macroalgas: receptor del sensor Eldonet (European Light Dosimeter NETWORK), que aporta medidas continuas de la radiación solar incidente (PAR; UV-A; UV-B) ( $\text{W m}^{-2}$ ).

La absorción de radiación PAR del FBR de metacrilato era del 6.5 %, y la medida se realizó con un fotómetro-radiómetro cuántico LICOR (Li-1400), un datalogger (almacenamiento de datos) preparado para la adquisición de datos de diferentes tipos de sensores de radiación PAR. Las medidas se tomaron acoplando un sensor esférico PAR (SPQA-2770). Las medidas de radiación de este equipo se toman en las unidades:  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Todas las medidas de pH se llevaron a cabo con pH-metro 507 (CRISON). Las medidas de la concentración de oxígeno disuelto (DO) y temperatura tanto para el tanque de peces como para los tanques de algas fueron obtenidas con un oxigenómetro DO100 (Cole-Palmer). Además se utilizó un oxigenómetro Oximatic 700 (WTW) para realizar medidas en continuo.



Figura 2.5. Equipo de trabajo (datalogger , adaptador, sensor esférico) con el cual se midió la radiación PAR que recibían las macroalgas en el fotobiorreactor. Las medidas de radiación de este equipo se toman en las unidades:  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

### 2.3.2.3. Biofiltración de N-amonio

Semanalmente, durante el periodo experimental se realizaron análisis para la determinación de la capacidad de biofiltración de N-amonio de las especies ensayadas. Después de ajustar la densidad de la biomasa de cada FBR. Se determinaron las eficacias de eliminación (NUE) y asimilación (NUR) de N-amonio en un periodo no superior a 24 horas. Las muestras analizadas se tomaron de los tanques de peces, flujo de entrada y de la salida de cada FBR. También se tomaron muestras de agua de mar como control.

#### 2.3.2.3.1. Análisis de amonio

La concentración de amonio fue determinada espectrofotométricamente de acuerdo con el método de (Patton y Crouch, 1977). Las muestras fueron tratadas en presencia de fenol, un donador de cloro (hipoclorito de sodio) y un agente complejante (citrato alcalino) cuya misión es evitar la precipitación de hidróxidos metálicos y otros compuestos, el nitroprusiato actúa como catalizador. El resultado de esta reacción es la formación de un compuesto coloreado indofenólico de color azul y es medido a una longitud de onda de 660nm.

#### Protocolo

Para la realización de este ensayo inicialmente se prepararon las siguientes disoluciones, a las concentraciones indicadas: disolución de fenol (DF): 0.1g/ml en alcohol etílico 95%, disolución nitroprusiato (DN):  $5 \cdot 10^{-3}$  g/ml en agua destilada, disolución alcalina (DA): 0.2 g/ml de citrato de sodio y 0,01 g/ml de hidróxido de sodio en agua destilada, disolución de hipoclorito de sodio (DH): 1.5 N y la disolución

oxidante (DO): mezcla (DA) con (DH) en proporción 4:1. A 10 ml de muestra, por triplicado, se añadieron 400 µl de la disolución de fenol, 400 µl de la disolución de nitroprusiato y 1 ml de la disolución oxidante. Se agitaron bien los tubos tras la adición de cada disolución. Los tubos tapados, se incubaron a temperatura ambiente (20-24 °C) y sin luz directa durante una hora. Paralelamente se preparó una curva patrón con cloruro de amonio a concentraciones entre 10-90 µM. Como blanco se empleó agua de mar. Posteriormente, se midió la absorbancia a 640 nm.

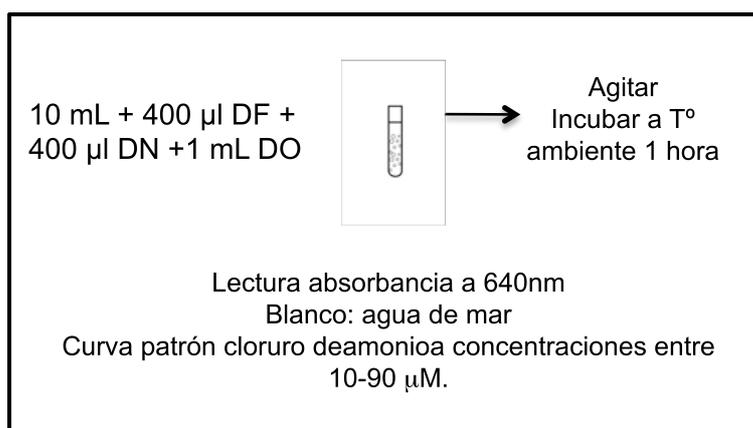


Figura 2.6. Protocolo análisis de amonio (Patton y Crouch, 1977).

### 2.3.2.3.2. Tasas de biofiltración y velocidad de absorción de amonio

La tasa de biofiltración es el porcentaje reducción de la concentración de amonio y refleja la eficacia con la que las algas son capaces de eliminar el amonio presente en el medio. La eficiencia de biofiltración (NUE) fue calculada como:

$$\text{NUE} = 100 - (C_s / C_e * 100)$$

donde  $C_s$  es la concentración en la salida del fotobioreactor y  $C_e$  es la concentración en la entrada.

La velocidad de asimilación de amonio NUR expresado en  $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$  fue calculada como:

$$\text{NUR} = F_i * (C_e - C_s) / L$$

siendo,  $F_i$  el flujo de entrada,  $C_s$  ( $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) la concentración en la salida del fotobioreactor y  $C_e$  ( $\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) la concentración en el flujo de entrada y  $L$ , volumen del fotobiorreactor.

### **2.3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (Capítulo I)**

#### **2.3.3.1. Estudio de la actividad antiradical (Ensayo DPPH)**

#### **2.3.3.2. Poder reductor**

### **2.3.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES(Capítulo I)**

### **2.3.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS (Capítulo I)**

#### **2.3.5.1. Obtención de los extractos**

#### **2.3.5.2. Determinación de pigmentos liposolubles**

#### **2.3.5.3. Determinación de pigmentos hidrosolubles**

### **2.3.6. ANÁLISIS DE CARBONO Y NITRÓGENO (Capítulo I)**

La metodología utilizada para estas determinaciones (Desde 2.3.3. hasta 2.3.6) es descrita en profundidad en el Capítulo I.

### **2.3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los valores representados corresponden a valores medios±el error estándar de las réplicas realizadas para cada ensayo. Se realizó un contraste de medias mediante una prueba de análisis de varianzas (ANOVA). Algunos resultados además se analizaron aplicando la comparación de medias mediante en test de Tukey B. El nivel de significación fue del 95% ( $\alpha=0.95$ ) en todos los casos. El análisis de correlación de Pearson se realizó con intervalos de confianza del 95 y 99%. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS para MAC OS X.

## **2.4. RESULTADOS**

### **2.4.1. RESPUESTA DE LAS ESPECIES ENSAYADAS A LAS CONDICIONES DE CULTIVO**

Las especies ensayadas respondieron en general positivamente a las condiciones de cultivo descritas, mostrando en algunos casos adaptaciones morfológicas representativas de la dinámica de los FBR. La rotación permanente del sistema de cultivo induce a que las especies cultivadas no presenten estructuras de fijación y al desarrollo de morfologías pseudo-esféricas (en las especies no foliosas, y sobre todo en las especies de estructura ramificada de crecimiento apical). A continuación se muestran las imágenes más representativas (Fig. 2.7., 2.8., 2.9). El orden de adaptación al sistema y condiciones de cultivo observado durante el ensayo fue, *Caulerpa racemosa*, *Ulva rigida*, *Hypnea spinella* >*Codium intertextum*, *Grateloupia dichotoma*, *Laurencia majuscula* >*Pterocladia capillacea*, *Halopithys incurva* >*Cystoseira abies-marina* >*Fucus spiralis* (Tabla 2.2.).

Tabla 2.2. Resumen comparativo de las especies ensayadas en el sistema de cultivo, indicado de mayor a menor adaptación (++++,+++,+ -).

Especies	Adaptación a las condiciones de cultivo
<i>C. intertextum</i>	+++
<i>C. racemosa</i>	++++
<i>U. rigida</i>	++++
<i>P. capillacea</i>	++
<i>H. spinella</i>	++++
<i>G. dichotoma</i>	+++
<i>H. incurva</i>	++
<i>L. majuscula</i>	+++
<i>F. spiralis</i>	-
<i>C. abies-marina</i>	+

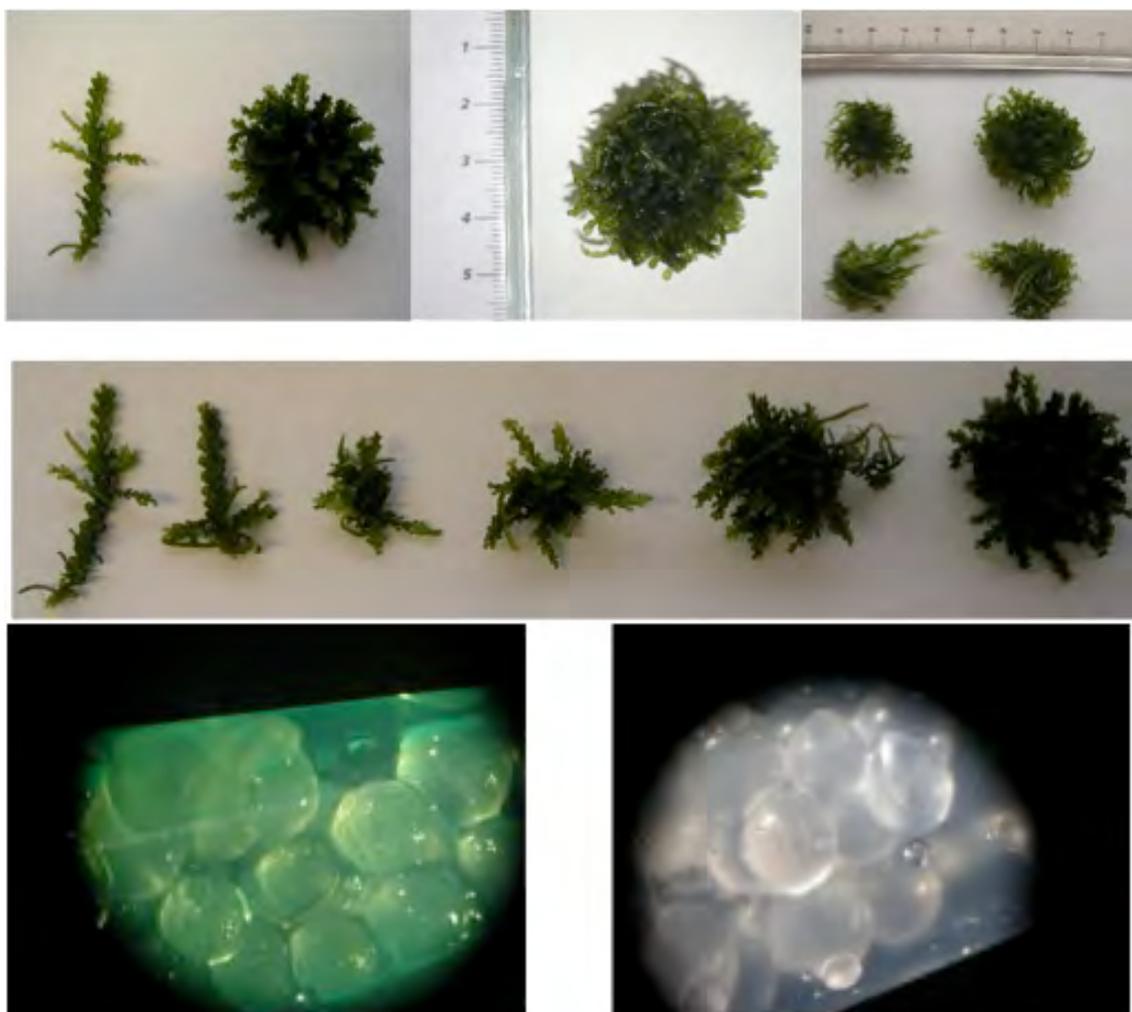


Figura 2.7. Cambio de morfología de *Caulerpa racemosa* en cultivo en fotobiorreactor. Las imágenes de la parte interior fueron observadas a la lupa, corresponden al interior de la morfología "bola" observada tras el cultivo durante cuatro semanas en fotobiorreactor.

En el cultivo de *Caulerpa racemosa* se pudo observar la formación paulatina de una especie de “bolas” provocado por el hidrodinamismo del sistema de cultivo que alcanzaron una media de 5 cm transcurrido el mes de ensayo. Pero al observar el interior de estas “bolas” a la lupa, se pudo comprobar el sombreado que producía esta morfología a la parte interior de la misma (Fig 2.8.).

Las algas rojas junto con las verdes son las que presentaron mejor adaptación. A modo de ejemplo, se muestra el cambio de aspecto que se observó en *Pterocladia capillacea* (Fig 2.8.) la cual presenta un color oscuro y brillante cultivada en alto contenido de N-amonio que carece en la naturaleza. Por el contrario, la adaptación de las especies pardas cultivadas en el ensayo no fue positiva, observando una decadencia en el tejido de *Fucus spiralis* (Fig. 2.9) y coloración turbia del agua.

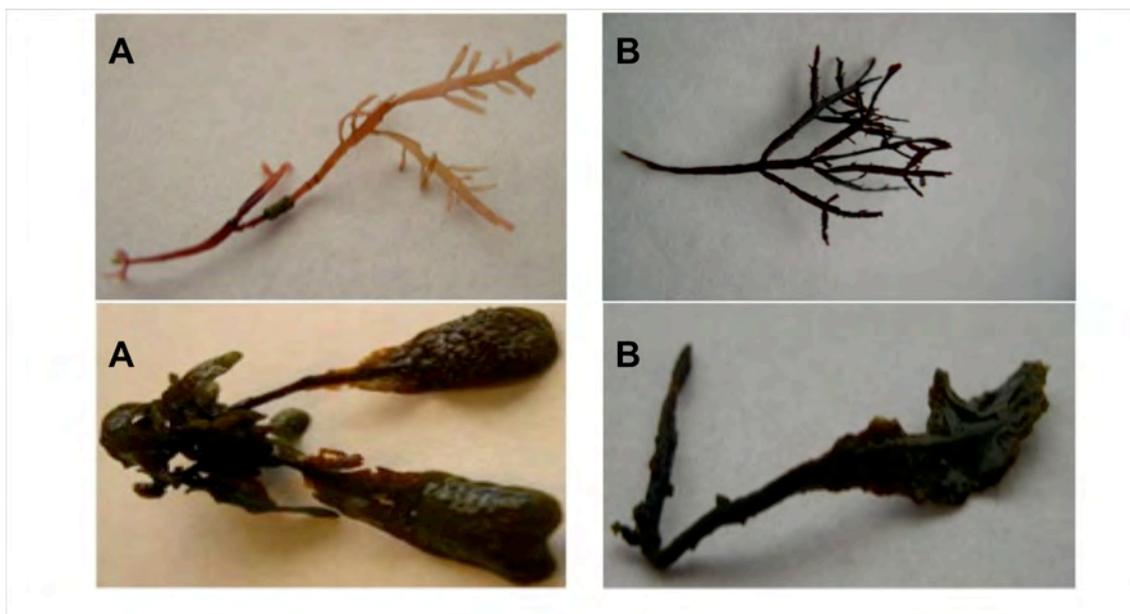


Figura 2.8. Cambio de morfología observada en *Pterocladia capillacea* (imágenes superiores) y *Fucus spiralis* (imágenes inferiores) en cultivo en fotobiorreactor. A: día 0, B: después de un mes.

### 2.4.2. ESTUDIO DE BIOFILTRACIÓN DE LAS ESPECIES

Un control semanal permitió el cálculo del amonio biofiltrado por las especies de macroalgas así como la velocidad de absorción a lo largo de las cuatro semanas en las que transcurrió el experimento. Los valores mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Durante el periodo de ensayo la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en la entrada de los fotobiorreactores fue de  $81.5 (\pm 23.4) \mu\text{M}$ .

La biofiltración es el porcentaje de amonio eliminado del total que entra en cada sistema de cultivo. Por ello, los resultados responden al número de tasas de renovación y la capacidad de absorción de cada especie dentro del sistema. La capacidad biofiltradora (NUE) y velocidades de absorción de amonio (NUR) de las especies, fue alta en general tal y como se resume en la Tabla 2.3., siendo las algas pardas *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina* las que mostraron resultados más bajos, no pudiendo terminar el ensayo de cultivo por su falta de adaptación al sistema de cultivo planteado en el experimento. *Fucus spiralis*, se cosechó la semana 2 y *Cystoseira abies-marinala* semana 3. La eficiencia media de eliminación máxima fue del 61 % y el valor mínimo fue cercano al 17% observados ambos en la especie roja *P. capillaceae*. Las especies *Codium intertextum*, *Caulerpa racemosa* y *Ulva rigida* presentaron valores máximos cercanos al 48 % y mínimos de 23, 32 y 43 % respectivamente.

Tabla 2.3. Resumen comparativo de la eficiencia de asimilación de amonio NUE (%) y velocidades de absorción NUR ( $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) de las especies de macroalgas estudiadas (media  $\pm$  desv, n=4). En paréntesis se señala la semana en la que se obtuvo el máximo y mínimo de asimilación de amonio.

Especies	NUE (%)	NUE Máx-Mín	NUR ( $\mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ )
<i>C. intertextum</i>	36	47(S2)-23(S1)	6.6 $\pm$ 2.6
<i>C. racemosa</i>	42	48(S2)-32 (S4)	9.44 $\pm$ 2.3
<i>U. rigida</i>	45	47(S1)-43(S2)	10.49 $\pm$ 2.8
<i>P. capillacea</i>	36	61(S4)-17(S1)	8.00 $\pm$ 4.5
<i>H. spinella</i>	37	31(S2)-47(S4)	11.31 $\pm$ 3.45
<i>G. dichotoma</i>	50	54(S3)-42(S4)	11.41 $\pm$ 2.8
<i>H.incurva</i>	33	39(S3)-30(S1)	7.47 $\pm$ 1.3
<i>L. majuscula</i>	48	55(S4)-42(S3)	8.68 $\pm$ 3.2
<i>F. spiralis</i>	27	33(S1)-20(S2)	7.23 $\pm$ 2.3
<i>C. abies-marina</i>	20	21(S1)-19(S3)	4.57 $\pm$ 1.5

La reducción de los niveles de  $\text{NH}_4^+$  en el efluente por parte de las algas pardas fueron en general los más bajos, siendo estos valores de 20 y 27 % correspondientes

a *F. spiralis* y a *C. abies-marina* respectivamente. La tasa de incorporación de  $\text{NH}_4^+$ (NUR) presentó diferencias significativas entre las diferentes especies ensayadas, encontrando los valores más altos entre las especies *H. musciformis*, *G. dichotoma* y *U. rigida*  $11.31(\pm 3.45) \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,  $11.41(\pm 2.8) \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,  $10.49 (\pm 2.8) \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente. El principal efecto de la tasa de recambio es la cantidad de amonio suministrado a las algas por unidad de tiempo, de modo que con una tasa de renovación de  $8.5 \text{ vol d}^{-1}$  la media en general fue de  $8.5 (\pm 0.9) \mu\text{mol l}^{-1}\text{h}^{-1}$ .

### 2.4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### 2.4.3.1. Ensayo DPPH

La actividad antioxidante mostrada (Fig. 2.10, 2.11) corresponde a extractos de macroalgas cultivadas durante un mes dentro del sistema de policultivo integrado (SPI) en alto contenido de N-amonio. Estos resultados, muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la actividad detectada en las tres divisiones Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta mediante el ensayo DPPH, extractos metanólicos (Fig. 2.10) e hidroalcohólicos (Fig. 2.11) donde se han representado los valores medios ( $n=9$ ) y desviaciones.

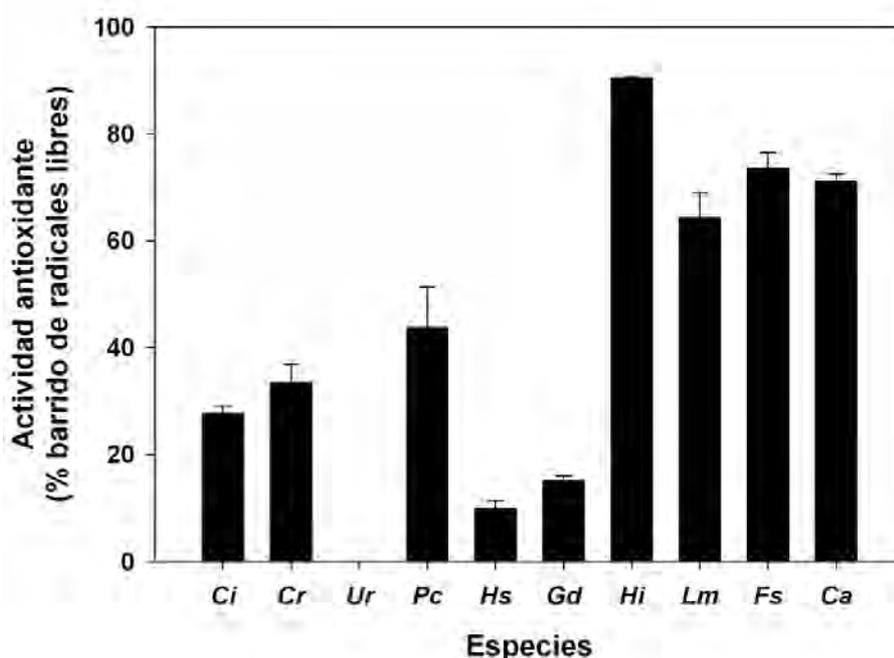


Figura 2.10. Actividad antioxidante (% barrido del radical libre) detectado en extractos metanólicos de macroalgas cultivadas (media  $\pm$  desv,  $n=9$ ). Las especies se representan mediante las siguientes iniciales, Ci: *Codium intertextum*, Cr: *Caulerpa racemosa*, Ur: *Ulva rígida*, Pc: *Pterocladia capillacea*, Hs: *Hypnea spinella*, Gd: *Grateloupia dichotoma*, Hi : *Halopithys incurva*, Lm: *Laurencia majuscula*, Fs : *Fucus spiralis*, Ca: *Cystoseira abies-marina*.

De todos los extractos estudiados, los valores encontrados varían entre máximos de 90.36 % de barrido de radical libre en *H. incurva* y mínimos de 9.84 % en *Hypnea spinella* detectados ambos en los extractos metanólicos. En estas comparativas no se ha incluido la ausencia de actividad del extracto metanólico de *Ulva rigida*. Entre los extractos metanólicos de las especies de la División Chlorophyta la actividad antioxidante disminuye de *Caulerpa racemosa* > *Codium intertextum* > *Ulva rigida* (que no muestra actividad) y el orden de la actividad detectada en los extractos hidroalcohólicos fue el mismo. Todos los extractos metanólicos e hidroalcohólicos de las especies de algas rojas mostraron actividad antioxidante. Estos valores en los extractos metanólicos disminuyen *H.incurva* > *L.flexilis* > *P. Capillacea* > *G.dichotoma* > *H. spinella* .

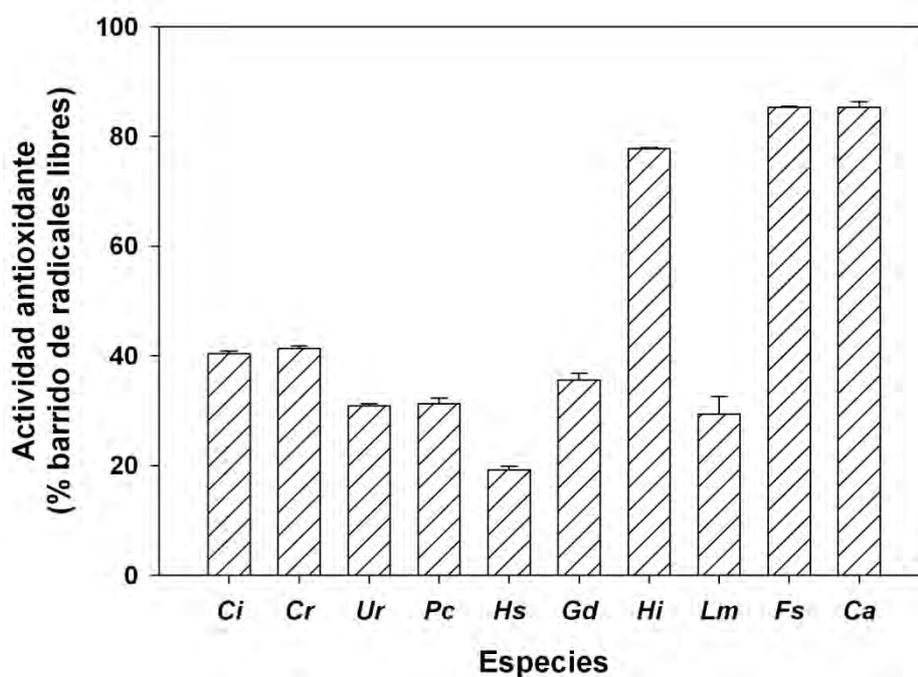


Figura 2.11. Actividad antioxidante (% barrido del radical libre ) detectado en extractos hidroalcohólicos de macroalgas cultivadas (media  $\pm$  desv, n=9). Las especies se representan mediante las siguientes iniciales, Ci: *Codium intertextum*, Cr: *Caulerpa racemosa*, Ur: *Ulva rigida*, Pc: *Pterocladia capillacea*, Hs: *Hypnea spinella*, Gd: *Grateloupia dichotoma*, Hi : *Halophytis incurva*, Lm: *Laurencia majuscula*, Fs : *Fucus spiralis*, Ca: *Cystoseira abies-marina*.

En cuanto a los resultados obtenidos de los extractos hidroalcohólicos el orden varía significativamente, *H.incurva* > *G.dichotoma* > *P. capillacea* > *L.flexilis* > *H. spinella*. Entre los resultados de las especies pardas, destacar la alta actividad detectada en ambas siendo muy similar en ambas pero significativamente superior el detectado en los extractos hidroalcohólicos.

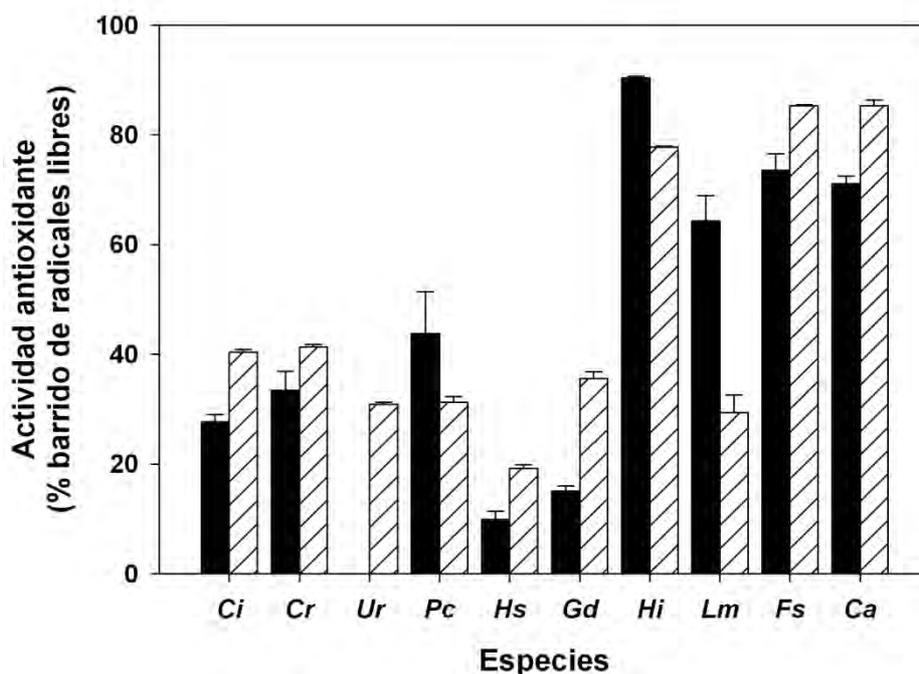


Figura 2.12. Comparativa entre la actividad antioxidante (% barrido del radical libre ) detectado sobre el radical libre DPPH• de los extractos metanólicos ■ e hidroalcohólicos □ de macroalgas cultivadas (media ± desv, n=9). Las especies se representan mediante las siguientes iniciales, Ci: *Codium intertextum*, Cr: *Caulerpa racemosa* Ur: *Ulva rígida*, Pc: *Pterocladia capillacea*, Hs: *Hypnea spinella* , Gd: *Grateloupia dichotoma*, Hi : *Halopithys incurva*, Lm: *Laurencia majuscula*, Fs : *Fucus spiralis*, Ca: *Cystoseira abies-marina*.

Paralelamente se midió la actividad antioxidante de los antioxidantes comerciales propilo galato, vitamina E, vitamina C, BHT y floriglucinol también se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Estos resultados mostraron que el propilo galato y ácido ascórbico tienen una alta actividad 95.68 y 96.44 % de barrido de radical libre respectivamente, comparable a la actividad detectada en el extracto metabólico de *H.incurva*. El floriglucinol mostró una actividad de 69.34 % seguido de la actividad detectada en la vitamina E y el antioxidante comercial BHT, 37.73% y 28.7 % de barrido de radical libre respectivamente. A continuación se presenta un resumen de los resultados, en esta prueba se calculó el EC50, es decir, el índice de concentración necesario para decolorar en un 50% la concentración inicial del DPPH•, con el fin de estandarizar los resultados entre los diferentes extractos. Al realizar el análisis estadístico se observó que existen diferencias significativas entre todos los extractos (METOH, ETOH50).

La actividad del barrido del radical DPPH, expresada como EC50 ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), en las especies cultivadas pertenecientes a los phylum Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta mostraron también diferencias significativas entre los distintos extractos

( $p < 0.05$ ). *Caulerpa racemosa* (en ambos extractos) exhibió la mayor actividad en el radical DPPH con una EC50 muy baja  $1.87 \pm 0.12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (extracto metabólico) y  $1.45 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (extracto hidroalcohólico). El extracto metanólico de la especie roja *L. majuscula* exhibió también una alta actividad de barrido de radicales libres  $1.56 \pm 0.11 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  seguida dentro de este phylum de *H. incurva* (en ambos extractos)  $2.54 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (extracto metanólico) y  $2.66 \pm 0.04 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (extracto hidroalcohólico). Los siguientes datos más representativos correspondieron a los extractos de las algas pardas *F. spiralis* y *Cystoseira abies-marina* (en ambos extractos) con valores similares a *H.incurva*. En ningún caso estos extractos fueron similares a los antioxidantes comerciales, que mostraron una EC50 muy baja en el caso del ácido ascórbico  $0.06 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  seguido del propil galato  $0.15 \pm 0.19 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Tabla 2.4. Resultados de la capacidad antioxidante expresados como EC50 ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) de los extractos de especies de macroalgas cultivadas. Siendo, los extractos metanólicos (METOH) e hidroalcohólicos y ETOH 50%) (-) sin actividad, (media  $\pm$  desv,  $n=3$ ). Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B).

Especies	EC50 ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	
	Extracto METOH	Extracto ETOH 50%
<i>C. intertextum</i>	$3.98 \pm 0.19^c$	$2.72 \pm 0.04^b$
<i>C. racemosa</i>	$1.87 \pm 0.12^a$	$1.45 \pm 0.01^a$
<i>U. rigida</i>	-	$4.90 \pm 0.06^d$
<i>P. capillacea</i>	$7.46 \pm 1.26^d$	$9.71 \pm 0.52^f$
<i>H. spinella</i>	$15.40 \pm 1.89^e$	$7.75 \pm 0.17^e$
<i>G. dichotoma</i>	$15.24 \pm 0.11^e$	$6.54 \pm 0.07^d$
<i>H. incurva</i>	$2.54 \pm 0.01^b$	$2.66 \pm 0.04^b$
<i>L. majuscula</i>	$1.56 \pm 0.11^a$	$3.52 \pm 0.23^c$
<i>F. spiralis</i>	$2.72 \pm 0.11^b$	$2.35 \pm 0.01^b$
<i>C. abies-marina</i>	$2.52 \pm 0.02^b$	$2.11 \pm 0.01^b$

#### 2.4.3.2. Poder reductor

Los resultados obtenidos respecto a la actividad antioxidante en los extractos mediante el método del poder reductor detectado en las especies de macroalgas cultivadas se presentan en la Tabla 2.5. de modo resumido, expresados como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido ascórbico (AA). Los resultados reflejan que, nuevamente la mayor actividad antioxidante en extractos ETOH50% significativamente superior ( $p < 0.05$ ) se encuentra en *Halopithys incurva*, seguida de las algas pardas *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina* un  $5.0 \pm 0.04$  y  $3.4 \pm 0.02 \mu\text{g AA mg}^{-1}$  respectivamente en los extractos metanólicos. En cambio el comportamiento que exhibieron los extractos hidroalcohólicos de las algas pardas (*Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-*

*marina*) no mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con valores de  $8.6 \pm 0.14$  y  $8.9 \pm 0.19 \mu\text{g AA mg}^{-1}$  respectivamente.

Tabla 2.5. Resultados obtenidos mediante el método poder reductor ( $\mu\text{g AA mg}^{-1}$ ) en los extractos (metanólicos e hidroalcohólicos) de macroalgas cultivadas bajo alto contenido de N-amonio (media  $\pm$  desv,  $n=3$ ). Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B).

Especies	Poder reductor ( $\mu\text{g AA mg}^{-1}$ )	
	Extracto METOH	Extracto ETOH 50%
<i>C. intertextum</i>	$0.18 \pm 0.02^a$	$3.19 \pm 0.01^d$
<i>C. racemosa</i>	<b><math>3.30 \pm 0.01^f</math></b>	<b><math>4.90 \pm 0.02^e</math></b>
<i>U. rigida</i>	$1.60 \pm 0.20^d$	$3.20 \pm 0.04^d$
<i>P. capillacea</i>	$0.83 \pm 0.01^c$	$0.75 \pm 0.01^b$
<i>H. spinella</i>	$0.32 \pm 0.02^b$	$0.56 \pm 0.01^a$
<i>G. dichotoma</i>	$0.37 \pm 0.01^b$	$0.40 \pm 0.03^a$
<i>H. incurva</i>	<b><math>2.30 \pm 0.04^e</math></b>	<b><math>21.75 \pm 1.05^g</math></b>
<i>L. majuscula</i>	$1.16 \pm 0.10^d$	$1.14 \pm 0.04^c$
<i>F. spiralis</i>	$5.00 \pm 0.04^g$	<b><math>8.60 \pm 0.14^f</math></b>
<i>C. abies-marina</i>	$3.40 \pm 0.02^f$	<b><math>8.90 \pm 0.19^f</math></b>

En los extractos de las algas verdes, se encontraron grandes diferencias, siendo el valor significativamente inferior ( $p < 0.05$ ) en el extracto metanólico de *C. intertextum*  $0.18 \pm 0.02 \mu\text{g AA mg}^{-1}$ . En cambio, aunque se encontraron diferencias significativas entre las especies Rhodophytas también se encontraron diferencias y valores muy bajos en general entre los diferentes extractos.

#### 2.4.4. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES ANTIOXIDANTES DE LAS ALGAS

##### 2.4.4.1. Determinación de compuestos fenólicos totales

De todas las especies estudiadas *Halopithys incurva* presentó un contenido significativamente superior ( $p < 0.05$ ) en compuestos fenólicos totales 3.53 % de su peso seco, mientras que los valores más bajos entre las especies cultivadas se observaron en *Ulva rigida* 0.54 % de su peso seco. Aunque todas las especies muestran diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales (Tabla 2.6.).

Los compuestos fenólicos se detectaron tras añadir PVPP sólo en las especies pardas (*Fucus* y *Cystoseira*) y una especie roja (*Halopithys*). Siendo la especie parda *Cystoseira abies-marina* la que mostró el contenido más alto en polifenoles aplicando el tratamiento con PVPP, 2.04% de su peso seco.

Tabla 2.6. Contenido de polifenoles totales con y sin el tratamiento PVPP ambos valorados mediante el método FC en los extractos de especies de macroalgas cultivadas en el biofiltro expresado como % de peso seco(media  $\pm$  desv, n=3). Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B).

Especies	Compuestos fenólicos totales (% masa seca)	Compuestos fenólicos totales (% masa seca) PVPP
<i>C.intertextum</i>	0.96 $\pm$ 0.00 <sup>e</sup>	-
<i>C.racemosa</i>	<b>1.46 <math>\pm</math> 0.01<sup>h</sup></b>	-
<i>U.rigida</i>	0.54 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	-
<i>P.capillacea</i>	0.80 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	-
<i>H.spinella</i>	0.65 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	-
<i>G.dichotoma</i>	0.50 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	-
<i>H.incurva</i>	<b>3.54 <math>\pm</math> 0.02<sup>j</sup></b>	<b>0.91 <math>\pm</math> 0.02<sup>b</sup></b>
<i>L.majuscula</i>	1.41 $\pm$ 0.00 <sup>g</sup>	-
<i>F.spiralis</i>	<b>1.11 <math>\pm</math> 0.00<sup>f</sup></b>	<b>0.25 <math>\pm</math> 0.01<sup>a</sup></b>
<i>C.abies-marina</i>	<b>2.80 <math>\pm</math> 0.02<sup>i</sup></b>	<b>2.04 <math>\pm</math> 0.00<sup>c</sup></b>

#### 2.4.4.2. Cuantificación de los pigmentos

##### 2.4.4.2.1. Pigmentos liposolubles : Clorofila a, b y carotenoides

La cuantificación de los pigmentos liposolubles, clorofila a, b y carotenoides totales, expresados como mg·g PS<sup>-1</sup> se muestra en la Tabla 2.7. Las cuales presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), siendo *Ulva rigida* la especie que muestra mayores valores en clorofila a y en carotenoides, 0.27  $\pm$  0.01 mg · g PS<sup>-1</sup> y 0.07  $\pm$  0.01 mg · g PS<sup>-1</sup> respectivamente. Las algas rojas presentaron valores entre un mínimo de 0.04 mg·g PS<sup>-1</sup> en *L. majuscula* y un máximo de 0.13  $\pm$  0.01 mg·g PS<sup>-1</sup> en *P. capillacea*. En las algas verdes *Codium intertextum* y *Caulerpa racemosa* se detectaron los valores más bajos ( 0.04 mg · g PS<sup>-1</sup>). En las algas pardas se encontraron valores de 0.09 mg·g PS<sup>-1</sup> en *Fucus spiralis* y 0.13 mg·g PS<sup>-1</sup> en *Cystoseira abies-marina*. Los resultados de la concentración de clorofila b son inferiores a los valores detectados de la clorofila a, pero la diferencia es menor respecto a las algas verdes. Y los niveles de los carotenoides totales, en general bastante bajos a excepción de las especies, *Ulva rigida* y *Cystoseira abies-marina* 0.07  $\pm$  0.01 mg·g PS<sup>-1</sup> y 0.06  $\pm$  0.01 mg·g PS<sup>-1</sup> que mostraron diferencias significativas superiores ( $p < 0.05$ ), respecto al resto de las especies.

Tabla 2.7. Contenido de pigmentos liposolubles, clorofilas y carotenoides, expresados como mg·g PS<sup>-1</sup> en las especies de macroalgas cultivadas en el biofiltros, (media ± desv, n=3). Las letras indican las diferencias significativas (p<0.05, ANOVA, test de Tukey B).

Especies	Cl a (mg · g PS <sup>-1</sup> )	Cl b (mg · g PS <sup>-1</sup> )	Carotenoides totales (mg · g PS <sup>-1</sup> )
<i>C.intertextum</i>	0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>C.racemosa</i>	0.04 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>U.rigida</i>	<b>0.27 ± 0.01<sup>d</sup></b>	0.07 ± 0.00 <sup>b</sup>	<b>0.07 ± 0.01<sup>c</sup></b>
<i>P.capillacea</i>	0.13 ± 0.00 <sup>c</sup>		0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>H.spinella</i>	0.07 ± 0.00 <sup>b</sup>		0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
<i>G.dichotoma</i>	0.10 ± 0.00 <sup>c</sup>		0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
<i>H.incurva</i>	0.09 ± 0.00 <sup>b</sup>		0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>
<i>L.majuscula</i>	0.04 ± 0.00 <sup>a</sup>		0.01 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>F.spiralis</i>	0.09 ± 0.00 <sup>b</sup>		0.03 ± 0.01 <sup>b</sup>
<i>C.abies-marina</i>	0.13 ± 0.00 <sup>c</sup>		<b>0.06 ± 0.01<sup>c</sup></b>

Y los niveles de los carotenoides totales, en general bastante bajos a excepción de las especies, *Ulva rigida* y *Cystoseira abies-marina* 0.07 ± 0.01 mg·g PS<sup>-1</sup> y 0.06 ± 0.01 mg·g PS<sup>-1</sup> que mostraron diferencias significativas superiores (p<0.05), respecto al resto de las especies.

#### 2.4.4.2.2.Pigmentos hidrosolubles: ficoeritrina

La concentración de ficoeritrina extraídos del tejido de las macroalgas cultivadas y cuantificados sólo en las especies Rhodophytas muestran diferencias significativas (p<0.05) (Tabla 2.8). Se observa una clara diferencia entre las cinco especies analizadas.

Tabla 2.8. Contenido de pigmentos hidrosolubles, ficoeritrina, en las cinco especies de macroalgas rojas cultivadas en el biofiltros expresado como mg·g PS<sup>-1</sup>(media ± desv, n=3). Las letras indican las diferencias significativas (p<0.05, ANOVA, test de Tukey B).

Especies	PE ( mg · g PS <sup>-1</sup> )
<i>Pterocliadiella capillacea</i>	0.88 ± 0.01 <sup>d</sup>
<i>Hypnea spinella</i>	0.28 ± 0.01 <sup>b</sup>
<i>Grateloupia dichotoma</i>	0.19 ± 0.00 <sup>a</sup>
<i>Halopithys incurva</i>	0.42 ± 0.01 <sup>c</sup>
<i>Laurencia majuscula</i>	0.24 ± 0.02 <sup>b</sup>

La especie que destacó por su mayor contenido fue *Pterocladia capillacea* con un valor de  $0.88 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{g PS}^{-1}$  seguida de *Halopithys incurva* con una concentración en ficoeritrina de  $0.42 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{g PS}^{-1}$  mientras que las concentraciones más bajas fueron detectadas en *Hypnea spinella*, *Laurencia majuscula* y *Grateloupia dichotoma*, siendo  $0.28 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{g PS}^{-1}$ ,  $0.24 \pm 0.02 \text{ mg}\cdot\text{g PS}^{-1}$  y  $0.19 \pm 0.00 \text{ mg}\cdot\text{g PS}^{-1}$  respectivamente.

#### 2.4.5. CORRELACIONES ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DETECTADA Y LAS SUSTANCIAS CUANTIFICADAS

A continuación se muestran los resultados del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) obtenido entre la actividad antioxidante detectada mediante el ensayo DPPH y el poder reductor y el contenido en fenoles totales así como en pigmentos liposolubles e hidrosolubles de las 10 especies de macroalgas cultivadas (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Resultados de  $R^2$  de las correlaciones realizadas, entre la actividad antioxidante detectada en las especies cultivadas mediante el ensayo DPPH en (%) y el método del poder reductor ( $\mu\text{g AA mg}^{-1}$ ) y los polifenoles valorados mediante dos métodos y pigmentos liposolubles (clorofila a y carotenoides totales) e hidrosolubles (ficoeritrina).

Biomoléculas	REGRESION LINEAL ( $R^2$ )			
	Ensayo DPPH (% Barrido radicales libres)		Poder reductor ( $\mu\text{g AA mg}^{-1}$ )	
	Extracto METOH	Extracto ETOH50	Extracto METOH	Extracto ETOH50
Clorofilas ( $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	0.100	$6.226\text{e}^{-5}$	$1.624\text{e}^{-3}$	$9.9740\text{e}^{-5}$
Carotenoides ( $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	0.070	0.0394	$2.672\text{e}^{-3}$	0.014
Ficoeritrina ( $\text{mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	0.20	0.066	0.045	0.039
Polifenoles (%)	<b>0.641</b>	<b>0.519</b>	<b>0.652</b>	<b>0.769</b>
Polifenoles PVPP (%)	0.138	0.358	$4.118\text{e}^{-4}$	0.047

El valor óptimo de correlación entre la actividad antioxidante de los extractos metanólicos e hidroalcohólicos obtenida con el método del DPPH se detectó con el contenido en polifenoles (sin PVPP) siendo estas ( $R^2= 0.641$ ) y ( $R^2=0.519$ ) respectivamente.

Sin embargo, el análisis de correlación realizado entre el método del poder reductor mostró la mejor correlación polifenoles sin tratamiento PVPP extracto hidroalcohólico ( $R^2 = 0.769$ ) seguido del extracto metanólico con un valor de ( $R^2= 0.652$ ). El resto de las correlaciones realizadas con la actividad antioxidante detectada mediante este método fueron muy bajas en general.

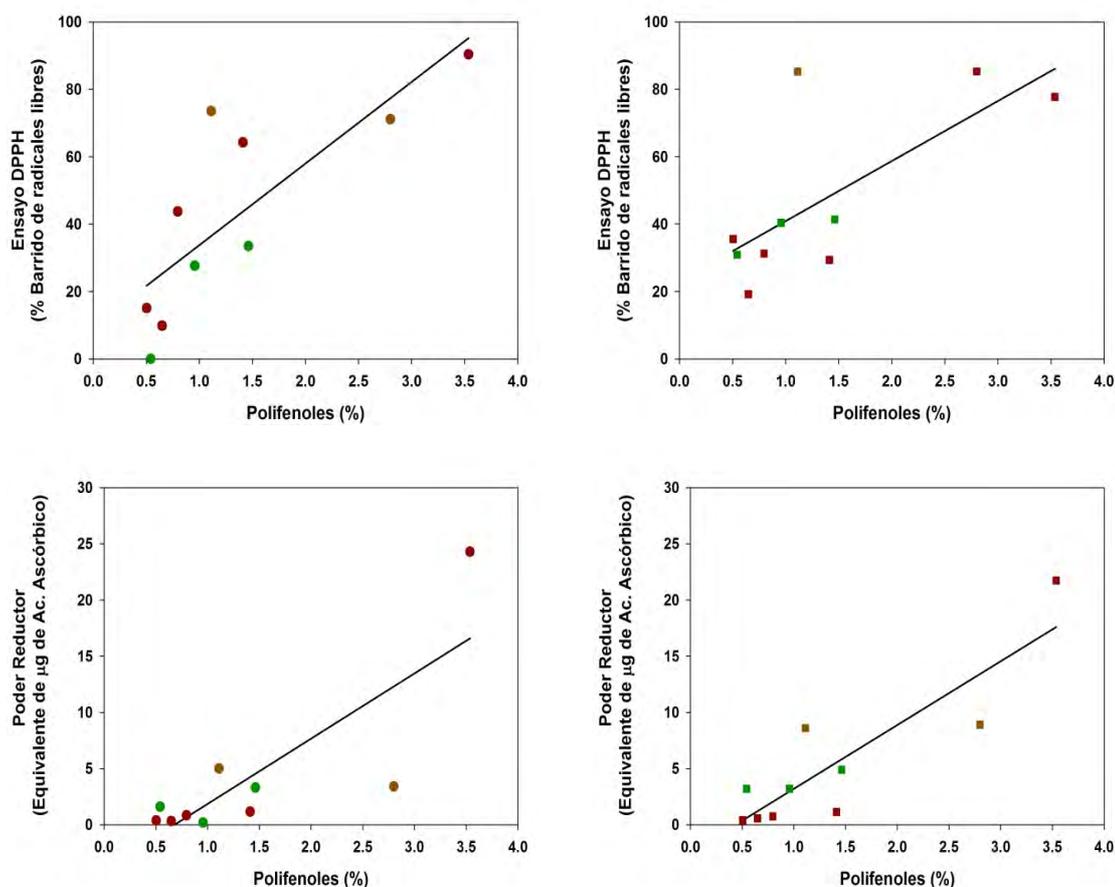


Figura 2.13. Representación gráfica del análisis de correlación entre la actividad antioxidante detectada entre el ensayo DPPH (% barrido de radicales libres) respecto a los extractos metanólicos (● Clorofitas ● Rodofitas ● Feofitas) ( $R^2 = 0.641$ ) y ( $R^2 = 0.519$ ) respecto a los extractos hidroalcohólicos (■ Clorofitas ■ Rodofitas ■ Feofitas). En la parte inferior de la figura se representan los resultados de correlación entre el poder reductor ( $\mu\text{g AA mg}^{-1}$ ) y el contenido en polifenoles (% peso seco) ( $R^2=0.652$ ) con extractos metanólicos (● Clorofitas ● Rodofitas ● Feofitas) y ( $R^2=0.769$ ) con extractos hidroalcohólicos (■ Clorofitas ■ Rodofitas ■ Feofitas) respectivamente.

El resultado de la correlación de Pearson mostró una correlación positiva entre el extracto metanólico y actividad antioxidante (tanto en el ensayo DPPH como en el poder reductor) pero presentó una correlación negativa tanto con la eficiencia de biofiltración (NUE) de las especies como respecto a la tasa de incorporación de nitrógeno (NUR). En un nivel de significancia de ( $p < 0.01$ ) respecto a la biofiltración (NUE) y un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ) respecto a la velocidad de incorporación de nitrógeno (NUR).

La correlación del contenido en nitrógeno de las especies ( $\text{mg N} \cdot \text{g PS}^{-1}$ ) con respecto a la biofiltración (NUE) y tasa de absorción de nitrógeno (NUR) relativamente baja también. Y respecto a la actividad antioxidante (tanto en el ensayo DPPH como en el poder reductor) fue negativa en ambos extractos (EM y EH).

Tabla 2.10. Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson para las variables D-EM, la actividad antioxidante detectada mediante el ensayo DPPH con extractos metanólicos; D-EH, la actividad antioxidante detectada mediante el ensayo DPPH con extractos hidroalcohólicos; P-EM, actividad antioxidante detectada mediante el poder reductor con extractos metanólicos; P-EH, actividad antioxidante detectada mediante el poder reductor con extractos hidroalcohólicos; N, contenido en nitrógeno ; C, contenido en carbono; C:N, relación carbono nitrógeno; NUE, biofiltración de N-amonio; NUR, velocidad de absorción de N-amonio.

	D-EM	D-EH	P-EM	P-EH	N	C	C:N	NUE	NUR
<b>D-EM</b>	1								
<b>D-EH</b>	0.780**	1							
<b>P-EM</b>	0.647*	0.577	1						
<b>P-EH</b>	0.722*	0.777**	0.951**	1					
<b>N</b>	-0.150	-0.575	-0.193	-0.411	1				
<b>C</b>	0.039	-0.219	-0.128	-0.275	0.730*	1			
<b>C/N</b>	0.228	0.552	0.039	0.260	-0.831**	-0.332	1		
<b>NUE</b>	-0.805**	-0.832**	-0.294	-0.518	0.385	0.120	-0.549	1	
<b>NUR</b>	-0.716*	-0.736*	-0.265	-0.481	0.322	0.182	-0.442	0.954**	1

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral).

\* . La correlación es significante al nivel 0.05 (bilateral).

#### 2.4.6. CONTENIDO EN CARBONO Y NITRÓGENO

La relación C:N de las especies cultivadas (Fig. 2.14) mostraron diferencias significativas tanto entre los tres phylum como dentro de cada uno de ellos ( $p < 0.05$ ). Entre las algas verdes *Codium intertextum* es la que mostró menor relación C:N siendo este valor de 6.6%. *Ulva rigida* y *Caulerpa racemosa* muestran valores de 13.5 % y 8.04% respectivamente. Entre las algas rojas cultivadas, la relación C:N máxima se detectó en *Halopithys incurva* 8.65 % seguida en orden decreciente de *Grateloupia dichotoma* y *Laurencia majuscula* 8.42 % y 7.41%. La relación más baja dentro de este phylum correspondió a *Pterocladia capillacea* e *Hypnea spinella* 6.91 y 6.29 % respectivamente. Entre las algas pardas, *Fucus spiralis* se detectó una relación de 10.8 % y en *Cystoseira abies-marina* 15.8 %.

El contenido de N mostró diferencias significativas entre las especies cultivadas ( $p < 0.05$ ). El bajo contenido *Ulva rigida* fue significativamente inferior en comparación a las algas verdes del ensayo.

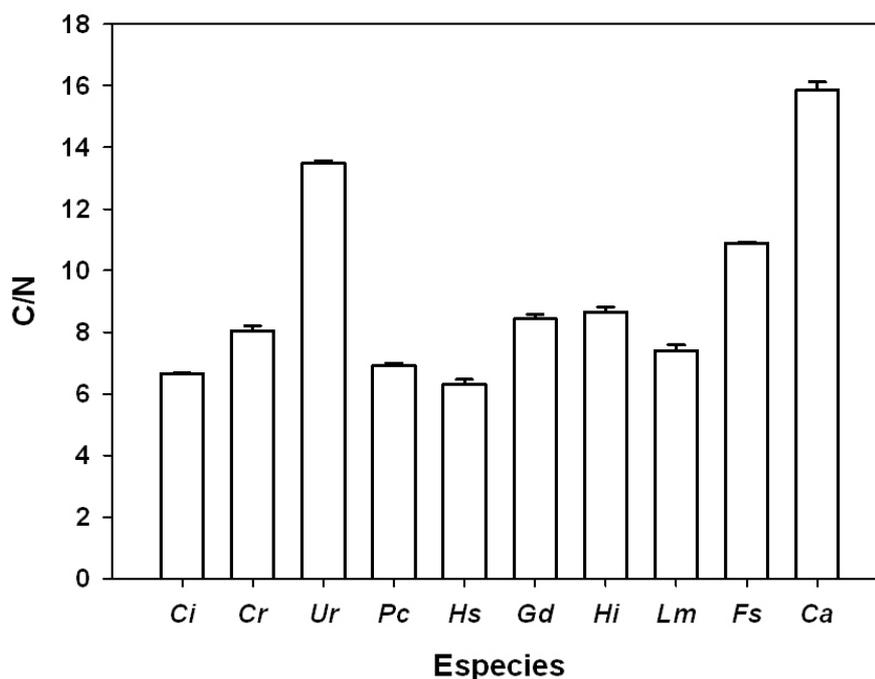


Figura 2.14. Relación C:N en las diez especies de macroalgas cultivadas (media  $\pm$  desv, n=3)

En cambio, entre las algas rojas el contenido en N fue significativamente superior en *Pterocliadiella capillacea*. Entre las algas pardas también se detectaron diferencias significativas entre ambas especies.

Tabla 1.10. Contenido en N ( $\text{mg g PS}^{-1}$ ) y C ( $\text{mg g PS}^{-1}$ ) en las especies cultivadas.

Especies	( $\text{mg N} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )	( $\text{mg C} \cdot \text{g PS}^{-1}$ )
<i>C.intertextum</i>	$35.47 \pm 0.20$	$236.22 \pm 0.8$
<i>C.racemosa</i>	$30.75 \pm 0.65$	$247.26 \pm 4.78$
<i>U.rigida</i>	$19.45 \pm 0.14$	$262.46 \pm 0.78$
<i>P.capillacea</i>	$57.35 \pm 0.75$	$396.27 \pm 0.82$
<i>H.spinella</i>	$44.00 \pm 0.33$	$276.80 \pm 6.81$
<i>G.dichotoma</i>	$37.14 \pm 0.55$	$312.83 \pm 0.89$
<i>H.incurva</i>	$31.42 \pm 1.28$	$271.83 \pm 6.80$
<i>L.majuscula</i>	$39.07 \pm 0.95$	$289.24 \pm 2.64$
<i>F.spiralis</i>	$27.81 \pm 1.79$	$302.75 \pm 20.36$
<i>C.abies-marina</i>	$15.30 \pm 0.08$	$243.89 \pm 3.73$

## 2.5. DISCUSIÓN

Los trabajos dirigidos a evaluar el potencial antioxidante de los extractos de algas informan, en su gran mayoría, han sido realizados en macroalgas recolectadas de la naturaleza (Kuda et al., 2005; Santoso et al., 2004; Zhang et al., 2007; Zubia et al., 2007, 2009). El presente estudio, a nuestro conocimiento, es el primero en evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de macroalgas cultivadas en un biofiltro en el que la fuente de nutrientes con un alto contenido en N-amonio proviene de los efluentes de un sistema de cultivo de dorada (*Sparus aurata*). La disponibilidad de nitrógeno, como nutriente esencial, es uno de los factores importantes para evaluar los estados fisiológico y bioquímico, y sus respuestas, de las macroalgas crecidas en sistemas de cultivo intensivo. Dada la importancia industrial de las algas agarófitas, el efecto de la adición y limitación de nitrógeno sobre los cambios en los componentes bioquímicos en especies del género *Gracilaria* cultivadas en sistemas intensivos durante periodos de tiempo prolongados, han sido investigados ampliamente (Bird et al. 1981; 1982; Lapointe 1981; Lapointe y Duke, 1984; Levy y Friedlander, 1990; Friedlander et al., 1991; Haglund y Pedersen, 1993). Sin embargo, existe poca información sobre los procesos bioquímicos que la disponibilidad de N tiene sobre la activación de las defensas antioxidantes. Los resultados obtenidos en los ensayos descritos en el presente capítulo sugieren que la fuente y la concentración de nitrógeno han mostrado un efecto directo sobre los cambios en las actividades antioxidantes detectadas, principalmente debido a los cambios en la composición bioquímica de las especies estudiadas. La capacidad de adaptación al sistema de cultivo establecido de la mayoría de las especies ensayadas y los porcentajes de biofiltración de amonio determinados, muestran que durante periodos experimentales cortos, no superiores a un mes, estas especies son capaces de responder a situaciones de vida libre en la columna de agua bajo elevadas concentraciones de nutrientes, funcionando como trampas de N-amonio y eliminando la carga de nutrientes provenientes de los efluentes, tal y como anteriormente ha sido descrito en otros trabajos con diferentes especies (Neori et al., 1991; Shpigel et al., 1993; Jiménez del Río et al., 1996; Neori, 1996). Las especies que son morfológicamente más simples y que presentan altas relaciones superficie/volumen muestran una tasa de absorción de amonio mayor (Wallentinus, 1984; Hein et al., 1995; Taylor et al., 1998), lo que queda demostrado con especies como *Ulva rigida* (División Chlorophyta) y *Grateloupia dichotoma* (División Rhodophyta), con eficiencias de biofiltración medias cercanas al 50% en las condiciones ensayadas. No ocurrió así con las especies

pertenecientes a la División Phaeophyta, que mostraron poca adaptación a la dinámica del sistema con valores de eficiencia de eliminación de amonio entre el 17 y el 27%, poco representativos en comparación a los obtenidos con el resto de especies. Estos resultados obtenidos con algas pardas concuerdan con los obtenidos en otros experimentos en los que especies no pertenecientes a los géneros conocidos como *kelps* (*Laminaria*, *Undaria*, *Macrocystis*), muestran poca capacidad de adaptación a los sistemas de cultivo en los que las condiciones de estrés a las que son sometidas (rotación libre en la columna agua con desarrollo de morfologías pseudo-esféricas, ausencia de estructuras de fijación, altas irradiaciones o elevada disponibilidad de nutrientes) conducen a la excreción de metabolitos que producen el colapso del sistema (Pedersen et al., 1996).

Las morfologías esféricas, fundamentalmente en las especies no foliosas o ramificadas de crecimiento apical, son comunes y muestran diámetros que varían entre 1 y 25 cm dependiendo de la plasticidad de cada especie y la hidrodinamismo del sistema (Robledo y García-Reina, 1993). En nuestro estudio, este tipo de adaptaciones fueron encontradas en la especie *Caulerpa racemosa* cuyos individuos llegaron a alcanzar diámetros de hasta 5 cm. Una vez alcanzados estos tamaños, se detectó una disminución del crecimiento probablemente debido al autosombreado que se produce sobre las células interiores de la morfología generada, no favoreciendo la captación de energía luminosa y por lo tanto el crecimiento de la planta. Este tipo de crecimiento responde además a la disponibilidad de nutrientes, principalmente nitrógeno, que presentan los efluentes de piscifactoría. La morfología esférica aumenta las relaciones superficie-volumen del alga, aumentando la capacidad de incorporación de nutrientes como se ha observado en otras especies como *Asparagopsis armata* (*Falkenbergia rufolanosa*) cultivada en este tipo de efluentes (Figuerola et al., 2008; Mata et al., 2010). Estudios más recientes, en los que se compara la capacidad de asimilación de nitrógeno inorgánico disuelto (DIN) de diferentes especies de macroalgas, demuestran como especies con características de crecimiento oportunista como *Ulva pertusa*, muestran mayor afinidad por el nitrógeno disponible que otro tipo de especies morfológicamente más complejas como *Gracilaria lemaneiformis*, *Undaria pinnatifida* e *Hizikia fusiforme* (Liu et al., 2006).

La actividad antioxidante medida como porcentaje de barrido antirradical en los extractos metanólicos e hidroalcohólicos obtenidos de las especies ensayadas previamente cultivadas en condiciones de alto aporte de N-amonio, mostraron diferencias significativas. Resultados similares fueron obtenidos mediante el ensayo del poder reductor. Pero hay una falta de información publicada sobre la capacidad

antioxidante en especies de macroalgas procedentes de cultivo. Nuestro estudio sugiere una alta capacidad en las especies cultivadas y que los mecanismos antioxidantes que desempeñan estos extractos se basan principalmente en el barrido de radical. Los valores máximos se detectaron en las especies *Halopithys incurva*, *Fucus spiralis* y *Cystosira abies-marina*, resultado similar al estudio del capítulo I. Especies pertenecientes a estos órdenes pero recolectados de la naturaleza, han sido señalados por diversos autores como especies con alta capacidad antioxidante la actividad de las mismas en la naturaleza (Connan et al., 2007; Zubia et al., 2009). La variación en la actividad de los diferentes extractos es atribuida a la polaridad de los compuestos diferentes presentes en cada especie (Matanjun et al., 2008). Estos resultados eran esperados, considerando que la polaridad intermedia del metanol, permite la extracción de compuestos que presentan ciertas características hidrofóbicas (anillos aromáticos o cadenas laterales de hidrocarburos) con grupos funcionales y sustituyentes polares (grupos hidroxilo y carboxilo, azúcares, etc.) en la misma molécula a diferencia de los extractos hidroalcohólicos. De manera resumida, el orden de actividad antioxidante decreciente detectada mediante el ensayo DPPH en extractos metanólicos fue *H.incurva* >*Fucus spiralis*>*Cystosira abies-marina*>*L.flexilis*> *P. Capillacea* >*Caulerpa racemosa*> *Codium intertextum* >*G.dichotoma*> *H. spinella*>*Ulva rigida*. En extractos hidroalcohólicos el orden decreciente fue, *Cystoseira abies-marina*>*Fucus spiralis*> *H.incurva*>*Caulerpa racemosa*> *Codium intertextum*> *G.dichotoma*> *P. Capillacea* >*Ulva rigida*> *L.flexilis*>*H. spinella*. La actividad del barrido del radical DPPH, expresada como EC50 ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), en las especies cultivadas pertenecientes a los phylum Chlorophyta, Phaeophyta y Rhodophyta mostraron también diferencias significativas entre los distintos extractos ( $p<0.05$ ). *Caulerpa racemosa* (en ambos extractos) exhibió la mayor actividad con una EC50 muy baja  $1.87 \pm 0.12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (extracto metanólico) y  $1.45 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (extracto hidroalcohólico). El extracto metanólico de la especie roja *L. majuscula* exhibió también una alta actividad de barrido de radicales libres  $1.56 \pm 0.11 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  seguida dentro de este phylum de *H. incurva* (en ambos extractos)  $2.54 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (extracto metabólico) y  $2.66 \pm 0.04 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (extracto hidroalcohólico). Los siguientes datos más representativos correspondieron a los extractos de las algas pardas *F. spiralis* y *Cystoseira abies-marina* (en ambos extractos) con valores similares a *H.incurva*. En ningún caso estos extractos fueron similares a los antioxidantes comerciales, que mostraron una EC50 muy baja en el caso del ácido ascórbico  $0.06 \pm 0.01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  seguido del propil galato  $0.15 \pm 0.19 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Considerando los resultados obtenidos para el contenido en compuestos fenólicos totales, se observó una variación significativa entre todas las especies analizadas. Sin embargo, contrariamente a lo que cabría esperar, las especies recolectadas de la naturaleza (Capítulo I) presentaron contenidos en polifenoles mayores que los obtenidos con las especies cultivadas, aunque las correlaciones realizadas indican que la actividad antioxidante superior en las especies cultivadas está directamente relacionada con el contenido de este grupo de sustancias. El contenido de polifenoles en algas está directamente influenciado por la disponibilidad de nutrientes, factores ambientales como la salinidad, la irradiación, la radiación ultravioleta y la intensidad de la herbivoría (Targett y Arnold, 1998; Amsler y Fairhead, 2006; Jormalainen y Honkanen, 2008). La variación en el contenido en polifenoles puede ser la respuesta a cambios ambientales e incluso a la divergencia genética entre las poblaciones naturales, como ha sido descrito en *Fucus vesiculosus* (Jormalainen y Honkanen, 2004). Otros factores que influyen en la acumulación de compuestos fenólicos están relacionados con la estacionalidad o la localización de estos elementos en la planta (Connan et al., 2006; Abdala et al., 2011). Como ha sido discutido previamente, las situaciones de estrés bajo las condiciones de cultivo establecidas podrían explicar la síntesis, acumulación y exudación al medio de este tipo de elementos, como fue observado en el alga roja *Halopithys incurva*, y como también ha sido en el caso de trihidroxycumarina en algas verdes en ambientes variables como los charcos intermareales (Pérez-Rodríguez et al., 2003).

Además los parámetros de cultivo y la disponibilidad de N-amonio durante el periodo de cultivo provocaron la acumulación de compuestos nitrogenados en la biomasa producida, fuente de los extractos ensayados. Esta observación se confirma con los resultados obtenidos para la concentración de pigmentos liposolubles (clorofila y carotenoides) e hidrosolubles (ficoeritrina), en función de la especie analizada, así como las relaciones C:N, que disminuyeron sustancialmente respecto a los resultados obtenidos en las mismas especies provenientes de la naturaleza. Varios autores han descrito en trabajos anteriores que el contenido de la ficoeritrina en algas rojas, y clorofila *a* en general, está positivamente correlacionado con el aporte de nitrógeno y los niveles de radiación (Lapointe, 1981; Bird et al., 1982; Vergara y Niell, 1993). Este hecho parece responder a un mecanismo de almacenamiento de nitrógeno en los periodos de disponibilidad de nitrógeno. Entre las especies ensayadas, *Ulva rigida* mostró las mayores concentraciones de clorofila *a* y carotenoides ( $0.27 \pm 0.01$  mg·g PS<sup>-1</sup> y  $0.07 \pm 0.01$  mg·g PS<sup>-1</sup> respectivamente). Se ha demostrado que la concentración de pigmentos responde al resultados de los cambios en las

concentraciones de las distintas formas orgánicas e inorgánicas de N (Bird *et al.*, 1982; Horrocks, 1993). Sin embargo, cabe señalar que los extractos metanólicos de esta especie no mostraron actividad antioxidante en el ensayo de DPPH contrariamente a los resultados obtenidos mediante el ensayo del poder reductor donde se cuantificaron valores de  $1.60 \pm 0.20$  equivalentes de ácido ascórbico. La síntesis de ficobiliproteínas en algas rojas (tanto R-ficoeritrina como R-ficocianina) se produce a niveles bajos de irradiancia y cuando la disponibilidad de N es suficiente (Lapointe, 1981). La luz constituye un factor fundamental en el crecimiento de las algas bajo condiciones de cultivo, tanto como fuente de energía para la fotosíntesis, como por sus interrelaciones con otros parámetros. Sin embargo, una cantidad excesiva de irradiación puede ocasionar la disminución de la tasa fotosintética y, si se prolonga en el tiempo, producir daños en el aparato fotosintético. La alta densidad de las algas en el sistema, que alcanzó valores de  $18 \text{ g l}^{-1}$  en los fotobiorreactores, en combinación con el movimiento rotatorio que mantienen las algas en los cultivos como consecuencia de la aireación forzada, produce que los individuos queden expuestos a la luz durante cortos periodos de tiempo (efecto flash), lo que está igualmente relacionado con la plasticidad y el contenido en polisacáridos estructurales constituyentes de cada especie, y la afinidad por los nutrientes (Lobban *et al.*, 1985). Todos estos factores influyeron positivamente en la concentración de ficoeritrina cuantificada en las cinco especies de algas rojas cultivadas, encontrándose valores máximos de  $0.88 \text{ mg} \cdot \text{g PS}^{-1}$  en *Pterocliadiella capillaceae*. El aumento del color rojo y el brillo de la biomasa han sido descritas anteriormente en cultivos de *Gracilaria spp.* (Lapointe *et al.*, 1976). *Gracilaria conferta* crecida en efluentes de piscifactoría y radiación PAR + UVR, incrementó el contenido en biliproteínas unas 90% veces respecto a los controles crecidos en agua de mar (Figueroa *et al.*, 2010) lo que fue observado igualmente en las especies de rodofitas ensayadas en nuestro estudio. La concentración de ficobiliproteínas detectada en algas en agua de mar es mucho menor a la hallada en las cultivadas en efluentes ricos en  $\text{NH}_4^+$ . Vergara y Niell (1993) demostraron que *Corallina elongata* mostró una proporción de proteínas pigmentadas y no pigmentadas variable en función del aporte de distintas concentraciones de N y la disponibilidad de luz. Esto parece funcionar como un mecanismo para el almacenamiento de N para los períodos siguientes, cuando los nutrientes son limitantes. De esta forma, cuando los organismos tienen limitación de algún nutriente esencial tal como el N se produce la degradación de los ficobilisomas para proporcionar el nutriente deficitario (Aráoz & Häder, 1997). Entre las sustancias identificadas con poder antioxidante en macroalgas también han sido descritas las

ficobiliproteínas ficocianina (Romay et al., 1998) y ficoeritrina. La administración de ficoeritrina en ratas diabéticas aumentó la situación general antioxidante por el aumento de bilirrubina, superóxido dismutasa, catalasa, las concentraciones de glutatión peroxidada y los antioxidantes no enzimáticos del sistema (Soni et al., 2009). Los resultados de otro trabajo, sugirieron que la proteína de ficoeritrina es fácilmente digerida para liberar el compuesto ficoeritrobilina durante el proceso de la digestión gastrointestinal en mamíferos, el cual mostró la capacidad de captación de radicales peróxidos, concluyendo que diversas actividades terapéuticas de la ficoeritrina parecen estar asociadas con el compuesto ficoeritrobilina (Yabuta et al., 2010).

Las especies de algas verdes *Ulva rigida*, *Codium intertextum* y *Caulerpa racemosa* presentaron un color verde intenso y un brillo metálico como puede ser observado en la biomasa cosechada. Debido a la alta capacidad de asimilación de amonio de estas especies, el contenido interno de nitrógeno aumentó de manera significativa como indicaron los bajos valores observados en las relaciones C:N. La relación C: N es un índice del estado fisiológico de las macroalgas (Duarte, 1992; Vergara et al., 1993). La relación en general muestra valores bajos cuando N fue abundante y aumenta cuando el aporte de N es limitado (ver resultados Capítulo I). La relación C:N con valores cercanos a 10 se ha descrito como óptimo o normal para el estado de nitrógeno de las algas y una proporción superior a 10 indica limitación de N (Lapointe y Ryther, 1979). En el presente estudio las relaciones C:N obtenidas en las especies cultivadas bajo alta disponibilidad de amonio mostraron disminuciones, en algunos casos hasta del 50%, respecto a las macroalgas provenientes de la naturaleza (creciendo bajo limitación de nutrientes). Este resultado, en el que la relación C:N disminuye con la mayor disponibilidad de nitrógeno, ha sido descrito en numerosos trabajos (Lapointe et al., 1976; Jackson, 1977; Hanisak, 1979; Lapointe y Tenore, 1981). El resultado de la correlación de Pearson mostró una correlación positiva entre el extracto metanólico y actividad antioxidante (tanto en el ensayo DPPH como en el poder reductor) pero presentó una correlación negativa tanto con la eficiencia de biofiltración (NUE) de las especies como respecto a la tasa de incorporación de nitrógeno (NUR). En un nivel de significancia de ( $p < 0.01$ ) respecto a la biofiltración (NUE) y un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ) respecto a la velocidad de incorporación de nitrógeno (NUR). La correlación del contenido en nitrógeno de las especies ( $\text{mg N} \cdot \text{g PS}^{-1}$ ) con respecto a la biofiltración (NUE) y tasa de absorción de nitrógeno (NUR) relativamente baja también. Y respecto a la actividad antioxidante (tanto en el ensayo DPPH como en el poder reductor) fue negativa en ambos extractos (EM y EH). Estos resultados, no llevan a concluir que las especies con mayor

capacidad de biofiltración muestran una menor actividad antioxidante. En las condiciones de cultivo ensayadas para las diferentes especies, el almacenamiento de nitrógeno podría estar también relacionado con la acumulación de otro tipo de metabolitos. La capacidad antioxidante de las macroalgas depende de la naturaleza y concentración de los antioxidantes naturales presentes en cada especie que pueden ser modificadas bajo condiciones de crecimiento controladas. Al analizar los resultados en su conjunto podemos destacar que los extractos, tanto metanólicos como hidroalcohólicos, obtenidos a partir de las especies *Halopithys incurva*, *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina* cultivadas en alta disponibilidad de nitrógeno mostraron actividades significativamente superiores a los obtenidos con otras especies y permiten establecer las bases para profundizar en las modificaciones que sobre las características de la biomasa y por tanto las moléculas constituyentes podrían ser obtenidas bajo condiciones de cultivo. Considerando los pobres resultados obtenidos con las especies de algas pardas, en cuanto a la capacidad biofiltradora se refiere, en los siguientes ensayos planteados nos centramos en el estudio exhaustivo de la asimilación de nutrientes, el cultivo y la actividad antioxidante del alga roja *Halopithys incurva*.

## 2.6. BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J., Cid, A., Hidalgo, J.P., Torres, E., Herrero, C. 1995. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Primera ed. Monografías Nº26. Universidad da Coruña. A Coruña. 210 pag.
- Ackefors, H., Enel, M. 1990. Discharge of nutrients from swedish fish farming to adjacent sea areas. *Ambio*. 19:29-35.
- Afonso, J., Sansón, M. 1999. Algas, hongos y fanerógamas marinas de las Islas Canarias. Primera ed. Universidad de La Laguna. Santa cruz de Tenerife. 254 pág.
- Amsler, C.D., Fairhead, V.A. 2006. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Adv Bot Res* 43:1-91.
- Araoz, R., Häder, D.P. 1997. Ultraviolet radiation induces both degradation and synthesis of phycobilisomes in *Nostoc* sp.: a spectroscopic and biochemical approach. *FEMS Microbiol Ecol* 23:301-313.
- Athiperumalsami, T., V.D. Rajeswari., S.H. Poorna., V. Kumar., L.L. Jesudass. 2010. Antioxidant activity of seagrasses and seaweeds. *Bot. Mar.* 53: 251-257.
- Bandaranayake, W.M. 1998. Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat.Prod.Rep.*, Letchworth, p159-172.

## Capítulo II

---

- Becker, E.W. 1994. *Biotechnology and Microbiology*. Cambridge. University Press. Cambridge. 293 pág.
- Bidwell, R.G.S., McLachlan, J., Lloyd, N.D.H. 1985. Tank cultivation of Irish moss, *Chondrus crispus* Stackh. *Bot. Mar.* 28, 87-97.
- Bird, K.T., Hanisak M.D., Ryther. J. 1981. Chemical quality and production of agars extracted from *Gracilaria tikvahiae* grown in different nitrogen enrichment conditions. *Bot Mar* 24: 441-444.
- Bird, K.T., Habig, C., Debusk, T., 1982. Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahie* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 18, 344-348.
- Braud, J. 2006. Continuous Seaweed Tank Culture in France: From *Chondrus crispus* to Co-culture of Macroalgae and Diatom *Odontella aurita*. In: *Seaweed Resources of the World* (Critchley, A. T., Ohno, M., Largo, D.B. editors). Japan International Cooperation Agency, Yokosuka.
- Buschmann, A.H., Varela, D., Cifuentes, M.R., Hernández-González, M.C., Henríquez, L., Westermeier, R., Correa, J.A. 2004. Experimental indoor cultivation of the carrageenophytic red alga *Gigartina skottsbergii*. *Aquaculture* 241, 357-370.
- Buschmann, A., Hernández-González, M.C., Aranda, C., Chopin, T., Neori, A., Halling, C., Troell, M. 2008a. Mariculture waste management. In: S.E. Jørgensen and B.D. Fath (Eds.), *Encyclopaedia of Ecology*. Vol. 3, Elsevier, Oxford, 2463-2475.
- Buschmann, A.H., Varela, D.A., Hernández-González, M.C., Huovinen P. 2008b. Opportunities and challenges for the development of an integrated seaweed-based aquaculture activity in Chile: determining the physiological capabilities of *Macrocystis* and *Gracilaria* as biofilters. *J. Appl. Phycol.* 20: 571–577.
- Cahill, P.L., Hurd, C.L., Lokman, M. 2010. – Keeping the water clean – Seaweed biofiltration outperforms traditional bacterial biofilms in recirculating aquaculture. *Aquaculture*, 305: in press.
- Chapman, V.J., Chapman D.J. 1980. *Seaweeds and their uses*. Third ed. Chapman and Hall, London. 497 pág.
- Chávez-Crooker, P. y Obreque-Contreras, J. 2010. Bioremediation of aquaculture wastes. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 313-317.
- Chopin, T., Robinson, S.M.C., Troell, M., Neori, A., Buschmann, A., Fang, J., 2008. Multitrophic Integration for Sustainable Marine Aquaculture. In: S.E. Jørgensen and B.D. Fath (Eds.), *Encyclopedia of Ecology*. Vol. 3, Elsevier, Oxford, 2463-2475.
- Connan, S., F. Delisle, E. Deslandes and E.A. Gall. 2006. Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot. Mar.*, 49: 39-46.
- Connan, S., E. Deslandes, Ar Gall., E. 2007. Influence of daynight and tidal cycles on phenol content and antioxidante capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 349: 359–369.
- Cohen, I., Neori, A. 1991. *Ulva lactuca* biofilters for marine fishpond effluents. *Bot Mar*, 34: 475-482.
- Cripps, S.J. 1996. Reductions in Wastes from aquaculture. In: Baird, J.D., Beveridge, M,C.M, Kelly, L.A., Muir, J.F., *Aquaculture and Water Resource Management*. Blackwell science ltd. UK. Pp.166-197

- Clesceri L.S., Greenberg A.E., Trussell A.R. & Franson M. A. H. 1992. Métodos normalizados para análisis de aguas potables y residuales, ed. Díaz de Santos, American Public Health Association, Madrid, DC.
- D'Antonio C. 1985. Epiphytes in the rocky intertidal red algae *Rhodomela larix* (Turner) C. Agardh: negative effects on the host and food for herbivores? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 86, 197-218.
- Goff L.J. 1982. The biology of parasitic red algae. In: *Progress in Phycological Research*. Round F.E., Chapman D.J. (eds), Elsevier, Amsterdam.
- De la Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F.L., De Galvez, M.V., Herrera, E. (2009). Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J. Appl. Phycol.* 21: 161-169.
- Demetropoulos, C.L. y Langdon C.J., 2004a. Enhanced production of Pacific dulse (*Palmaria mollis*) for co-culture with abalone in a land-based system: effects of seawater exchange, pH, and inorganic carbon concentration. *Aquaculture* 235: 457-470.
- Demetropoulos, C.L. y Langdon, C.J., 2004b. Enhanced production of Pacific dulse (*Palmaria mollis*) for co-culture with abalone in a land-based system: effects of stocking density, light, salinity, and temperature. *Aquaculture* 235:471-488.
- Deng, D.Y., Guo, J., Zeng, G.Q., Sun, G.P. 2008. Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and dyes by a new isolated *Bacillus cereus* strain DC11. *International Biodeterioration y Biodegradation* 62, 263–269.
- Duarte, C.M. 1992. Nutrient concentration of aquatic plants: Patterns across species. *Limnology and Oceanography* 37: 882-889.
- Edding E. 1995. Cultivo de *Gracilaria* en estanques. *Manual de Métodos Ficológicos*, 577-595.
- FAO 1997. The world State of Fisheries and Aquaculture. Roma, Italy. Electronic edition <http://fao.org>.
- Figueroa, F.L., Bueno, A., Korbee, N., Santos, R., Mata, L., Schuenhoff, A. 2008. Accumulation of mycosporine-like aminoacids in *Asparagopsis armata* grown in tanks with fishpond effluents of gilthead sea bream *Asparus aurata*. *J World Aquacult Soc* 39:692-699
- Figueroa, F.L., Israel, A., Neori, A., Malta, E.J., Martínez, B., Put, A., Inken, S., Marquardt, R., Abdala, R.T., Korbee, N., 2010. Effect of nutrient supply on response of photosynthesis and pigmentation to short-term stress (temperature and UV radiation) in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Marine Pollution Bulletin* 60, 1768-1778.
- Friedlander, M., Krom, M.D., Ben-Amotz, A. 1991. The effect of light and ammonium on growth, epiphytes and chemical constituents of *Gracilaria conferta* in outdoor cultures. *Bot. Mar.* 34, 161–166.
- Friedlander, M., Levy, I. 1995. Cultivation of *Gracilaria* in outdoor tanks and ponds. *J. Appl. Phycol.* 7, 315-324.
- Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A., and Cheresch, D.A. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct tyrosine integrins. *Science* 270, 1500–1502.
- Friedlander, M. 2008. Israeli R & D activities in seaweed cultivation. *Israel Journal of Plant Sciences.* 56, 15-28.
- Fujimoto, K. 1990. Antioxidant activity of algal extract. En *Introduction to applied phycology* (I. Akatsuka, ed.) SPB Academic Publishing, (pp. 199-208

- Gal-Or, S., Israel, A. 2004. Growth responses of *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta) in laboratory and outdoor cultivation. *J. Appl. Phycol.* 16:195-202.
- Greenberg A.E., Clesceri L. S.; Eaton A.D. 1992. Standard Methods for examination of Water and Wastewater, 18 ed., American Public Health Association, Washington, DC.
- Gómez Pinchetti, J.L., del Campo Fernández, E., Moreno Díez, P.; García Reina, G. 1998. Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycology*10: 383-389
- Gómez, I., Pérez –Rodríguez, E., Viñepla, B., Figueroa, F.L.; Karsten, U. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis , UV absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from southern Spain *J. Photochem. Photobiol.* 47: 46-57.
- Gordin, H. 1982. Aquaculture: potencial development. In : (P.G. Brewer, ed) *Oceanography: Present and Future*. Springer Verlag. New York. Pp 347-361.
- Gowen, R.J., Rosenthal, R., Makinen, T., Ezzi, I. 1989. Environmental impact of aquaculture activities. EAS (European Aquaculture Society) special publication No.10. p.300.
- Haglund, K., Pedersen, M. 1993. Outdoor pond cultivation of the subtropical marine red alga *Gracilaria tenuistipata* in brackish water in Sweeden. Growth, nutrients uptake, co-cultivation with rainbow trout and epiphyte control. *J. App. Phycol.*, 5: 271-284.
- Hanisak, M.D., 1979. Nitrogen limitation of *Codium fragile ssp. tomentosoides* as determined by tissue analysis. *Mar. Biol.* 5, 333-337.
- Hansen, J.E., Packard, T.E.; Doyle, W. T. 1981. Mariculture of red seaweeds. Report # T-CSGCP-002. California Sea Grant College Program Publication. Pp. 42.
- Harrison, P.J., Hurd, C.L. 2001. Nutrient physiology of seaweeds: application of concepts to aquaculture. *Cah Biol Mar* 42:71-82
- Hayashi, L., Yokoya, N.S., Ostini, S., Pereia, R.T.L., Braga, E.S., Oliveira, E.C. 2008. Nutrients removed by *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in integrated cultivation with fishes in re-circulating water. *Aquaculture* 277: 185-191.
- He, P., Xu, S., Zhang, H., Wen, S., Dai, Y., Lin, S., Yarish, C. 2008. Bioremediation efficiency in the removal of dissolved inorganic nutrients by the red seaweed, *Porphyra yezoensis*, cultivated in the open sea. *Water. Res.* 42: 1281-1289.
- Hein, M., Pedersen, M.F., Sand-Jensen, K. 1995. Size-dependent nitrogen uptake in micro and macroalgae. *Mar ecol Prog ser* 118:247-253
- Horrocks, J.L. 1993. Tissue nutrient content of *Gracilaria spp.* (Rhodophyta) and water quality of Logan River and southern Moreton Bay. Honours Dissertation, University of Queensland.
- Huovinen, P., Matos, J., Sousa-Pinto, I., Figueroa, F.L. 2006. The role of nitrogen in photoprotection against high irradiance in the Mediterranean red alga *Grateloupia lanceola*. *Aquatic Botany* 84: 208-316.
- Hwang, H.J., Kim I.H., Nam T.J. 2008. Effect of a glycoprotein from *Hizikia fusiformis* on acetaminophen-induced liver injury. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 3475-3481
- Jackson, G. A. 1977. Nutrients and production of the giant kelp *Macrocystis pyrifera*, off southern California. *Limnol. Oceanogr.* 22: 992-995.

- Jiménez del Río, M., Ramazanov, Z., García-Reina, G. 1994. Optimisation of yield and biofiltering efficiencies of *Ulva rigida* cultivated with *Sparus aurata* waste waters. *Scientia Marina* 58(4): 329-335.
- Jimenez del Rio, M., Ramazanov Z.; García-Reina G. 1996. *Ulva rigida* (Ulvales. Chlorophyta) tank cultura as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. *Hydrobiología*. 326-327:61-65.
- Jormalainen, V., Honkanen, T. 2004. Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *J Evol Biol* 17: 807-820.
- Jormalainen, V., Honkanen, T. 2008. Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring temperate marine communities. In *Algal Chemical Ecology*, Amsler CD (ed). Springer: Berlin; 57-89.
- Kang, Y., Shin, J., Kim, M., Chung, I. 2008. A preliminary study of the bioremediation potential of *Codium fragile* applied to seaweed integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) during the summer. *J. Appl. Phycol.* 20, 183-190.
- Korbee, N., Figueroa, F.L. , Aguilera, J. 2005. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochem. Photobiol.* 80: 71-78
- Korbee, N., Figueroa, F.L. , Aguilera, J. 2006. Acumulación de aminoácidos tipo micospolina (MAAs): biosíntesis, fotocontrol y funciones ecofisiológicas. *Revista Chilena de Historia Natural* 79:119-132.
- Korbee, N., Aabdala-Díaz, R.T., Figueroa, F.L., Helbling, E.W. 2004. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *Journal of Phycology* 40: 248-259.
- Korbee, N., Huovinen, P., Figueroa, F.L., Aguilera, J., Karsten U. 2005. Availability of ammonium influences the photosynthesis and the accumulation of MAAs in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta) from different latitudes. *Marine Biology* 146: 645-654.
- Krom, M.D., Poter, C.; Gordin, H. 1985. Causes of fish mortalities in semi-intensively operated seawater ponds in Eliat, Israel. *Aquaculture*, 49:159-177.
- Korbee, N., Huovinen, P., Figueroa F.L., Aguilera, J. , Karstenn, U. (2005). Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like aminoacids in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). . *Marine Biology* 146: 645-654
- Kumar, M., Kumari, P., Gupta, V., Anisha, P.A., Reddy, C.R., Jha, B. 2010. Differential responses to cadmium induced oxidative stress in marine macroalga *Ulva lactuca* (Ulvales, Chlorophyta). *Biometals* 23, 315–325.
- Lapointe, B.E., Duke, C.S., 1984. Biochemical strategies for growth for *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in relation to light intensity and nitrogen availability. *J. Phycol.* 20, 465–488.
- Lapointe B.E. 1981. The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* vs. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 17: 90-95.
- Lapointe, B. E., Williams, L. D., Goldman, J. C., Ryther, R. H. 1976. The mass outdoor culture of macroscopic marine algae. *Aquaculture* 8: 9-22.

## Capítulo II

---

- Lapointe, B. E. 1987. Phosphorus- and nitrogen-limited photosynthesis and growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) in the Florida Keys: An experimental field study. *Mar. Biol.* 93:561-568.
- Lapointe, B.E.; Ryther, J. H.1978. Some aspects of the growth and yield of *Gracilaria tikvahiae*. *Aquaculture* 92:7-19.
- Lapointe, B.E.; Ryther, J. H.1979. The effects of Nitrogen and seawater Flow Rate on the Growth and Biochemical Composition of *Gracilaria foliifera* var. *Angustissima* in Mass Outdoor Cultures, 1979. *Botanica Marina*, Vol.XXII, Pp. 529-537.
- Le Tutour, B., Benslimane, F., Gouleau, M.P., Gouygou, J.P., Saadan, B., Quemeneur, F. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.*, 10, 121-129.
- Levy, I. and M. Friedlander. 1990. I. Growth, pigment, and carbohydrate characterization of strains of *G. conferta* and *G. verrucosa* (Rhodophyta, Gigartinales). *Bot. Mar.* 33: 339-345.
- Litchman, E., Neale, P.J., Banaszak, A.T. 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: photoprotection and repair. *Limnol Oceanogr* 47:86-94
- Liu, H. G., Wang, Y., Lian, L., Xu, L. H. 2006. Tributyltin induces DNA damage as well as oxidative damage in rats. *Environ Toxicol.*, 21: 166-171.
- Lobban, C.S., Harrison P.J.; Duncan, M.J. 1985. *The Physiological ecology of seaweeds*. First ed. Cambridge University Press, Cambridge. 241 págs.
- López-Figueroa, F. y Niell, F.X.1987. Feeding behaviour of *Hydrobia ulvae* (Pennant) in microcosms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 114: 153-167.
- Maschek, J.A., Baker, B.J. 2008. The chemistry of algal secondary metabolites. In: Amsler CD, editor. *Algal chemical ecology*. Heidelberg: Springer. p. 1–24.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Ceatano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and Rather applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14: 217-232.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K. Ming, C.H. 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J. Appl. Phycol.*, 20: 367-373
- Matsukawa, R., Z. Dubinsky, E. Kishimoto, K. Masaki, Y. Masuda, T. Takeuchi, M. Chihara, Y. Yamamoto, E. Niki and I. Karube. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 9: 29-35
- Molina, A., Claver, I., García, I. 2001. *Libro Blanco Acuicultura, Tomo (II)*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.230 pag.
- Muir, J.F.1982. Recirculated water systems in aquaculture. *Recent Advances in Aquaculture*. Westview Press: 357-457.
- Neish, A.C., Shacklock, P.F., Fox C.H.; Simpson F.J. (1977). The cultivation of *Chondrus Crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. *Can. J. Bot.* 55, 2263-2271.
- Neori, A., Krom, M.D., Ellner, S.P., Boyd, C.E., Popper, D., Rabinovich, R., Davison, P.J., Dvir, Zuber, D., Ucko, M., Angel, D.; Gordin, H. 1995. Seaweed biofilters as regulatrs of water quality in integrated fish-seaweed culture units. *Aquaculture* 141: 183-199.

- Neori, A., Cohen, I., Gordin H. 1991. *Ulva lactuca* biofilteres for marine fishpond effluent. II Growth rate, yield and C:N ratio. *Bot. Mar.*, 34:483-489.
- Neori, A., Shpigel M., Ben-Ezra D. 2000. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture* 186:279-291.
- Neori, A., Krom, M.D., Cohen, Y., Gordin. H. 1989. Water quality conditions and particulate chlorophyll a of new intensive seawater fishpond in Eilat, Israel: daily and dial variations. *Aquaculture* 80, 63-78.
- Neori, A., Msuya, F.E., Shauli, L., Schuenhoff, A., Kopel, F., Shpigel, M. 2003. A novel three-stage seaweed (*Ulva lactuca*) biofilter design for integrated mariculture. *J. Appl. Phycol.* 15, 543-553.
- Neori, A., Shpigel, M., Scharfstein, B. 2001a. Land-based low-pollution integrated mariculture of fish, seaweed and herbivores: principles of development, design, operation and economics. *Aquaculture Europe 2001 Book of Abstracts Eur. Aquac. Soc. Spec. Publ.*, vol. 29, pp. 190- 191. 388 A. Neori et al. / *Aquaculture* 231 (2004) 361-391
- Neori, A., Shpigel, M., Zmora, O. 2001b. Sustainable land-based mariculture in arid environments. In: Critchley, A.T. (Ed.), *Proceedings of the Symposium on Co-Management of Resources off the South-Western coast of Africa*, Lüderitz, Namibia, 21–14 June 2000. Namibian Ministry of Fisheries and Marine Resources, Windhoek, pp. 124-131.
- Neori, A., T. Choplin, M. Troell, A.H. Buschmann, G.P. Kraemer, C. Halling, M. Shpigel and C. Yarish. 2004. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 231:361-391.
- Neori, A., Shpigel, M. 1999. Algae treat effluents and feed invertebrates in sustainable integrated mariculture. *World Aquac.* 30 46- 49, 51.
- Neori, A. 1996. The form of N-supply (ammonia or nitrate) determines the performance of seaweed biofilters integrated with intensive fish culture. *Isr. J. Aquac. Bamidgeh* 48, 19-27.
- Neori, A. 2008. Essential role of seaweed cultivation in integrated multi-trophic aquaculture farms for global expansion of mariculture: an analysis. *J. Appl. Phycol.* 20: 567-570.
- Nobre, A.M., Robertson-Andersson, D., Neori, A., Sankar, K. 2010. Ecological economic assessment of aquaculture options: comparison between abalone monoculture and integrated multi-trophic aquaculture of abalone and seaweeds. *Aquaculture* 306, 116-126
- Pang, S.J., Lüning, K. 2004. Tank cultivation of the red alga *Palmaria palmata*: effects of intermittent light on growth rate, yield and growth kinetics. *J. Appl. Phycol.* 16: 93-99.
- Pang, S.J., Lui, F., Shan, T.F., Xu, N., Zhang, Z.H., Gao, S.Q., Chopin, T., Sun, S. 2010. Tracking the algal origin of the *Ulva* bloom in the Yellow Sea by a combination of molecular, morphological and physiological analyses. *Marine Environmental Research* 69, 207–215.
- Patton, C.J., Skirrow J.P.. 1977. Spectrophotometric and Kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal. Chem. Oceanogr.* 2:245-297.
- Peckol, P., DeMeo-Anderson, B., Rivers, J., Valiela, I., Maldonado, M., Yates, J. 1994. Growth, nutrient uptake capacities and tissue constituents of the macroalgae *Cladophora*

## Capítulo II

---

- vagabunda* and *Gracilaria tikvahiae* related to site-specific nitrogen loading rates. Mar Biol 121:175–185
- Pedersén, M., Collen, J., Abrahamsson, K., Ekdahl, A. 1996. Production of halocarbons from seaweeds: An oxidative stress reaction? Sci. Mar. Barc. 60(1), 257-263
- Perez-Rodríguez, E., Aguilera J., Figueroa, F.L. 2003. Tissue localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser. A photoprotective role? J. Experimental Botany 384: 1-8.
- Pillay, T.V.R. 1992. Aquaculture and the environment. Blackwell Scientific publications Ltd, Londres 189. Pp.
- Porter C.B., Krom D., Brickel M.; Davidson A. 1987. Ammonia excretion and N budget gilthead seabream (*Sparus aurata*) and its effects on water quality conditions. Aquaculture 117: 115-128.
- Rice, D.L. ; Lapointe, B.E. 1981. Experimental outdoor studies with *Ulva Fasciata* Delile. II. Trace chemistry. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 54, 1-11.
- Robertson-Andersson, D.V., Potgieter, M., Hansen, J., Bolton, J.J., Troell, M., Anderson, R.J., Halling, C., Probyn, T. 2008. Integrated seaweed cultivation on an abalone farm in South Africa. Journal of Applied Phycology 20: 129-145
- Robledo, D.R., García-Reina, G. 1993. Apical callus formation of *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) cultured in tanks. Hydrobiologia 261:401-406.
- Romay, C., González, R., Ledón, N., Remirez, D., Rimbau V. 2003. C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. Curr. Protein Pept. Sci. 4: 207-216.
- Ryther, J.H., DeBoer, J.A.; Lapointe, B.E. 1978. Cultivation of seaweeds for hydrocolloids, waste treatment and biomass for energy conversion. En. Procc. 9<sup>th</sup> International Seaweed Symposium. A. Jensen & J.R. Stein (Eds). Princenton, Science Press. Pp 1-16.
- Santoso, J., Yoshie-Stark, Y., Suzuki T. 2004. Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. Fisheries Sci. 70: 183-188.
- Shpigel, M., Neori, A., Popper, D.M. and Gordin, H. 1993. A proposed model for "environmentally clean" land-based culture of fish, bivalves and seaweeds. Aquaculture, 117: 115-128.
- Shpigel M., Neori A., Ben-Ezra, D. 1999. A sustainable integrated system for cultura of fish, seaweed and abalone. Aquaculture 186:279-291.
- Shpigel M., Friedman R. 1990. Propagation of the Manila clam (*Tapes semidecussata*) in the effluent of fish aquaculture ponds in Eilat, Israel. Aquaculture, 90: 113-122.
- Soni, B., Visavadiya, N.P., Madamwar, D. 2009. Attenuation of diabetic complications by C-phycoerythrin in rats: antioxidant activity of C-phycoerythrin including copper-induced lipoprotein and serum oxidation. Br J Nutr. 102(1):102-9.
- Tacon, A.G.J. 1997. Production and production trends In: Fao Fisheries Circular No.886. Review of the State of world Aquaculture. Roma, Italy.
- Targett, N.M., Arnold, T.M. 1998. Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. J Phycol 34: 195-205.

- Taylor, R.B., Peek, J.T.A., Rees, T.A.V.1998. Scaling of ammonium uptake by seaweeds to surface area:volume ratio:geographical variation and the role of uptake by passive diffusion. *Mar Ecol Prog Ser* 169:143-148.
- Tierney, M.S., Croft, A.K., Hayes, M.2010.A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. *Bot. Mar.* 53(5):387-408.
- Troell M., Kautsky N., Folke C. 1999. Applicability of integrated coastal aquaculture systems. *Ocean & Coastal management* 42:63-69.
- Troell, M., Halling, C., Neori, a., Chopin, T., Bushmann, A.H., Kautsky, N., Yarish, C. 2003. Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture* 226,69-90.
- Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A.H., Fang, J.-G. 2009. Ecological engineering in aquaculture — Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture* 297: 1-9.
- Vandermeulen, H., Gordin, H. 1990. Ammonium uptake using *Ulva* (Chlorophyta) in intensive fishpond systems: mass culture and treatment of effluent. *J. Phycol.* 2: 63-374.
- van Rijn, J. .1995. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture- A review. *Aquaculture* 139:181-201.
- Vergara, J.J., Niell, F.X. 1993. Effects of nitrate availability and irradiance on internal nitrogen constituents in *Corallina elongata* (Rhodophyta). *J Phycol* 29:285-293
- Viera, M. P., Gómez Pinchetti, J. L., Courtois de Vicose, G., Bilbao, A., Suárez, S., Haroun, R., Izquierdo, M. 2005. Suitability of three red macroalgae as a feed for the abalone *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve. *Aquaculture* 248: 75-82
- Wallentinus, I. 1984. Comparisons of nutrient uptake rates for Baltic macro-algae with different thallus morphologies. *Marine Biology* 80: 215-225.
- Westermeier, R., Patiño, D.J. Murua, P Müller D.2010. *Macrocystis* mariculture in Chile: growth performance of heterosis genotype constructs under field conditions. *J Appl Phycol*, online
- Yabuta, Y., Fijimura, H., Kwal, C.S., Enomoto, T. and Watanabe, F. 2010. Antioxidant activity of the phycoerythrobilin compound formed from a dried Korean purple laver (*Porphyra* sp.) during in vitro digestion. *Food Sci. Technol. Res.* 16:347-351
- Zhang, Y., Fu, F.-X., Whereat, E., Hutchins, D.A.2006. Bottom-up controls on a mixed-species HAB assemblage: a comparison of sympatric *Chattonella subsalsa* and *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) isolates from the Delaware Inland Bays, USA. *Harmful Algae* 5, 310-320.
- Zubia, M., Robledo, D., Freile-Pelegrin, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl Phycol* 19: 449-458.
- Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., Deslandes, E. 2009. Antioxidant and antitumor activities of some Phaeophyta from Brittany Coasts. *Food Chem.* 116: 693-701.



### **CAPITULO III**

---

**CULTIVO INTENSIVO DE *HALOPITHYS INCURVA* EN SISTEMAS DE BIOFILTRACIÓN. EFECTO DEL APORTE DE NUTRIENTES Y LA IRRADIANCIA Y CALIDAD ESPECTRAL SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

### 3.1. INTRODUCCIÓN

La producción comercial de algas, ya sea para consumo humano o para la elaboración de diferentes productos industriales, ha experimentado un crecimiento considerable debido a los beneficios económicos de este tipo de productos así como por el desarrollo potencial de nuevas aplicaciones a partir de las macroalgas (Chapman y Chapman, 1980; Lembi y Waaland, 1988). En la actualidad hay descritas aproximadamente 221 especies de macroalgas utilizadas en todo el mundo (Zemke-White y Ohno, 1999), de las cuales sólo un total de 10 géneros y otras tantas especies se cultivan de forma controlada tanto en instalaciones acuícolas en tierra como en el propio medio costero. Entre estas especies se encuentran las algas pardas *Laminaria japonica* y *Undaria pinnatifida*, algas rojas de los géneros *Porphyra*, *Eucheuma*, *Kappaphycus* y *Gracilaria* y algas verdes de los géneros *Ulva*, *Monostroma* y *Enteromorpha* (Kain y Dawes, 1987; Tseng, 1987b; Pérez et al., 1988; Wikfors y Ohno, 2001). El objetivo principal de estos cultivos ha sido fundamentalmente la extracción de polisacáridos estructurales de aplicación en alimentación humana, biotecnología y microbiología (agar, carragenatos y alginatos) así como la obtención de proteínas para consumo humano o como suplemento en piensos animales de granja o mascotas, agricultura y en menor medida para fines médicos (Msuya y Neori, 2002; Smit, 2004; Viera et al., 2005). El desarrollo de estos cultivos no sólo resuelve el problema de la sobreexplotación que han sufrido algunas poblaciones naturales, sino que facilita su manejo y cosechado, y se asegura una materia prima uniforme, obtenida de forma controlada, para la industria (Guiry y Blunden, 1991). En la actualidad, las principales áreas de cultivo y producción de algas en mar abierto y lagunas costeras se concentran en el este de Asia (China, Corea y Japón).

La necesidad de cultivar algas para la producción, económicamente rentable, de metabolitos secundarios son similares a los requerimientos para la explotación de plantas terrestres: alto valor económico, densidades limitadas en el medio costero, limitada disponibilidad de fuentes naturales (especies raras o en peligro de extinción, difícil acceso y especies sobreexplotadas), y difícil cultivo (Misawa, 1994; Verpoorte et al., 2002.). Al tomar estos factores en consideración, el cultivo intensivo, desarrollado bajo un alto grado de control, ofrece una gran variedad de ventajas: extracciones más simples, posibilidad de dirigir el metabolismo hacia nuevos productos que no se encuentran de forma abundante en

su medio natural, la independencia de las variaciones de los factores climáticos y estacionales, mayor posibilidad de obtención de variantes y la respuesta a la demanda farmacéutica que requiere biomoléculas de alto perfil, entre otros. Además permite la mejora y modificación de la calidad de la biomasa (Gómez-Pinchetti et al., 1998). El cultivo intensivo de plantas terrestres requiere un alto aporte de nutrientes, en general fertilizantes químicos. El cultivo de macroalgas no es una excepción. Con el fin de reducir el uso de fertilizantes y por lo tanto reducir los costes de producción, se pueden emplear efluentes cargados en nutrientes como los de piscifactorías. Este enfoque además produce un beneficio ambiental ya que reduce la carga de nutrientes en los vertidos desde las instalaciones piscícolas a la costa.

En la especie *Halopithys incurva*, al igual que en otras especies pertenecientes al Orden Ceramiales (*Laurencia*, *Polysiphonia* y *Bryothamnion* entre otras) se han identificado compuestos con actividades biológicas diversas; antimicrobiana y antifúngica (Hornset & Hide, 1974), antiviral (Blunden et al., 1993) y recientemente inmunoestimuladora (Abdala et al., 2010) que podrían ser utilizados para la obtención de productos nutracéuticos, cosméticos y/o preparados farmacéuticos. Todo ello ha justificado el interés por el estudio del cultivo de *Halopithys incurva* y el potencial antioxidante de sus extractos mediante el uso de diferentes metodologías. El estudio previo llevado a cabo en capítulos anteriores (Capítulo I y Capítulo II) muestra una actividad antioxidante comparable a las sustancias antioxidantes sintéticas actualmente empleadas por la industria, tanto en *Halopithys incurva* recolectada de la naturaleza como la procedente del cultivo en sistemas de biofiltración.

La posibilidad de que *Halopithys incurva* constituya una fuente de moléculas antioxidantes efectivas, está sustentada en las siguientes razones: a) en la naturaleza esta especie se localiza en la zona intermareal, con lo que se expone a altos niveles de radiación solar (con presencia de radiación UV cosa que no ocurre en instalaciones de tierra cuando se cultiva bajo plásticos de invernadero). La alta irradiancia fotosintética y la radiación UV dentro del espectro solar favorecen la generación de radicales libres, y probablemente condicionan la existencia de compuestos antioxidantes que la protejan, b) Se ha encontrado una actividad antioxidante alta en extractos de otras 4 especies de algas rojas que están incluidas en la misma familia a la que pertenece la especie *Halopithys incurva* (Rhodophyta Ceramiales, Rhodomelaceae): *Brongniartella byssoides*, *Polysiphonia urceolata*, *Polysiphonia lanosa*, *Rhodomelateres*, *Rhodomela confervoides* y *Symphocladia*

*latiuscula* y *Laurencia obtusa* (Fujimoto y Kaneda, 1984; Anggadiredja et al., 1997; Yan et al., 1998; Huang y Wang, 2004, Zubia et al., 2007, 2009), c) *Halopithys incurva* siendo un alga roja no se espera que tenga una alta concentración de fenoles como ocurre en algunas algas pardas (Pavía et al., 1997; Connan 2004), en las especies de este Phylum se han identificado una gran variedad de compuestos fenólicos (Whitfield et al., 1999), cuyas propiedades antioxidantes han sido bien documentadas (Bravo, 1998). Se ha demostrado además que la acumulación de fenoles está influenciada por la disponibilidad de Nitrógeno (Pavía et al., 2000), por lo que el cultivo de *Halopithys* en efluentes de peces (altos niveles de amonio) podría incrementar el contenido en fenoles

Los parámetros de un ecosistema altamente productivo son los mismos tanto en tierra como en el mar, con la máxima productividad en  $1.8 \text{ kg C m}^{-2} \text{ año}^{-1}$  y una concentración máxima de clorofila de  $3 \text{ g m}^{-2}$  de superficie iluminada. En un cultivo intensivo de algas marinas, esto se logra con una biomasa de algas de aproximadamente  $10 \text{ kg m}^{-2}$  (Lüning 1990). En contraste, la mayoría de los fotones que inciden en una comunidad natural son absorbidos o dispersados por las partículas abióticas, porque las algas tienen una distribución estratificada. Esto se traduce en una productividad mucho más alta en los sistemas de cultivo en comparación a las determinadas en poblaciones naturales (Bidwell, 1985).

Una planta piloto para el cultivo intensivo, permite el control, entre otros factores, de la intensidad y el tipo de radiación (PAR y UVR) y el suministro de nutrientes (particularmente nitrógeno), hidrodinamismo (agitación por aire), todos ellos factores que afectan a la actividad fotosintética de las algas cultivadas en tanque de manera intensiva (Figuroa et al., 2009), a la productividad (Lüning, 2003) y a la estimulación de la síntesis de metabolitos (Figuroa et al., 2011). Estos aspectos además dependen de la tasa de aporte de nutrientes a la que se somete el cultivo (Troell et al., 2003). Además, cabe esperar que estos factores influyan directamente en la acumulación de ciertas sustancias (polifenoles, pigmentos, MAAs o polisacáridos) y verse reflejado en la capacidad antioxidante de las algas producidas, y en nuestro caso particular, de *Halopithys incurva*.

La exposición a la radiación UV tanto UV-B (280-315 nm) como UVA (315-400 nm) lleva asociada la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el oxígeno singlete, superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo radicales (Moldava, 1999). Esta situación conduce a una destrucción oxidativa de los componentes de la célula a través de la oxidación por daño en los ácidos nucleicos, los lípidos de membrana, proteínas y enzimas (Davis, 1987; Imlay y Linn,

1998; Aguilera et al, 2002;. Shiu y Lee, 2005; Roleda et al, 2006a, 2006b). Existen evidencias de que las algas expuestas a estrés oxidativo tienden a aumentar las defensas enzimáticas antioxidantes (Malanga et al, 1997; Huang et al., 2002; Rijstenbil, 2002; Rossa et al., 2002;. Shiu y Lee, 2005; Wang y Tang, 2005). Esto indica que los niveles de actividad, mayores y más estables, de enzimas antioxidantes, constitutivas o inducidas, se asocian con una mayor tolerancia al estrés en las algas (Aguilera et al., 2002). De este hecho se concluye que el mecanismo de defensa antioxidante contra las ROS es fundamental para la supervivencia de las algas en condiciones de estrés (Collen y Davison, 1999; Aguilera et al., 2002; Shiu y Lee, 2005).

El impacto que la radiación UV produce sobre los componentes celulares y los procesos metabólicos en macroalgas es muy diverso, depende de la especie y las características bio-ópticas (Henley et al., 1991; Döhler et al. 1995; Figueroa, 1997). El aporte de nutrientes esenciales como nitrógeno (N) y fósforo (P) juega un papel determinante en comparación a otro tipo de factores. El nitrógeno es necesario para la formación de componentes metabólicos esenciales en las células de las algas, tales como aminoácidos, ácidos nucleicos, aminoácidos y azúcares (Lobban y Harrison, 1994). Los efectos de la radiación UV sobre la absorción y el metabolismo del N fueron ya observados en macroalgas por Döhler et al. (1995) encontrando que la absorción de N-amonio está influenciada por la incidencia de la radiación UV. Estos autores concluyen que existe un efecto de la radiación UV sobre la absorción de nitrógeno inorgánico, pero que la respuesta es específica de la especie (Döhler et al., 1995; Korbee-Peinado et al., 2004). La radiación azul/UVA regula el metabolismo del nitrógeno a través de la fotoestimulación del transporte de nitrato, actividad nitrato reductasas o glutamina sintetasa (López-Figueroa y Rüdiger, 1991; Rüdiger y López Figueroa, 1992; López Figueroa, 1993; Figueroa et al., 1995 a,b; Figueroa et al., 1996)

Igualmente ha sido descrita la estrecha relación que existe entre el metabolismo del nitrógeno y el metabolismo del carbono tanto en plantas superiores como en microalgas (Syrett, 1981; AslamyHuffaker, 1984).

Tal y como ha sido expuesto en capítulos anteriores (Introducción y Capítulo II) el nitrógeno inorgánico procedente de los efluentes de piscifactorías puede ser asimilado eficientemente por diferentes especies de macroalgas. Pero la optimización de la eficiencia global de un sistema de acuicultura integrada en el que las macroalgas son el organismo biofiltrador es compleja ya que requiere el establecimiento de un equilibrio entre la producción de biomasa con posible interés

la eficiencia de biofiltración (Chopin et al., 2001; Troell et al., 2003). El cultivo de algas marinas en los IMTA aumenta la producción y con menos variabilidad que en las algas procedentes de la naturaleza debido a la mayor disponibilidad de nutrientes, como el caso de los cultivos de *Gracilaria* y *Ulva* en este tipo de sistemas (Neori et al., 2000; Buschmann et al., 2001; Abreu et al., 2009; Bolton et al., 2009). La disponibilidad de nitrógeno es prácticamente constante con solo ligeras fluctuaciones relacionadas con la biología de los peces (Abreu et al., 2009; Lüning y Pang, 2003)

Durante los últimos años en el Centro de Biotecnología Marina (CBM) de la ULPGC y en cooperación con otros grupos y centros de investigación nacionales y europeos se han desarrollado diversos proyectos basados en un sistema de policultivo integrado peces-macroalgas a escala de planta piloto, con el objetivo de demostrar la eficacia de este tipo de tratamientos y al mismo tiempo aprovechar la biomasa de algas producida en el biofiltro. El proyecto europeo “Species Diversification and improvement of aquatic production in seaweeds purifying effluents from integrated fish farms (SEAPURA)” y El Proyecto I+D +I del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Agroalimentarias (AGL) en colaboración con el Grupo de Fotobiología y Biotecnología de la UMA, denominado DEPUSIAL “Depuración y biofiltración de efluentes de piscifactorías con macroalgas marinas y valoración de la biomasa de algas como fuente de sustancias de interés biomédico (fotoprotectores y antioxidantes), piscícola (inmunoestimuladores) y agronómico (bioestimuladores)”. Estos proyectos tenían como objetivo la identificación de especies de macroalgas marinas con alta capacidad de crecimiento y biofiltración de efluentes de piscifactorías (beneficio ambiental) pero que además presentaran sustancias con interés agronómico (bioestimulantes) y biomédico (fotoprotectores-antioxidantes e inmunoestimulantes). El estudio de la influencia de las condiciones de cultivo de macroalgas crecidas en efluentes de piscifactorías sobre la estimulación de las rutas del C y/o del N fue uno de los principales objetivos se abordó a continuación en otro Proyecto también del Programa Nacional de Ciencias y Tecnologías Agroalimentarias (AGL) denominado BIFARO “Bio-inmunoestimulantes y fotoprotectores de algas rojas con alta capacidad de biofiltración de efluentes de piscifactorías” cuyos objetivos fundamentales se centraron en la obtención de biomasa de algas rojas cultivadas, con bajo coste económico, en efluentes con alto contenido en nutrientes procedentes del cultivo de dorada (*Sparus aurata*) para evaluar la capacidad y mejora de la biofiltración de dichos efluentes empleando distintas especies de macroalgas (*Gracilaria cornea*,

*Hypnea spinella*, *Halopythis incurva* y *Jania adhaerens*), y además, se realizó la valoración económica de la biomasa, cultivada en las distintas condiciones, en relación a la acumulación de MAAs, sustancias fotoprotectoras y con alto potencial antioxidante, y de polisacáridos con función inmunoestimuladora (Fig.3.1.).

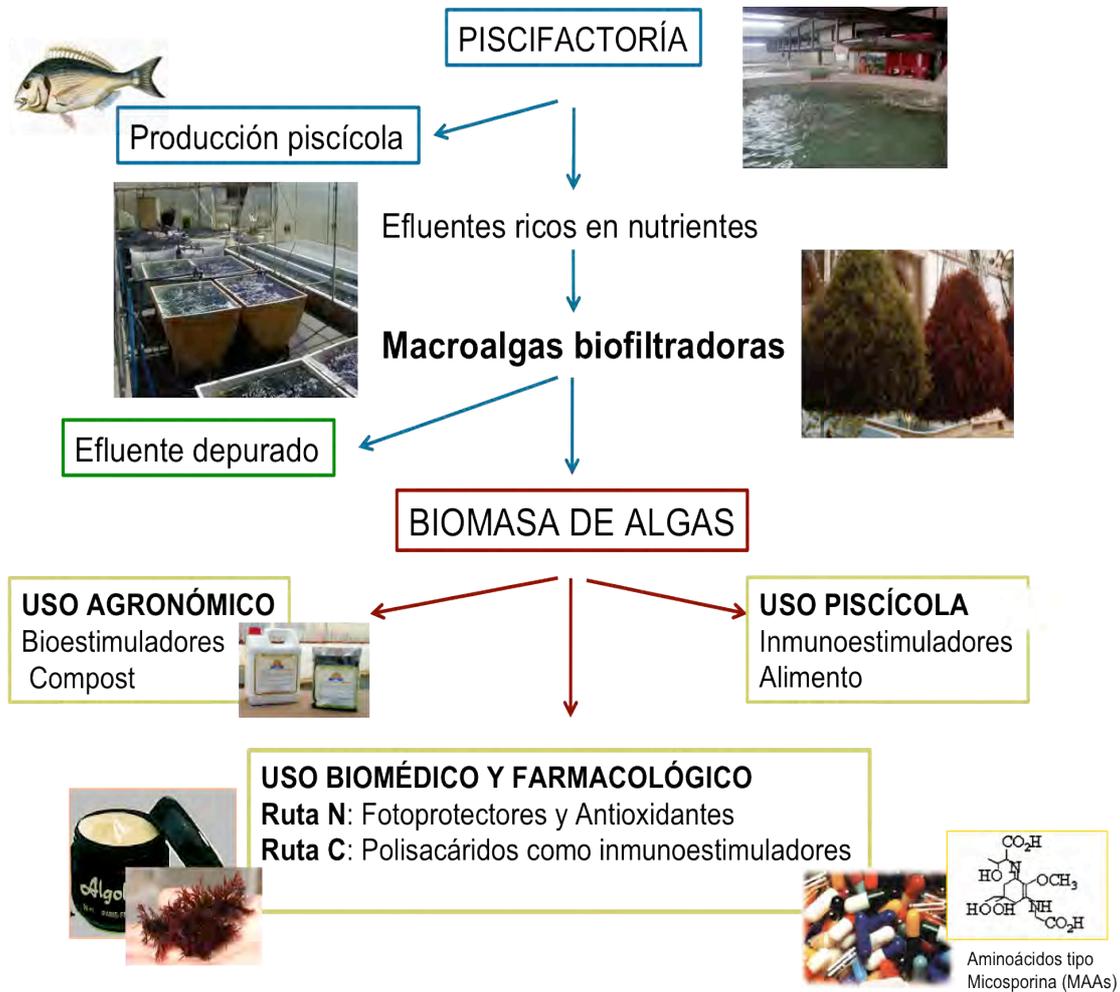


Figura 3.1. Diseño del proyecto “Bio-bioinmunoestimulantes y fotoprotectores de algas rojas con alta capacidad de biofiltración de efluentes de piscifactorías – BIFARO” (UMA-ULPGC) y posibles usos de la biomasa generada.

### 3.2. OBJETIVOS

A la vista de los resultados obtenidos y presentados en los capítulos precedentes, nos pareció relevante estudiar el efecto de las condiciones de cultivo en un sistema de biofiltración, con aporte continuo de nutrientes, en la calidad de la biomasa y la actividad antioxidante de los extractos de una especie que, hasta el momento, no ha sido cultivada de forma comercial, el alga roja *Halopithys incurva*. Con los antecedentes planteados, los objetivos del presente capítulo son:

- Estudiar la capacidad de respuesta de *Halopithys incurva* a diferentes posibilidades de cultivo en tanques, durante periodos prolongados, y bajo diferentes condiciones de aporte de nutrientes; adición de pulsos o bombeo continuo de los efluentes provenientes de los tanques para el cultivo de peces, y valorar su capacidad como especie biofiltradora.
- Estudiar los efectos que la dinámica del aporte de nutrientes combinada con diferentes condiciones de irradiación natural, tanto distintos niveles de radiación fotosintética como la presencia o ausencia de radiación solar ultravioleta, tienen sobre la fisiología y el metabolismo de *Halopithys incurva* bajo condiciones de cultivo intensivo.
- Valorar los efectos y las posibilidades que las diferentes condiciones de cultivo ensayadas tienen sobre la actividad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de la biomasa de *Halopithys incurva*.

### **HIPÓTESIS**

**Es posible el cultivo intensivo de *Halopithys incurva* en tanques con agitación del agua mediante aire bajo condiciones controladas.**

**El cultivo de *H. incurva* en tanques dispuestos en cascada permite aumentar la tasa de renovación de agua reduciendo el riesgo de limitación de nutrientes y optimizando las eficiencias de biofiltración de los efluentes.**

**Además de la disponibilidad de nutrientes, la radiación luminosa juega un papel importante para la obtención de producciones significativas y sostenibles de *H. incurva*.**

**Los extractos obtenidos de la biomasa de *Halopithys incurva* cultivada bajo alta irradiación (PAR + UVR) presentan mayor capacidad antioxidante.**

### 3.3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Las especies *Halopithys incurva* (Hudson) Batters y *Jania adherens* J.V. Lamouroux, fueron recolectadas de poblaciones naturales localizadas en la Playa de Jinamar (28°01'N; 15°24'W, Isla de Gran Canaria), donde se observa su coexistencia. Durante la bajamar, se seleccionaron plantas de buen porte, con baja incidencia de epífitos y pigmentación rojiza. Una vez en el laboratorio se procedió a una limpieza detenida, principalmente de otras algas y arena. Las algas seleccionadas fueron inoculadas en los tanques y las condiciones de cultivo bajo invernadero durante un periodo de aclimatación previo a los ensayos. Los experimentos fueron desarrollados una vez alcanzada la biomasa suficiente para la inoculación de los tanques a la densidad óptima establecida. *Sparus aurata* Linnaeus (Familia Sparidae; nombre común: Sama dorada) fue cultivada, a una densidad óptima de 20 kg m<sup>-3</sup>, en dos tanques de 11 m<sup>3</sup> con tasas de renovación de agua entre 6 - 8 vol d<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2. SISTEMA DE CULTIVO Y COSECHADO

Los experimentos de cultivo fueron desarrollados en las instalaciones del Centro de Biotecnología Marina (CBM) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Los tanques utilizados en los diferentes experimentos de cultivo de *Halopithys incurva* fueron: tanques semicirculares (SCT) de fibra de vidrio, con 750L de capacidad, 1.8 m<sup>2</sup> de superficie y una relación S:V=2.4 m<sup>-1</sup> y la pared interior recubierta de pintura epoxi blanca. La aireación se dispone longitudinalmente en la parte central del fondo del tanque de modo que se crean dos células de convección (Fig.3.2. a). Tanques circulares (CPT) de polietileno blanco semi-transparente, con 1500L de capacidad y área de 1.5 m<sup>2</sup> y S:V= 1 m<sup>-1</sup>. La aireación se dispone en forma de anillo en el fondo del tanque, creándose una célula de circulación que mueve las algas desde el fondo a la superficie y desde la periferia hacia el centro. (Fig.3.2. b). Tanques circulares (CPTP), de polietileno blanco semi-transparente, con 90L de capacidad y 0.2 m<sup>2</sup> de superficie aérea (S:V = 2.2 m<sup>-1</sup>). En estos tanques, la aireación se dispone longitudinalmente en la parte

central del fondo creándose suficiente movimiento de las algas por todo el tanque (Fig.3.2.c).

En los tanques, la biomasa de algas se mantiene libre en la columna de agua por la inyección forzada de aire mediante una bomba soplante (SIEMENS Elmo-G).El flujo abierto de agua se mantiene a través de un desagüe situado en la parte superior de los tanques que es cubierto con una malla para evitar los escapes de biomasa algal. Las tasas de renovación del medio son establecidas para cada tanque en función del experimento a desarrollar.

El cosechado de los tanques se realiza sacando la biomasa total con la ayuda de redes y dejándola escurrir durante un periodo de 15-30 minutos para obtener el peso fresco escurrido. Antes de ser nuevamente inoculada, la biomasa es pesada y ajustada a la densidad óptima del tanque correspondiente. La tasa de renovación del medio es ajustada tras la re-inoculación y revisada diariamente durante el periodo experimental.

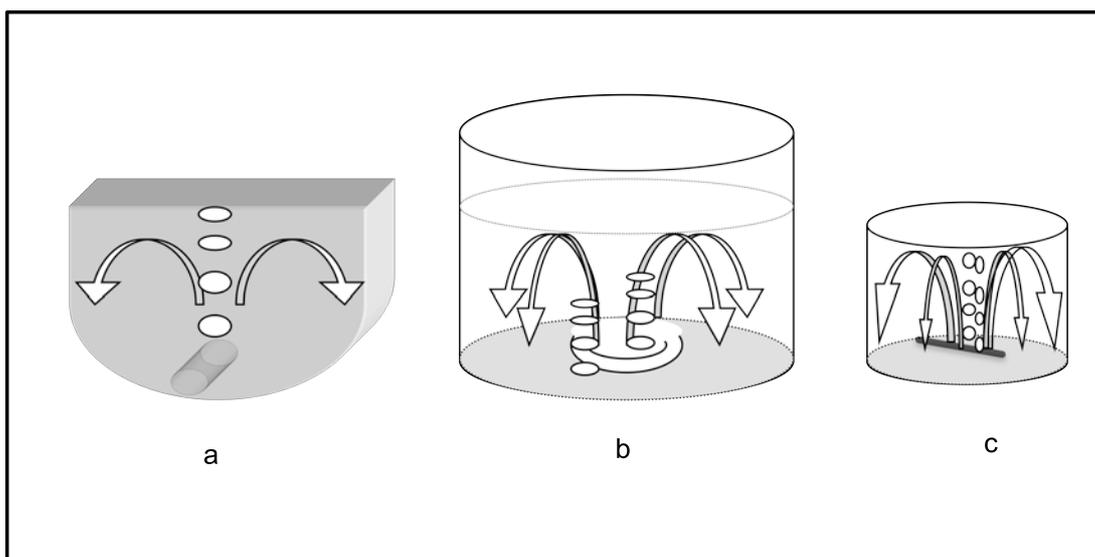


Figura 3.2. Modelos de tanque utilizados en los experimentos de cultivo de macroalgas, tanque semicircular de 750L (a), tanque circular de 1500L (b) y tanque circular de 90L (c).

### 3.3.3. DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA EL CULTIVO DE *HALOPITHYS INCURVA*

El cultivo de *Halopithys incurva*, se realizó en tres diseños experimentales :

1.Cultivo de *Halopithys incurva* en tanques SCT con adición de N-amonio por pulsos. en circuito cerrado y con aporte de N-amonio por pulsos, se llevó a cabo

durante el periodo comprendido entre el 22 de febrero y el 26 de abril de 2005 (8 semanas). Los pulsos de N-amonio, a partir de una solución madre de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se añadieron a las concentraciones 20, 60 y 100  $\mu\text{M}$  para cada tratamiento. Se dispuso un tanque control con agua de mar sin aporte de nutrientes. Los pulsos fueron añadidos diariamente a las 11:30 horas. La densidad inicial de cada tanque fue de 5  $\text{g L}^{-1}$ . Los tanques fueron dispuestos en condiciones naturales de radiación sin filtrar (PAR + UV). La radiación PAR media máxima del periodo alcanzó los 422  $\text{W m}^{-2}$ . Los cultivos fueron cosechados semanalmente para calcular los valores de producción y tasa específica de crecimiento. Muestras de los diferentes tratamientos fueron procesadas para el análisis del contenido en carbono y nitrógeno interno y las relaciones C:N.

2.Cultivo de *Halopithys incurva* en tanques distribuidos en cascada. el diseño experimental del cultivo en cascada de *H. incurva* consistió en tanques tipo circulares (CPT – 1500 L) con flujo de entrada de agua rica en amonio proveniente del efluente de los tanques de cultivo de peces (Nivel 1= N1), y cuyo desagüe alimentaba el flujo de entrada a los tanques semicirculares (SCT – 750 L) (Nivel 2= N2) a modo de cascada, tal como se muestra en la Figura 3.3.

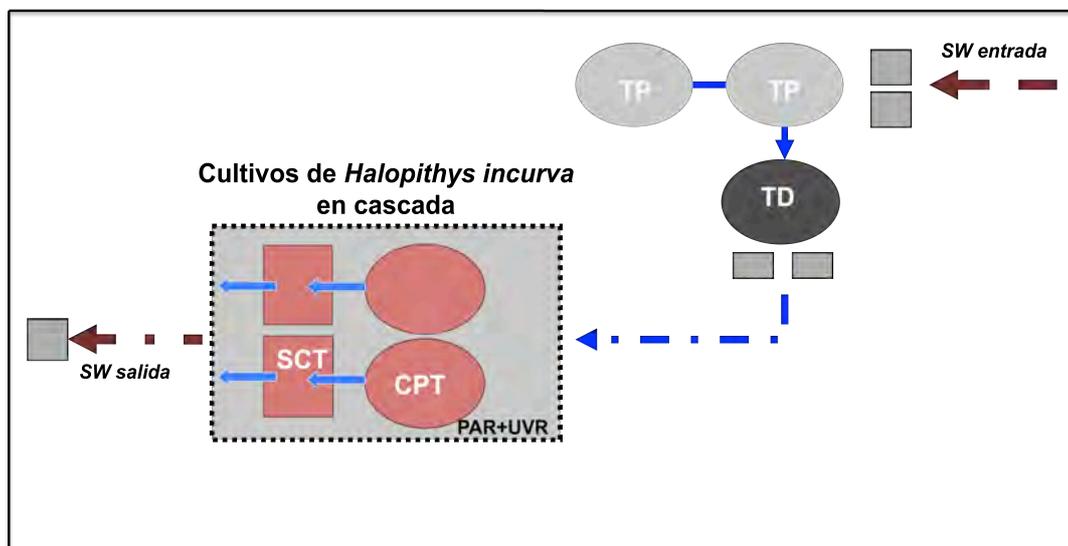


Figura 3.3. Esquema del diseño experimental del cultivo en cascada de *Halopithys incurva*. Entrada del agua de mar (SW), tanque de peces (TP), tanque de decantación (TD), tanque circular (CPT–N1), tanque semicircular (SCT–N2). Las condiciones de irradiación fueron exteriores (PAR+UV).

Tabla 3.1. Características experimentales y condiciones de cultivo para cada uno de los dos niveles del sistema de biofiltración en cascada; tanque circular (CPT), tanque semicircular (SCT), relación superficie volumen (S/V) y tasa de renovación de agua (TR).

Características	N1	N2
Modelo tanque	CPT	SCT
Superficie (m <sup>2</sup> )	1.5	1.8
Volumen (m <sup>3</sup> )	1.5	0.75
S/V	1	2.4
Tasa renovación (vol d <sup>-1</sup> )	4	8
Tasa entrada agua (L h <sup>-1</sup> )	375	375
Densidad cultivo (kg m <sup>-2</sup> )	7	2.9
Densidad cultivo (g L <sup>-1</sup> )	7	7

Para facilitar el trasvase de agua por gravedad entre las dos unidades, el segundo tanque se dispuso con un desnivel de 10 cm respecto al primero. El caudal de entrada de agua al N1 fue ajustado a una tasa de renovación de 4 vol. d<sup>-1</sup>. El flujo de agua en los tanques SCT (N2) fue de una tasa de renovación de 8 vol d<sup>-1</sup>. La densidad de inoculación fue de 7 g L<sup>-1</sup>. Los tanques fueron dispuestos en condiciones de radiación solar sin filtrar (PAR + UV). Los cultivos fueron cosechados cada 15 días para el cálculo de la producción, la tasa de crecimiento, las eficacias de biofiltración de amonio (NUE) y la tasa de asimilación de amonio (NUR). En la Tabla 3.1. se resumen las características y condiciones experimentales.

3. Co-cultivo de *Halopithys incurva* y *Jania adhaerens*, previamente al experimento de co-cultivo de *Halopithys incurva* y *Jania adhaerens*, ambas especies fueron mantenidas conjuntamente en tanques SCT (750 L) con aporte continuado de N-amonio a modo de biofiltro por un periodo superior a tres meses. El periodo experimental de 6 semanas se desarrolló entre los meses de septiembre y noviembre de 2007. Para el experimento de co-cultivo se emplearon tanques circulares de polietileno (CPTP – 90L) (Fig. 3.4.). La densidad de inoculación de los tanques fue ajustada a 13.3 g L<sup>-1</sup> (6 kg m<sup>-2</sup>), manteniéndose una relación 50:50 de cada especie al inicio del periodo experimental. La tasa de renovación de agua fue establecida en 20 vol d<sup>-1</sup>. Los muestreos fueron realizados separando la biomasa de ambas especies para la obtención de datos por especie. Se establecieron dos condiciones de radiación para los dos grupos de seis tanques: (1) bajo radiación natural natural sin filtrar (100% PAR + UV) y (2) bajo las condiciones de invernadero con un plástico que reduce la radiación PAR (80% de transmisión de PAR), la

radiación UV-A(10% de transmisión de UVA) y filtra la totalidad de la radiación UV-B ( 0% de transmisión de UVB). Durante las 4 primeras semanas, los tanques fueron mantenidos con agua enriquecida con N-amonio (concentración media,  $82.14 \pm 42.97 \mu\text{M}$ , con mínimos de  $24.53 \mu\text{M}$  y máximos de  $165.68 \mu\text{M}$ ) y P-fosfato (concentración media,  $23.66 \pm 11.47 \mu\text{M}$ , con mínimos de  $12.72 \mu\text{M}$  y máximos de  $49.62 \mu\text{M}$ ) proveniente de los efluentes de los tanques de peces, y en los controles las algas fueron cultivadas únicamente con agua de mar (donden no se detectaron concentración de N-amonio y P-fosfato).

Durante las siguientes 2 semanas todos los tanques fueron mantenidos con flujo de agua de mar no enriquecida con nutrientes. Finalmente, la biomasa de *Halopithys incurva* muestreada para los distintos análisis en cada tratamiento fue envasada en bolsas de plástico y congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su secado en un liofilizador Labconco (6.5 L).

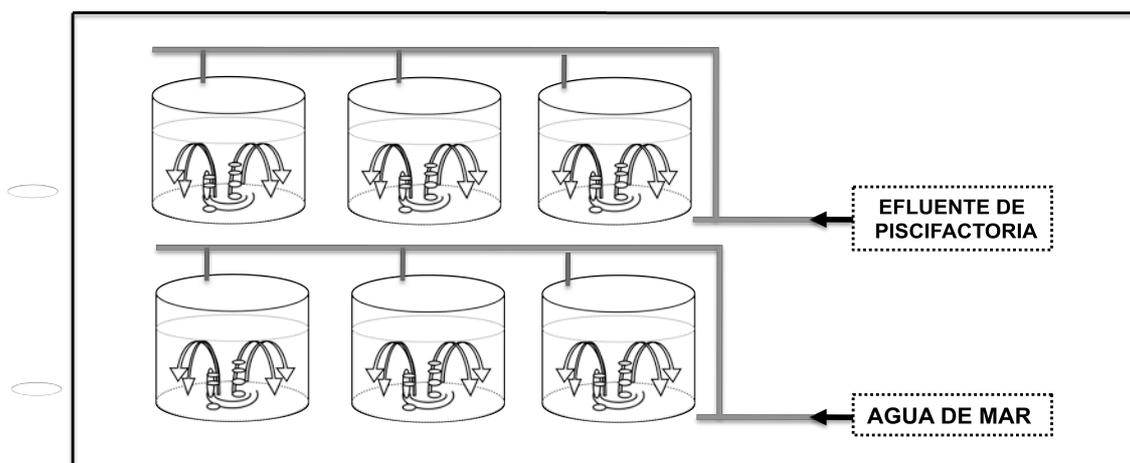


Figura 3.4. Esquema del diseño experimental del co-cultivo de *Halopithys incurva* y *Jania adhaerens* donde se muestra la disposición de los tanques circulares (CPTP).

Se obtuvieron datos de producción, tasa de crecimiento, eficiencias de biofiltración de N-amonio (NUE) y P-fosfato (PUE), y tasas de asimilación de N-amonio (NUR) y P-fosfato (PUE), y las dinámicas en los contenidos de R-ficoeritrina y las relaciones C:N de las muestras obtenidas en las diferentes condiciones. Para determinar el grado de estrés de la biomasa en cada tratamiento se obtuvieron valores del rendimiento cuántico óptimo utilizando medidas de fluorescencia de la clorofila, descritas en el apartado 3.3.7.

### 3.3.4. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y LA TASA DE CRECIMIENTO

Después de escurrir la biomasa cosechada de *Halopithys incurva* para la obtención del peso fresco escurrido (PF) la producción ( $\text{g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) fue calculada de acuerdo a DeBoer y Ryther (1977):

$$P = ((N_t - N_0)/t) * (PS/PH) / A$$

siendo  $N_0$  el peso inicial,  $N_t$  peso a los  $t$  días,  $PS/PH$  la relación peso seco/peso fresco y  $A$  el área del tanque de cultivo.

Para determinar la relación  $PS/PH$ , se eliminó el exceso de agua con ayuda de papel de filtro, se pesó el peso fresco escurrido y se secaron muestras por triplicado en estufa a una temperatura de  $90^\circ\text{C}$  hasta obtener un peso seco constante. La relación  $PS/PH$  fue 0.23 para *Halopithys incurva* y 0.22 para el experimento de co-cultivo con *H. incurva* y *Jania adherens*. La tasa de crecimiento neta fue calculada de acuerdo a D'Elia y DeBoer (1978):

$$TC = 100 * \ln(P_t/P_0) / t$$

siendo  $P_0$  peso inicial de la biomasa,  $P_t$  el peso final de la biomasa a los  $t$  días.

### 3.3.5. BIOFILTRACIÓN DE AMONIO Y FOSFATO

Semanalmente, el día posterior al cosechado y reajuste de los tanques, se determinaron las tasas de biofiltración de amonio y fosfato (en el experimento correspondiente) durante el periodo de enriquecimiento con nutrientes. Las muestras recolectadas en las entradas y salidas de los diferentes tanques fueron procesadas inmediatamente siguiendo los métodos colorimétricos de Parsons et al. (1984), tal y como se ha detallado en el Capítulo II. Con los resultados obtenidos se calcularon la tasa de eliminación de nutrientes para el N-amonio y P-fosfato (NUE y PUE) respectivamente:

$$UE (\%) = 100 - (C_s/C_e * 100)$$

donde  $C_s$  y  $C_e$  son las concentraciones de amonio y fosfato en la salida (desagüe) y en la entrada del tanque; y las velocidades de asimilación (NUR y PUR):

$$UR \text{ (mmol m}^{-2} \text{ h}^{-1}) = Q * (C_e - C_s) / A$$

donde Q = flujo de agua ( $L h^{-1}$ ),  $C_e$  = concentración de N-amonio o P-fosfato en la entrada (mM),  $C_s$  = concentración de N-amonio o P-fosfato en la salida (mM) y A = superficie aérea del tanque de cultivo ( $m^2$ ).

### 3.3.6. MEDIDAS DE RADIACIÓN Y OTROS PARÁMETROS DE INTERÉS

Las condiciones de radiación fueron determinadas por la localización de los tanques de cultivo en el ensayo correspondiente, distinguiéndose dos condiciones generales en un invernadero: (1) bajo invernadero con transmisiones de 80%PAR, 20%UVA y 0%UVB, y (2) en condiciones naturales sin filtrar y por lo tanto con transmisiones de radiación incidente de 100%PAR y 100% UV). Un espectrorradiómetro de multiodos Sphere Optics (SMS-500) con barrido cada minuto fue utilizado para determinar el espectro de radiación en ambas condiciones (ver Figura 3.3.). Los tanques situados bajo un segundo invernadero reciben 99.84% de radiación PAR y 0.16% de radiación UVA, mientras que la radiación UVB es filtrada en su totalidad. En los cultivos en el exterior los tanques de macroalgas reciben el 100% de la radiación solar distribuida en 90.30% PAR, 9.44% UVA y 0.26% UVB. Con los valores de irradiancia se calcularon los porcentajes de transmisión y absorción del invernadero según las siguientes fórmulas:

$$T = (E_{inv}/E_{ext}) * 100$$

$$A = 1 - T$$

donde T es el porcentaje de transmisión;  $E_{inv}$  es la irradiancia recibida en el invernadero;  $E_{ext}$  es la irradiancia en el exterior y A el porcentaje de absorción.

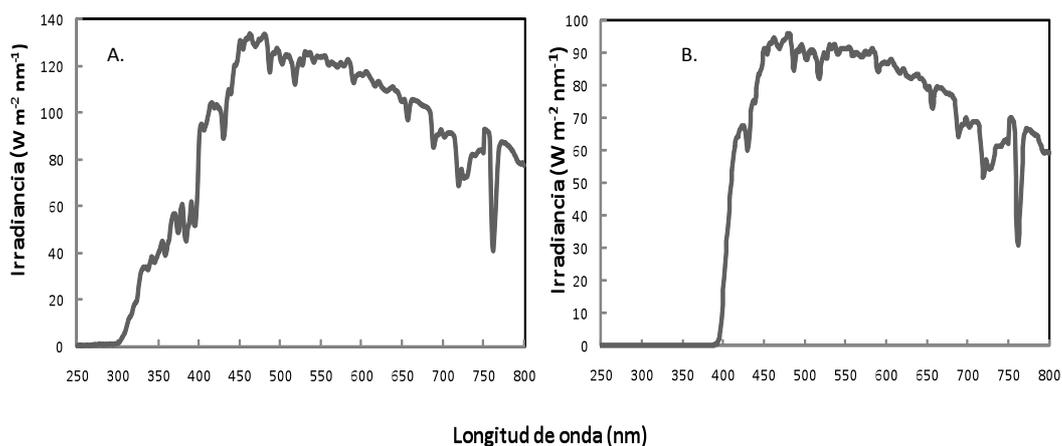


Figura 3.5. Espectros de irradiación en las condiciones ensayadas: exterior (A), y bajo invernadero (B).

En la Figura 3.6. se representan los porcentajes de absorción y transmisión de radiación del invernadero.

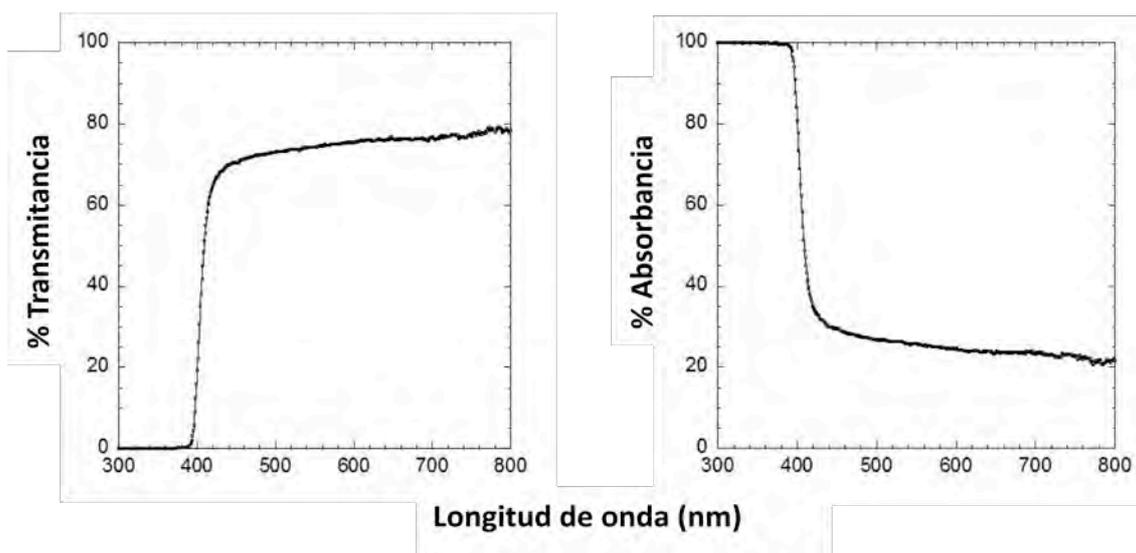


Figura 3.6. Porcentajes de transmitancia y absorbancia de la cubierta del invernadero.

Durante el periodo experimental, los datos de irradiación ( $W m^{-2}$ ) fueron obtenidos de forma diaria con un radiómetro ELDONET (Real Time Computer, Erlangen, Alemania). Este radiómetro toma lecturas en tres canales (PAR, 400-700 nm; UV-A, 315-400 nm; UV-B, 280-315 nm) a intervalos de 1 s y almacena los datos a través del software WinDose 2000, que calcula la dosis diaria acumulada ( $kJ m^{-2} d^{-1}$ ).

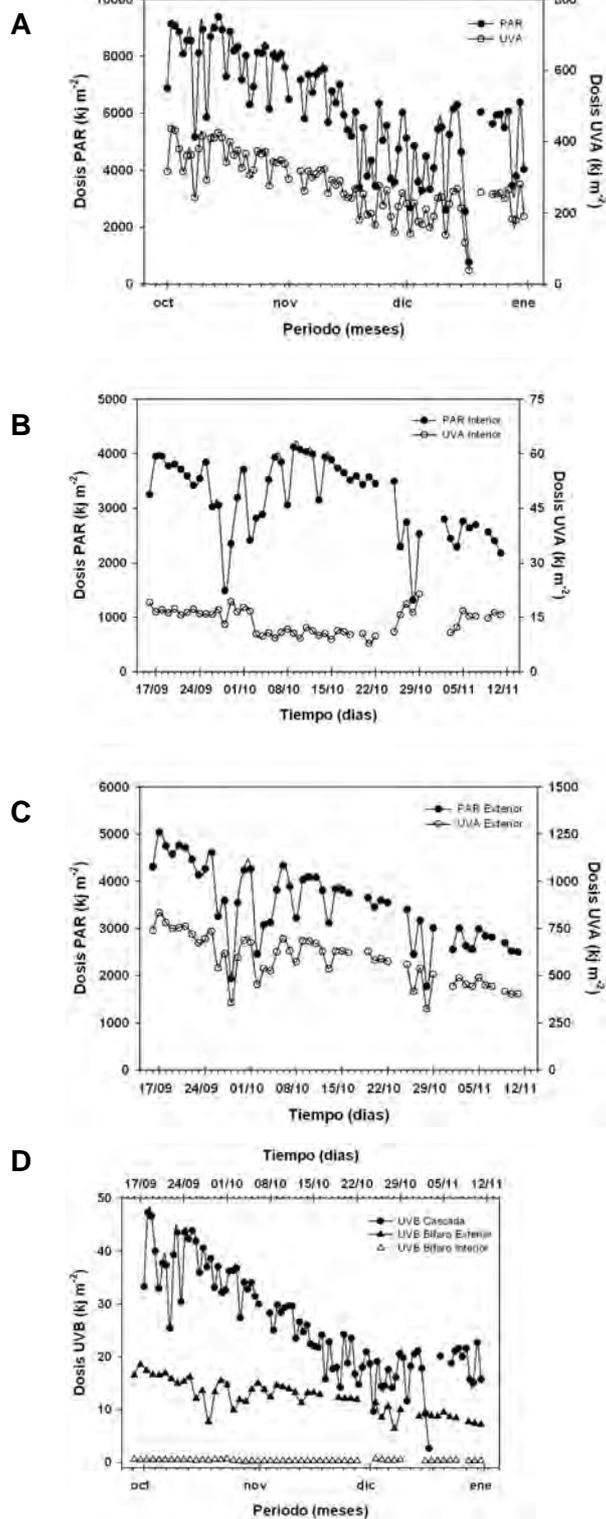


Figura 3.7. Dosis de radiación solar PAR y UV-A ( $\text{kJ m}^{-2}$ ) en, (A) experimento cultivo en cascada (Oct-Dic, 2002) (B), experimento cocultivo condiciones interiores (C), experimento cocultivo condiciones exteriores (Sept-Nov, 2007). (D) Dosis de radiación solar UV-B ( $\text{kJ m}^{-2}$ ) en las tres condiciones de cultivo, cascada, cocultivo exterior (bifaro exterior) e cocultivo interior (bifaro interior).

Las determinaciones del pH del medio se realizaron con un pH-metro 507 (Crison) calibrado diariamente de acuerdo a las instrucciones, y las medidas de oxígeno disuelto (DO) y temperatura de los tanques fueron obtenidas con un oxímetro DO100 (Cole-Palmer).

### **3.3.7. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO ÓPTIMO ( $F_v/F_m$ ) DEL FOTOSISTEMA II (MEDIDAS DE LA FLUORESCENCIA IN VIVO DE LA CLOROFILA ASOCIADA AL FOTOSISTEMA II)**

Para la determinación del efecto de las diferentes condiciones de cultivo sobre el grado de estrés de la biomasa, en el experimento de co-cultivo, se utilizó un Plant Efficiency Analyzer (Pocket PEA, Hansatech, UK) con el que se determinó, *in vivo*, el rendimiento cuántico óptimo del FSII ( $F_v/F_m$ ) a través de las medidas de fluorescencia de la clorofila

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

Donde  $F_0$ , es el nivel mínimo de fluorescencia,  $F_m$ , es el nivel de fluorescencia máximo en un pulso de saturación,  $F_v$ , es la fluorescencia variable y PSII, fotosistema II. Para ello las algas fueron adaptadas a la oscuridad durante un tiempo de 15 min antes de aplicar un pulso de luz de 3.000  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (100% de saturación) durante un intervalo de 5 s. Las medidas fueron tomadas por triplicado al menos una vez cada semana durante el periodo experimental.

### **3.3.8. DETERMINACIÓN DE R-FICOERITRINA**

El protocolo de determinación de la R-ficoeritrina está descrito con detalle en el Capítulo I.

### **3.3.9. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBONO Y NITRÓGENO INTERNO**

Los contenidos internos de C y N total, y las relaciones C:N, se determinaron empleando un analizador elemental CNHS LECO-932 a 1050°C, que realiza el análisis mediante un detector de infrarrojos. Para el análisis de las muestras de algas, previamente liofilizadas, se utilizó EDTA como patrón. Se determinaron los

contenidos de C y N ( $\text{mg C ó N g}^{-1}$  PS) que finalmente fueron expresados en forma de porcentaje.

### 3.3.10. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

#### 3.3.10.1. Ensayo DPPH

El protocolo de determinación del estudio del barrido de radicales libres mediante el ensayo DPPH está descrito con detalle en el Capítulo I.

#### 3.3.10.2. Ensayo ferrilmioglobina/ ABTS

El ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), ó ABTS, es un compuesto que presenta gran estabilidad química, alta solubilidad en agua y un máximo de absorción en la banda del UVA a 342 nm. Cuando este compuesto se oxida, se transforma en un radical metaestable ( $\text{ABTS}^+$ ) con un espectro de absorción característico y diferente al ABTS, presentando máximos de absorción en la región espectral del UV y visible a 413, 645, 727 y 811 nm (Fig. 3.8). El producto de oxidación del ABTS, el catión-radical de larga vida  $\text{ABTS}^+$ , permite determinar la actividad antioxidante total de antioxidantes donadores de hidrógeno (capturadores de radicales en fase acuosa) y antioxidantes rompedores de cadena (capturadores de radicales peroxilo lipídicos). El estudio de la capacidad antioxidante a través de la oxidación del ABTS se abordó en este trabajo tal y como se describe a continuación.

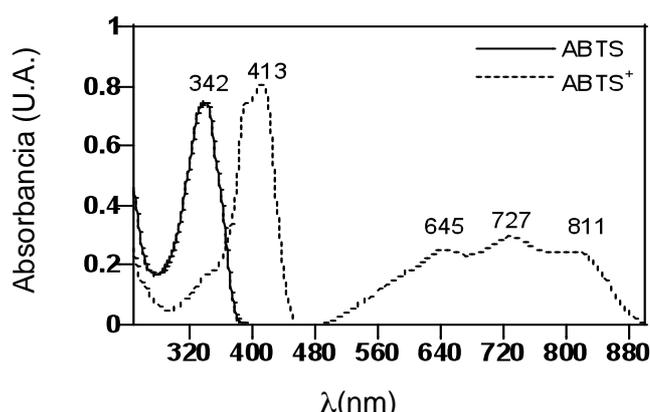


Figura 3.8. Espectros de absorción del ABTS y  $\text{ABTS}^+$ .

El ensayo  $\text{ABTS}^+$  se basa en la activación de la ferrilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir el radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes.

## **PROTOCOLO**

Se llevó cabo según el método desarrollado por Miller et al.1993. La mezcla de reacción se preparó directamente en una cubeta de cuarzo de 1 ml donde se añadieron progresivamente las siguientes soluciones con las concentraciones finales indicadas. 2.5  $\mu$ M metmioglobina, 150  $\mu$ M ABTS, 75  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50 mM de tampón fosfato, pH= 7.5. La absorbancia se midió a 413 nm. El resultado final se expresó como equivalentes de los compuesto de referencia ácido ascórbico (CVEAC) y pirogalol (CPEAC).

### **3.3.10.3. Ensayo de decoloración de beta-caroteno**

La técnica se fundamenta en la capacidad de diversos extractos de disminuir la decoloración oxidativa del betacaroteno en una emulsión ácida de betacaroteno/linoleico. El ácido linoleico se oxida fácilmente ante la presencia de átomos de oxígeno especialmente activados. El  $\beta$ -caroteno, precursor de la vitamina A, también es conocido como antioxidante lipofílico, ya que previene la peroxidación lipídica en membranas secuestrando moléculas de oxígeno singlete (Burton e Ingold, 1984) y radicales lipídicos peróxidos. El  $\beta$ -caroteno, cuando se encuentra en presencia de ácido linoleico, cede electrones retardando así la etapa de iniciación del proceso de autooxidación del ácido linoléico y limitando la fase de propagación del daño (elimina simultáneamente radicales peróxidos formados). Si se añade una sustancia con capacidad antioxidante al medio de reacción betacaroteno/linoleico, ésta nueva sustancia tenderá a oxidarse ella preferentemente al  $\beta$ -caroteno, compitiendo con este por el secuestro de estos radicales.

## **PROTOCOLO**

Se preparó una solución madre de  $\beta$ -caroteno (0,2 mg/mL de cloroformo), 1 mL de ésta solución se adicionó a un balón volumétrico de 100 mL que contenía 15  $\mu$ l de ácido linoleico y 0.2 mL de Tween 20 y se llevó a sequedad tras pasar la mezcla por un rotavapor. Tanto la solución madre de  $\beta$ -caroteno como el ácido linoléico se bombearon con nitrógeno para evitar su oxidación. Al residuo obtenido se le adicionaron 100 mL de agua ultrapura previamente saturada con oxígeno. A continuación se dispensó en tubos de ensayo 2 mL de esta emulsión más 100  $\mu$ L de los extractos testados. Se utilizó como control positivo  $\alpha$ -tocoferol 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M.

Se tomaron medidas espectrofotométricas, inicialmente ( $t=0$ ) y a intervalos de 15 minutos hasta completar 45 minutos una longitud de onda de 470 nm. Los tubos de ensayo, preparados por triplicado, se cubrieron con papel de aluminio y fueron introducidos en un baño de agua a 40°C mientras se realizaron las lecturas. Todos los reactivos usados fueron grado analítico.

#### **3.3.10.4. Ensayo de secuestro de radical superóxido ( $O_2 \cdot^-$ )**

La generación no enzimática del anión superóxido fue generado por la reacción entre PMS, NADH y NBT el cuál permite evaluar el barrido del anión superóxido de los extractos por la reducción del NBT.

#### **PROCOLO**

Se desarrolló un microensayo adaptando el método descrito por Payá et al., 1993. En las cubetas de cuarzo se añadieron, 10  $\mu$ L del extracto de alga, 50  $\mu$ L de NADH 166  $\mu$ M, 50  $\mu$ L de NBT 43  $\mu$ M, 50  $\mu$ L PMS 5  $\mu$ M y tampón fosfato 850  $\mu$ L a pH 7.5. Los cambios de absorbancia se registraron a 560 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la formación del anión superóxido en comparación con una muestra a la que no se le agregó ningún tratamiento. Todas las medidas, tanto de las muestras y controles positivos (pirogalol, cumarina y LPS) se realizaron por triplicado.

#### **3.3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los valores representados corresponden a valores medios  $\pm$  desviación estándar de las réplicas realizadas para cada ensayo. Para comparar las medias, en el experimento en cascada y los resultados de producción de cocultivo se empleó el test de t-Student, previo test de Levene para asegurar la homogeneidad de varianza. Para el estudio de los factores (tiempo, luz y nutrientes). Se realizó un análisis de varianza múltiple, test de Fisher LSD, ( $p < 0.05$ ) y el estudio de subconjuntos entre medias se analizó mediante el test de Tukey-B. Los análisis se realizaron con el programa informático SPSS para MAC OS X y Sigma Plot para PC.

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. CULTIVO DE *HALOPITHYS INCURVA* EN TANQUES SCT CON ADICIÓN DE N-AMONIO POR PULSOS

El cosechado semanal de los cultivos permitió calcular las producciones y tasas de crecimiento a lo largo de las ocho semanas. La influencia de las distintas concentraciones de N-amonio se muestran de forma resumida en la Tabla 3.2. Durante el periodo experimental, la temperatura en los tanques de cultivo fue de  $18.2 \pm 1.05$  °C, el pH 8,5 ( $\pm 0.1$ ) y el promedio de la concentración de oxígeno disuelto de  $9.8 \pm 0.3$  mgL<sup>-1</sup>.

El cultivo de *Halopithys incurva* a lo largo de las ocho semanas alcanzó una producción máxima de  $9.08 \pm 1.90$  g PS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> en el tanque que recibía pulsos de N-amonio con una concentración de 100  $\mu$ M d<sup>-1</sup>, mientras que las producciones más bajas se detectaron en el tanque control (sin aporte de nutrientes) siendo estas de  $2.14 \pm 0.81$  g PS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. Los tanques que recibieron pulsos diarios de 20  $\mu$ M y 60  $\mu$ M de N-amonio, mostraron valores promedio de  $3.23 (\pm 1.23)$  g PS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y  $5.43 (\pm 1.02)$  g PS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> respectivamente.

Tabla 3.2. Producción expresada en g PS m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup> y tasa de crecimiento expresada en % d<sup>-1</sup>, contenido en C y N (mg g PS<sup>-1</sup>) y relación C:N obtenidos tras el cultivo de *Halopithys incurva* bajo diferentes concentraciones de N-amonio (medias  $\pm$  desv, n=3). El nitrógeno es aplicado a modo de pulsos.

Concentración N-amonio ( $\mu$ M)	Producción (g PS m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	Tasa de crecimiento (% d <sup>-1</sup> )	C mg C gPS <sup>-1</sup>	N mg N gPS <sup>-1</sup>	C:N
HTC	$2.14 \pm 0.81$	$0.86 \pm 0.31$	$298.13 \pm 2.25$	$15.80 \pm 0.27$	$18.80 \pm 0.42$
HT20	$3.23 \pm 1.23$	$1.27 \pm 0.46$	$293.56 \pm 1.94$	$20.67 \pm 0.34$	$14.20 \pm 0.14$
HT60	$5.43 \pm 1.02$	$2.08 \pm 0.36$	$278.33 \pm 2.18$	$27.26 \pm 0.58$	$10.21 \pm 0.14$
HT100	$9.08 \pm 1.90$	$3.30 \pm 0.60$	$303.75 \pm 0.90$	$32.52 \pm 0.21$	$9.34 \pm 0.64$

Las tasas de crecimiento mostraron diferencias entre los cuatro tanques de cultivo, siendo mayor en el tanque con concentraciones 100  $\mu$ M de N-amonio,  $3.3 (\pm 0.81)\%$  d<sup>-1</sup>. Tanto los resultados del contenido en N como la relación C:N se vieron afectados significativamente por la disponibilidad de N-amonio (Tabla 3.2).

La relación disminuyó de manera significativa en función de la concentración de pulsos de N-amonio recibidos, encontrando la relación C:N más baja en algas cultivadas con pulsos diarios de 100  $\mu\text{M}$  (Tabla 3.2). Las diferencias que se detectaron en el contenido de nitrógeno en talo de *Halopithys incurva* cultivada con pulsos diarios de N-amonio mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Se observó un incremento del 55,5 % en el contenido de nitrógeno entre el tanque control (HTC) y el tanque que recibe el mayor pulso de N-amonio (HT100) tal y como se muestra la Tabla 3.2.

### 3.3.2. CULTIVO DE *HALOPITHYS INCURVA* EN TANQUES DISTRIBUÍDOS EN CASCADA

La producción y tasas de crecimiento obtenidos en el sistema a lo largo del ensayo se muestran de manera resumida en la Tabla 3.3. No se encontraron diferencias en los valores de producción (Fig. 3.9.) ( $p < 0.05$ , test t-Student) entre los dos tipos de tanque de cultivo utilizados.

Tabla.3.3. Producción expresada en  $\text{g PS m}^{-2}\text{d}^{-1}$  y tasa de crecimiento expresada como  $\% \text{d}^{-1}$  (medias  $\pm$  desv,  $n=2$ ) obtenidos para *Halopithys incurva* cultivada en los dos niveles de biofiltros.

Mes	Sistema Cultivo	Nivel de biofiltro en cascada	Densidad ( $\text{gL}^{-1}$ )	Densidad ( $\text{gm}^{-2}$ )	Producción ( $\text{gPSm}^{-2}\text{d}^{-1}$ )	Tasa crecimiento ( $\% \text{d}^{-1}$ )
Octubre					$16.70 \pm 6.2$	$0.91 \pm 0.4$
Noviembre	CPT	1	7	7	$11.20 \pm 8.3$	$0.60 \pm 0.4$
Diciembre					$18.02 \pm 0.7$	$1.25 \pm 0.05$
Octubre					$17.20 \pm 0.9$	$1.60 \pm 0.8$
Noviembre	SCT	2	7	2.9	$10.4 \pm 1.3$	$1.30 \pm 0.2$
Diciembre					$21.2 \pm 7.6$	$3.30 \pm 1.1$

El cultivo de *Halopithys incurva* alcanzó un rendimiento medio de  $15.3 \pm 3.61 \text{ gPSm}^{-2}\text{d}^{-1}$  en los tanques CPT y  $16.2 \pm 5.46 \text{ gPSm}^{-2}\text{d}^{-1}$  en los tanques SCT. Los mayores valores de producción en ambos niveles,  $18.02 \pm 0.7 \text{ g PS m}^{-2} \text{d}^{-1}$  en tanque CPT y  $21.2 \pm 7.6 \text{ g PS m}^{-2}\text{d}^{-1}$  en SCT, fueron obtenidos en el mes de diciembre. Los valores más bajos, en ambos niveles se observaron el mes de noviembre  $0.6 \pm 0.4 \text{ g PS m}^{-2}\text{d}^{-1}$  en tanques CPT y  $1.3 \pm 0.2 \text{ g PS m}^{-2}\text{d}^{-1}$  en tanques SCT. Sin embargo las tasas de crecimiento (Fig. 3.10) fueron significativamente superiores en el 2º nivel ( $p < 0.05$ ), demostrando que no existió limitación para el crecimiento de las algas en este nivel. El mes de diciembre fue donde se

alcanzaron los mayores valores,  $1.25 \pm 0.05 \text{ \% d}^{-1}$  en tanque CPT y  $3.3 \pm 1.1 \text{ \% d}^{-1}$  en SCT. Los valores más bajos, en ambos niveles se observaron el mes de noviembre  $0.6 \pm 0.4 \text{ \% d}^{-1}$  en tanques CPT y  $1.3 \pm 0.2 \text{ \% d}^{-1}$  en tanques SCT.

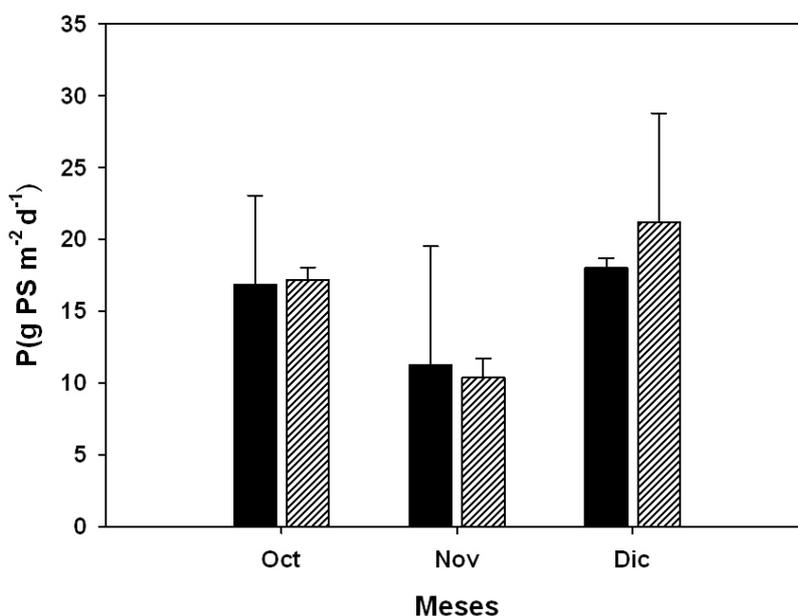


Figura 3.9. Resultados de producción y tasas de crecimiento en los cultivos en cascada de *Halopithys incurva* en los dos niveles de biofiltros (medias  $\pm$  desv, n=3). Donde  corresponde a la producción (g PS m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup>) obtenida en tanque CPT (Nivel 1) y  corresponde a la producción (g PS m<sup>-2</sup>d<sup>-1</sup>) obtenida en tanque SCT (Nivel 2).

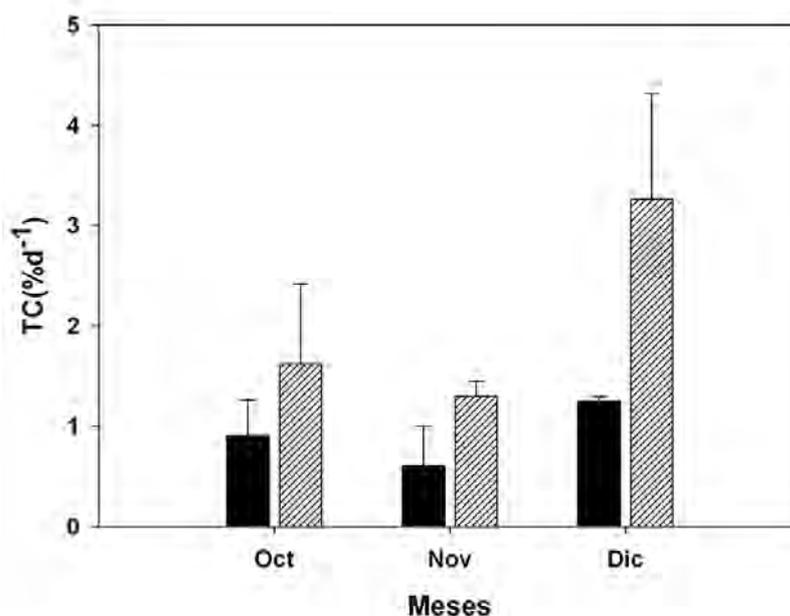


Figura 3.10. Resultados de la tasa de crecimiento (TC) en los cultivos en cascada de *Halopithys incurva* en los dos niveles del biofiltro (medias  $\pm$  desv, n=3). Donde  corresponde a la tasa de crecimiento (% d<sup>-1</sup>) obtenida en tanque CPT (Nivel 1) y  corresponde a la tasa de crecimiento (% d<sup>-1</sup>) obtenida en tanque SCT (Nivel 2).

corresponde a la tasa de crecimiento (% d<sup>-1</sup>) obtenida en tanque CPT (Nivel 1) y  $\square$  corresponde a la tasa de crecimiento (% d<sup>-1</sup>) obtenida en tanque SCT (Nivel 2).

Durante el periodo de ensayo la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la entrada de los cultivos osciló entre 12 - 82 μM. La eficiencia media de eliminación en el 1<sup>er</sup> BF fue del 45.9% obteniéndose valores máximos cercanos al 68%. En el 2<sup>o</sup> BF los valores de NUE disminuyeron, con valores medios del 25.6% y máximos del 57% (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Concentración N-amonio en los tanques (Et) expresado en μM y eficiencia de incorporación de N (NUE,%) y tasa de incorporación de nitrógeno (NUR, mmol NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> valores medios(MEDIA), mínimos (MIN) y máximos (MAX) obtenidos en H.incurva crecida en dos niveles del sistema en cascada .

	Et	% Eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (NUE)			mmol NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> (NUR)		
		MEDIA	MIN	MAX	MEDIA	MIN	MAX
1 <sup>er</sup> BF	45.9	45.9	24.4	67.6	0.57	0.30	0.76
2 <sup>o</sup> BF	25.6	25.6	13.12	47	1.04	0.58	2.73
<b>Total</b>		<b>71.5</b>	<b>54.1</b>	<b>97.5</b>	-	-	-

La eficiencia media de eliminación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a la salida del conjunto del sistema fue del 71%, eliminándose más del 64% de este porcentaje en el 1<sup>er</sup> BF. La reducción de los niveles de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> medios en cada nivel del sistema (nivel 1 (CPT) y nivel 2 (SCT) se muestra en la figura 3.11. La concentración media en los efluentes finales se redujo hasta un 28 % con respecto a los niveles contenidos en el efluente del cultivo de peces.

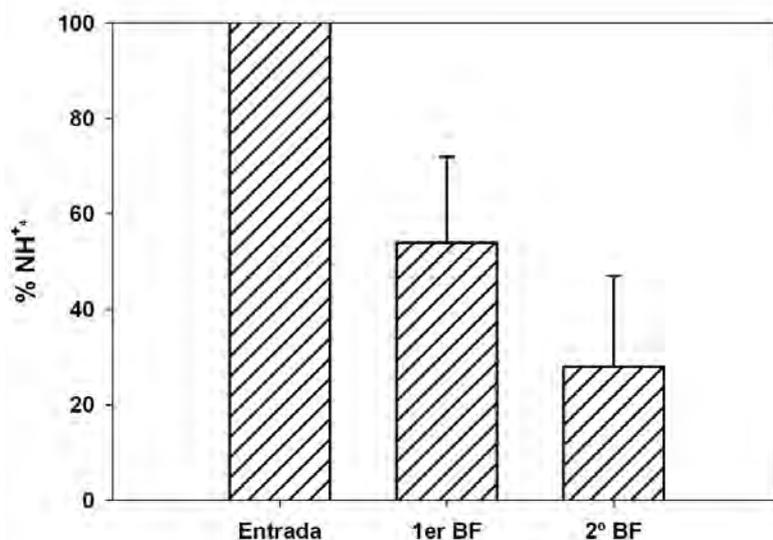


Figura 3.11. Concentración de N-amonio (%) en la entrada del tanque, nivel 1 del biofiltros (1er BF) y nivel 2 del biofiltro (1er BF).

### 3.3.3. CO-CULTIVO DE *HALOPITHYS INCURVA* Y *JANIA ADHAERENS*

Los resultados de producción del experimento de cocultivo *Halopithys-Jania* mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ , test de t-Student). Las mayores producciones ( $54.5 \pm 22.2 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) se encontraron sin aporte de nutrientes y crecidas bajo condiciones naturales sin filtrar la radiación solar (PAR+ UV), mientras que las menores se encontraron en los cultivos interiores con suministro de nutrientes proveniente del efluente  $34.3 \pm 11.9 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . Los resultados de la tasa de crecimiento máximos y mínimos correspondieron a las algas cultivadas en las mismas condiciones, donde se encontraron valores de  $3.6 \pm 1.2 \text{ \% d}^{-1}$  y  $1.8 \pm 0.9 \text{ \% d}^{-1}$ . A continuación se representan los datos de manera resumida en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Producción expresada en  $\text{g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  y tasa de crecimiento expresada como  $\%$  (medias  $\pm$  desv,  $n=3$ ) obtenidos en el experimento de cocultivo en las diferentes condiciones, exterior (PAR+UVR), en invernadero (PAR) y sin nutrientes (sn).

Irradiación	Nutrientes	P ( $\text{g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ )	TC ( $\% \text{ d}^{-1}$ )
PAR	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> -P	$34.3 \pm 11.9$	$1.8 \pm 0.9$
	sn	$40.7 \pm 13.9$	$2.5 \pm 1.0$
PAR+UV	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> -P	$48.7 \pm 29.3$	$3.2 \pm 1.7$
	sn	$54.5 \pm 22.2$	$3.6 \pm 1.2$

Las eficiencias de biofiltración de  $\text{NH}_4^+$  (NUE) y la tasa de incorporación de  $\text{NH}_4^+$  (NUR) en los tanques con aporte de aguas del efluente ricas en N-amonio se presentan en la Tabla 3.6. A los 7 días desde el inicio del experimento se alcanza la eficiencia de biofiltración máxima, siendo ésta del 100%. Dicha eficiencia es igual en el caso de los experimentos en exterior (PAR+UVR) que en los experimentos en invernadero (PAR). La tasa de incorporación de  $\text{NH}_4^+$  no presenta grandes diferencias entre los tratamientos aunque es mayor en exterior  $31.5 \pm 17.1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , que bajo invernadero,  $27.9 \pm 16.8 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ .

Al igual que sucede con la eficiencia de biofiltración, la eliminación de fosfato es muy similar en ambas condiciones de irradiación pero los valores son muy inferiores, logrando la retirada de  $20.2 \pm 6.4 \%$  en condiciones de alta irradiación (PAR+UVR) y  $21.5 \pm 4.3 \%$  bajo invernadero. La velocidad de absorción de fosfato (PUR) fue significativamente superior ( $p < 0.05$ ) en condiciones de alta irradiación  $11.1 \pm 5.3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  frente a las algas cultivadas bajo invernadero  $8.5 \pm 5.7 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ .

Tabla 3.6. Eficiencia de incorporación de nitrógeno-  $\text{NH}_4^+$  (NUE) expresada como %, tasa de incorporación de N-amonio (NUR) expresada en  $\text{mmoles m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ , eficiencia de biofiltración de  $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$  (PUE) expresada en % y tasa de incorporación de fosfato (PUR) expresada en  $\text{mmoles m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (medias  $\pm$  desv,  $n=8$ ) obtenidos en el experimento de *cocultivo* bajo diferentes condiciones de irradiancia y aporte de nutrientes.

Irradiación	Nutrientes	NUE (%)	NUR ( $\text{mmoles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )	PUE (%)	PUR ( $\text{mmoles m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )
PAR	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ , $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ sn	$100.0 \pm 0.0$	$27.9 \pm 16.8$	$20.2 \pm 6.4$	$8.5 \pm 5.7$
PAR+UVR	$\text{NH}_4^+\text{-N}$ , $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ sn	$100.0 \pm 0.0$	$31.5 \pm 17.1$	$21.5 \pm 4.3$	$11.1 \pm 5.3$

En iguales condiciones lumínicas el rendimiento cuántico óptimo ( $F_v/F_m$ ) fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con efluentes de piscifactorías que en aquellos con agua de mar (Fig. 3.12.). En los casos con aporte de  $\text{NH}_4^+$  se observaron diferencias significativas entre los tratamientos bajo invernadero (PAR) y en exterior (PAR+UVR).

Tabla 3.7. Análisis de varianza múltiple (tiempo, luz y nutrientes), test de de Fisher LSD, ( $p < 0.05$ ) para el estudio de los factores que afectan en el resultado Fv/Fm.

FACTORES	GL	F	P
TIEMPO	2	2.308	0.142
IRRADIACIÓN	1	3.261	0.096
NUTRIENTES	1	63.505	<0.001
TIEMPO x IRRADIACIÓN	2	1.070	0.374
TIEMPO x NUTRIENTES	2	3.197	0.077
IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	1	10.304	0.007
TIEMPO x IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	2	1.269	0.316

También se aprecia una variación significativa del rendimiento cuántico óptimo a lo largo de cada uno de los muestreos en función de los días, salvo en el caso del tratamiento en exterior (PAR) con agua de mar, en el que se observa una disminución significativa a los 42 días. En cambio respecto al factor, irradiación (PAR, PAR+UV), no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ , test de Fisher LSD)(Tabla 3.7).

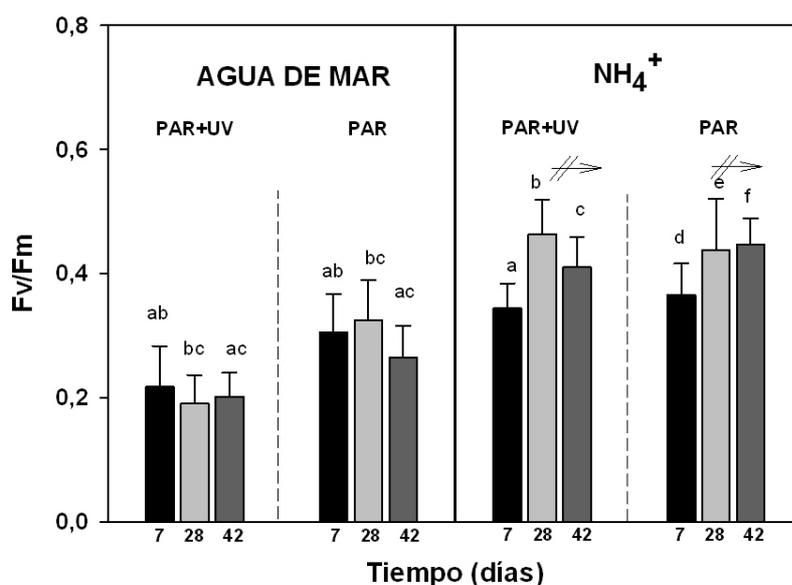


Figura 3.12. Rendimiento cuántico óptimo (Fv/Fm) de *Halophytis incurva* cultivada bajo diferentes condiciones (medias  $\pm$  desv, n=3). Donde ■ corresponde a muestras cosechadas a los 7 días de cultivo, □ corresponde a muestras cosechadas a los 28 días de cultivo y ▒ corresponde a muestras cosechadas a los 42 días de cultivo. En el caso del tratamiento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a los 28 días las algas a los 28 días las algas fueron transferidas a agua de mar (↗). Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Fisher, LSD).

La concentración de ficobiliproteínas no experimentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) cuando las algas son cultivadas con aporte de efluentes, aunque se observó una disminución de dicha concentración en la quinta semana de experimento y coincidiendo ésta con el cese de los aportes de  $\text{NH}_4^+$  con los efluentes (Figura 3.13.). Se observaron diferencias cuando el medio no fue enriquecido con  $\text{NH}_4^+$  en condiciones de baja irradiación (PAR) al igual que se detectaron dichas diferencias entre los tratamientos en iguales condiciones de nutrientes pero no fueron significativas ( $p < 0.05$ , test de Fisher LSD).

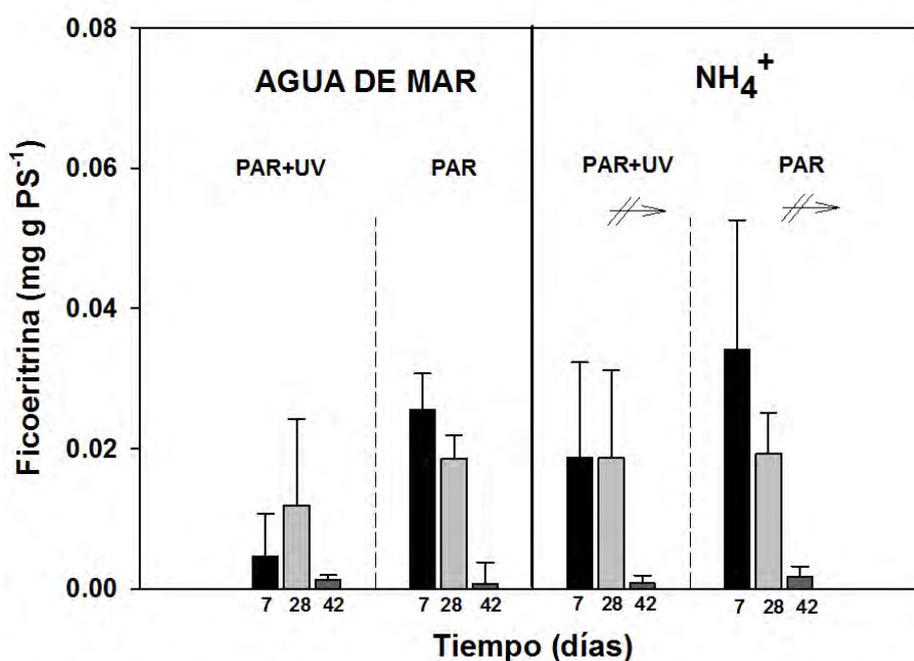


Figura 3.13. Contenido en ficoeritrina ( $\text{mg g PS}^{-1}$ ) de *Halophity sincurva* cultivada bajo diferentes condiciones (medias  $\pm$  desv,  $n=3$ ). Donde  corresponde a muestras cosechadas a los 7 días de cultivo,  corresponde a muestras cosechadas a los 28 días de cultivo y  corresponde a muestras cosechadas a los 42 días de cultivo. En el caso del tratamiento de  $\text{NH}_4^+$  a los 28 días las algas fueron transferidas a agua de mar ( $\# \Rightarrow$ ).

Tras 42 días de experimento, el contenido en N ( $\text{mg N gPS}^{-1}$ ) se mantuvo entorno al 27-31%. El contenido en C más bajo fue observado en condiciones interiores (PAR) tras 28 días en cultivo  $253.8 \pm 14.0$  ( $\text{mg C gPS}^{-1}$ ) mientras que los valores más altos, entorno a  $310.4 \pm 14.8$  ( $\text{mg C gPS}^{-1}$ ) fueron observados también a los 28 días pero en condiciones exteriores (PAR+UV).

La relación C/N no se ven afectados significativamente por la disponibilidad de N, el tiempo y la irradiación ( PAR, PAR+UV) respecto a las algas en agua de mar (sin nutrientes) en iguales condiciones de tiempo e irradiación. El análisis estadístico reveló una falta de interacción significativa entre los tres factores ( $p < 0.05$ , test de Fisher LSD). Aunque se observan oscilaciones entre los valores de *H. incurva* con aporte de N-amonio, respecto a las algas cultivadas en agua de mar sin aporte de nutrientes en condiciones de exterior (PAR+UV) aunque no fue significativa (Tabla 3.8.).

Tabla 3.8. Relación C/N, contenido de C ( $\text{mg g PS}^{-1}$ ) y N ( $\text{mg g PS}^{-1}$ ) obtenidos en *H. incurva* cultivada bajo diferentes condiciones de irradiación y aporte de nutrientes (medias  $\pm$  desv, n=3).

Día	Irradiación	Nutrientes	C:N	mg C $\text{gPS}^{-1}$	mg N $\text{gPS}^{-1}$
7	PAR	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ , $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$	$10.63 \pm 1.69$	$283.6 \pm 20.7$	$27.3 \pm 3.2$
		sn	$12.24 \pm 0.8$	$334.0 \pm 16.1$	$27.4 \pm 2.0$
	PAR+UV	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ , $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$	$9.29 \pm 0.6$	$294.3 \pm 12.2$	$32.1 \pm 2.5$
		sn	$10.84 \pm 0.7$	$303.4 \pm 15.1$	$29.0 \pm 2.2$
28	PAR	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ , $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$	$11.89 \pm 5.6$	$255.7 \pm 19.5$	$31.6 \pm 3.3$
		sn	$19.04 \pm 6.24$	$253.8 \pm 14.0$	$13.6 \pm 2.1$
	PAR+UV	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ , $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$	$9.42 \pm 0.22$	$279.4 \pm 26.1$	$26.5 \pm 2.7$
		sn	$16.07 \pm 0.23$	$310.4 \pm 14.8$	$19.6 \pm 2.1$
42	PAR	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ , $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$	$15.25 \pm 6.25$	$271.2 \pm 4.9$	$23.3 \pm 6.7$
		sn	$10.9 \pm 0.7$	$309.0 \pm 15.3$	$29.6 \pm 2.0$
	PAR+UV	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ , $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$	$8.23 \pm 0.61$	$289.9 \pm 28.9$	$35.5 \pm 1.3$
		sn	$12.44 \pm 0.3$	$286.8 \pm 15.7$	$24.1 \pm 2.2$

### 1.3.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los resultados de la actividad antioxidante de los extractos de *Halopithys incurva* preparados a partir de la biomasa producida en los diferentes ensayos de cultivo y determinada por los métodos DPPH, ABTS y oxidación del beta-caroteno se presentan en las tablas 3.9, 3.10 y la figura 3.14. Mediante el ensayo DPPH, la evaluación de la actividad antioxidante de todas las muestras de *H. incurva* fue positiva (Tabla 3.9.). Observando que los valores de % de barrido de radical libre de las muestras estudiadas oscilaron entre un máximo de 95.43% y un mínimo de 73.03%, siendo en algunos caso similar al mostrado por el control positivo, propil galato 91.69 %. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las algas que fueron cultivadas con aporte de pulsos de N-amonio y procedentes del sistema en cascada respecto a las co cultivadas a excepción de las algas que recibieron radiación PAR y aporte de N-amonio. Esta misma diferencia se observó en la capacidad atrapadora exhibida por el control positivo, propil galato pero menor en todos los extractos que la detectada con el control positivo ácido ascórbico. La concentración EC50 del extracto de *H. incurva* necesario para reducir el 50% de la estabilidad de los radicales libres DPPH fue de aproximadamente 97.5 y 94 veces mayor que la requerida para el ácido ascórbico y propil galato, respectivamente. El extracto hidroalcohólico de *H.incurva* que presentó el menor valor de EC50 fue ( $2.42 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ), aunque en general fue similar en todos los extractos, no encontrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el resto de los extractos a excepción de *H.incurva* cultivada bajo radiación PAR y agua de mar.

Tabla 3.9. Actividad antioxidante, determinada *in vitro* por el método DPPH, de los extractos de *Halopithys incurva* obtenidos de la biomasa producida en los tres experimentos de cultivo descritos. Los resultados están expresados como % de barrido de radicales libres y EC50 ( $\text{mg ml}^{-1}$ ). Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Tukey B).

Experimento	Irradiación	Nutrientes	% Barrido de radicales libres	EC50 ( $\text{mg ml}^{-1}$ )
Pulsos N-amonio	PAR+UV	Agua de mar (sn)	$92.48 \pm 0.18$	$2.48 \pm 0.01$ <sup>bc</sup>
		$20 \mu\text{M d}^{-1}$	$92.43 \pm 0.20$	$2.48 \pm 0.00$ <sup>bc</sup>
		$60 \mu\text{M d}^{-1}$	$92.16 \pm 0.21$	$2.49 \pm 0.00$ <sup>bc</sup>
		$100 \mu\text{M d}^{-1}$	$91.69 \pm 0.14$	$2.50 \pm 0.00$ <sup>bc</sup>
Cascada	PAR+UV	$\text{NH}_4^+$	$90.36 \pm 0.35$	$2.50 \pm 0.04$ <sup>b</sup>
Co-cultivo	PAR	Agua de mar (sn)	$73.03 \pm 0.23$	$3.13 \pm 0.03$ <sup>d</sup>
		$\text{NH}_4^+$	$95.43 \pm 0.10$	$2.42 \pm 0.01$ <sup>c</sup>

PAR+UV	Agua de mar (sn)	87.13 ± 0.03	2.65 ± 0.02 <sup>b</sup>
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	89.93 ± 0.31	2.58 ± 0.02 <sup>b</sup>
Antioxidantes comerciales	Ácido ascórbico	96.44 ± 0.14	0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>
	Propil galato	90.69 ± 0.20	0.15 ± 0.19 <sup>a</sup>

Los resultados de inhibición mediante el ensayo ABTS en muestras del ensayo de co cultivo mostraron un comportamiento similar a los detectados mediante el ensayo DPPH, aunque el % de inhibición fue muy inferior. Cuando los resultados se expresan en VCEAC (equivalente de ácido ascórbico) y VPEAC (equivalente de pirogalol) el mejor resultado corresponde en ambos casos a las algas que reciben irradiación PAR y aporte de N-amonio 4.86 ± 0.71 y 19.60 ± 3.06, respectivamente. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los tratamientos (p<0.05).

Tabla 3.10. Actividad antioxidante, determinada *in vitro* mediante el ensayo ABTS, de los extractos de *Halopithys incurva* obtenidos de la biomasa producida en el experimento de co-cultivo. Los resultados están expresados como % de inhibición, VCEAC (equivalentes de ácido ascórbico en mg g de PS) y PCEAC (equivalentes de pirogalol mg g de PS). Las letras indican las diferencias significativas (p<0.05, ANOVA, test de Tukey B).

Condiciones de cultivo		Ensayo ABTS		
Irradiación	Nutrientes	(% Inhibición)	VCEAC	PCEAC
PAR	Agua de mar (sn)	33.31	2.17 ± 0.55 <sup>a</sup>	12.53 ± 0.93 <sup>a</sup>
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	48.60	4.86 ± 0.71 <sup>c</sup>	19.60 ± 3.06 <sup>b</sup>
PAR+UV	Agua de mar (sn)	35.96	3.60 ± 0.29 <sup>b</sup>	13.11 ± 1.08 <sup>a</sup>
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	36.25	3.63 ± 0.47 <sup>b</sup>	12.59 ± 0.58 <sup>a</sup>

La actividad antioxidante de peroxidación lipídica a través del método de decoloración del betacaroteno (Fig. 3.14.) de los extractos de *H.incurva* fue negativa, no mostrando inhibición frente a los resultados obtenidos mediante el control positivo vitamina E a diferentes concentraciones.

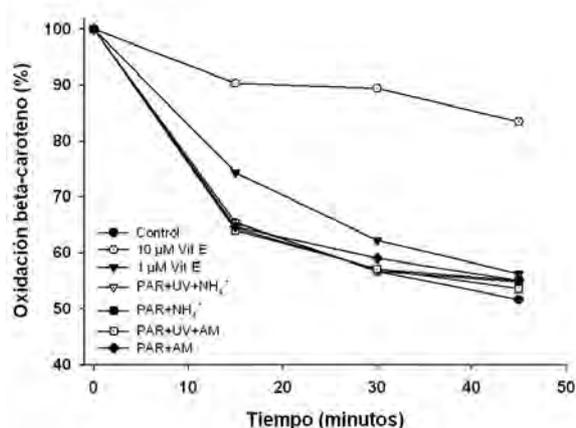


Figura 3.14. Decoloración oxidativa del beta-caroteno tras la adición de los extractos de *Halopithys incurva* obtenidos de la biomasa producida en el experimento de co-cultivo. Como control positivo se utilizó vitamina E a diferentes concentraciones (10 µM y 1 µM).

El radical superóxido fue formado en el sistema PMS/NADH-NBT, la disminución de la absorbancia 560 nm provocada por el antioxidante, lo que implicó el consumo del radical superóxido. En este ensayo, el efecto de los extractos crudos de *Halopithys incurva* sobre el anión superóxido no mostraron capacidad para disminuir los radicales superóxido, mostrando el efecto contrario.

### 3.4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los capítulos 1 y 2 motivaron la selección de la especie de alga roja *Halopithys incurva* para un estudio más profundo sobre su cultivo en tanques así como de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos en la biomasa producida bajo estas condiciones controladas. Por un lado, se compararon diferentes posibilidades en cuanto al aporte de N-amonio proveniente de los efluentes de los tanques de cultivo de dorada, bajo dos condiciones de irradiación: tanques bajo cubierta de plástico en un invernadero (80%PAR+10%UVA) y tanques al exterior bajo radiación solar sin filtra (PAR+UVR=PAR+UVA+UVB) empleando diferentes modelos de tanques de distintas formas, transparencia, volumen y relación S:V. Por otro lado se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de *Halopithys incurva* empleando diferentes métodos *in vitro*, con el fin de completar el conocimiento de su potencial como fuente de antioxidantes.

*Rendimiento de biomasa y producción*

La disponibilidad de nutrientes es uno de los principales factores que regula la el rendimiento de la biomasa, ya que limita su tasa de crecimiento y producción (Topinka y Robins, 1976; DeBoer y Ryther, 1977). En algunos casos puede controlar el contenido bioquímico, la reproducción, el desarrollo, la morfología y la distribución (DeBoer,1981; Lobban y Harrison, 1994). La producción y tasas de crecimiento aumentaron por el aporte de  $\text{N-NH}_4^+$  ya sea como  $\text{NH}_4\text{Cl}$  aplicado a modo de pulsos ( $9.08 \pm 1.90 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  y  $3.30 \pm 0.60 \% \text{ d}^{-1}$  respectivamente) o procedente de efluentes de peces en el que se alcanzaron producciones mayores que aplicando pulsos de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  tanto en el primer biofiltro ( $11.20\text{-}18.02 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) como en el segundo ( $10.4\text{-}21.2 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ). Hay que tener en cuenta que en estos experimentos no solo era diferente el tipo de fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  versus  $\text{NH}_4^+$  contenido en los efluentes) si no que además los experimentos se hacen en periodos del año diferentes (Febrero-Abril en el caso del experimento de pulsos versus octubre-diciembre en el caso de las cascada con efluentes de peces). Además la densidad de algas fueron diferentes  $5\text{g/l}$  en el diseño de pulsos y  $7\text{g/l}$  en el de cascada. Los tanques en el caso del experimento de pulsos eran SCT ( $750 \text{ l}$ ,  $\text{S:V}=2.4 \text{ m}^{-1}$ ) y en el experimento de cascada en el primer biofiltro CPT ( $1.500 \text{ l}$  y  $\text{S:V}=1 \text{ m}^{-1}$ ) y el segundo filtro era con tanques SCT. En el tercer experimento con tanques SCT de  $90 \text{ l}$   $\text{S:V}=2.2 \text{ m}^{-1}$  realizado de septiembre a noviembre y con amonio procedente de efluentes de peces se alcanzaron valores de producción aún mayores ( $34.3\text{-}54.5 \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ ) aunque hay que precisar que esta experiencia se hizo en cocultivo *Jania adhaerens* y densidad de algas inicial de  $13.3 \text{ g/l}$  de ambas especies. Así la cifra incluye el crecimiento de la otra especie del cocultivo, *Jania adhaerens*, aunque *Halopithys incurva* representaba la parte mayoritaria. Con el diseño empleado no se puede discriminar la variable de mayor influencia sobre el crecimiento: volumen de tanques, relación S:V de los tanques, densidad de algas, periodo del año y nieles de nitrógeno pero si se pueden observar tendencias. En primer lugar parece que a concentraciones de amonio similares entre el experimento de pulsos con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y amonio de efluentes ( $60\text{-}100 \text{ mM}$ ) la producción fue prácticamente el doble en el caso de cultivo en cascada con efluentes, así los efluentes parece que aportan otros elementos que influyen en el crecimiento, tal y como se demostró en el experimento 3 (concentración media,  $82.14 \pm 42.97 \text{ }\mu\text{M}$ , de N-amonio con mínimos de  $24.53 \text{ }\mu\text{M}$  y máximos de  $165.68 \text{ }\mu\text{M}$ ) y P-fosfato (concentración media,  $23.66 \pm 11.47 \text{ }\mu\text{M}$ , con mínimos de  $12.72 \text{ }\mu\text{M}$  y máximos de  $49.62 \text{ }\mu\text{M}$ ) proveniente de los efluentes de los tanques de peces),

excluyendo las diferencias de dosis de radiación, ya que fueron similares aunque en el ensayo aplicando pulsos fue en aumento (meses de Febrero-Abril) y en el ensayo en cascada disminuyendo (meses de Octubre a Diciembre). Con valores mínimos de  $4500 \text{ KJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  y máximos de  $8500 \text{ KJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ .

La producción puede también haber aumentado por haber iniciado el cultivo en el caso del experimento en cascada con una densidad mayor (7g/l) frente a 5g/l del experimento de pulsos, hay que señalar que las máximas producciones se alcanzan en el experimento de cocultivo con densidades iniciales de 13.3 g/l realizado en periodo del año similar (septiembre-noviembre) que el del experimento de cascada (octubre-diciembre) y en este caso el efecto del N se excluye ya que ambos tenían efluentes de peces. Por otro el efecto tanque sobre la tasa de producción se puede excluir basándonos en el experimento de cascada donde no se encontraron diferencias en la producción entre el primer biofiltro en tanques CPT (1.500 L, S:V=1  $\text{m}^{-1}$ ) y tanques SCT (750 L, S:V, 2.4  $\text{m}^{-1}$ ). Se puede concluir que *H.incurva* puede cultivarse en tanques con agua de mar con efluentes de peces y moviéndose libre en el tanque mediante agitación con aire. Las tasas de crecimiento en todo caso son menores que otras especies empleados en biofiltración de efluentes como especies del género *Ulva* y *Gracilaria* (Chen y Neori, 1991; Jiménez del Río et al., 1996, Mata y Santos, 2003; Figueroa et al., 2009, 2010) pero está dentro de los valores medios de producción de algas crecidas en efluentes tanto a baja como a alta irradiancia. En las especies rojas *Gracilaria cornea*, *Hypnea spinella* se obtuvieron valores de producción entorno a 29.3 y 43.5  $\text{gPSm}^{-2}\text{d}^{-1}$  respectivamente, en condiciones de baja irradiancia. En estas mismas condiciones, la especie *Ulva rigida* alcanzó producciones de 37.7  $\text{g PSm}^{-2}\text{d}^{-1}$  (Datos Proyecto Depusial y Bifaro).

El cultivo en cascada de *Halopithys incurva* en relación a los valores de producción, tasa de crecimiento demostró que el flujo de agua procedente del primer nivel de la cascada (nivel 1) no produjo ningún tipo de limitación en cuanto a nutrientes, para el crecimiento de los cultivos del nivel 2 (Tabla 3.3.). La mayor tasa de crecimiento obtenida en este nivel (3.3 %  $\text{d}^{-1}$ ), fue probablemente resultado de una mayor eficiencia en la utilización de la luz condicionada por el diseño del tanque de cultivo. Los tanques semicirculares (SCT) empleados para el cultivo en el 2º nivel tienen una mayor relación superficie volumen que los circulares (CPT), y la mitad de profundidad que éstos. Estas características del tanque permiten que las algas reciban más cantidad de luz por unidad de tiempo. En condiciones de nutrientes no limitantes, como en este caso, el mayor aprovechamiento de la luz

aumenta la tasa fotosintética y se traduce en un aumento del crecimiento. La agitación por burbujeo desde el fondo obliga a las algas a subir a la superficie donde quedan expuestas a la luz a modo de pulso, y bajar de nuevo al fondo del tanque quedando en oscuridad por unos segundos antes de ser de nuevo impulsadas a la superficie. Aunque para densidades de cultivo moderadas, esta exposición intermitente a la luz permite una fotosíntesis más eficiente que la exposición a luz continua (Bidwell et al., 1985), la profundidad del tanque junto con la densidad de cultivo, son factores críticos para una dinámica correcta del cultivo en tanque. La mayor profundidad de los tanques CPT implica una mayor duración del periodo de oscuridad durante el movimiento de las algas, reduciendo la frecuencia de los periodos de exposición a la luz. Por otro lado hay que tener en cuenta que a la densidad de cultivo ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ) elegida para el ensayo, en los tanques SCT hay menos de la mitad de biomasa que en los CPT. Al tener ambos modelos prácticamente la misma superficie, la densidad de cultivo expresada en  $\text{kg m}^{-2}$  (superficie útil para la captación de luz), también es menos de la mitad en el modelo SCT ( $2.9 \text{ kg m}^{-2}$ ) que en los CPT ( $7 \text{ kg m}^{-2}$ ). El hecho de tener una mayor densidad junto con una mayor profundidad del tanque reduce la cantidad de luz que llega a zonas inferiores de la columna de agua, lo cual provoca una menor tasa de crecimiento para las algas cultivadas en el nivel 1 entre  $0.6$  y  $1.25 \text{ \% d}^{-1}$ . Sin embargo, aunque la tasa de crecimiento de plantas individuales sea menor, la mayor densidad de inóculo por unidad de superficie de la que parten los cultivos permite que las producciones no desciendan. Una ventaja a tener en cuenta en estas condiciones es que la mayor densidad de cultivo y mayor sombreado reducen notablemente el crecimiento de epífitos (*Ulva rígida*) en relación con el modelo SCT.

El principal efecto del aumento de la tasa de renovación de agua es el incremento en la disponibilidad de amonio suministrado por unidad de tiempo, variando de  $6.4 \text{ g N h}^{-1}$  a una tasa de renovación de  $8 \text{ vol d}^{-1}$  a  $3.2 \text{ g N h}^{-1}$  a  $4 \text{ vol d}^{-1}$ . Si comparamos la producción de *Halopithys incurva* cultivada en tanques CPT frente a la producción en los SCT, la diferencia no es tan notoria, alcanzando un máximo de  $18.0 \text{ gPSm}^{-2}\text{d}^{-1}$  y teniendo en cuenta que el aporte de N-amonio es el mismo, por el efecto volumen de cada modelo de tanque, se puede deducir que la morfología de la especie también juega un papel importante. Las tasas de crecimiento son mayores para los cultivos en tanques SCT. Estas diferencias reflejan que la mayor relación superficie/volumen de este modelo de tanque

permiten a las algas un aprovechamiento más efectivo de la luz y por tanto un incremento del crecimiento diario.

El co-cultivo de *Halopithys incurva* y *Jania adhaerens* (experimento 3) en el sistema de biofiltración bajo las condiciones ensayadas, irradiación y aporte de nutrientes, confirmó la capacidad de adaptación y respuesta de ambas especies al crecimiento conjunto sin competencia. Los mejores resultados de producción se obtuvieron en condiciones de alta irradiación (PAR+UVR) con y sin aporte de nutrientes, obteniéndose en estas últimas condiciones, valores de producción cercanos a  $54.5 \pm 22.2$  g PS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>. La producción en condiciones de baja irradiación fue significativamente inferior, resultado que corrobora la importancia que juega la luz en el cultivo de macroalgas, señalado con anterioridad (Lobban y Harrison, 1997; Lüning, 1990) junto con la temperatura. Aunque en nuestros experimentos, este último parámetro (temperatura) no es determinante debido a sus estrechas variaciones, de 19 a 24 °C, uno de los primeros trabajos al respecto, mostró una relación positiva entre la tasa de crecimiento y la temperatura en cultivo en tanques de *Gracilaria tenuistipitata* (Haglund y Pedersen, 1993). La capacidad de *H.incurva* para sostener el crecimiento quedó reflejada en la tasa de crecimiento experimentada a lo largo de las 6 semanas de duración del ensayo. Una vez más, las mayores tasas de crecimiento se relacionan de forma directa con la cantidad de luz (PAR+UVR) que reciben los cultivos. *H.incurva* presentó tasas de crecimiento 3.6 % d<sup>-1</sup> (con aporte de nutrientes) y 3.2 % d<sup>-1</sup> (sin aporte de nutrientes).

En el experimento 3 (cocultivo) realizado de septiembre a noviembre se puede conocer el efecto de la dosis de radiación y de la radiación UV ya que se cultivaron algas bajo plástico dentro de un invernadero (80% transmisión de PAR, 10% de UVA y 0% de UVB) y en el exterior sin filtrar la radiación solar (100% de transmisión de PAR+UVA+UVB). La producción o rendimiento de biomasa así como las tasas de crecimiento fueron mayor en el exterior que dentro del invernadero (Tabla 3.5). Así no se ha producido ningún negativo de la radiación UV sobre el crecimiento. No es de extrañar ya que por un lado el experimento se hizo en un periodo del año con decrecimiento de las dosis de radiación UV (Figura 3.7.) y la densidad de algas en el tanque es alta (13.3 g/l) por lo que el efecto de autosombreado sobre la atenuación de la radiación UV se espera que sea elevada. La radiación UV desaparece en la primera capa (10 cm) de acuerdo a medidas realizadas en tanques similares (Figuroa et al., 2006) aunque con otras especies (*Gracilaria cornea* y *Falkenbergia rufolanosa* (tetraesporofito de *Asparagopsis armata*)

Así el crecimiento de *H.incurva* en el periodo de septiembre a noviembre fue mayor en algas expuestas a toda la radiación. La disminución de la dosis de radiación PAR probablemente sea la responsable de la citada de la producción en algas crecidas dentro del invernadero ya que la radiación UV apenas penetra en la columna de agua por la elevada densidad de algas. Aguirre von Wobesser et al. (2000) y Cabello Pasini et al. (2000) encontraron que la radiación UV reduce la producción fotosintética en *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyte), *Chondrus crispus* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) crecidas en tanques pero a densidades mucho más bajas de las empleadas en este estudio ( $< 1\text{g/l}$  frente  $5\text{-}13\text{ g/l}$ ) y en tanques con un relación S:V también mucho más alta ( $8\text{ m}^{-1}$  frente a  $1\text{-}2.4\text{ m}^{-1}$ ), de esta manera el efecto de autosombreado es mucho menor y la radiación UV incide mas sobre la biomasa de algas y alcanza profundidades mayores en el tanque.

En algas crecidas con aporte de amonio procedente de efluentes de peces no hay diferencias en el rendimiento máximo en algas crecidas dentro o fuera del invernadero. Sin embargo la radiación UV si que disminuye la producción en algas crecidas en agua de mar (sin enriquecimiento de nitrógeno). Este resultado coincide con lo observado con otras especies (Figueroa et al., 2008, 2009, 2010). Según los datos publicados por Figueroa et al. (2006), cabría esperar que la radiación UV afectara negativamente no solo al rendimiento fotosintético sino también a la acumulación de sustancias nitrogenadas. No obstante, lo resultados del presente estudio muestran lo contrario: el rendimiento fotosintético es significativamente superior en las algas que son sometidas a radiación PAR+UV que en aquéllas que sólo reciben PAR. La fluorescencia de clorofila demostró ser una herramienta poderosa para detectar situaciones de estrés en cultivos integrados de algas marinas con efluentes (Figueroa et al. 2006). En particular, el rendimiento cuántico óptimo de las algas puede ser supervisado como una alerta temprana del estrés fisiológico de los cultivos. Se ha propuesto que el nitrógeno se moviliza hacia sustancias fotoprotectoras con actividad antioxidante como los aminoácidos tipo micopsorina (Korbee et al., 2004, Huovinen et al., 2006).

### *Biofiltración: NUE y NUR*

Las mayores eficiencias de eliminación de amonio (NUE) se obtuvieron en el primer nivel del sistema en cascada siendo este valor de 45.9 %. Esto se explica porque al ser menor la tasa de renovación en este tanque, aumenta el tiempo de

residencia del agua, lo que facilita el consumo de un mayor % de  $\text{NH}_4^+$ . Por el contrario la NUE se reduce en el 2º nivel del BF. Los cultivos de este nivel reciben una menor concentración de amonio, y en principio un flujo de agua limitado en nutrientes de forma general (principalmente nitrógeno y fósforo) al proceder del 1º nivel del BF, sin embargo la mayor tasa de renovación de agua aumenta la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de las algas. Es un hecho ampliamente demostrado que el aumento de la tasa de renovación produce el aumento del crecimiento de las algas (Lapointe y Ryther, 1978; Friedlander y Ben-Amotz, 1991). Los resultados obtenidos para las tasas de consumo de  $\text{NH}_4^+$  (NUR) muestran un patrón contrario, obteniéndose mayores valores para los cultivos de 2º nivel del sistema. La relación inversa que existe entre la NUE y la tasa de renovación así como la directa entre la NUR y la tasas de renovación han sido descritas anteriormente en sistemas de cultivo de macroalgas (Jiménez del Río, et al., 1994; Muñoz y Varas, 1998; Buschmann et al., 2001; Hernández et al., 2002 Schuenhoff et al., 2006).

Los resultados del experimento 3 (cocultivo) muestran que *H.incurva* puede actuar como un eficiente biofiltrador de los efluentes procedentes del cultivo intensivo de dorada, con valores de NUE del 100 % a los flujos de  $\text{NH}_4^+$  ensayados ( $4.5 \pm 2.6 \text{ mmol h}^{-1}$ ). Al igual que con otras especies de algas rojas ensayadas durante el proyecto Bifaro, como *Gracilaria (Hydropuntia) cornea* (Figuroa et al., enviado) o *Hypnea spinella*, se han mostrado eficiencias de biofiltración de hasta el 90 % (Gil Jérez, 2010) similares a las obtenidas en sistemas integrados combinados de animales y macroalgas (Chow et al., 2001).

Se ha observado que la tasa de eliminación es máxima cuando las algas son cultivadas bajo alta irradiación (PAR+UVR) consiguiéndose la retirada de  $0.44 \pm 0.03 \text{ g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  de los  $2 \text{ g N h}^{-1}$  que pasan diariamente por el sistema de biofiltración (Tabla 3.6.). Esta tasa de asimilación de N es superior a la capacidad de biofiltración que mostró *Gracilaria cornea*  $0.34 \pm 0.04 \text{ g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  dentro de los mismos experimentos y a la lograda con el cultivo de *Gracilaria bursa pastoris*  $0.14 \text{ g N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  (Matos et al., 2006).

#### C:N y compuestos internos

El aporte de pulsos de  $\text{NH}_4^+$  (experimento) incrementó el contenido interno de N afectando a las relaciones C:N que mostraron una disminución al igual que los valores en el contenido interno de N. La disminución de C:N se debió al

incremento del contenido en N ya que el contenido C no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos de N a excepción de las algas que recibieron pulsos de  $\text{NH}_4^+$  de 60  $\mu\text{M}$ . Se deduce que en los tanques de cultivo siempre tienen carbono disponible, mientras el N está sujeto al aporte externo. Un incremento en 5 veces de la concentración de amonio (de 20 a 100  $\mu\text{M}$ ) incrementó 2 veces en el contenido interno de nitrógeno indicando una movilización importante del nitrógeno disponible en la biomasa. En el experimento 3 (cocultivo) se observa especialmente a las 4 semanas de cultivo que las algas crecidas en efluentes presentan un contenido interno de N mayor que las algas crecidas en agua de mar. No se observa efecto de la radiación UV sobre el contenido interno de nitrógeno a los 28 d de cultivo pero en cultivos en agua de mar (control) el contenido en N interno fue ligeramente mayor en presencia de radiación UV. La transferencia de las algas crecidas en efluentes a agua de mar (día 28 a día 42) produjo caída en el nitrógeno interno solo en las algas crecidas dentro del invernadero sin radiación UV. En cambio en algas crecidas en el exterior, la transferencia a agua de mar produjo al contrario de lo esperado un incremento del N interno pero lo mismo ocurre del día 28 al 42 en algas crecidas de forma continuada en agua de mar tanto dentro como fuera. Estos datos parecen indicar que ha habido en este tiempo en los tanques alguna entrada de nitrógeno no controlada responsable del aumento del N interno.

Este N se moviliza hacia estructuras celulares que demanda el crecimiento pero también se acumula en compuestos nitrogenados como es el caso de biliproteínas (Fig. 3.12). La concentración de ficoeritrina es más alta en algas crecidas en efluentes especialmente en algas crecidas dentro del invernadero. En algas crecidas al exterior, el nitrógeno de los efluentes no se movilizó tanto hacia la ficoeritrina o la radiación UV produjo un efecto negativo sobre la acumulación de ficoeritrina como han descrito otros autores en algas crecidas en el medio natural (Figuerola et al., 1997; Flores-Moya et al., 1998) o en el laboratorio con el uso de lámparas artificiales (Aguilera et al., 1999).

La concentración de ficobiliproteínas también es mayor en las algas cultivadas en presencia de UV, puede ser indicativo de que esta radiación estimula la movilización del N disponible en el medio hacia la síntesis de compuestos nitrogenados con capacidad fotoprotectora (MAAs) y pigmentos (ficobiliproteínas y clorofilas). La acumulación de MAAs puede ser inducida por la radiación UV o la luz azul de forma directa, no viéndose ésta afectada por la luz roja ni verde (Franklin et al., 2001; Korbee et al., 2005). Esto sugiere la existencia de fotorreceptores

específicos asociados a la síntesis de MAAs (Shick y Dunlap, 2002). Se ha observado que la luz azul estimula el metabolismo del N mediante la acumulación de clorofilas y ficobiliproteínas (López-Figueroa y Niell, 1991) y la luz roja el metabolismo del C y el crecimiento (Figueroa et al., 1995). Además, la acumulación de compuestos nitrogenados bajo luz azul está relacionada con la estimulación de la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  (Figueroa, 1996). Por ello, no se descarta la existencia de una estimulación indirecta de la radiación UV sobre la acumulación de MAAs a través de fotorreceptores asociados a mecanismos de incorporación de N. De esta forma, al producirse una mayor síntesis de MAAs en presencia de  $\text{NH}_4^+$  en el medio, las algas cultivadas en estas condiciones tienen una mayor capacidad de fotoprotgerse ante esta radiación y esto les permite aumentar el rendimiento fotosintético. Los cultivos de *H. incurva* sin aporte de nutrientes muestran un rendimiento fotosintético (Fv/Fm) inferior. No obstante, se han descrito resultados en los que la exposición a radiación UV o PAR no supone la inducción de la acumulación de MAAs (Gröniger et al., 1999) u otros en los que los MAAs no proveen de una protección completa frente a los efectos del UV (García-Pichel et al. 1993, Neale et al. 1998, Franklin et al. 1999, Yakovleva y Titlyanov 2001). Por otra parte, las algas cultivadas en los efluentes de piscifactoría poseen un mayor rendimiento fotosintético que las cultivadas en agua de mar, siendo éste mayor tanto en los casos de exposición a PAR+UV como en los de exposición sólo a PAR. Esta relación entre el aporte de  $\text{NH}_4^+$  y el rendimiento fotosintético ya ha sido previamente estudiada por Korbee et al. (2005, 2006) en distintas especies de *Porphyra* observándose una menor caída del rendimiento fotosintético en las algas cultivadas con alta concentración de  $\text{NH}_4^+$ .

La relación C :N es ampliamente utilizado para evaluar la fisiológica estado de las macroalgas (Atkinson y Snlith 1983, Hanisak 1990, Duarte 1992, Vergara et al. 1993). Los contenidos en N interno en el experimento 1 (pulsos de amonio) oscilaron de 1.58-3.2% y en el experimento de cocultivo con amonio suministrado con efluentes de peces 2.3-3.1% en algas crecidas dentro del invernadero y de 2.6-3.5% en algas cecidas en el exterior sin filtrar la radiación solar. Estos valores se encuentra en los valores más altos encontrados entre macroalgas del medio natural (3.2-4.2%) y próximos a los observados en algas crecidas en efluentes de piscifactorías por Figueroa et al. (2009) en *Ulva lactuca* (2.5-4.1%) y por Figueroa et al. (2010) *Gracilaria conferta* (4.5-5.5%). Como los niveles de C no varía tanto en experimento1 (pulsos) como en el experimento 3 (co-cultivo), las variaciones en C:N son debidas a los cambios en el contenido en N interno. Los valores de C:N en

algas crecidas en medios ricos en amonio rinden valores de C:N que oscilan de 9 a 18 en el experimento 1 y de 9 a 12 en el experimento 3 , lo que corresponde de acuerdo al estudio de Duarte (1992) a macroalgas con un buen estado nutritivo y por tanto con reservas para poder emplear este nitrógeno en situaciones de deficiencia de nitrógeno. En el caso del crecimiento en tanques con aporte continuado de nitrógeno, el alga no necesita utilizar las reservas ya que la disponibilidad es siempre alta pero puede ser muy útil si se quiere mantener la tasa de crecimiento o no reducir demasiado cuando se corta la fuente de nitrógeno con el fin de obtener productos del metabolismo del C (polisacáridos) o lipídico (Lobban et al., 1985). Las algas con altos niveles de N interno gracias al cultivo en efluentes de piscifactorías son unas excelentes candidatas para el repoblamiento de zonas degradadas (restauración ambiental) o para la biofiltración del exceso de nutrientes en las jaulas flotantes con peces en áreas costeras. Estas algas con alto contenido interno de N sufrirán menos el estrés de la transferencia al medio natural con más radiación fotosintética y UV que bajo las condiciones controladas de cultivo en tanques ya que entre los compuestos nitrogenados se encuentran fotoprotectores y sustancias antioxidantes (Figueroa et al., 2009,2010). El uso de las algas para la biofiltración y bioextracción del nitrógeno disuelto en el medio costero próximo a jaulas de peces (salmón) ha sido empleado ya con éxito en Chile con *Gracilaria chilensis* o en Canadá con *Laminaria saccharina* (Neori et al., 2004, 2007).

### *Actividad antioxidante*

Los resultados presentados en este estudio demuestran que *H. incurva* cultivada bajo diferentes condiciones de aporte de nutrientes e irradiación solar, posee actividad antioxidante frente a los radicales libres DPPH y ABTS•+. En cambio, sus extractos hidroalcohólicos no inhibe la oxidación del ácido linoleico ni presentan capacidad atrapadora del anión superóxido. Mostrando así un comportamiento diferente en los cuatro ensayos *in vitro*, probablemente debido a los diferentes mecanismos involucrados en los pasos del proceso de oxidación. La capacidad de los extractos de *H.incurva* para reducir el radical DPPH mediante la donación de un átomo de hidrógeno o electrones ha sido entre aproximadamente 2 y 22 veces más débil que el ácido ascórbico y el propil galato. La concentración EC50 (también llamado índice de oxidación) del extracto de *H. incurva* fue de aproximadamente 97.5 y 94 veces mayor que la requerida para el ácido ascórbico y propil galato, respectivamente. El valor más bajo( $2.42 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) correspondió

a la biomasa de *H.incurva* obtenida tras cuatro semanas en cultivo bajo radiación PAR y aporte de N-amonio. Los resultados de EC50 en algas rojas más relevantes han sido descritas en dos especies pertenecientes al Orden Ceramiales, *Brongniartella byssoides* ( $0.14 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y *Polysiphonia lanosa* ( $2.71 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y una especie perteneciente al orden Gigartinales, *Furcellaria fastigiata* ( $1.39 \pm 0.04 \text{ mg ml}^{-1}$ ) (Zubia et al., 2010). Se encontraron diferencias en el comportamiento de los compuestos antioxidantes en el ensayo DPPH y ABTS•+ siendo los porcentajes de inhibición inferiores en este último. Aunque en ambos métodos el extracto más activo fue el de *H.incurva* obtenida tras cuatro semanas en cultivo bajo radiación PAR y aporte de N-amonio (Ver tabla 3.9,3.10). Estas diferencias se han descrito que están relacionado con la estequiometría de la reacción del número de electrones disponibles para inactivar los radicales libres (Koleva et al., 2002). La reacción de compuestos antioxidante presentes en el extracto *H.incurva* utilizado en el presente estudio, puede que presente un mecanismo de reacción más complejos que implique una o más reacciones secundarias en la extinción del DPPH así como en el radical libre ABTS•+ (Koleva et al., 2002). En la literatura se encuentra ampliamente referenciada la necesidad de utilizar más de un método cuando se evalúa la capacidad antioxidante de extractos vegetales en profundidad, debido a que los antioxidantes pueden actuar por mecanismos diferentes dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria (Sacchetti et al., 2005). Los métodos DPPH y ABTS•+ son de los más aplicados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, al considerarse métodos de elevada sensibilidad, rápidos y muy estables (Arnao et al., 2000). Ambos ensayos reflejan la habilidad que posee un antioxidante de donar protones en un medio fisiológico pH 7.5 o en un medio metanólico. La desventaja más relevante entre ambos métodos es el tiempo de medida necesario para realizar las medidas de DPPH (60 minutos) en comparación con el método ABTS•+ (1 minuto).

El ensayo de DPPH ha sido utilizado por muchos investigadores para evaluar la libre actividad de los radicales del barrido de las moléculas antioxidantes y extractos de algas a pesar del hecho de que este cromógeno no solubiliza fácilmente; aunque, sí genera soluciones fuertemente coloreadas con metanol y etanol como disolventes (Blois, 1958; Matsukawa et al, 1997; Yan et al, 1999; Yan et al, 1998; Pellegrini et al , 1999) además es un método rápido, reproducible e independiente de la polaridad de las muestras. El ensayo del ABTS se basa en la inhibición por los antioxidantes del radical catiónico verde-azulado ABTS•+. Para el

desarrollo del método se suelen emplear dos estrategias: inhibición y decoloración. En la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS<sup>•+</sup> y lo que se determina es la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el ABTS<sup>•+</sup> se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de éste (Sánchez-Moreno, 2002). En nuestro trabajo hemos aplicado el método original descrito por Miller et al. (1993) que emplea metamioglobina y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para generar ferrilmioglobina, la cual reacciona con el ABTS para generar el radical ABTS<sup>•+</sup>. La muestra a analizar se añade antes de la formación del ABTS<sup>•+</sup> por lo que se trata de un ensayo de inhibición. Este orden de adición de los reactivos ha hecho que el método sea criticado, ya que posibles interferencias de los antioxidantes con el sistema de generación de radicales puede llevar a una estimación de los valores de actividad antioxidante por debajo de los reales (Prior et al., 2005). Este método espectrofotométrico es válido para el estudio de antioxidantes hidrofílicos, lipofílicos o sanguíneos, compuestos puros y extractos alimentarios (Sánchez-Moreno, 2002).

Los resultados obtenidos con el método decoloración de betacaroteno y secuestro del anión superóxido han sido negativos, poco reproducibles y en algunos casos incoherentes. El ensayo de peroxidación lipídica en el sistema micelar metil linoleato/ $\beta$ -caroteno es más complejo, porque mide tres propiedades antioxidantes de la muestra (Rosas et al., 1999). Dos de las propiedades se pueden explicar basados en el mecanismo general de la oxidación de ácidos grasos. En el mecanismo, el antioxidante puede atrapar radicales peroxilos en la etapa de propagación inhibiendo la continuación de la reacción en cadena. El antioxidante también puede tener la propiedad de inhibir la etapa de iniciación extinguiendo el oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), retardando así la oxidación del metil linoleato. La tercera propiedad antioxidante que mide el método en el sistema micelar metil linoleato/ $\beta$ -caroteno, está dirigida al carácter lipofílico-hidrofílico de la molécula a evaluar, de manera que la ubicación del compuesto en la micela podría permitir la interacción más frecuente con posibles especies radicalarias que se formen durante la oxidación del ácido graso. Un posible mecanismo para la decoloración del  $\beta$ -caroteno en el sistema emulsionado, se asume que es debido al ataque del radical peróxido proveniente del metil linoleato oxidado (Frankel, 1991). Los extractos hidroalcohólicos de *H. incurva* mostraron escasa capacidad antioxidante a nivel de inhibición de peroxidación lipídica (Figura 3.15.) presentando un comportamiento

similar al control la oxidación del betacaroteno se completó a los 15min de comenzar la reacción. En cambio en los resultados del control positivo, vitamina E (a concentraciones de  $1\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) se encontraron diferencias significativas, exhibiendo inhibición en la decoloración del betacaroteno. Para interpretar estos resultados en el Capítulo II, se ha detectado una correlación positiva entre la actividad antioxidante de *H. incurva* y el contenido en fenoles totales. Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos se ha demostrado que dependen de la solubilidad del compuesto (Frankel et al., 1993). Según Porter et al. (1997) los antioxidantes hidrofóbicos inhiben la oxidación de lípidos en la fase de emulsiones. En las emulsiones de lípidos, los fenoles son generalmente equilibrados en el agua, emulsionante (Tween 20). Es posible que los compuestos fenólicos presentes en los extractos de *H.incurva* no han logrado este equilibrio, mientras que la vitamina E han permanecido principalmente en la fase lipídica del sistema, lo que justifica la baja actividad antioxidante mostrada por estos extractos. Recientemente, De la Coba et al. (2009) presenta que extractos purificados que contienen distintas microsporinas (porphyra 334, shinorine, palythine y asterina 330) presentan actividad antioxidante a nivel de inhibición de la peroxidación lipídica siendo estos dos últimos los que ofrecen mejores resultados.

Por último, la capacidad de los extractos *H. incurva* de interactuar con el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) fue contrariamente a lo esperado prooxidante. Los ensayos para la medida de la capacidad desactivadora de  $\text{O}_2^-$ , se basan habitualmente en la inhibición de la reducción de un compuesto coloreado (normalmente una sal de tetrazolio, como el NBT) por el radical superóxido. En la medida en la que la concentración de compuestos antioxidantes en los medios de reacción aumenta, se produce una disminución de la cantidad de aceptor reducido y, por lo tanto, la reducción de color observada será menor. La cuantificación de estas variaciones de absorbancia a las longitudes de onda a las que absorben los cromóforos utilizados dará una indicación de la capacidad atrapadora de  $\text{O}_2^-$  de la muestra ensayada. Este radical, puede iniciar entre otros, procesos de oxidación de lípidos de forma indirecta a través de la formación de radicales hidroxilo en presencia de metales de transición contribuyendo al proceso patológico de muchas enfermedades. Mediante este método, trabajos previos han indicado una fuerte actividad en varias especies de algas pardas (Siriwardhana et al., 2003.; Kim et al., 2005; Kuda et al., 2005; Zubia et al., 2007). En este sentido, Robak y Gryglewski, 1988 demostraron que los compuestos fenólicos son eficaces principalmente a través de la compactación de los aniones superóxido. Trabajos posteriores

presentaron actividades de captación de radicales aniones muy bajos (<5%) para diversos extractos de Rhodophyta (Kim et al., 2005). En este estudio, los extractos de *H. incurva* inducen la producción de superóxido anión radical en lugar de la inhibición de la misma. La actividad prooxidante de los extractos no se podría explicar hasta no identificar los compuestos antioxidantes presentes en los extractos. Sin embargo, está documentado que algunos antioxidantes, como el ácido ascórbico o  $\alpha$ -tocoferol, puede actuar como pro-oxidantes, dependiendo de la dosis y condiciones experimentales (Zhang y Omaye 2001). En conclusión, este estudio permitió establecer la actividad antioxidante de *H.incurva* mediante ensayos viables, sencillos y reproducibles para detectar los antioxidantes a partir de extractos crudos de algas.

Para concluir, lo observado en los ensayos antioxidantes *in vitro*, no implica que las actividades de los extractos de *H.incurva* podrían ejercer efectos protectores también *in vivo*, hecho invita a futuras investigaciones a cerca del comportamiento de los compuestos implicados en la actividad de esta especie en modelos experimentales *in vivo*.

### 3. 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdala Díaz, R.T., Chabrilón, M., Cabello-Pasini, A., Gómez-Pinchetti, J.L., Figueroa, F.L. 2010. Characterization of polysaccharides from *Hypnea spinella* (Gigartinales) and *Halopithys incurva* (Ceramiales) and their effect on RAW 264.7 macrophage activity. J. Appl. Phycol. DOI 10.1007/s10811-010-9622-7. Publicado online: 13 nov 2010.
- Abreu, M.H., Varela, D.A., Henriquez, L., Villarroel, A., Yarish, C., Sousa-Pinto, I., Buschmann, A.H. 2009. Traditional vs. integrated multi-trophic aquaculture of *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, J. McLachlan & E. C. Oliveira: productivity and physiological performance. Aquaculture 293: 211-220.
- Aguilera, J., Jiménez, C., Figueroa, F.L., Lebert, M., Häder, D.-P. 1999. Effects of ultraviolet radiation on thallus absorption and photosynthetic pigments in the red alga *Porphyra umbilicalis*. J. Photochem. Photobiol. 48: 75-82.
- Aguilera, J., Dummermuth, A., Karsten, U., Schriek, R., Wiencke, C. 2002. Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. Polar Biol. 25:432-441.
- Aquirre-Von-Wobeser, E., Cabello-Pasini, A. y Figueroa, F.L. 2000. Effects of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. J. Applied Phycology, 12: 159-168.

- Anggadiredja, J., Andyani, R., Hayati, M. 1997. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtuse* (Rhodophyta) from Seribu Islands. J. Appl. Phycol. 9:477-479.
- Arnao, M.B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends Food Sci. Technol. 11:419-421.
- Aslam, M., Huffaker, R.C. 1984. Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. Plant Physiol. 75, 623-628.
- Atkinson, M.J., Smith, S.V. 1983. C:N:P ratios of benthic marine seaweeds. Limnol. Oceanogr. 28:568-574.
- Bidwell R.G., McLachlan J, Lloyd N.D. 1985. Tank cultivation of Irish Moss, *Chondrus crispus* Stackh. Bot. Mar. 28: 87-97.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181:1199-1200.
- Blunden, G. 1993. Marine algae as sources of biologically active compounds. *Interdiscip. Sci.Rev.* 18:73-80
- Bolton, J.J., Robertson-Andersson, D.V., Shuuluka, D., Kandjengo, L. 2009. Growing *Ulva* (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a SWOT analysis. J. Appl. Phycol. 21:575-583.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Rev., 11:317-333.
- Burton, G.W., Ingold, K.U. 1984.  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science 224:569-573.
- Buschmann, A., Troell, M., Kautsky, N. 2001. Integrated algal farming: a review. Cah. Biol. Mar. 42: 83- 90.
- Cabello-Pasini, A., Aquirre-Von-Wobeser, E.& Figueroa, F.L. 2000. Photoinhibition of photosynthesis in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyte), *Chondrus crispus* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) in out-door culture systems.J. Photochem. Photobiol. 57: 169 - 178.
- Chapman, V.J., Chapman, D.J. 1980. Seaweeds and their uses, 3rd edn. Chapman and Hall, London, p. 334
- Chopin, T., Buschmann, A.H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G.P., Zertuche-González, J.A., Yaris, C., Neefus, C. 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. J. Phycol. 37: 975-986.
- Chow, F., Macchiavello, J., Cruz, S.S., Fonck, E., Olivares, J. 2001. Utilization of *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariaceae) as a biofilter in the depuration of effluents from tank cultures of fish, oysters, and sea urchins. J. World Aquaculture Soc. 32:215-220.
- De La Coba, F., Aguilera, J., Figueroa, F.L., De Gálvez, M.V., Herrera, E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. J. Appl. Phycol. 21: 161-169.

### Capítulo III

---

- Collén, J., Davison, I.R. 1999. Stress tolerance and reactive oxygen metabolism in the intertidal red seaweeds *Mastocarpus stellatus* and *Chondrus crispus*. *Plant Cell Environ.* 22:1143-1151.
- Connan S (2004) Etude de la diversité spécifique des macroalgues de la Pointe de Bretagne et analyse des composés phenoliques des Phéophycées dominantes. PhD Dissertation University of West Brittany, 324 pp
- Davis, K.J. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 262:9895-9901.
- DeBoer, J.A. 1981. Nutrients. En: Lobban, C.S., Wynne, m.J. (Eds.) *The biology of seaweeds*. Blackwell Scientific, Oxford. Pp. 356-391.
- DeBoer, J. A., Ryther, J.H. 1977. Potential yields from a waste-recycling algal mariculture system. En: R. Krauss (Ed.) *The marine plant biomass of the Pacific Northwest Coast*. Oregon State University Press, Corvallis, Oregon, USA, pp. 231-249.
- D'Elia, C.F., DeBoer, J.A. 1978. Nutritional studies of two red algae: II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake. *J. Phycol.* 14:266-272.
- Döhler, G., Hagmeier, E., David, C. 1995. Effects of solar and artificial UV radiation on pigments and assimilation of <sup>15</sup>N ammonium and <sup>15</sup>N nitrate by macroalgae. *J. Photochem. Photobio. B* 30:179-187.
- Duarte, C.M. 1992. Nutrient concentration of aquatic plants. *Limnol Oceanogr.* 37:882-889.
- Figueroa, F.L., Aguilera, J., Jiménez, C., Vergara, J.J., Robles, M.D., Niell, F.X. 1995. Growth, pigment synthesis and nitrogen assimilation in the red alga *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützting (Bangiales, Rhodophyta) under blue and red light. *Sci. Mar.* 59:9-20.
- Figueroa, F. L., Salles, S., Aguilera, J. Jiménez, C. Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A. y Altamirano, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur. in *Le Jol.Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151:81 - 90.
- Figueroa, F.L., Santos, R., Conde-Alvarez, R., Mata, L., Gómez Pinchetti, J.L., Matos, J., Huovinen, P., Schuenhoff, A., Silva, J. 2006. The use of chlorophyll fluorescence for monitoring photosynthetic condition of two tank-cultivated red macroalgae using fishpond effluents. *Bot. Mar.* 49:275-282.
- Figueroa, F.L., Israel, A., Neori, A., Martínez, B., Malta, E., Ang Jr., P., Inken, S., Marquardt, R., Korbee, N. 2009. Effects of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation in *Ulva lactuca* (Chlorophyta): responses to short-term stress. *Aquat. Biol.* 7:173-183.
- Flores-Moya, A., Gómez, I, Viñegla, B., Altamirano, M., Pérez-Rodríguez, E., Maestre, C, Caballero, R. M. & Figueroa, F. L. 1998. Effects of solar radiation on photosynthetic performance, pigment content and enzymatic activities related to nutrient uptake, of the endemic Mediterranean red alga *Rissoella verruculosa*. *New Phytologist.* 139: 673 - 683.
- Frankel, E.N. 1991. Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food Agric.* 54: 495-511.
- Frankel, E. N.; Kanner, J.; German, J. B.; Parks, E.; Kinsella, J. E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine". *Lancet* 1993,

341, 454-457.

- Franklin, L.A.; Yakovleva, I.; Karsten, U., Lüning, K. 1999. Synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. *J. Phycol.* 35:682-693.
- Franklin, L.A., Kräbs, G., Kuhlenskamp, R. 2001. Blue light and UV-A radiation control the synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae). *J. Phycol.* 37:257-270.
- Friedlander, M., Ben-Amotz, A. 1991. The effect of outdoor culture conditions on growth and epiphytes of *Gracilaria conferta*. *Aquat. Bot.* 39:315-333.
- Fujimoto, K., Kaneda, T. 1984. Separation of antioxygenic (antioxidant) compounds from marine algae. *Hydrobiologia* 117:111-3.
- Garcia-Pichel, F., Wingard, C.E., Castenholz, R.W. 1993. Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:170-176.
- Gil Jeréz (2010) Evaluación de la capacidad de biofiltración y acumulación de aminoácidos tipo micosporina (MAAs) de *Gracilaria cornea* J. Agardh cultivada en efluentes de piscifactorías. Trabajo Fin de Master. Master de Biotecnología Avanzada (UMA-UNIA), 92 pp.
- Gómez Pinchetti, J.L., del Campo Fernández, E., Moreno Diaz, P., García Reina, G. 1998. Nitrogen-guided down and up dynamic of the biochemical composition and photosynthesis of tank cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 10: 383-389.
- Gröniger, A., Hallier, C., Häder, D.P. 1999. Influence of UV radiation and visible light on *Porphyra umbilicalis*: Photoinhibition and MAA concentration. *J. Appl. Phycol.* 11:437-445.
- Guiry, M.D., Blunden, G. 1991. Seaweed resources in Europe: uses and potential. John Wiley & Sons, Chichester.
- Haglund, K., Pedersén, M. 1993. Outdoor pond cultivation of subtropical marine red alga *Gracilaria tenistipitata* in brackish water in Sweden. Growth, nutrient uptake, co-cultivation with rainbow trout and epiphyte control. *J. Appl. Phycol.* 5:271-284.
- Hanisak, M.D., 1990. The use of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales, Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweeds. *Hydrobiologia* 204:79-87.
- Henley, W.J., Levavasseur, G., Franklin, L.A., Osmond, C.B., Ramus, J. 1991. Photoacclimation and photoinhibition in *Ulva rotundata* as influenced by nitrogen availability. *Planta* 184:235-243.
- Hernández, I., Martínez-Aragón, J.F., Tovar, A., Pérez-Lloréns, J.L., Vergara, J.J., 2002. Biofiltering efficiencies for dissolved ammonium in three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (*Dicentrarchus labrax*) waste waters. *J. Appl. Phycol.* 14:375-384.
- Hornsey, I.S. Hide, D. 1974. The production of antimicrobial compounds by British marine algae. I. Antibiotic-producing marine algae. *Br. Phycol. J.* 9:353-361.

## Capítulo III

---

- Huang, H.L., Wang, B.G. 2004. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao coastline. *J. Agric. Food Chem.* 52:4993-4997.
- Huang, J., Tang, X.X., Liu, T., Li, Y.Q. 2002. Alteration of activated oxygen and antioxidant system in kelp during alginic acid decomposing bacteria infection. *J. Ocean Univ. Qingdao* 32: 574-578.
- Huovinen, P., Matos, J., Sousa-Pinto, I., Figueroa, F.L. 2006. The role of nitrogen in photoprotection against high irradiance in the Mediterranean red alga *Grateloupia lanceola*. *Aquatic Botany* 84: 208-316.
- Imlay, J.A., Linn, S. 1998. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240:1302-1309.
- Jimenez del Rio, M., Ramazanov, Z., Garcia-Reina, G. 1994. Optimization of yield and biofiltering efficiencies of *Ulva rigida* C. Ag. cultivated with *Sparus aurata* L. waste waters. *Sci. Mar.* 58: 329-335.
- Kain (Jones), J.M., Dawes, C.P. 1987. Useful European seaweeds: past hopes and present cultivation, *Hydrobiologia*, 151/152: 173-181.
- Kim, S.J., Woo, S., Yun, H., Yum, S., Choi, E., Do, J.R. 2005. Total phenolic contents and biological activities of Korean seaweed extracts. *Food Sci. Biotechnol.* 14:798-802.
- Koleva, I., van Beek, T., Linssen, J., Groot, A., Yevstatieva, L. 2002. Screening of plants extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemistry Anal.* 13:8-17.
- Korbee-Peinado, N., Abdala-Díaz, R., Figueroa, F., Helbling, W. 2004. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J. Phycol.* 40:248-259.
- Korbee, N., Huovinen, P., Figueroa, F.L., Aguilera, J., Karsten, U. 2005. Availability of ammonium influences the photosynthesis and the accumulation of MAAs in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta) from different latitudes. *Mar. Biol.* 146:645-654.
- Korbee, N., Figueroa, F., Aguilera, J. 2006. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like aminoacids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *Mar. Biol.* 80:71-78.
- Kuda, T., Tsunekawa, M., Hishi, T., Araki, Y. 2005. Antioxidant properties of dried 'kayamonori', a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Food Chem.* 89: 617-622.
- Lapointe, B.E., Ryther, J.H. 1978. Some aspects of the growth and yield of *Gracilaria tikvahiae* in culture. *Aquaculture* 15:185-193.
- Lembi, C., Waaland, J.R. 1988. *Algae and human affairs*. Cambridge University Press, New York, p. 590.
- Lobban, C.S., Harrison, P.J. 1997. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press. 366 pp.

- López-Figueroa, F. y Rüdiger, W. 1991. Stimulation of nitrate net uptake and reduction by red and blue light and the reversion by far-red light in the green alga *Ulva rigida*. *Journal of Phycology*. 27: 389 - 394.
- López-Figueroa, F. 1993. Photoregulation of nitrogen metabolism and protein accumulation in the red alga *Corallina elongata* Ellis et Soland. *Z. Naturforsch.* 48 c: 788 - 794.
- Figueroa, F.L., Aguilera, J., Niell, F.X. 1995. Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützinger (Bangiales, Rhodophyta). *Europ. J. Phycol* 30: 11 - 18.
- Figueroa, F.L. 1996. Effects of light quality on Nitrate reductase and Glutamine synthetase activities in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur. in Le Jol. and other macroalgae. In: *Underwater light and algal Photobiology*. (F. L. Figueroa, C. Jiménez and J. L. Pérez-Lloréns eds.) *Scientia Marina* 60: (Supl. 1): 163 - 170.
- Figueroa, F.L., Aguilera, J., Jiménez, C., Vergara, J.J., Robles, M.D., Niell, F.X. 1995. Growth pigment synthesis and nitrogen assimilation in the red alga *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützinger (Bangiales, Rhodophyta) under blue and red light. *Sci. Mar.* 59, 9–20.
- Luning, K. 1990. *Seaweeds — their environment, biogeography, and ecophysiology*. John Wiley and Sons, Inc, New York. 527 pp.
- Lüning K., Pang, S. 2003. Mass cultivation of seaweeds: current aspects and approaches. *J. Appl. Phycol.* 15: 115-119.
- Malanga, G., Calmanovici, G., Puntarulo, S. 1997. Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plant.* 101:455-462.
- Matos, J., Costa, S., Rodrigues, A., Pereira, R., Sousa-Pinto, I. 2006. Experimental integrated aquaculture of fish and red seaweeds in Northern Portugal. *Aquaculture* 252:31-42.
- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara M., Yamamoto, Y., Niki, E., Karube, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 9:29-35.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci. (London)* 84:407-412.
- Misawa, M. 1994. *Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite*. FAO Agricultural Services Bulletin No. 108. Roma, Italy.
- Moldau, H. 1999. Ozone detoxification in the mesophyll cell wall during a simulated oxidative burst. *Free Radical Res.* 31:19-24.
- Msuya, F.E., Neori, A. 2002. *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa*: macroalgae that can biofilter effluent from tidal fishponds in Tanzania. *Western Indian Ocean J. Mar. Sci.* Vol. 1(2): 117-126.
- Muñoz, M.P., Varas, Y.D. 1998. Absorción de nutrientes por *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) en estanques utilizando efluentes de peces y moluscos: efecto de la tasa de recambio de agua. Tesis of Aquaculture Engineering, Universidad de los Lagos, Osorno, 39 pp.

### Capítulo III

---

- Neale, P.J., Banaszak, A.T., Jarriel, C.R. 1998. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *J. Phycol.* 34:928-938
- Neori, A., Shpigel, M., Ben-Ezra, D. 2000. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture* 186: 279-291.
- Parsons, T., Maita, Y., Lalli, C. 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford. 173 p.
- Pavia H, Cervin G, Lindgren A, Åberg P (1997) Effects of UVB radiation and simulated herbivore on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar Ecol Prog Ser*157:139-46
- Pavia H, Toth GB (2000) Influence of nitrogen on the phlorotannins content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Hydrobiologia* 440:299-305
- Payá, M., Ferrándiz, M.L., Miralles, F., Montesinos, C., Alcaraz, M.J. 1993. Effects of coumarin derivatives on superoxide anion generation. *Arzneim-Forsch* 43:655-658.
- Porter, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. 1997. *Toxicological and Industrial Health*, v. 9, n. 1-2, p. 93-122.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1231-1237.
- Rijstenbil, J.W. 2002. Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UVA and UVB radiation. *J. Plankton Res.* 24: 1277-1288.
- Robak, J., Gryglewski, I. 1988. Flavonoides are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 37, 837 - 841.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial foods. *Food Chemistry* 91: 621-632.
- Roleda, M.Y., Hanelt, D., Wiencke, C. 2006a. Growth and DNA damage in young *Laminaria* sporophytes exposed to ultraviolet radiation: implication for depth zonation of kelps on Helgoland (North Sea). *Mar. Biol.* 148:1201-1211.
- Roleda, M.Y., Wiencke, C., Lüder, U.H. 2006b. Impact of ultraviolet radiation on cell structure, UV-absorbing compounds, photosynthesis, DNA damage, and germination in zoospores of Arctic *Saccorhiza dermatodea*. *J. Exp. Bot.* 57:3847-3856.
- Rosas-Romero, A.J., Rojano, B., Herrera, J.C., Silva, J., Hernandez, C.A., Martínez, C. 1999. A novel approach to quantitative structure-property relationships in antioxidants. *Ciencia* 7:78-87.

- Rossa, M.M., de Oliveira, M.C., Okamoto, O.K., Lopes, P.F., Colepicolo, P. 2002. Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 14: 151-157.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Das, P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol. Adv.* 18:91-120.
- Rüdiger, W. y López-Figueroa, F. 1992. Yearly review: Photoreceptors in algae. Annual review. *Photochem. Photobiol.* 55(6): 949 - 954.
- Sanchez-Moreno, C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8:121-137.
- Shick, J.M., Dunlap, W.C. 2002. Mycosporine like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation and UV-protective functions in aquatic organisms. *Ann. Rev. Physiol.* 64:223-262.
- Shiu, C.T., Lee, T.M. 2005. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*. *J. Exp. Bot.* 56:2851-2865.
- Siriwardhana, N., Lee, K.W., Kim, S.H., Ha, J.H., Jeon, Y.J. 2003. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci. Tech. Int.* 9:339-346.
- Smit, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. *J. Appl. Phycol.* 16: 245-262.
- Schuenhoff, A., Mata, L., Santos, R. 2006. The tetrasporophyte of *Asparagopsis armata* as a novel seaweed biofilter. *Aquaculture* 252, 3-11.
- Syrett, P.J. 1981. Uptake and utilization of nitrogenous compounds. *Can. Bull. Fish. Aq. Sci.* 210:182-210.
- Topinka, J. A., Robbins, V. 1976. Effects of nitrate and ammonia enrichment on growth and nitrogen physiology in *Fucus spiralis*. *Limnol. Oceanogr.* 21:659-664.
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A.H., Kautsky, N., Yarish, C. 2003. Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture* 226: 69-90.
- Tseng, C.K. 1987. *Laminaria* mariculture in China. In: Doty, M.S., Caddy, J.F., Santelices, B. (Eds). Case study of seven commercial seaweed resources, FAO Fisheries Technical Paper 281:239-264.
- Vergara, J.J., Niell, F.X., Torres, M. 1993. Culture of *Gelidium sesquipedale* (Clem.) Born. et Thur. in a chemostat system. Biomass production and metabolic responses affected by N flow. *J. Appl. Phycol.* 5:405-415.
- Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 1:13-25.
- Viera, M.P., Pinchetti, J.L.G., de Vicose, G.C., Bilbao, A., Suarez, S., Haroun, R.J., Izquierdo, M.S. 2005. Suitability of three red macroalgae as a feed for the abalone *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve. *Aquaculture* 29:75-82.

### Capítulo III

---

- Wang, Y., Tang, X.X. 2005. Relationships between antioxidant activities and heat-resistant features of two *Laminaria japonica* strains. *Chin. J. Appl. Ecol.* 16:1507-1512.
- Whitfield, F.B., Helidoniotis, F., Shaw, K.J., Svoronos, D. 1999. Distribution of bromophenols in species of marine algae from Eastern Australia. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 2367-2373.
- Wikfors, G.H., Ohno, M. 2001. Impact of algal research in aquaculture. *J Phycol* 37:968-974
- Yakovleva, I.M., Titlyanov, E.A. 2001. Effect of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus*: stress, photoinhibition and protective mechanisms. *Aquat. Bot.* 71:47-61.
- Yan, X., Nagata, T., Fan, X. 1998. Antioxidant activities in some common seaweeds. *Plant Foods Human Nutr.* 52:253-262.
- Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M., Nagata, T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:605-607.
- Zemke-White, W. L., Ohno, M. 1999. World seaweed utilisation: and end of the century summary. *J. Appl. Phycol.* 11: 369-376.
- Zhang, P., Omaye, S.T. 2001. Antioxidant and prooxidant roles for  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. *Toxicology In Vitro* 15:13-24.
- Zubia, M., Robledo, D., Freile-Pelegri, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J. Appl. Phycol.* 19: 449-458.
- Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., Deslandes, E. 2009. Antioxidant and antitumor activities of some Phaeophyta from Brittany Coasts. *Food Chem.* 116: 693-701.

## **CAPITULO IV**

---

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN  
*HALOPITHYS INCURVA*:  
POLIFENOLES, MICOSPORINAS Y POLISACÁRIDOS**

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Las sustancias con actividad antioxidante pueden ser de distinta naturaleza, tal y como se ha descrito en la introducción general son numerosos los trabajos científicos que señalan a los polifenoles, micosporinas y polisacáridos como compuestos con poder antioxidante (Aruoma et al.,2003; Qi et al., 2005; De la Coba et al.,2009).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático y un anillo benceno con uno o más grupos hidroxilados incluyendo derivados funcionales, como podrían ser ésteres, glucósidos, entre otros (Tsimidou,1998). La naturaleza de estos compuestos varía desde moléculas simples, como ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Los polifenoles se encuentran en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos caso se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello, la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glucósidos siendo solubles en agua y solventes orgánicos (Shahidi et al., 1995). Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos generalmente son glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y otros compuestos fenólicos (Bravo, 1998).

Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes debido a su estructura química, ya que son excelentes donadores de protones o electrones (Kinsella, 1993). Además, su capacidad de quelar metales, especialmente cobre y hierro, los hace actuar indirectamente como antioxidantes ya que inhiben la acción de los metales como catalizadores en la formación de radicales libres (Conner et al.,1996). Hasta el momento, las algas pertenecientes al phylum Phaeophyta han destacado por contener los niveles más altos de fenoles entre las algas, principalmente florotaninos, es decir polímeros de floroglucionol (1,3,5-trihidroxibenceno) de un peso molecular de hasta unos 650 KDa. La actividad antioxidante de los polifenoles de las algas parece depender de su estructura y sobre todo del grado de polimerización de floroglucinol; los florotaninos más pequeños han mostrado ser más activos en general que los compuestos polimerizados (Nakamura et al., 1996). Estos compuestos, desempeñan un papel

importante en la protección del talo contra herbívoros (Geiselman y McConell, 1981; Pavia y Toth, 2000), patógenos (Ragan y Glombitza, 1986) y epífitos (Jennings y Steinberg, 1997). Pero además, están implicados en los mecanismos de fotoprotección y son especialmente eficaces en la lucha contra los efectos citotóxicos de la radiación UV (Pavía et al., 1997; Abdala et al., 2006).

Las estructuras de los polifenoles aisladas de varias especies de algas pardas, se han caracterizado como el esqueleto dibenzo-1,4-dioxina (Shin et al., 2006). Las estructuras de estos compuestos están constituidas por unidades floroglucinol ligadas por enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno. Ejemplos de ellos son el fucofurectol, obtenido de *Eisenia arborea* (Haslam, 1998), eckol, 8.8'-bieckol, 8,4''''-dieckol y florofucofuroeckol A, aislados de *Ecklonia cava* (Ahn et al., 2004). Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se determinan diversos aspectos químicos de polifenoles extraídos de *Stypocaulon scoparium*, como son la variación del rendimiento según la polaridad del solvente así como la detección e identificación de varios polifenoles apuntando como compuesto mayoritario el ácido gálico (López et al., 2011).

El estudio y cuantificación de fenoles en algas verdes y algas rojas también ha sido abordado aunque en menor grado (Santo Raymundo et al., 2004; Zubia et al., 2007), así como la identificación de los mismos. Entre este tipo de fenoles se encuentran la trihidroxicumarina, identificada en la macroalga verde *Dasycladus vernicularis* (Pérez-Rodríguez et al., 1998; Pérez-Rodríguez et al., 2001; Pérez-Rodríguez et al., 2003) y excretada al medio en situación de estrés (alta irradiancia solar, incremento de radiación UV, aumento de temperatura o bajada de la salinidad).

Han y Han (2005) reportan que el alga verde *Ulva pertusa* Kjellman acumula sustancias con alta absorción en la banda de UV con su máximo a 294 nm en respuesta al incremento de la dosis de radiación UV-B. El espectro de acción policromático de síntesis de estos compuestos muestra un pico principal a 292 nm y otro más pequeño a 311.5 nm, no habiendo inducción significativa por encima de 354.5 nm, lo que llevó a Han y Han (2005) a sugerir que la naturaleza de esta sustancia era del tipo fenólica. Además, encontraron una relación positiva entre la cantidad de sustancia y actividad antioxidante de acuerdo al ensayo  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl.

En algas rojas, sin embargo no se han encontrado trabajos en los que se ahonde en la estructura de fenoles y su relación con la actividad antioxidante. Se

han descrito los bromofenoles pero a los que hasta el momento no se les ha atribuido capacidad antioxidante. Estas moléculas han sido descritas en géneros pertenecientes a la familia Ceramiales, concretamente en los géneros *Ceramium*, *Halopithys*, *Laurencia*, *Odonthalia* y *Polysiphonia* entre otros (Tabla 4.1.) (Carvalho et al., 2004).

Tabla 4.1. Fenoles, terpenos, digeneaside y florodósidos identificados en algas rojas de la familia Ceramiales, siendo F (fenoles), T (terpenos), D (Digeneaside) y F (Florodósidos).

Género	Metabolitos secundarios		Material de reserva		Referencia
	F	T	D	F	
<i>Ceramium</i>	x		x		Bouveng et al., 1955; Pedersen et al., 1974; Zubia et al., 2009
<i>Chondria</i>		x		x	Barrow et al., 1995
<i>Halopithys</i>	x		x		Lamure, 1944; Combaut et al., 1978
<i>Laurencia</i>	x	x		x	Erickson, 1983; Barrow et al., 1995; Zubia et al., 2007
<i>Odonthalia</i>	x		x		Craigie, 1974; Kurihara et al., 1999
<i>Osmundea</i>	x	x		x	Rahman et al., 1988; Barrow et al., 1995; Sabina y Aliya 2009
<i>Polysiphonia</i>	x		x		Lamure, 1944; Fenical, 1975; Zubia et al., 2009
<i>Rhodomela</i>	x		x		Whyte, 1970; Fenical, 1975
<i>Vidalia</i>	x		x		Carvalho, 2000

Otras sustancias que han captado creciente interés en el campo de los antioxidantes son los aminoácidos tipo micosporina (Micosporine-like Amino Acids, MAAs de sus siglas en inglés). Se trata de compuestos nitrogenados solubles en agua, de bajo peso molecular y máximo de absorción en la región del UV (310-360 nm) (Cockell y Knowland, 1999; Shick y Dunlap, 2002). Por su composición química se les considera derivados imino-carbonil del cromóforo de ciclohexenona de las micosporinas. El anillo se encuentra conjugado con sustituyentes nitrogenados (amino), aminoácidos o sus amino-alcoholes correspondientes. Los MAAs se sintetizan a través de la ruta del ácido shikímico, relacionada con la fotosíntesis (Bentley, 1990). Esto no implica que la regulación de la síntesis de MAAs esté

directamente acoplada a la asimilación de carbono con la fotosíntesis ya que existen otras variables ambientales que pueden modular la síntesis de estos compuestos. La acumulación de uno u otro tipo de MAA se ha descrito como dependiente de la calidad de la luz incidente y también de la especie (Karsten et al., 1998; Franklin et al., 1999). En macroalgas pertenecientes al phylum Rhodophyta, se han detectado altas concentraciones intracelulares de MAAs mientras que en algas verdes y pardas no se han determinado o sólo están presentes trazas (Karentz, 1994; Karsten et al., 1998; Hoyer et al., 2001; Korbee et al., 2006). Los MAAs actúan como filtros pasivos disipando térmicamente la energía UV absorbida sin dar lugar a productos intermedios tóxicos (Conde et al., 2000, 2004). Junto a la radiación solar, otros factores ambientales como salinidad, temperatura o disponibilidad de nutrientes pueden influir en la acumulación de MAAs (Bandanarayake, 1998; Dunlap y Shick 1998, Karsten y Wiencke 1999; Korbee et al., 2004; Huovinen et al., 2006). Se ha observado un incremento de la concentración de MAAs en especies del género *Porphyra* y *Grateloupia* cultivadas en medios con alta disponibilidad de N (Korbee et al., 2004, 2005; Huovinen et al., 2006), siendo este incremento más acusado en los casos en que el alga estaba sometida a radiación UV. Recientemente se ha demostrado que los MAAs asterina-330 y palythine presentaron una alta actividad antioxidante en el ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica mientras que porphyra-334 y shinorine tuvieron actividad moderada (De la Coba et al., 2009). Por otro lado porphyra-334 presentaba una alta actividad antioxidante en solvente acuoso (ensayo ABTS), estos resultados han dado lugar a la publicación de varias patentes sobre la aplicación de MAAs como antioxidantes frente al estrés oxidativo provocado por diversas enfermedades (De la Coba et al., 2005-2007). Es más, otros autores han publicado una patente en la que se apunta a que, gracias a la capacidad antioxidante de los MAAs, se podrían emplear como cosmético contra el envejecimiento prematuro de la piel (Schmid et al., 2004).

En la última década los trabajos dirigidos al estudio de antioxidantes en algas, han apuntado a los polisacáridos sulfatados (PS) también como sustancias con un alto poder antioxidante. El conocimiento de la naturaleza de los polisacáridos y de sus fracciones, permite establecer relaciones entre su estructura, cantidad y posición de los grupos funcionales así como las propiedades biológicas tal y como muestran los numerosos trabajos publicados al respecto (Rochas et al.; 1986; Duarte et al., 2004; Lu et al., 2008). Además de los polisacáridos de reserva como el almidón, las algas marinas sintetizan polisacáridos estructurales presentes

en su pared celular en cantidades variables, conformados por diferentes monosacáridos, algunos con grupos sulfatos y algunos de ellos con diversas propiedades biológicas constituyendo un recurso renovable de importancia (Rupérez et al., 2002; Toida et al., 2003; Wang et al., 2009). Los PS comprenden un grupo de macromoléculas, constituidos por polímeros que contienen en su estructura una cantidad de grupos sulfatos esterificados con los azúcares (Shanmugam y Mody, 2000; Giroldoy Viera, 2002). Su estructura primaria varía en composición y secuencia monomérica, peso molecular, configuración anomérica, posición del enlace glucosídico y densidad de cargas. En las macroalgas, estas variaciones estructurales dependen del tipo de alga que los produce y de la manera en que ellas responden al medio ambiente (Yalpani, 1988). El contenido de polisacáridos es modulable por radiación y disponibilidad de nutrientes, así bajo limitación de nitrógeno (efecto Neish) y bajo radiación roja el metabolismo es dirigido hacia la acumulación de polisacáridos, mientras que en condiciones ricas de nitrógeno y bajo radiación enriquecida en luz azul, se acumula el nitrógeno en compuestos de reserva fácilmente movilizables como en el caso de *Porphyra leucosticta* (Figuroa et al. 1995, 1997 ) o *Gelidium sesquipedale* (Carmona et al., 1996). También éste esto ocurre en el orden Gigartinales, donde se han descrito variaciones respecto al rendimiento y calidad del carragenato asociados a cambios estacionales (irradiación, disponibilidad de nutrientes, temperatura) además del ciclo de vida y diferentes zonas de localización (Dawes et al., 1977a; Doty y Santos, 1978; Craigie, 1990). La diversidad estructural de los PS explica su amplio rango de propiedades físicas, químicas y biológicas, algunas de las cuales han encontrado uso en múltiples aplicaciones frente a los polisacáridos no sulfatados tales como anticoagulantes, inmunoestimuladores y antioxidantes entre otros (Shanmugam y Mody, 2000; Xue et al., 2001, Pereira et al., 2002). Estudios previos han señalado que la composición, estructura primaria, la conformación, solubilidad intrínseca, la viscosidad, y el peso molecular de los polisacáridos tienen gran influencia en la actividad biológica de éstos (Chen y Wang, 1997). En este último sentido, se ha descrito que polisacáridos de bajo peso molecular extraídos de *Chondrus ocellatus*, eran más eficaces sobre las actividades de la inhibición de tumores que los de alto peso molecular (Zhou et al., 2004). También se ha informado que los efectos anticoagulantes de los fucanos dependen de su grado de sulfatación y de el peso molecular (Ferial et al., 2000). Se ha demostrado que los polisacáridos sulfatados del alga parda *Fucus vesiculosus* presentan actividad antioxidante (Rupérez et al., 2002) al igual que polisacáridos sulfatados de *Laminaria japonica* y *Ecklonia*

*jurome* Okam también señalados como secuestradores de radicales libres (Hu et al., 2001). Los polisacáridos más activos con actividad antioxidante hasta el momento han sido aislados a partir de algas pardas y verdes, aunque existen ejemplos interesantes en algas rojas como es el caso de *Porphyra haitanensis* (Zhanget al., 2003) *Porphyridium sp* (Tannin-Spitz et al., 2005). Recientemente, se ha publicado la actividad inmunoestimuladora de polisacáridos ácidos extraídos de *Hypnea spinella* y *Halopithys incurva* (Abdala et al., 2011).

En este capítulo se aborda el estudio de las moléculas identificadas en *Halopithys incurva* y si bajo la influencia de las diferentes condiciones de cultivo fluctúa el rendimiento de las sustancias (polifenoles, MAAs y polisacáridos ácidos). Además se investigará la estimulación de la vía del carbono en el sistema de biofiltración de efluentes con el fin de incrementar la acumulación de polisacáridos y MAAs con potencial biológicamente activo.

## 4.2. OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio planteado en este capítulo se centró en determinar las características cualitativas, composición y estructuras de polifenoles, MAAs y polisacáridos ácidos de la biomasa obtenida en cultivo, ahondado en el Capítulo 3, de *Halopithys incurva* (Ceramiales) con posibles propiedades novedosas de aplicación, ya sea como antioxidantes o hidrocoloides en la industria alimentaria o medicinal. La biomasa valorada, procede de cultivos en diferentes condiciones de irradiancia solar fuera o dentro de un invernadero, así como aporte de nutrientes. Los objetivos concretos planteados se detallan a continuación:

- Determinar el contenido cuantitativo de polifenoles en extractos hidroalcohólicos mediante el método Folin Ciocalteu.
- Separación, identificación y cuantificación de los polifenoles presentes en extractos *Halopithys incurva*.
- Extracción, separación, identificación y cuantificación de los MAAs presentes en extractos de *Halopithys incurva*.
- Purificación de polisacáridos ácidos y determinación el rendimiento.
- Estudio de las estructuras de los polisacáridos ácidos de la biomasa obtenida bajo diferentes condiciones de cultivo mediante espectros IR que permitan identificar la estructura y grupos funcionales en dichos polisacáridos.

### HIPÓTESIS

**El cultivo que presente una mayor tasa fotosintética y alta disponibilidad de nitrógeno acumulará más MAAs y fenoles mientras que el cultivo con limitación de nitrógeno acumulará principalmente carbohidratos (incluyendo polisacáridos ácidos).**

**La radiación UV solar (cultivos fuera del invernadero) induce la acumulación de fotoprotectores: MAAs y fenoles.**

**El extracto acuoso *Halopithys incurva* posee propiedades antioxidantes que guardan relación con su contenido en sustancias potencialmente antioxidantes como son los polifenoles, amino ácidos tipo micosporina y polisacáridos ácidos.**

### 4.3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 4.3.1. Material biológico y diseño experimental

La especie *Halopithys incurva* (Hudson) Batters (Ceramiales; Rhodophyta) fue producida en un cocultivo en tanques dentro de un sistema de biofiltración. El periodo experimental tuvo una duración de seis semanas llevándose a cabo desde el 30 de septiembre al 13 de noviembre de 2007. Los cultivos se mantuvieron con aporte en circuito abierto de efluentes procedentes de cultivo intensivo de peces (tal como se describe en el capítulo III) desde el inicio del experimento hasta el final de la cuarta semana, momento en el que cesaban dichos aportes y estos tanques eran mantenidos únicamente en agua de mar durante las dos últimas semanas del experimento. Durante todo el periodo experimental se mantuvieron cultivos control con circuito abierto de agua de mar natural (sin aporte de nutrientes).

Estas condiciones experimentales se realizaron simultáneamente bajo dos condiciones de diferentes de irradiación: (1) baja irradiación, para cultivos mantenidos en el interior de un invernadero que permite el paso del 80% de la radiación PAR incidente y bloquea toda la radiación UV y (2) alta irradiación considerada para cultivos mantenidos en exterior (cultivos outdoor) que reciben 100% de irradiación para además de radiación UV (PAR+UV). La tabla 4.2 muestra un resumen de las combinaciones de condiciones experimentales.

Tabla 4.2. Condiciones de irradiación y aporte de nutrientes bajo las que se cultivó la biomasa estudiada. Sin aporte de nutrientes (sn).

Irradiación	Nutrientes
PAR (interior)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -P sn
PAR+UV (exterior)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -P sn

Los ensayos de cuantificación y caracterización de fenoles se llevaron a cabo con biomasa liofilizada de *Halopithys incurva* obtenida tras cuatro semanas de cultivo, bajo las diferentes condiciones ambientales de irradiación y aporte de nutrientes descritas (Tabla 4.2.). Los ensayos de cuantificación y caracterización de polisacáridos y MAAs se evaluaron en muestras de biomasa liofilizada de *Halopithys incurva* cosechada al final de la primera, cuarta y última semana del experimento, es decir, a los 7, 28 y 42 días del comienzo del mismo, con el fin de

analizar las variables de estudio consideradas. En la figura 4.1 se representa un esquema del diseño experimental, indicando los puntos temporales de toma de muestras.

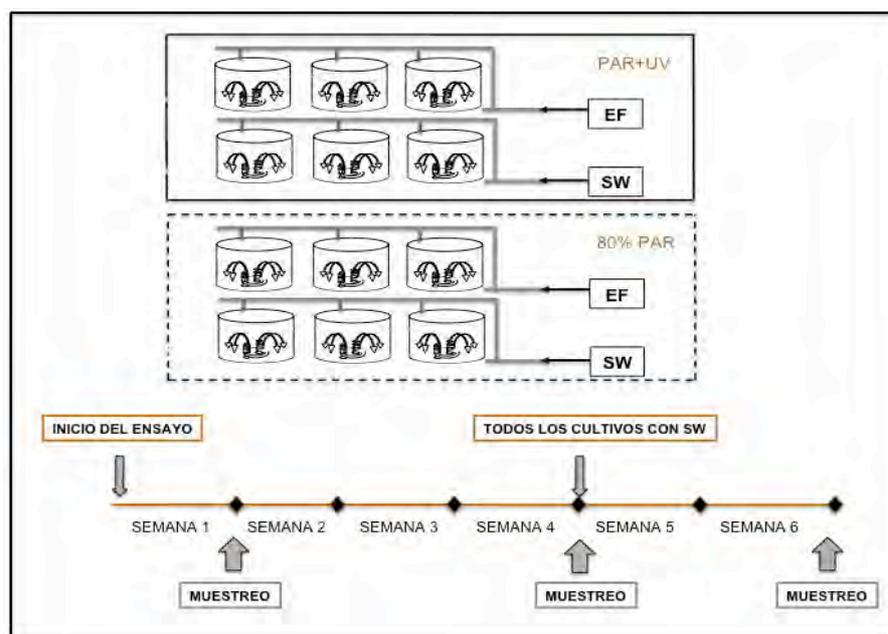


Figura 4.1. Esquema del diseño experimental mostrando la disposición de los cultivos de donde se obtuvo la biomasa para los diferentes análisis de fenoles, polisacáridos ácidos y micosporinas y el cronograma de muestreo. EF: efluente de piscifactoría, SW: agua de mar.

#### 4.3.2. Preparación de los extractos para el estudio de fenoles

Los extractos de *Halopithys incurva* liofilizada procedente de diferentes condiciones de cultivo, se realizaron con el mismo protocolo descrito en el Capítulo 1, con solventes de distinta polaridad (etanol:agua, metanol y agua destilada). Para la cuantificación de fenoles y para los análisis mediante NRM se emplearon únicamente los extractos de etanol:agua (1:1)(v/v), mientras que para los estudios de caracterización mediante HPLC se emplearon los tres tipos de extracto.



Figura 4.4. Imágenes de la formación de micelios (izquierda), polisacáridos purificados (centro) y liofilizados (derecha).

### 4.3.3. Extracción, fraccionamiento y purificación de polisacáridos ácidos

Las muestras de *Halopithys incurva* liofilizadas se sometieron a un proceso de despigmentación (eliminación de clorofilas y ficobiliproteínas) con el fin de obtener el polisacárido lo más blanquecino posible. El protocolo se llevó a cabo tal y como se describe en la Figura 4.4. Para la eliminación de las clorofilas se resuspendieron 10 g de alga seca liofilizada en 150 ml de etanol al 80 % en agitación sin calor. Posteriormente se centrifugó a 4500 r.p.m. durante 5 min, desechando el sobrenadante. Este paso se realizó 4 veces. Para la eliminación de las ficobiliproteínas se partió del precipitado obtenido tras la eliminación de las clorofilas, al cual, se le añadió 150 ml de Buffer fosfato en agitación sin calor. Posteriormente se centrifugó a 4500 r.p.m. durante 5 min, obteniéndose un precipitado. Este paso se realizó 2 veces. El precipitado obtenido tras la despigmentación se redisuelve en 250 ml de agua destilada mediante agitación y calor. Una vez disueltos se autoclavó a 134°C durante 10 minutos. La muestra autoclavada se centrifuga a 4.500 r.p.m. durante 15 minutos.



Figura 4.3. Imágenes de la formación de micelios(izquierda), polisacáridos purificados (centro) y liofilizados (derecha).

Como resultado de la centrifugación, se obtuvo el primer sobrenadante, (sobrenadante 1). Al precipitado obtenido se le añadió nuevamente agua destilada y se le sometió a los mismos pasos anteriores, obteniéndose, en este caso el segundo de sobrenadante, (sobrenadante 2). El precipitado se desechó, y se unieron los dos sobrenadantes. Los polisacáridos nativos contenidos en el sobrenadante final se sometieron a fraccionamiento por precipitación con un agente selectivo con el fin de obtener polisacáridos ácidos (Figura 4.3., izquierda).



Figura 4.4. Protocolo de extracción y purificación de polisacáridos ácidos.

Para la precipitación selectiva, se añadió cetavión al 2%, al sobrenadante, en este paso separamos polisacáridos ácidos de neutros, observándose formación de micelios. A continuación se centrifugó a 4.500 r.p.m. durante 20 minutos. El precipitado se disolvió con una solución de cloruro sódico (NaCl) 4M en agitación y calor. Una vez enfriado se precipitó con etanol (1:1) (v/v) y se centrifuga a 4.500 r.p.m. durante 15 minutos. Este paso se realiza hasta lograr la máxima purificación de los polisacáridos (hasta que el precipitado obtenga un color blanquecino). El precipitado se dializó en una solución de NaCl 2M con agitación. Transcurridas 24 horas se vacía la tripa y los tratamientos químicos finalizan precipitando nuevamente en etanol. Tras eliminar el etanol, el precipitado (polisacárido purificado) se congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 horas antes de su liofilización. El rendimiento se expresó como (%) de peso seco .

#### 4.3.4. Extracción y análisis de MAAs

El protocolo de extracción se llevó a cabo según Korbee-Peinado et al. (2004). Se pesaron 20 mg de peso seco de cada muestra por triplicado para realizar la extracción durante dos horas en un baño de agua a 45°C utilizando 1mL de una solución acuosa de metanol al 20%.

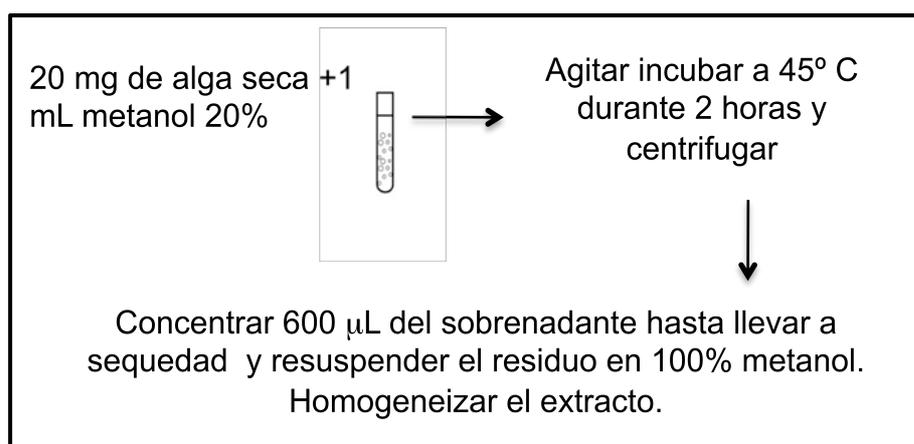


Figura 4.5. Protocolo de extracción de aminoácidos tipo micosporina.

Tras centrifugar a 5000 g durante 5 minutos se tomaron 600 µ L del sobrenadante y se llevaron a sequedad en un concentrador centrífugo al vacío (Jouan RC 10-09). Los extractos resultantes se resuspendieron en 600 µ L de metanol 100% y se mezclaron en un vórtex durante 30 segundos. Para el análisis de los aminoácidos tipo micosporina se empleó el método de Korbee-Peinado et al. (2004) basado en la separación por cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC de sus siglas en inglés) y en su posterior cuantificación a partir de su máximo de absorción en la región del ultravioleta. Los extractos previamente preparados se analizaron mediante un equipo de HPLC Waters 600 tras pasar por un filtro de membrana de 0.2 µm de diámetro previamente las muestras. La fase móvil era una solución acuosa de 2.5% metanol y 0.1% de ácido acético con un flujo isocrático de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Se hicieron pasar 20 µL de cada muestra a través de una columna Spherclone C8 (relleno de 5 µm de diámetro, 250 x 4.6 mm, Spherclone) con una precolumna afín (C8, Octyl, MOS; Phenomenex).

La detección se realizó con un detector de fotodiodos (Waters Photodiode Array Detector 996) a 330 nm y con un espectro de absorción entre 290 y 400 nm de forma que se registraban cada segundo los picos de absorción. La identificación de los MAAs se realizó por comparación entre el espectro de absorción y los tiempos de retención de varios patrones de macroalgas marinas (*Mastocarpus stellatus* (Shinorine), *Porphyra rosengurtii* (Porphyra-334), *Bostrychia scorpioides* (Palythine). La cuantificación se realizó utilizando coeficientes de extinción ya publicados (Takano et al. 1978; Tsujino et al. 1980; Dunlap et al. 1986; Gleason, 1993). Los resultados se expresaron como mg/g de peso seco.

#### **4.3.5. Cuantificación de polifenoles**

La metodología utilizada llevada a cabo para la cuantificación de fenoles totales en extractos hidroalcohólicos mediante el método Folin-Ciocalteu está descrita en profundidad en el Capítulo I.

#### **4.3.6. Caracterización de polifenoles**

##### A. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El análisis cualitativo de los polifenoles se ha realizado mediante la separación por cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC de sus siglas en inglés) en un cromatógrafo Waters 600 (Figura 4.6.). Los extractos, antes de ser inyectados, se filtraron por 0.2  $\mu\text{m}$ , para eliminar posibles residuos que podrían afectar al equipo. La columna empleada para la separación de los polifenoles en el HPLC fue una  $\text{C}_{18}$  y una precolumna afín de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, el tamaño de dicha columna fue de 250x4.6 mm. La fase móvil consistió en acetonitrilo y un 0.1% de ácido fosfórico, filtrada y desgasificada previamente. La temperatura de inyección fue de 29.7 $^{\circ}$  C y se inyectaron volúmenes de las muestras entre 10 y 50  $\mu\text{l}$ , que pasaba a un flujo isocrático de 0.5 ml/min. El tiempo de elución fue de 20 minutos. Se empleó un detector de UV y visible (Waters Photodiode Array Detector 996) que hacía un barrido para cada muestra entre 220-380nm, tomando datos cada segundo para cada longitud de onda de entre este rango seleccionado. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad HPLC. La identificación de los polifenoles se realizó por comparación entre el espectro de absorción y los tiempos de retención de varios patrones de polifenoles comerciales, cumarina, 4-hidroxycumarina, umbelliferona y pirogallol. Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como  $\text{mg g}^{-1}$  PS.



Figura 4.6. Filtrado de los extractos antes de la inyección y equipo de HPLC empleado con todos sus componentes.

## B. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los análisis de espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance 500 equipado con una criosonda  $1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  TCI, utilizando secuencias de pulso estándar disponibles en el software de Bruker (Bruker, Wissembourg, Francia). Todos los espectros se registraron en  $\text{D}_2\text{O}$ , a  $298^\circ\text{K}$ . Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm en relación con 2,2,3,3 sal de ácido de sodio tetra deuterio-3-(trimetilsilil)-propanoico como referencia externa. Asimismo, fueron realizados experimentos Bidimensional (2D RMN) HMBC (conectividad heteronuclear enlace múltiple) con el fin de establecer las correlaciones y el acoplamiento entre un protón dado y átomos vecinos de C (hasta C3) (cuando se utiliza HMQC: heteronuclear MultiQuantum coherencia, de protones en el heteroátomo (C, pero también de N) a la que se enlaza directamente). A continuación, los desplazamientos químicos de las resonancias de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  pueden ser comparados con los datos de la literatura. Debe hacerse constar que todos los análisis de RNM fueron realizados en el Servicio Commun de RMN, UFR Sciences et Techniques - University of Western Brittany Brest, Brittany, Francia por la Dr. Stéphane Cérantola y la colaboración del Dr. Erwan Argall.

### **4.3.7. Caracterización de los polisacáridos**

El estudio de las estructuras de los polisacáridos se llevó a cabo por espectroscopía de infrarrojo FT-IR. Estos ensayos se realizaron empleando un

equipo marca Bruker modelo Tensor 27. Para el estudio se prepararon unas pastillas de polisacárido liofilizado con bromuro de potasio combinadas (1% w/w). La mezcla fue homogeneizada en un mortero de ágata y para dar forma a la pastilla, el homogeneizado fue colocado en un pastillero, aplicando a continuación una presión de 121,5 atm durante 2 minutos. Se prepararon pastillas de cada tratamiento de cultivo por triplicado, en tres tratamientos del cultivo. Los estándares empleados fueron el ácido algínico de *Macrocystis pyrifera* de Sigma, kappa-carragenato de Sanofi Bio-Industries, ulvan, cold extract de *Gracilaria* y Pullulan de Sigma.



Figura 4.7. Homogeneizado del polisacárido y equipo de FT-IR empleado con todos sus componentes.

#### 4.3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores representados corresponden a valores medios  $\pm$  desviación estándar de las réplicas realizadas para cada ensayo. Se realizó un contraste de medias mediante una prueba de análisis de varianzas (ANOVA). El nivel de significación fue del 95% ( $\alpha=0.05$ ) en todos los casos. Los tests se realizaron con el programa informático SPSS para MAC OS X. Para comparar las medias, se empleó el test de t-Student, previo test de Levene para asegurar la homogeneidad de varianza. Y el test de Tukey B, en el caso de determinar subconjuntos en función del factor solvente. Para el estudio de los factores (tiempo, solvente, radiación y nutrientes) se realizó un análisis de varianza múltiple, test de Fisher LSD, ( $p < 0.05$ ). Los análisis se realizaron con el programa informático SPSS para MAC OS X y Sigma Plot para PC.

## 4.4. RESULTADOS

### 4.4.1. Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación del contenido de fenoles totales en los extractos hidroalcohólicos de *Halopithys incurva* se llevó a cabo mediante el método Folin-Ciocalteu y dio lugar al contenido de polifenoles en % de peso seco (Tabla. 4.3.). Se encontraron diferencias significativas en el contenido de polifenoles en relación al aporte de nutrientes a los que fue sometida la biomasa valorada ( $p < 0.05$ , test de t-Student) en cambio no se encontraron diferencias significativas respecto a la irradiación. Las muestras evaluadas que presentaron un mayor contenido de fenoles totales fueron los extractos preparados con talos de *Halopithys incurva* cultivada en condiciones de baja irradiación (PAR) y con aporte de N-amonio, siendo el contenido encontrado de  $6.22 \pm 0.04$  % masa seca. En los extractos de *Halopithys incurva* cultivada en condiciones de alta irradiación (PAR+UV) sin aporte de nutrientes y condiciones de baja irradiación (PAR) con aporte de nutrientes se detectaron valores de  $4.90 \pm 0.01$  y  $4.48 \pm 0.02$  de % de masa seca respectivamente. Las muestras con menor contenido de fenoles totales correspondieron a *Halopithys incurva* cultivada en condiciones de irradiación PAR y sin aporte de nutrientes (PAR/ sn),  $3.06 \pm 0.02$  % masa seca.

Tabla 4.3. Contenido de polifenoles totales valorado mediante el método Folin Cicaulteau en extractos hidroalcohólicos de *Halopithys incurva* procedente de distintas condiciones de cultivo expresado como % de peso seco,  $n=3 \pm DE$ . Sin aporte de nutrientes (sn).

Condiciones de cultivo		Compuestos fenólicos totales (%peso seco)
Irradiación	Nutrientes	
PAR (interior)	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ , $\text{PO}_4^- \text{-P}$	$6.22 \pm 0.04$
	sn	$3.06 \pm 0.02$
PAR+UV (exterior)	$\text{NH}_4^+ \text{-N}$ , $\text{PO}_4^- \text{-P}$	$4.48 \pm 0.02$
	sn	$4.90 \pm 0.01$

### 4.4.2. Identificación y caracterización de polifenoles

La cromatografía líquida de alta resolución permitió el análisis detallado del contenido de los extractos de *H.incurva*. La identificación de los picos cromatográficos fue posible tras el paso por la columna Sphereclone C8 de los extractos analizados (Fig. 4.9). Los fenoles detectados en los tres tipos de extractos, metanólico, etanol /agua (1/1) y acuoso, se caracterizaron por su absorción UV máxima a 270nm con un hombro al 285 nm, deducida de la detección

de espectros UV y visible. El análisis de los perfiles cromatográficos de los extractos permitieron apreciar algunas diferencias significativas. Los cromatogramas no mostraron diferencias en función de los diferentes tratamientos de cultivo y solvente en tiempos de retención ni espectros de absorbancia, pero se encontraron diferencias en las áreas de pico obtenidos.

Cada patrón fue probado individualmente con el fin de determinar su tiempo de retención (RT), las diferencias detectadas en el RT de las muestras patrón fueron determinantes para la identificación de los compuestos resultantes en los extractos analizados. Se analizaron cinco compuestos fenólicos comerciales, umberiferona (RT: 7.11 min), cumarina (RT: 3.2 min), 4 -hidroxicumarina (RT: 2.7 min), floroglucinol (RT: 25.0 min) y pirogalol (RT:2.7 min).

En la Fig. 4.8 se muestra la correcta separación del pirogalol. Cada análisis por HPLC se realizó utilizando volúmenes idénticos de inyección y concentración, siendo así los cromatogramas directamente comparables. Los cambios en los tiempos de retención son principalmente notables para los compuestos comerciales comparativos, a excepción de la 4-hidroxicumarina y el pirogalol que mostraron TR similares a los extractos.

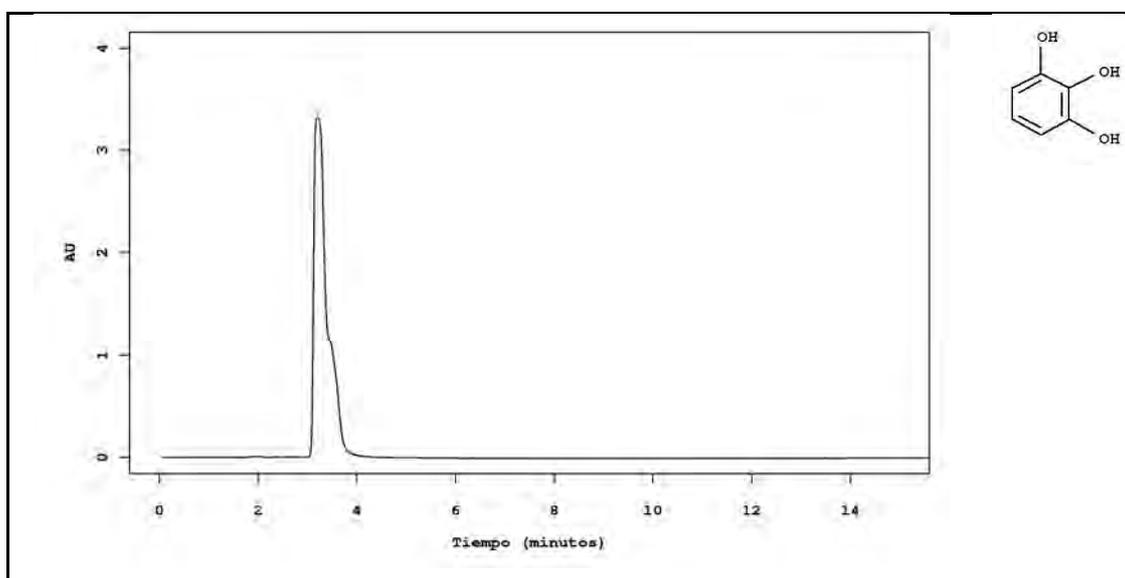


Figura 4.8. Cromatograma correspondiente al pirogalol.

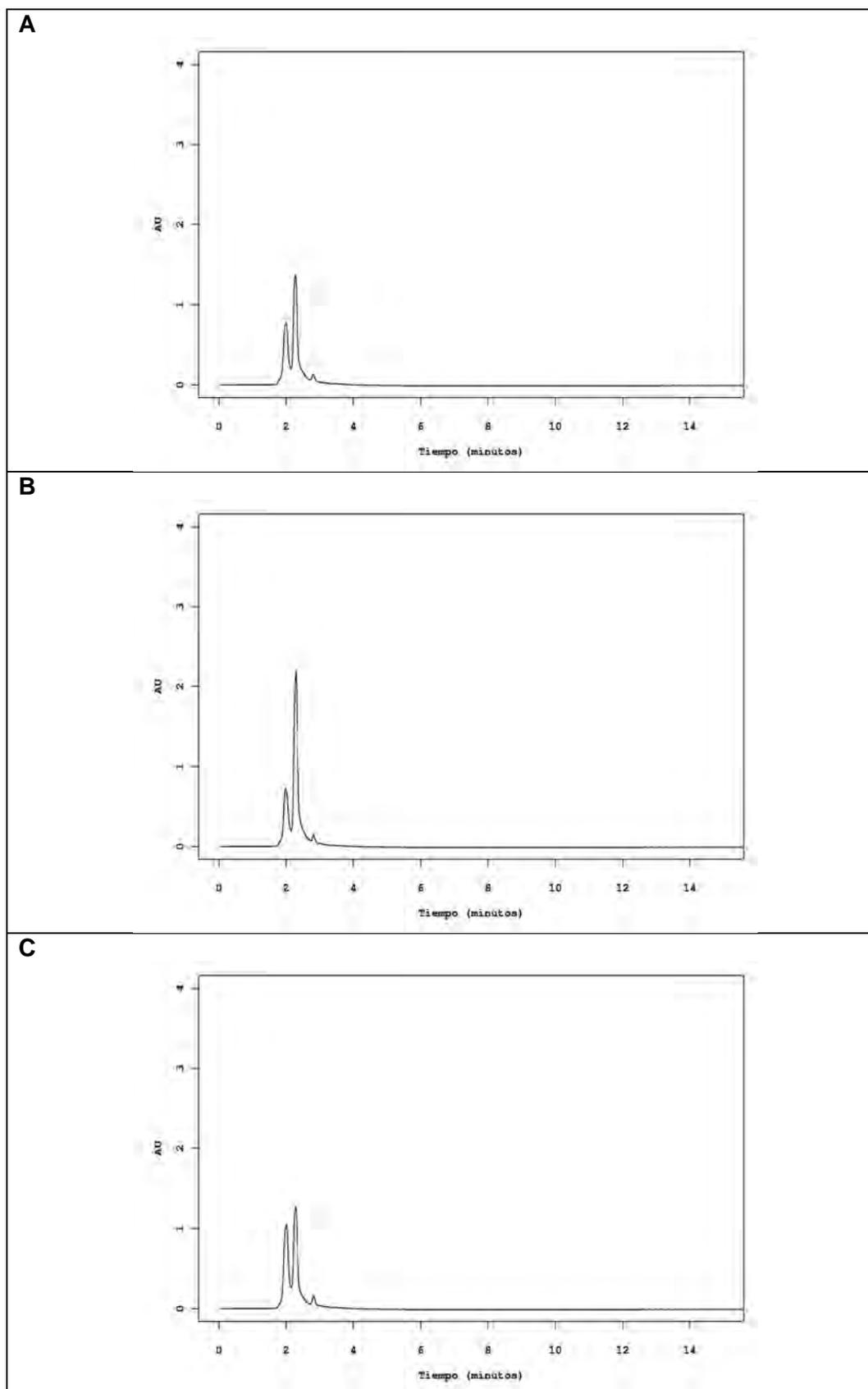


Figura 4.9. Cromatogramas de los extractos de *Halopithys incurva* en los diferentes solventes estudiados. Siendo el cromatograma correspondiente al extracto acuoso (A), al extracto hidroalcohólico (B) y al extracto metanólico (C).

Los rendimientos detectados de los diferentes extractos de *Halophytis incurva* se presentan en la Tabla 4.4. Estos resultados muestran diferencias significativas en la concentración detectada en función de las diferentes condiciones de cultivo. El orden de los rendimientos de mayor a menor fue: etanol: agua (1:1)>agua>metanol.

Tabla 4.4. Concentración de pirogalol en *Halophytis incurva* en muestras de diferentes condiciones de cultivo y diferentes solventes de extracción, expresada en mg·g<sup>-1</sup> PS, (medias ± desv, n=3). Baja irradiación, interior (PAR), alta irradiación, exterior (PAR+UV), efluentes de cultivo (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), agua de mar sin nutrientes (sn). Las letras indican las diferencias significativas (p<0.05, ANOVA, test de Tukey B).

Solventes	Condiciones de cultivo		mg Pirogalol·g <sup>-1</sup> PS
	Irradiación	Nutrientes	
Agua destilada	PAR (interior)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> -P	8.29±0.14 <sup>d</sup>
		sn	6.94±0.13 <sup>c</sup>
	PAR+UV (exterior)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> -P	4.58±1.89 <sup>c</sup>
		sn	6.94±0.20 <sup>c</sup>
ETOH50%	PAR (interior)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> -P	23.15±0.33 <sup>f</sup>
		sn	18.62±0.32 <sup>e</sup>
	PAR+UV (exterior)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> -P	21.89±0.44 <sup>e</sup>
		sn	20.04±0.11 <sup>e</sup>
METOH	PAR (interior)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> -P	3.64±0.16 <sup>a</sup>
		sn	5.03±0.74 <sup>b</sup>
	PAR+UV (exterior)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N , PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> -P	-
		sn	5.77±0.34 <sup>b</sup>

La mayor concentración de pirogalol se determinó en los extractos ETOH50% preparados a partir de la biomasa de *H.incurva* cosechada en condiciones de baja irradiación (PAR) con aporte de nutrientes (p<0.05, ANOVA, test de Tukey B) a los 28 de cultivo. En cambio las concentraciones más bajas correspondieron a los extractos metanólicos preparados con biomasa de *H.incurva* en iguales condiciones de irradiación (PAR) y con aporte de nutrientes.

La realización de los análisis RNM en los extractos hidroalcohólicos estudiados permitió la obtención de señales que dieron prueba de la existencia de anillos aromáticos en los extractos de *H. incurva*. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.10. en representación de los cromatogramas obtenidos, ya que no se detectaron diferencias entre los distintos tratamientos de cultivo.

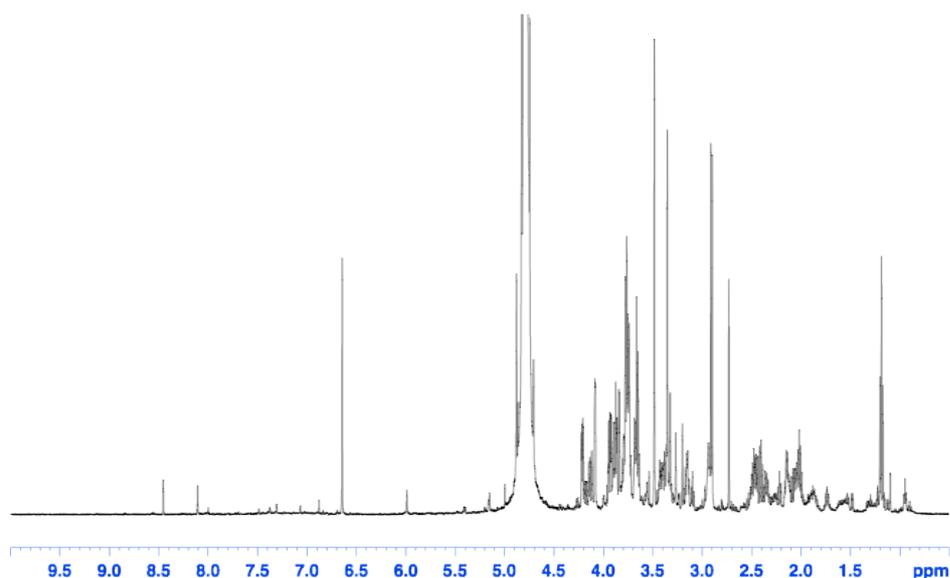


Figura 4.10. Muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de un extracto hidroalcohólico de *H. incurva*.

#### 4.4.3. Contenido en polisacáridos ácidos

El contenido de polisacáridos ácidos precipitados obtenidos de *Halopithys incurva* no varió significativamente ( $p < 0.05$ ) en función de aporte de nutrientes, sí en cambio en respuesta a las dos condiciones de irradiación, condiciones de radiación (PAR) y (PAR+UV) tal y como se observa de manera resumida en la Figura 4.11. En general, el contenido de polisacáridos ácidos obtenido fue muy bajo. Los tanques de cultivo de *Halopithys incurva* fueron muestreados los 7 y 28 días, en el que las algas recibían el agua del efluente (alto aporte de N-amonio) y a los 42 días, fecha en la que llevaban 2 semanas sólo recibiendo agua de mar (sin aporte de nutrientes). El muestreo se realizó en ambas condiciones de irradiación así como en los cultivos control (interior y exterior sólo con aporte de agua de mar 42 días) para poder ser comparados. Tras una semana de cultivo se observó una clara influencia de la irradiación sobre el contenido en polisacáridos ácidos. Tanto para los cultivos en agua de mar como para los cultivos con aporte de nitrógeno, se observó un mayor contenido en polisacáridos ácidos bajo condiciones de alta irradiación que en baja irradiación (Fig. 4.11).

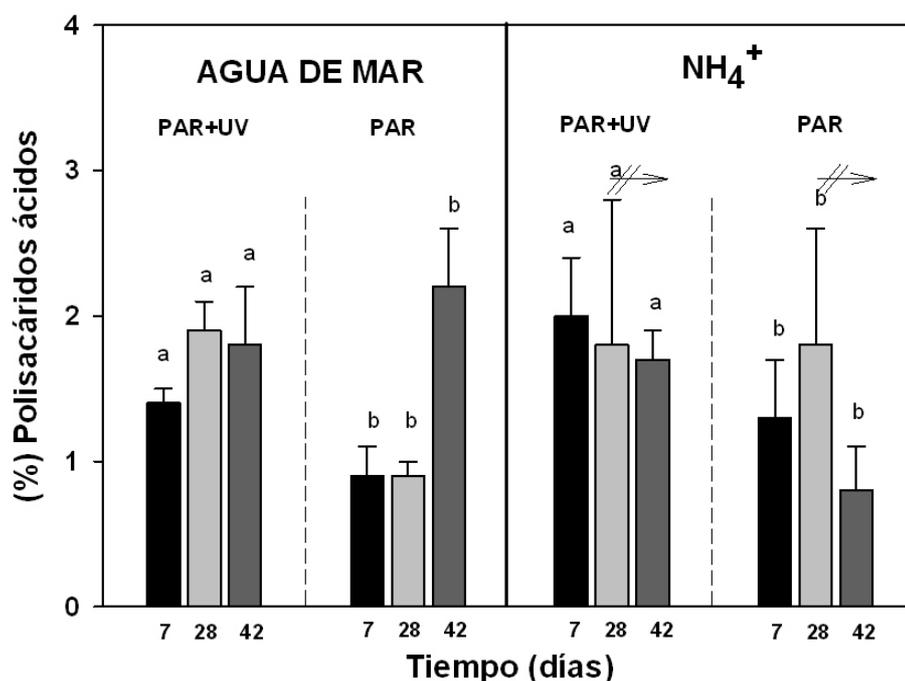


Figura 4.11. Contenido de polisacáridos ácidos obtenidos de *Halophytis incurva* cultivada bajo diferentes condiciones. Donde ■ corresponde a muestras cosechadas a los 7 días de cultivo, □ corresponde a muestras cosechadas a los 28 días de cultivo y ▒ corresponde a muestras cosechadas a los 42 días de cultivo. En el caso del tratamiento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> al los 28 días las algas fueron transferidas a agua de mar, interrupción del aporte de N (↘). Las letras indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA, test de Fisher, LSD).

A las cuatro semanas de cultivo se mantuvo este patrón solo en algas crecidas dentro del invernadero (PAR) sin embargo el contenido fue similar independiente de la disponibilidad de nitrógeno en algas cultivadas bajo radiación solar fuera del invernadero (PAR+UV). En general se observa una acumulación mayor de polisacáridos en algas crecidas fuera del invernadero con mayor irradiación y presencia de radiación UV comparada con las algas crecidas dentro del invernadero, especialmente acusado en cultivos con agua de mar. Al cortar la entrada de N- amonio (muestras correspondientes al día 42), el contenido de polisacáridos se mantuvo en algas crecidas en alta irradiación solar (PAR+UV) pero disminuye drásticamente ( un 56%) en algas crecidas en irradiación PAR. Las algas crecidas en agua de mar sin nutrientes, fuera del invernadero (PAR+UVR) mantuvieron el contenido de polisacáridos a los 42 días comparado a los 28 días, sin embargo las que se encontraban dentro del invernadero acumularon drásticamente polisacáridos a los 42 días de forma no esperada. Es decir aumentó de manera significativa un 59.1 % respecto a los 7 días de cultivo.

Tabla 4.5. Análisis de varianza múltiple de los factores (tiempo, luz y nutrientes), test de Fisher LSD, ( $p < 0.05$ ) que afectan al contenido de polisacáridos ácidos.

FACTORES	GL	F	P
TIEMPO	2	0.915	0.913
IRRADIACIÓN	1	6.165	0.029
NUTRIENTES	1	2.050	0.178
TIEMPO x IRRADIACIÓN	2	0.152	0.861
TIEMPO x NUTRIENTES	2	0.592	0.569
IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	1	1.550	0.237
TIEMPO x IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	2	0.465	0.639

#### 4.4.4. Análisis Infrarrojo de polisacáridos ácidos

Los espectros infrarrojos analizados mediante FT-IR de la fracción de polisacárido ácido de *Halophytis incurva* cultivada bajo cuatro condiciones diferentes se presentan en la Figura 4.13. Estos espectros no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de cultivo ( $p < 0.05$ ). El análisis estructural de los espectros obtenidos como resultado se basó principalmente en la interpretación de las bandas observadas a 2918, 2850, 1654, 1379, 1267, 950, 925 y a 719  $\text{cm}^{-1}$ , pero también se tuvo en cuenta la detección de otras bandas. Las bandas de absorción a 3444 y 2918  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la vibración del enlace O-H, del asociado por puentes de hidrógeno y al estiramiento C-H, respectivamente. La banda a 2850 se asocia con  $\text{CH}_2$  mientras que la banda a 1471  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a las vibraciones de los enlaces del grupo carboxilo de ácido. También se observan bandas a 1379 y 1267  $\text{cm}^{-1}$  atribuidas a los grupos sulfatos (S=O) que es corroborada con la banda de 611  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 2850 se asocia con  $\text{CH}_2$  mientras que la banda a 1471  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a las vibraciones de los enlaces del grupo carboxilo de ácido. También se observan bandas a 1379 y 1267  $\text{cm}^{-1}$  atribuidas a los grupos sulfatos (S=O) que es corroborada con la banda de 611  $\text{cm}^{-1}$ . La señal observada a los 1082  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 4.12), bastante ancha, es atribuida a la vibración de los enlaces hemiacetálicos del anillo de azúcar. La banda a 950  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con grupos sulfatos y la banda a 925  $\text{cm}^{-1}$  normalmente es atribuida a 3,6- anhidro-galactosa, detectadas a baja intensidad. Mientras que a 786 y 719  $\text{cm}^{-1}$  el espectro infrarrojo muestra dos bandas probablemente debido a un sulfato en la posición C-4 de galactosa.

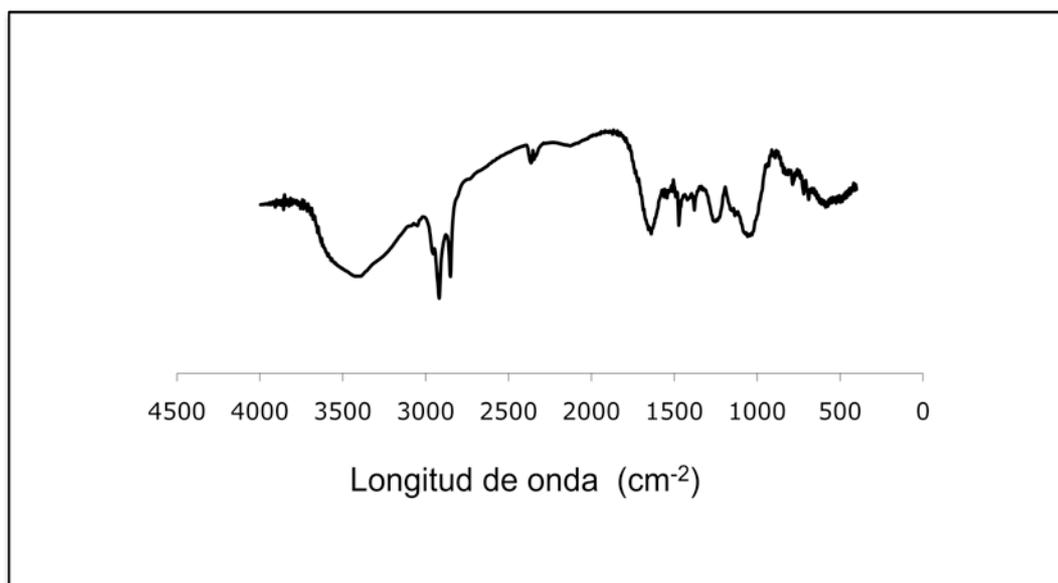


Figura 4.12. Espectro infrarrojo completo obtenidos mediante FT-IR de las fracciones de polisacáridos ácidos aislados de *Halopithys incurva*, en el que se representa la transmitancia en bandas entre 0 y 4500  $\text{cm}^{-1}$ .

Además, se llevó a cabo tal y como se muestra (Fig. 4.13) el análisis de polisacáridos conocidos. En todas ellos se observaron bandas características entre 1200 y 520 $\text{cm}^{-1}$ , los espectros del ácido algínico y pullulan (Fig. 4.13. A,E) mostraron una banda a 1750  $\text{cm}^{-1}$  atribuida a enlaces C-C. El espectro correspondiente al ulvan (Fig. 4.13. B) mostró una banda a 845  $\text{cm}^{-1}$ , estas vibraciones representan enlaces -C-O-S aunque no a 1270 $\text{cm}^{-1}$  lo que corroboraría su presencia.

En el espectro de kappa carragenato (Fig. 4.13. E) destacar vibraciones a 830  $\text{cm}^{-1}$  y 820  $\text{cm}^{-1}$  (galactosa -6-sulfato y galactosa -2-sulfato) y a 805 $\text{cm}^{-1}$  que identifican a 3,6- anhydro-galactosa-2-sulfato). El cold extract (Fig. 4.13. D) mostró una banda ancha y pronunciada a 930  $\text{cm}^{-1}$  que evidencia la presencia de 3,6-anhydro-galactosa.

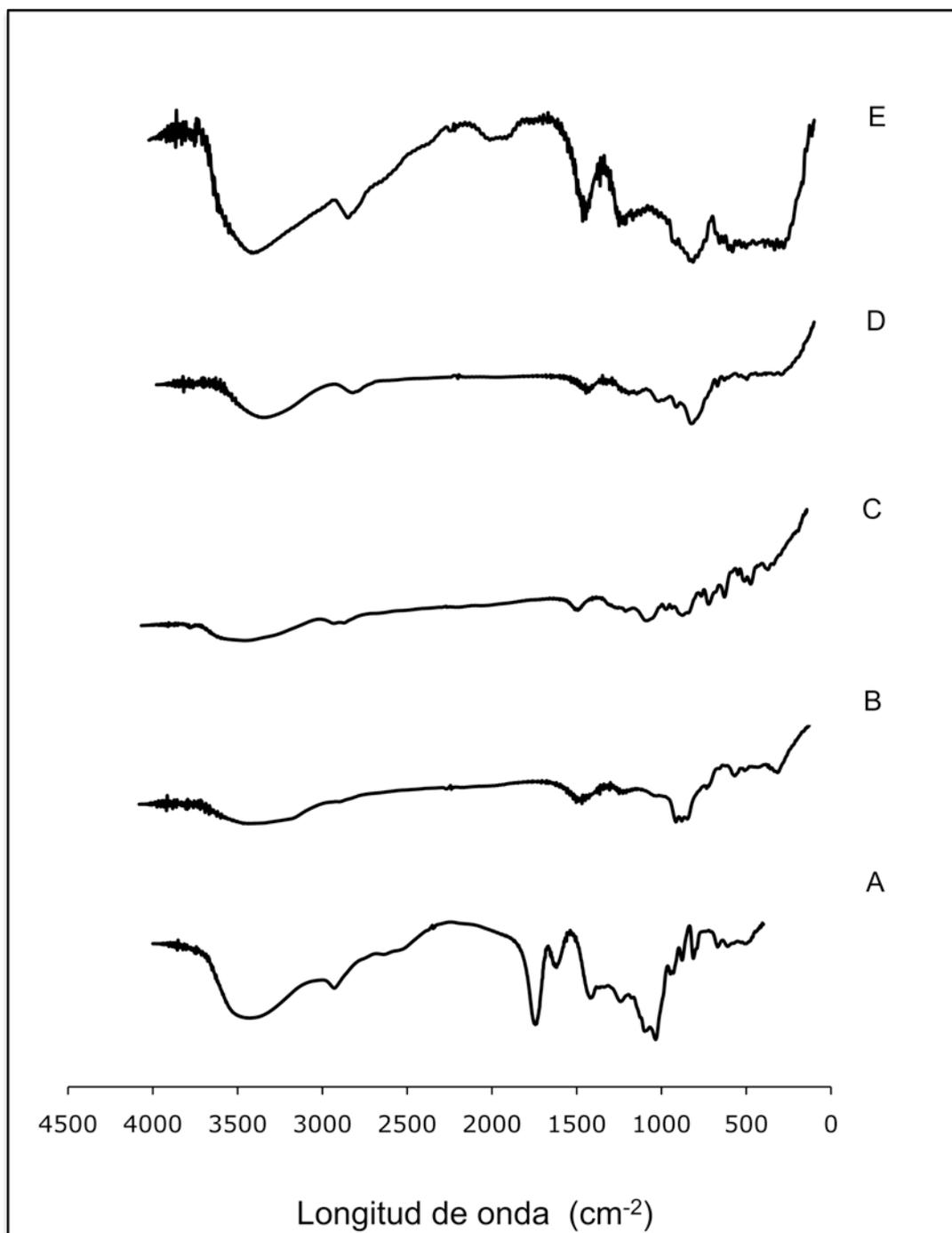


Figura 4.13. Espectros infrarrojos obtenidos mediante FT-IR de polisacáridos comerciales. Donde se representan el ácido alginico (A), ulvan (B), kappa carragenato (C), cold extract (D) y pullulan (E).

#### 4.4.5. Composición de aminoácidos tipo micosporina (MAAs)

La concentración de MAAs totales es mayor en los tratamientos con agua de mar que en aquellos con aporte de efluente de piscifactoría (alto contenido en  $\text{NH}_4^+$ ) (Fig. 4.15). Entre los días 28 y 42 se produce un aumento de MAAs en las algas crecidas fuera del invernadero (PAR+UVR). Este aumento fue más evidente en algas cultivadas en agua de mar que en algas que habían sido transferidas de cultivo en efluentes ( $\text{NH}_4^+$ ) a agua de mar. La acumulación de MAAs en algas crecidas dentro del invernadero (PAR) es significativamente menor que aquellas crecidas fuera (PAR+UVR), ( $p < 0.05$ , test de Fisher LSD). El contenido de MAAs fue bajando a lo largo del tiempo en algas crecidas dentro del invernadero (PAR) sin embargo el contenido se mantuvo si se aportaba amonio (efluentes) para bajar cuando se corta este aporte a partir del día 28.

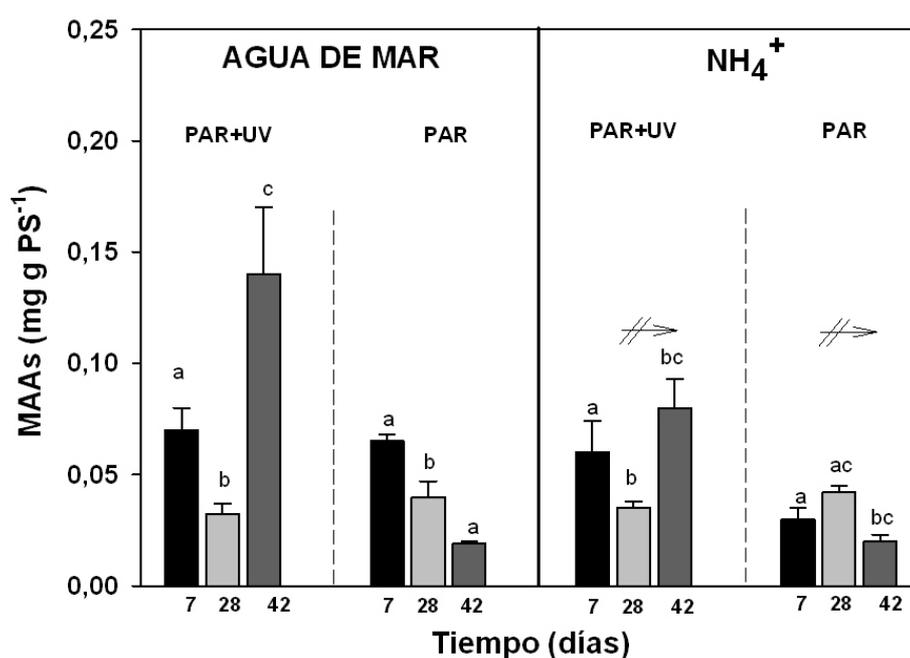


Figura 4.15. Concentración de MAAs totales detectado en *Halopithys incurva* cultivada bajo diferentes condiciones. Donde ■ corresponde a muestras cosechadas a los 7 días de cultivo, □ corresponde a muestras cosechadas a los 28 días de cultivo y ▒ corresponde a muestras cosechadas a los 42 días de cultivo. En el caso las algas que reciben el tratamiento de  $\text{NH}_4^+$  a los 28 días éstas fueron transferidas a agua de mar, cesando el aporte de N (↗).

Tabla 4.6. Análisis de varianza múltiple de los factores (tiempo, luz y nutrientes), test de Fisher LSD, ( $p < 0.05$ ) que afectan al contenido de MAAs.

FACTORES	GL	F	P
TIEMPO	2	26.795	<0.001
IRRADIACIÓN	1	104.415	<0.001
NUTRIENTES	1	13.116	0.004
TIEMPO x IRRADIACIÓN	2	75.514	<0.001
TIEMPO x NUTRIENTES	2	5.001	0.026
IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	1	0.771	0.397
TIEMPO x IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	2	11.387	0.002

Los resultados de los análisis en relación al contenido en MAAs mostraron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de shinorine en *Halopithys incurva* los 28 días de cultivo dentro del invernadero (baja irradiación), pero este incremento que sí dependió de la irradiancia, fue independiente de la concentración de nutrientes en el medio (Fig. 4.16, Tabla 4.7.).

Este incremento significativo del porcentaje de shinorine coincidió con una caída de porphyra-334 y palythine. Por lo tanto, parece ser que frente a irradiancias inferiores se acumula preferentemente shinorine. Sin embargo, tras dos semanas sin agua de mar (a los 42 días) los porcentajes vuelven a igualarse con los de las semanas 1 (7 días) y 4 (28 días). Las algas cultivadas fuera del invernadero (PAR+UV) tienen proporcionalmente más palythine que las algas que crecen en el interior (PAR). Además se encontraron diferencias significativas en función del aporte de nutrientes ( $p < 0.05$ ).

En cambio el contenido de shinorine a los 28 días de cultivo proporcionalmente fue alta en algas que crecen dentro invernadero (PAR) tanto alto aporte de N-amonio como en agua de mar. Por último, destacar que los tres factores (tiempo, irradiación y nutrientes) afectan al contenido exhibido de porphyra-334 en *H.incurva* tal y como reveló el análisis estadístico (test de Fisher LSD,  $p < 0.05$ ).

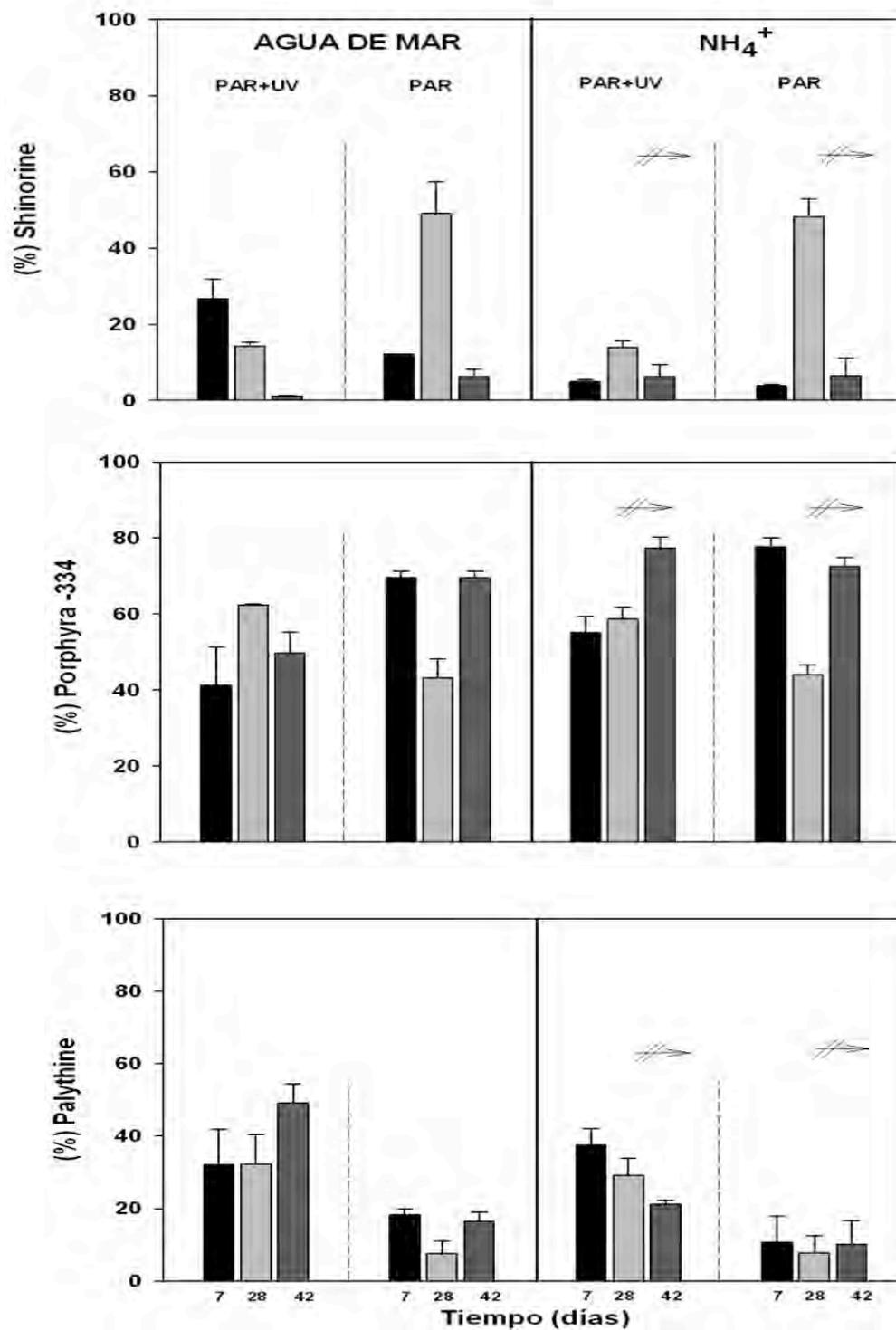


Figura 4.16. Porcentaje de cada MAA detectado en *Halopithys incurva* cultivada en agua de mar y con aporte de efluente de piscifactoria hasta los 28 días. Donde  corresponde a muestras cosechadas a los 7 días de cultivo,  corresponde a muestras cosechadas a los 28 días de cultivo y  corresponde a muestras cosechadas a los 42 días de cultivo. En el caso del tratamiento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a los 28 días las algas fueron transferidas a agua de mar, cesando el aporte de N (↗).

## Capítulo IV

Tabla 4.7. Análisis de varianza múltiple de los factores (tiempo, luz y nutrientes), test de Fisher LSD, ( $p < 0.05$ ) que afectan al contenido de las MAAs cuantificadas (Shinorine, Porphyra-334 y Palythine).

MAAs	FACTORES	GL	F	P
Shinorine	TIEMPO	2	44.966	<0.001
	IRRADIACIÓN	1	22.583	<0.001
	NUTRIENTES	1	3.284	0.095
	TIEMPO x IRRADIACIÓN	2	26.088	<0.001
	TIEMPO x NUTRIENTES	2	3.297	0.072
	IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	1	1.417	0.257
	TIEMPO x IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	2	1.670	0.229
Porphyra-334	TIEMPO	2	15.962	<0.001
	IRRADIACIÓN	1	8.476	0.013
	NUTRIENTES	1	11.228	0.006
	TIEMPO x IRRADIACIÓN	2	23.038	<0.001
	TIEMPO x NUTRIENTES	2	3.222	0.076
	IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	1	2.408	0.147
	TIEMPO x IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	2	1.463	0.270
Palythine	TIEMPO	2	2.775	0.102
	IRRADIACIÓN	1	67.720	<0.001
	NUTRIENTES	1	8.496	0.013
	TIEMPO x IRRADIACIÓN	2	0.0343	0.966
	TIEMPO x NUTRIENTES	2	5.808	0.017
	IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	1	1.641	0.224
	TIEMPO x IRRADIACIÓN x NUTRIENTES	2	5.003	0.026

### 4.4.6. Análisis de correlación

La correlación entre las diferentes sustancias estudiadas, fenoles, MAAs y polisacáridos ácidos es muy baja y/o negativa y como muestran los resultados (Tabla 4.8.). Siendo significativa entre MAAs y palythine ( $p < 0.01$ ) así como entre porphyra-334 y shinorine ( $p < 0.01$ ). El nivel de significancia entre palythine y shinorine ( $p < 0.05$ ) y entre polisacáridos ácidos y palythine fue de ( $p < 0.05$ ).

Tabla 4.8. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables indicadas.

	PF	MAAS	%Shino	%Porph	%Paly	PA
PF	1					
MAAs	-0.309	1				
%Shino	0.143	-0.252	1			
%Porphy	0.148	-0.257	<b>-0.695**</b>	1		
%Paly	-0.371	<b>0.562**</b>	<b>-0.430*</b>	-0.319	1	
PA	0.179	0,270	-0.268	-0.035	<b>0.421*</b>	1

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral).

\* . La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

#### 4.5. DISCUSIÓN

Con el fin de correlacionar los datos de actividad biológica con la presencia de las moléculas presentes en los extractos de talos de *Halopithys incurva* (Ceramiales) procedentes de diferentes tratamientos de cultivo, se han llevado a cabo diversos análisis tanto a nivel cuantitativo como cualitativo de dichos extractos. La cuantificación e identificación de los componentes de las macroalgas ha despertado un gran interés por su importancia, relacionada principalmente con la actividad biológica detectada en éstas. El primer objetivo que nos planteamos, mostró como resultado las diferencias significativas en el contenido en fenoles totales en extractos elaborados con algas cultivadas en diferentes condiciones, siendo en alto aporte de nitrógeno y baja irradiación donde se detectó el mayor contenido de fenoles totales. No se han encontrado trabajos con los que comparar los resultados obtenidos en las diferencias en el contenido de polifenoles en cultivo. Este resultado lo consideramos de gran interés por ser la primera vez que se determina. Se han expuesto resultados en relación al alto contenido de polifenoles en algas rojas perteneciente al orden Ceramiales (Zubia et al., 2009). También está descrito entre poblaciones naturales en algas pardas, los cambios en el contenido de florotaninos, influenciados no solo por la concentración de nutrientes, si no que estos niveles también pudieron variar como respuesta a otros factores ambientales como la salinidad, la disponibilidad de luz, la radiación ultravioleta y la presión de herbivoría (Targett y Arnold, 1998; Amsler y Fairhead, 2006; Jormalainen y Honkanen, 2008). En este último sentido tratando de entender estas variaciones intraespecíficas, estudios realizados por Pavia *et al.*, (1997), Pavia *et al.*, (1999) y Pavia y Brock (2000) han demostrado que un incremento de la radiación UV induce cambios en la producción de polifenoles en la especie *Ascophyllum nodosum*. Según estos estudios los florotaninos pueden actuar como pantalla frente a los efectos dañinos de la radiación UV. Incluso aunque la absorción máxima de los florotaninos es a una longitud de onda entre 260 y 280nm menor que la radiación UV en la superficie de la Tierra (295-400 nm) los fenoles también absorben en longitudes de onda más largas dentro de la banda de UV (280-400 nm). En estos mismos ensayos se estudió la relación entre la disponibilidad de nitrógeno con el contenido de florotaninos no observando ninguna relación. En cambio de acuerdo nuestros resultados, *Halopithys incurva* presentó diferencias influenciadas por el aporte de nutrientes, el contenido de fenoles incrementó con el aporte de amonio por los efluentes de peces (alto contenido de N-amonio), sin embargo al contrario

de lo esperado, este incremento fue menor por radiación UV y solo se produjo en algas cultivadas en agua de mar. Así el nitrógeno y la radiación UV no tiene efecto sinérgicos positivos como el caso de MAAs de algas rojas (Korbee et al., 2005), si no más bien lo contrario, se encuentra un efecto antagónico.

La respuesta al nitrógeno de esta especie también es contraria a la esperada en el caso de los MAAs. El contenido de MAAs en *H. incurva* resultó mayor en algas cultivadas en agua de mar que en efluentes. El amonio podría resultar negativo sobre la actividad fotosintética y a su vez sobre la acumulación de metabolitos secundarios como son los polifenoles y MAAs a las concentraciones que se dan en los efluentes de piscifactorías. De hecho Figueroa et al. (2008) encuentra que a altos flujos de amonio (por encima de 200  $\mu\text{M}$ ), el rendimiento de la biomasa de *Asparagopsis armata* aumenta pero no se acumulan MAAs. Estos resultados podrían también responder a la naturaleza de la estructura fenólica presente en esta especie y a los tratamientos empleados. En el caso del vino se ha demostrado que la composición fenólica está influenciada por diferentes factores: la variedad de uva, la ubicación viña, sistema de cultivo, clima, tipo de suelo, las prácticas de cultivo de la vid, tiempo de cosecha, proceso de producción y el envejecimiento (Shahidi y Naczki, 1995).

El análisis cualitativo de los polifenoles se ha realizado mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) comparándolos simultáneamente con estándares conocidos (cumarina, umbelliferona, pirogalol) una de las técnicas más utilizada para la caracterización de estos compuestos. La utilización del detector de multi fotodiodos facilita la detección de estos compuestos, al utilizar de forma conjunta el tiempo de retención y el espectro ultravioleta para la identificación de los picos (Bartolomé et al., 1993). Esta técnica permitió la separación, aislamiento e identificación del compuesto fenólico pirogalol en *Halopithys incurva*. La presencia y caracterización de polifenoles en extractos preparados mediante solventes de distinta polaridad (acuoso, metanólicos e hidroalcohólicos) fue confirmada por comparación de sus tiempos de retención y los espectros de UV con los de los compuestos estándar. La composición de fenoles determinada está afectada por el solvente empleado como ha demostrado López et al. (2011) en el alga parda *S. Scoparium*. De los resultados obtenidos puede concluirse que cada extracto mostró la presencia de pirogalol en concentraciones diferentes. En este análisis, el pirogalol fue cuantificado en mayor concentración en los extractos hidroalcohólicos encontrando diferencias significativas respecto a la concentración detectada en extractos metanólicos y acuoso pero también en función de las

condiciones de cultivo. Concretamente, las algas que recibieron aporte de amonio y fueron cultivadas en condiciones de menor irradiancia solar y sin la presencia de la radiación UV (tratamiento PAR dentro del invernadero) mostraron un contenido significativamente superior que las cultivadas en el resto de las condiciones. Los perfiles cromatográficos no mostraron diferencias significativas entre *Halopithys incurva* cultivada en medio con alto aporte de nutrientes (N-amonio) y el tratamiento control (agua demar) en relación a los tiempos de retención. Así el enriquecimiento de nutrientes no parece producir cambios cualitativos en la composición de fenoles. Sin embargo, existe la posibilidad de que el perfil no incluye los florotaninos que aumentan junto con el nivel de nutrientes. La concentración de polifenoles osciló entre 30.6 y 62.2 mg g<sup>-1</sup> PS, mientras que las concentraciones detectadas de pirogalol dependiendo del extracto analizado y del cultivo procedente oscilaron entre 3.6 y 24.9 mg de pirogalol g<sup>-1</sup> PS, lo cual nos indica que hay una parte del contenido de polifenoles sin identificar en las muestras analizadas. López et al. (2011), observan un resultado similar al analizar los polifenoles de *S.scoparium*. Algunos compuestos pueden permanecer sin ser detectados o insuficientemente representados en la cromatografía líquida de alta afinidad, como ya se ha discutido, debido a su baja respuesta a la radiación UV en relación a la concentración, la estructura molecular grande, la superposición de isómeros, o una polaridad inadecuada para la determinación cromatográfica (Adamson et al, 1999;. Lázaro et al, 1999). Hasta el momento existen pocos trabajos disponibles en la caracterización de polifenoles mediante técnicas de HPLC a partir de algas en general, y tampoco hemos encontrado trabajos sobre algas rojas al respecto para comparar los resultados obtenidos. El presente análisis no dio evidencia de moléculas de florotaninos en nuestras muestras. Este hallazgo apoya la sugerencia hecha por Ragan y Glombitza (1986), que los florotaninos son un grupo fenólico exclusivo en las algas pardas. Entre las principales clases estructurales de compuestos fenólicos marinos aislados hasta el momento en la división Rodophyta, podemos citar a los bromofenoles (Ragan y Glombitza, 1986) estructuralmente diferentes de los taninos en algas verdes y pardas. El bromofenol C-7-hidroxicilo ha sido detectadas exclusivamente en especies del orden Ceramiales. El más distribuido en todos ellos es el 2,3-dibromo-4,5- dihidroxibenzyl alcohol (lanosol) que también ha sido detectado en algas pardas. Los métodos químicos para el análisis de polifenoles en estudios ecológicos fueron revisados hace dos décadas (Ragan y Glombitza, 1986). A partir de entonces, rara vez han sido publicados métodos químicos adicionales para investigar sobre polifenoles.

La falta de métodos de análisis más sofisticados se debe principalmente a la reactividad y polaridad de los mismos (Amsler y Fairhead, 2006). Pero la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, ha traído consigo la necesidad de comparar distintos solventes de extracción para su identificación y cuantificación (Parys et al., 2007). Está abordado en la literatura que el rendimiento de extracción química de los fenoles depende del tipo de disolventes con diferentes polaridades, pH, tiempo de extracción y la temperatura, así como en las composiciones químicas de los muestra. En las mismas condiciones de tiempo y temperatura, el solvente y las propiedades químicas de la muestra son dos de los factores más importantes que contribuyen a la obtención de mayor contenido en estos compuestos. Dado que no existe un protocolo único para la extracción de taninos de material vegetal, los solventes utilizados para los taninos son muy variables (Hagerman, 1988). Los más utilizados para extraer polifenoles han sido mezclas acuosas de etanol y acetona tanto en algas rojas como pardas (Ragan y Glombitza, 1986; Zubia et al., 2007). Pero los cambios en la polaridad del disolvente pueden alterar su capacidad de disolver un grupo seleccionado de compuestos antioxidantes. En uno de los pocos trabajos recientemente publicado el extracto etanólico del alga parda *S. Scoparium* mostró tener ácido gálico (tanino hidrolizable como el pirogalo) en menor concentración (López et al. 2011).

Estos resultados nos lleva a plantearnos si además de la polaridad de los solventes el tipo de pared celular característico de los diferentes phylum (en algas pardas alginatos y en algas rojas galactanos) puede interferir en el rendimiento de extracción incluso en las estructuras de los polifenoles extraídos. Los posibles vínculos entre la pared celular (ácido algínico) de las algas pardas y florotaninos son el enlace éster y el enlace hemiacetal, los cuales son enlaces covalentes, lo que exige fuertes condiciones para degradar la pared. En los galactanos el enlace principal es de tipo glucosídico. Estas características pueden causar dificultades tanto en HPLC y análisis de RMN. La gran complejidad de los resultados encontrados mediante el análisis RMN fue debido a que los extractos valorados no están compuestos por un material homogéneo sino que se trata de extractos crudos. Por tanto la presencia de Br, I y otros halógenos, en las moléculas, que pueden provocar un cambio en la posición de los cambios de protones, pero para ello es necesario completar los estudios con la espectroscopia de masas y la dosificación de las sustancias estudiadas. En cambio, los resultados de RMN permitieron corroborar la presencia de anillos aromáticos en los extractos,

estructura básica de los fenoles. La utilización de estas técnicas como método de identificación y de cuantificación de los fenoles presentes en los extractos presentaron el problema añadido de la falta de disponibilidad de patrones de fenoles de algas rojas con los que comparar tiempos de retención y áreas.

En relación a los polisacáridos ácido, el cese de los aportes de  $\text{NH}_4^+$  a los 28 días no dio lugar a un aumento significativo de la concentración de polisacáridos aunque el hecho de que disminuyera en condiciones de menor irradiancia y ausencia de UV (dentro del invernadero) y se mantuviera en algas crecidas fuera del invernadero (PAR+UVR) sugiere que tienden hacia la ruta del carbono en ausencia de nutrientes, presencia de UV y dosis más altas de PAR. Mientras que el contenido de polisacáridos ácidos de las algas cultivadas fuera del invernadero (PAR+UVR) se mantienen similar en agua de mar como en cultivos con efluentes (alto amonio). Por tanto, la hipótesis del contenido de polisacáridos no se ha validado ya que el contenido han sido muy bajos en los distintos tratamientos de cultivo y tanto en las muestras cultivadas con aporte y sin aporte de  $\text{NH}_4^+$ .

Este comportamiento es diferente al descrito en otras algas rojas, ya que cuando existe rápido crecimiento se espera una baja acumulación, atribuible a que en un medio rico en nutrientes, el carbono producido en la fotosíntesis y que entra al ciclo de Krebs, es destinado principalmente a la síntesis de compuestos precursores de aminoácidos y en menor medida a la biosíntesis de carbohidratos (Raven, 1974; Neish et al.; 1977, DeBoer, 1979). No obstante el hecho de que el contenido de polisacáridos sea mayor en algas cultivadas fuera del invernadero nos puede indicar que la radiación UV puede estar provocando estrés como bajada de la actividad fotosintética y en consecuencia se produzca una acumulación de carbohidratos a costa de disminuir la tasa de crecimiento. Algunos trabajos de carragenofitas apuntan a una variación estacional en el rendimiento atribuida a condiciones ambientales tales como la temperatura y la salinidad (Fogg 1964; Neish y Shacklock, 1971; Dawes et al., 1977a; Zertuche-Gonzalez, 1988). Si bien está reconocido y avalado por numerosos trabajos que los principales nutrientes requeridos por las algas en mayor concentraciones son el nitrógeno (N) y fósforo (P) comparados con el resto (micronutrientes y elementos traza) (Lobban & Harrison 1994, véase cuadro 5.1) y por lo tanto suelen ser los factores limitantes para la productividad (Ryther y Dunstan, 1971), el efecto de los nutrientes en macroalgas se rige por relaciones de captación de algas, la asimilación, almacenamiento y liberación de N (Hanisak, 1983). La tasa de adquisición de las diferentes formas de N está influenciada por las condiciones ambientales

incluyendo la luz y la temperatura (Lapointe y Ryther, 1978; Valiela, 1984). Así como la asimilación de las diversas formas de N por las algas depende de la concentración de cada forma en el agua circundante, aunque el N-amonio es la forma más fácil de asimilación de N para la mayoría de las especies de macroalgas, en el agua de mar está presente en una concentración mucho más baja que el  $\text{NO}_3^-$  (Hanisak, 1983). Tras carencias de nitrógeno *Gracilaria* spp. mostró una rápida asimilación de N-amonio duplicando el total del contenido de N en el tejido 8h o menos, sin embargo, el consumo de N-nitrato fue menos rápido (Ryther et al., 1981). En nuestro caso, se observó que *Halopithys incurva* presenta en general un bajo contenido en polisacáridos ácidos dependiente de las condiciones de irradiación ( $p < 0.05$ ).

La técnica utilizada para el estudio de los polisacáridos ácidos precipitados de *Halopithys incurva*, la espectrometría infrarroja, ha encontrado interesantes aplicaciones en los estudios de conformación de los polisacáridos y ha sido utilizada en el estudio de polisacáridos de algas desde hace muchos años (Cerezo, 1967; MacCandless et al., 1973; MacCandless et al., 1975; Garay et al., 1976; Doty y Santos, 1978; Matulewicz y Cerezo, 1980; MacCandless et al., 1983; Rochas et al., 1989). Recientemente esta técnica ha sido perfeccionada mediante la transformada de Fourier (FT-IR). Así, el espectro FT-IR permite reconocer los diferentes tipos de polisacárido, por la presencia o ausencia de bandas características a partir del alga molida o su extracto (Chopin y Whalen, 1993). Además del uso de tablas de frecuencias de grupos característicos. La absorción infrarroja en la bandas 2960, 2920, 2845, 1640, 1370, 1250, 930, 900, 845, 805, 705  $\text{cm}^{-1}$  se utilizan para obtener información de las estructuras de agares y carragenatos (Rochas et al, 1986). Las bandas de absorción a 3444 y 2918  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la vibración del enlace O-H, del asociado por puentes de hidrógeno y al estiramiento C-H, respectivamente mientras que la banda a 2850 se asocia con  $\text{CH}_2$ . Estos análisis evidencian la presencia de algunos enlaces que pueden ser asociados a estructuras de carbohidratos en los polisacáridos ácidos purificados de *H. incurva*, enlazados unos con otros por enlaces del tipo C-O-C, 1082  $\text{cm}^{-1}$ , con abundancia de grupos hidroxilo 3444  $\text{cm}^{-1}$ , que forman parte de la estructura típica de los carbohidratos. Es interesante señalar la marcada presencia de los grupos hidrófilos, especialmente en la región entre 3600 y 3074  $\text{cm}^{-1}$  así como a 1654  $\text{cm}^{-1}$ , banda atribuida al agua, lo cual indica la tendencia de este tipo de moléculas a la captación de humedad (Zundel, 1969). También se observan bandas a 1379 y

1267  $\text{cm}^{-1}$  atribuidas a los grupos sulfatos (S=O) que es corroborada con la banda de 611  $\text{cm}^{-1}$  (Lloyd et al. 1961; Zundel, 1969). La banda a 2918  $\text{cm}^{-1}$  está asociada con la presencia de enlaces C-H. La banda a 1471  $\text{cm}^{-1}$  se asigna a las vibraciones de los enlaces del grupo carboxilo de ácido (Tako et al., 2000). La banda a 950  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con grupos sulfatos (Archbald et al., 1981) y la banda a 925  $\text{cm}^{-1}$  normalmente es atribuida a 3,6- anhydro-galactose (Stanley, 1963). La baja intensidad relativa a estas señal confirma la baja concentración de las mismas. Mientras que a 786 y 719  $\text{cm}^{-1}$  el espectro infrarrojo muestra dos bandas probablemente debido a un sulfato en la posición C-4 de galactosa. Aunque la posición de estos grupos funcionales no puede ser determinada mediante el uso de esta herramienta analítica. Estos resultados concuerdan con las señales detectadas para otras especies pertenecientes al orden Ceramiales *Polysiphonia* (Prado et al., 2008). De las especies pertenecientes al orden Ceramiales, el polisacárido extraído con agua mayoritariamente figura el agar, con una amplia gama de sustitutos en una variedad de posiciones, más bien con altos niveles de 3,6-anhidrogalactopiranosyl, como es en *Odonthalia*, *Pterosiphonia*, *Rhodomela* (Usov et al., 1992), *Acanthophora spicifera* (Noseda et al., 2000) y *Bostrychia moritziana* (Youngs et al., 1998). Recientemente, se ha encontrado mediante la comparación con los datos de la biblioteca de Thermo Fischer científico que la fracción de polisacáridos de *Halopithys incurva* tuvo el mayor porcentaje de similitud con P800 pullulan (86%)(Abdala et al., 2011). Pullulan es una  $\alpha$ -(1-6) maltotriosa, polímero soluble en agua obtenido de almidón por fermentación. Su uso más importante es para la fabricación de películas comestibles y cápsulas para la industria farmacéutica y nutracéutica.

En macroalgas rojas la proporción de los distintos tipos de MAAs, cuando se estimula la síntesis de éstos, puede variar en cuestión de días (Franklin et al., 1999). Se han observado cambios recíprocos en las concentraciones de shinorine y palythine en la macroalga *Chondrus crispus* y el coral *Stylophora pistillata* (Shick et al., 2002). En este trabajo se ha observado un comportamiento antagonista de las concentraciones de shinorine y porphyra-334 en presencia de  $\text{NH}_4^+$  existiendo una correlación negativa entre ambas. En ausencia de este nutriente y presencia de radiación UV son las concentraciones de palythine y porphyra-334 las que se correlacionan negativamente, produciéndose un aumento de la concentración de palythine en detrimento de la de porphyra-334. Estas mismas relaciones entre estos tipos de MAAs ya fueron descritas por en *Porphyra leucosticta* (Korbee 2004) aunque no fueron detectadas en estudios posteriores en la especie *Grateloupia*

*lanceola* (Houvinen et al., 2006). El aumento de un determinado amino ácido tipo micosporina y el aumento concomitante de otro ha sido relacionado con procesos de interconversión de unos MAAs por otros debido a condiciones ambientales (Dunlap y Shick, 1998; Conde et al., 2004) pero aún existe un consenso científico sobre la ruta de síntesis e interconversión de todos los MAAs (Carreto et al., 2005; Carreto y Carrignan, 2011). Los cambios en composición de MAAs detectados en este estudio, puede relacionarse por cambios en las condiciones de cultivo. Se ha demostrado que *Asterina-330(+Palythine)* presenta una alta capacidad contra la peroxidación lipídica por lo que es de esperar que se active si aumenta el estrés ambiental, por ejemplo radiación aumento de radiación UV como es en este caso: las algas de fuera del invernadero que reciben radiación UV tienen mayor contenido en Palythine (Fig. 4.16 A y B). Por otro lado, las diferencias en la tasa de fotodegradación de los distintos MAAs parecen estar relacionadas con las características químicas del radical R (Tabla X) siendo palythine, de los 3 tipos de MAAs encontrados en *G. cornea*, el que posee una estructura química más sencilla y una menor tasa de degradación (Whitehead et al., 2005). Se propone que éste sea el motivo por el que se detecta un incremento en la concentración de palythine en algas cultivadas en presencia de UV y en agua de mar con respecto a aquéllas cultivadas en efluentes con alta disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$ . Por ello, al ser el agua de mar un medio con baja disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$  en el que se ha detectado que la concentración total de MAAs es menor, se produce una acumulación preferente de palythine por tener una baja tasa de fotodegradación y en medios con alta disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$  se acumulan shinorine y porphyra-334 a pesar de que su estructura es más compleja y su tasa de fotodegradación mayor. Además, según de la Coba et al. (2009), palythine presenta una mayor capacidad antioxidante que shinorine y porphyra-334 por lo que puede explicarse que se acumule con preferencia en presencia de UV cuando la concentración total de MAAs es menor. El efecto de los nutrientes está afectado por la calidad de luz en algas cultivadas en agua de mar, la acumulación de MAAs es mayor fuera del invernadero (PA+UVR) que dentro del invernadero (PAR). Así la radiación UV estimula la acumulación de MAAs como se ha encontrado en otras algas rojas (Karsten et al., 2008; Franklin et al., 1999), sin embargo al contrario a lo encontrado en *Porphyra leucosicta* (Korbee et al. 2005), o *Grateloupia lanceola* (Houvinen et al., 2006) en cultivos en amonio la síntesis fue mayor en radiación PAR que en PAR+UVR. Como se indicó anteriormente elevadas concentraciones de amonio puede estar

---

relacionado más con la estimulación del crecimiento más que en la acumulación de MAAs.

En resumen, la radiación UV estimula la acumulación de fenoles y polisacáridos independiente de la disponibilidad de nitrógeno pero solo estimula la acumulación de MAAs a niveles bajos de amonio (cultivos en agua de mar). La acumulación de fenoles fue mayor en agua de mar que en efluentes (altos niveles de amonio) como en caso de los MAAs pero en este caso solo en PAR+UVR. Así la concentración de fotoprotectores, MAAs y fenoles aumenta en algas cultivadas en agua de mar subiendo de manera significativa en el caso de los fenoles día 42 en algas cultivadas en invernadero. Así es en los tratamientos supuestamente más generadores de estrés, cultivo fuera del invernadero con UV y baja disponibilidad donde se acumulan los fotoprotectores. Estas sustancias podrían estar indicando potenciación no solo de la capacidad de fotoprotección por absorción de irradiación UV (pigmento pantalla) sino también por su capacidad antioxidante (Zubia et al., 2007; De la Coba et al., 2009). Los polisacáridos en cambio siguen otro patrón, la acumulación es similar en algas cultivadas en agua de mar que en efluentes (amonio). Al retirar el nitrógeno el día 28 en las algas cultivadas en efluentes, el contenido de polisacáridos disminuye al contrario de lo esperado, así el efecto Neish a tan corto plazo en algas precultivadas en niveles altos de amonio no fue observado. El día 42 incluso el contenido de polisacáridos aumenta en algas que han estado cultivadas todo ese tiempo en agua de mar. En conclusión la baja disponibilidad de nitrógeno estimula la acumulación de polisacáridos pero el cultivo en amonio reduce la acumulación de polisacáridos incluso dos semanas después de retirarlo del medio. Los fotoprotectores y sustancias antioxidantes amino ácidos tipo micosporina (MAAs) incrementaron con la disponibilidad de nitrógeno como previamente se ha demostrado en distintas especie del género *Porphyra* (Korbee et al., 2005), *Grateloupia lanceola* (Huovinen et al., 2006), *Asparagopsis armata* (Figuerola et al., 2008) y *Gracilaria tenuistipitata* (Barufi Bonomi et al., 2011).

#### 4.6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdala-Díaz, R.T., Cabello-Pasini, A., Perez-Rodríguez, E., Conde-Alvarez, R.M., Figueroa, F.L. 2006. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* 148: 459-465.
- Abdala-Díaz, R., Chabrillón, M., C., Cabello-Pasini, A., Gómez- Pinchetti, J.L., Figueroa, F.L.. 2011. Characterization of polysaccharides from *Hypnea spinella* (Gigartinales) and *Halopithys incurva* (Ceramiales) and their effect on RAW 264.7 macrophage activity. *J. Applied Phycol*
- Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao GH, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH. 1999. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 47: 4184-4188.
- Aguilera, J., Figueroa, F.L., Niell, F.X. .1997. Short-term photocontrol of growth in *Porphyra leucosticta* Thuret in le Jolis. *Europ. J. Phycol.* 32: 417 – 424.
- Ahn MJ, Yoon KD, Min SY, Lee JS, Kim JH, Kim TG, Kim SH, Kim NG, Huh H, Kim J. 2004. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. *Biol Pharm Bull* 27: 544-547.
- Amsler, C.D., Fairhead, V.A. 2006. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Adv Bot Res* 43: 1-91.
- Aruoma OI. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research.* 523-524: 9-20.
- Araki, C. 1956. Structure of the agarose constituent of agaragar. *Bull. Chem. Soc. Japan* 29: 524-543.
- Armisen, R & F. Galatas, 1987. Production, properties and uses of agar. En: McHugh, D (ed). *Production and utilization of products from commercial seaweeds.* FAO Fisheries Technical Paper, vol 288:1-57 pp.
- Bandaranayake, W. M. 1998. Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat. Prod. Rep.* 15:159–72.
- Barrow, K., Karsten, U., King, R., West, J. 1995. Floridoside in the genus *Laurencia* (Rhodomelaceae: Ceramiales) a chemosystematic study. *Phycologia* 34:279–83.
- Barufi Bonomi, J., Korbee, N., Oliveira, M., Figueroa, F.L. 2011. Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under N limitation. *J. Appl. Phycol.* In press
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Review Nutrition Reviews.* 56(11):317-33
- Bentley, R. 1990. The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem.* 25, 307-384.
- Bellion, C., Hamer, G.K., Yaphe, W. 1981. Analysis of Kappa-iota hybrid carrageenans with kappa-carrageenan iota-carrageenan and <sup>13</sup>C NMR. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 10:379-384
- Bentley, R. 1990. The shikimate pathway-a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev.*

Biochem. Mol. Biol. 25:307–84.

- Bouveng, H., Lindberg, B., Wickberg, B. 1955. Low-molecular carbohydrates in algae. *Acta Chem Scand* 9:807-809.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance, *Nut. Rev.*, 56: 317-333.
- Carmona, R., J. J. Vergara, Perez-Llorens, J. L., Figueroa, F. L. Niell, F. X. 1996. Photosynthetic acclimation and biochemical responses of *Gelidium sesquipedale* cultured in chemostats under different qualities of light. *Marine Biology* 127: 25 - 34.
- Carvalho, L.R., Roque, N.F. 2004. Correlations between primary and secondary metabolites in Ceramiales (Rhodophyta) *Biochemical Systematics and Ecology* 32,337-342.
- Carvalho, L.R., Roque, N.F. 2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Química Nova* 23, 757-764.
- Carreto, J., Carignan, M.O., Montoya, N. G. 2005. A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology* 146: 237-252.
- Carreto, J., Carignan, M.O. 2011. Mycosporine-Like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. *Chemical and Ecological Aspects. Mar. Drugs*, 9, 387-446.
- Cerezo, A. 1967. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I Studies on a fraction of k-carrageenan. *Journal of the Chemical Society C*:992-997
- Chopin, T., Whalen, E. 1993. A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. *Carbohyd. Res.* 246: 51.
- Cockell, C. S., Knowland, J. 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* 74:311–345.
- Combaut, G., Y. Bruneau, J. Teste and L. Codomier. 1978. Halogen compounds from a red alga, *Falkenbergia rufolanosa*, tetrasporophyte of *Asparagopsis armata*. *Phytochemistry* 17:1661-1663.
- Conde F.R., Churio, M.S., Previtali, C.M. 2000. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra 334 in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. (B)* 56: 139-44.
- Conde F.R., Churio, M.S., Previtali, C.M. 2004. The deactivation pathways of the excited-states of the mycosporine –like aminoacids shinorine and porphyra-334 in aqueous solution. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3: 960-967.
- Connan S, Delisle F, Deslandes E, Gall EA. 2006. Intra-thallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot Mar* 49: 39-46.
- Connan S, Goulard F, Stiger V, Deslandes E, Gall EA. 2004. Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Bot Mar* 47: 410-416.
- Conner EM, Grisham MB. 1996. Inflammation, Free Radicals and Antioxidants. *Nutrition* 12: 274
- Correa-Díaz, F., Aguilar-Rosas, R and Aguilar-Rosas L.E. 1990. Infrared análisis of eleven carragenophytes from Baja California, Mexico. *Hydrobiologia*, 204/205:609-614

## Capítulo IV

---

Craigie, J. S. 1990. Cell walls. Biology of the Red Algae. *In:* (K. M. Cole and R. G. Sheath, eds) Cambridge University Press, New York. pp. 221–257.

Craigie, J.S. 1974. Storage products. In “Algal Physiology and Biochemistry,” Ed. W.D.P. Stewart, p. 206.

Dawes, C.J.- Stanley, N.F. and Stancioff, D.J. 1977a. Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry, and i-carrageenan from floridean *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica marina*, 20:137-147

DeBoer, J.A.(1979). Effects of nitrogen enrichment on growth rate and phycocolloid content in *Gracilaria folifera* and *Neogardhiella* Bailey (Florideophyceae). *Proc. Intl. Seaweed Symp.*, 9:263-271

De la Coba (2005-2007) Patentes:

1. Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, Francisca; Aguilera Arjona, José; López Figueroa, Félix. Título: Aminoácido tipo Micosporina (shinorine) como antioxidante. N. de solicitud: P200502157. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 31 de agosto de 2005. Entidad titular: Universidad de Málaga
  2. Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, Francisca; Aguilera Arjona, José; López Figueroa, Félix. Título: Aminoácido tipo Micosporina (asterine 330 + palythine) como antioxidante. N. de solicitud: P200502158. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 31 de agosto de 2005. Entidad titular: Universidad de Málaga
  3. Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, Francisca; Aguilera Arjona, José; López Figueroa, Félix. Título: Aminoácido tipo Micosporina (porphyra 334) como antioxidante. N. de solicitud: P200502161. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 31 de agosto de 2005. Entidad titular: Universidad de Málaga
  4. Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, Francisca; Aguilera Arjona, José; López Figueroa, Félix. Título: Aminoácido tipo Micosporina (M-gly) como antioxidante. N. de solicitud: P200502162. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 31 de agosto de 2005. Entidad titular: Universidad de Málaga
  5. Inventores (p.o. de firma): López Figueroa, Félix; Aguilera Arjona, José, De la Coba Luque, Francisca, Korbee Peinado, Nathalie. Título: Composición para protección solar a base de extractos de algas y líquenes. N. de solicitud: P200601662. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 6 de julio de 2006. Entidad titular: Universidad de Málaga
  6. Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F. Título: Uso de aminoácidos tipo micosporina (Shinorine) para la prevención y tratamiento de estado anímicos. N. de solicitud: P200701521. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 1 de junio de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
  7. Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F. Título: Uso de aminoácidos tipo micosporine (Shinorine) para la prevención de cataratas. N. de solicitud: P200701522. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 1 de junio de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
  8. Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F. Título: Uso de aminoácidos tipo micosporina (Shinorine) para la prevención y tratamiento de eritema actínico, fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento. N. de solicitud: P200701523. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 1 de junio de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
  9. Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F. Título: Uso de aminoácidos tipo micosporina (Shinorine) como antioxidante o aditivo en productos alimentarios. N. de solicitud: P200701524. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 1 de junio de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
-

- 10.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título:Uso de aminoácidos tipo micosporina (Shinorine) para la prevención de la oxidación de productos cosméticos y farmacéuticos. N. de solicitud: P200701525.  
 País de prioridad: España Fecha de prioridad: 1 de junio de 2007. Entidad titular:Universidad de Málaga
- 11.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título:Uso de aminoácidos tipo micosporina (Porfira 334) en productos para la prevención de procesos carcinogénicos. N. de solicitud: P200702942 País de prioridad: España Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular:Universidad de Málaga
- 12.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título:Uso de aminoácidos tipo micosporina (Porfira 334) en productos para la prevención y tratamiento terapéutico de Parkinson y Alzheimer.N. de solicitud: P200702943 País de prioridad: España Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007Entidad titular: Universidad de Málaga
- 13.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título:Uso de aminoácidos tipo micosporina (Porfira 334) en productos para la prevención de cataratas. N. de solicitud: P200702944. País de prioridad: España Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 14.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título: Uso de aminoácidos tipo micosporina (Porfira 334) en productos para la prevención y tratamiento del eritema actínico, fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento. N. de solicitud: P200702945País de prioridad: España Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 15.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título: Uso de aminoácidos tipo micosporina (Porfira 334) como antioxidante o aditivo en productos alimentarios. N. de solicitud: P200702946. País de prioridad: España Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 16.- Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título: Uso de aminoácidos tipo micosporina (Porfira 334) en la prevención de la oxidación de productos cosméticos y farmacéuticos. N. de solicitud: P200702947  
 País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga.
- 17.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título: Uso de a una mezcla purificada de aminoácidos tipo micosporina (asterina-330 + palatina en productos para la prevención de procesos carcinogénicos. N. de solicitud: P200702948 País de prioridad: España Fecha de prioridad: 1 de junio de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 18.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título: Uso de a una mezcla purificada de aminoácidos tipo micosporina (asterina-330 + palatina)en productos para la prevención y tratamiento terapéutico de Parkinson y Alzheimer. N. de solicitud: P200702949 País de prioridad: España.Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 19.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título: Uso de a una mezcla purificada de aminoácidos tipo micosporina (asterina-330 + palatina)en productos para la prevención de cataratas.N. de solicitud: P200702950 País de prioridad: España Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 20.-Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.  
 Título: Uso de a una mezcla purificada de aminoácidos tipo micosporina (asterina-330 + palatina)en productos para la prevención y tratamiento de eritema actínico, fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento. N. de solicitud: P200702951 País de prioridad: España Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga

## Capítulo IV

---

- 21.- Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F. m Título: Uso de a una mezcla purificada de aminoácidos tipo micospolina (asterina-330 + palatina)Como antioxidante o aditivo en productos alimentarios . N. de solicitud: P200702952. País de prioridad: España Fecha de prioridad: 7 denoviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 22.- Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F. Título: Uso de a una mezcla purificada de aminoácidos tipo micospolina (asterina-330 + palatina)En la prevención de oxidación de productos cosméticos y farmaceuticos. N. de solicitud: P200702953. País de prioridad: España Fecha de prioridad: 1 de junio de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 23.- Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F.Título: Uso de aminoácido tipo micospolina (M-Gly) en la prevención de oxidación de productos cosméticos y farmaceuticos. N. de solicitud: P200702954. País de prioridad: EspañaFecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 24.- Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F. Título: Uso de aminoácido tipo micospolina (M-Gly) como antioxidante o aditivo en productos alimentarios. N. de solicitud: P200702955País de prioridad: España Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga
- 25.- Inventores (p.o. de firma): De la Coba Luque, F., Aguilera, Arjona, López Figueroa, F. Título: Uso de aminoácido tipo micospolina (M-Gly) para la prevención y tratamiento de eritema actínico, fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento. N. de solicitud: P200702956 País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 7 de noviembre de 2007. Entidad titular: Universidad de Málaga.

De la Coba F, Aguilera J, Figueroa FL, de Gálvez MV, Herrera E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated form three red macroalgae and one marine lichen. *J Appl Phycol* 21:161-169

Doty, M.S and Santos, G.A.1978. Carrageenan from tetrasporic and cystocarpic *Euclima* species. *Aquat. Bot.*, 4:143

Duarte, M. E. R.; Cauduro, J. P.; Nosedá, D. G.; Nosedá, M. D.; Gonçalves, A. G.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Cerezo, A. S. 2004. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. *Carbohydr. Res.* 339, 335-347

Dunlap, W. C. & Shick, J. M. 1998. UV radiation absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* 34:418–30.

Dunlap, W. C., Chalker, B. E. & Oliver J. K. 1986: Bathymetric adaptations of reefbuilding corals at Davies Reef, Great Barrier Reef, Australia. III UV-B absorbing compounds. - *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 104: 239-248.

Erickson, K.L.1983. En: *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives* (Scheuer, P. J., ed.). Vol. V, pp. 131-257. Academic Press, New York.

Fenical, W. 1975. Halogenation in the Rhodophyta: a review. *J. Phycol.* 11: 245-259.

Figueroa, F.L., Aguilera, J., Jiménez, C., Vergara, J.J., Robles, M.D., Niell, F.X., 1995. Growth pigment synthesis and nitrogen assimilation in the red alga *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützting (Bangiales, Rhodophyta) under blue and red light. *Sci. Mar.* 59, 9–20.

Figueroa, F.L., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñebla, B., Flores-Moya,

- A., Altamirano, M., 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur in Le Jol. Mar. Ecol. Prog. Ser. 151, 81–90.
- Figueroa, F.L., Bueno, A., Korbee, N., Santos, R., Mata, L., Schuenhoff, A. 2008. Accumulation of mycosporine-like aminoacids in *Asparagopsis armata* grown in tanks with fishpond effluents of gilthead sea bream *Asparus aurata*. J World Aquacult Soc 39:692–699
- Fogg, G.E. 1964. Environmental conditions and the pattern of metabolism in algae. In: D. Jackson (ed.), Algae and man. New York: Plenum, pp 77-85.
- Folin O and Ciocalteu V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J Biol Chem 73: 627-650.
- Franklin, L. A., Yakovleva, I., Karsten, U. & Lüning, K. 1999. Synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. J. Phycol. 35:682–93.
- Garay, P. Luz; Fuentes R., C y Ching P., O. A. 1976. Aislamiento y observaciones estructurales del contenido del polisacárido de *Gigartina chamissoi* recolectada en las Playas de Chancay. Bol. Soc. Quím. del Perú. 43 (2): 57-66.
- Geiselman, J.A. and O.J. McConnell. 1981. Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. J. Chem. Ecol. 7: 1115–1133.
- Giroldo, D., A.A.H. Vieira. 2002. An extracellular sulfated fucosa-rich polysaccharide produced by a tropical strain of *Cryptomonas obovata* (Cryptophyceae). J. appl Phycology 14:185-191.
- Gleason, D.F. 1993. Differential effects of ultraviolet radiation on green and brown morphs of the Caribbean coral *Porites astreoides*. Limnol Oceanogr 38: 1452-1463
- Glombitza KW and Knöss W. 1992. Sulfated phlorotannins from the brown alga *Pleurophyucus gardneri*. Phytochemistry 31: 279-281.
- Glombitza KW and Keusgen M. 1995. Fucalols and deshydroxyfucalols from the brown alga *Sargassum spinuligerum*. Phytochemistry 38: 987-995.
- Glombitza KW and Schmidt A. 1999a. Nonhalogenated and halogenated phlorotannins from the brown alga *Carpophyllum angustifolium*. J Nat Prod 62: 1238-1240.
- Glombitza, K.W., Schmidt, A. 1999b. Trihydroxyphlorethols from the brown alga *Carpophyllum angustifolium*. Phytochemistry 51: 1095-1100.
- Glombitza KW and Pauli K. 2003. Fucols and phlorethols from the brown alga *Scytothamnus australis* Hook. et Harv. (Chnoosporaceae). Bot Mar 46: 315-320.
- Hagerman AE and Butler LG. 1989. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. J Chem Ecol 15: 1795-1810.
- Hagerman, A.E. 1988. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. J Chem Ecol 14: 453-461.
- Han, Y.S., Han T. 2005. UV-B induction of UV-B protection in *Ulva pertusa* (Chlorophyta). J. Phycology 41: 523-530.

## Capítulo IV

---

- Hanisak, M.D. 1983. The nitrogen relationships of marine macroalgae. In: Carpenter, E.J. and D.G. Capone (Eds.), Nitrogen in the Marine Environment. Academic Press, New York, pp: 699-730.
- Haslam, E. 1998. Practical polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological action: Cambridge, U.K., Cambridge University Press, 422 p.
- Hoyer, K., Karsten, U., Sawall, T., Wiencke, C. 2001. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211: 117-129.
- Huovinen, P., Matos, J., Sousa-Pinto, I., Figueroa, F.L. 2006. The role of nitrogen in photoprotection against high irradiance in the Mediterranean red alga *Grateloupia lanceola*. *Aquatic Botany* 84: 208-316.
- Jennings, J.G. and P.D. Steinberg. 1997. Phlorotannins versus other factors affecting epiphyte abundance on the kelp *Eckloniadiata*. *Oecologia* 109: 461-473.
- Jormalainen, V. and Honkanen, T. 2008. Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring temperate marine communities. In *Algal Chemical Ecology*, Amsler CD (ed). Springer: Berlin; 57-89.
- Karentz, D. 1994. Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. In Weiler, C. S. and Penhale, P. A. (Eds) *Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects*. American Geophysical Union, Washington, D.C., pp. 93-110.
- Karsten, U., Sawall, T., Wiencke, C. 1998. A survey of the distribution of UV-absorbing substances in tropical macroalgae. *Phycological Research* 46: 271-279.
- Karsten, U. & Wiencke, C. 1999. Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marinered alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *J. Plant. Physiol.* 155:407-15.
- Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J .1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol* 47:85-89.
- Kolender, A., M.C. Matulewicz, M.C. 2002. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. *Carbohydrate Research*, 337:57-68
- Korbee-Peinado N, Abdala-Díaz RT, Figueroa FL, Helbling WE. 2004. Ammonium and UV radiation stimulate the accumulation of mycosporine-like amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J Phycol* 40:248-259
- Korbee N, Huovinen P, Figueroa FL, Aguilera J .2005a. Availability of ammonium influences photosynthesis and the accumulation of mycosporine-like amino acids in two *Porphyra* species. *Mar Biol* 146:645-654.
- Korbee N, Figueroa FL, Aguilera J .2005b. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J Photochem Photobiol* 80:71-78.
- Korbee N, Figueroa FL, Aguilera J .2006. Accumulation of Mycosporine-like amino acids (MAAs): biosynthesis, photocontrol and ecophysiological functions *Rev Chil Hist Nat* 79:119-132.
- Kurihara H, Mitani T, Kawabata J, Takahashi K. 1999. Two new bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera*. *J. Nat. Prod.* 62: 882-884.

- Lahaye, M., C. Rochas, C., Yaphe W. 1985. A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers in the cell walls of *Gracilaria* spp. (Gracilariaceae, Rhodophyta). Canadian Journal of Botany, 64:579-584.
- Lamure, J. 1944. Les constituants glucidiques de *Vidalia volubilis* et de *Halopithys pinastroides*. Comptes Rendues 218, 246-247.
- Lapointe, B. E., Ryther, R. H. 1978. Some aspects of the yield of *Gracilaria tikvaheae* in culture. Aquaculture 15: 185-194.
- Lázaro, B., Cárcamo, J., Audicana, A., Perales, I., Fernández-Astorga, A. 1999. Viability and DNA maintenance in non-culturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. Applied and Environmental Microbiology 65, 4677-4681.
- Lloyd, A.G., Dodgson, K.S., Price, R.B. Rose, F.A. 1961. Polysaccharide sulphates. *Biochimica Biophysica Acta* 46:108-105
- Lobban CS, Harrison PJ, Duncan MJ. 1985. The physiological ecology of seaweeds. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- López, A., Rico, M., Rivero, A., Suárez de Tangil, M. 2011. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. Food Chemistry 125, 1104-1109
- Lu, Y., Wang, D.Y., Hu, Y. L, Huang, X. Y., Wang, J.M. 2008. Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV. Carbohydrate polymers, 71, 180-186
- McCandless, E.L., Craigie, J.S., Walter, J.A. 1973. Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. Planta, 112: 201-212
- McCandless, E.L., West A., Michael D. Guiry. 1983. Carrageenan Patterns in the Gigartinaceae. Biochemical Systematics and Ecology, Vol. 11, N. 3, pp. 175-182
- McCandless, E.L., Craigie, J. S., Hensen, J.E. 1975. Carrageenans of gametangial and tetrasporangial stages of *Iridaea cordata* (Gigartinaceae). Can. J Bot. 53: 2315-2318.
- Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S. 1980. Methylation analysis of carrageenans from the seaweed *Iridaea undulosa*. Phytochemistry, 19:2639-41
- Nakamura T, Nagayama K, Uchida K, Tanaka R. 1996. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. Fisheries Sci 62:923-926
- Neish, A.C. and Shacklock, P.F. 1971. Greenhouse experiments on the propagation of strain T4 of Irish Moss. National Research Council of Canada, Atlantic Regional Lab., Tech. Rep. No.14
- Neish, A.C., Shacklock, P.F., Fox, C.H and Simpson, F.J. 1977. The cultivation of *Chondrus crispus*. Factors affecting growth under greenhouse conditions. Can. J. Botany, 55:2263-2271.
- Painter, T.J. 1983. Algal Polysaccharides. In: G.O. Aspinall (ed.), The Polysaccharides. Academic Press Inc., New York, pp.2-195
- Parys, S., Rosenbaum, A., Kehraus, S., Glombitza, K.W., König, G.M. 2007. Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts. J. Nat. Prod. 70, 1865-1870.

- Pavia H, Cervin G, Lindgren A, Åberg P. 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar Ecol Prog Ser* 157: 139-146
- Pavia, H. and G.B. Toth. 2000. Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology* 81: 3212–3225.
- Pavia H, Toth G, Åberg P. 1999. Trade-offs between phlorotannin production and annual growth in natural populations of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *J Ecol* 761-771.
- Pavia, H., Toth, G.B. 2000a. Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology* 81: 3212-3225.
- Pavia, H., Toth, G.B. 2000b. Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Hydrobiologia* 440: 299-305.
- Pavia, H. and Brock, E. 2000. Extrinsic factors influencing phlorotannin production in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 193: 285–294.
- Pedersen, M., Saenger, P., Fries, L., 1974. Simple brominated phenols in red algae. *Phytochemistry* 13, 2273–2279.
- Pereira, A.D.S., Seixas, F.R.M.S., Aquino Neto, F.R., 2002. Própolis: 100 years of research and future perspectives. *Química Nova* 25, 321–326.
- Perez-Rodríguez, E., Aguilera J., Figueroa, F.L. 2003. Tissue localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser. A photoprotective role? *J. Experimental Botany* 384: 1-8
- Perez-Rodríguez, E., Aguilera J., Gómez, I., Figueroa, F.L. 2001. Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. *Marine Biology* 139: 633-639
- Pérez-Rodríguez, E., Gómez, I., Figueroa, F.L. 1998. Effects of UV radiation on photosynthesis and excretion of UV-absorbing pigments of *Dasycladus vermicularis* (Chlorophyta, Dasycladales) from Southern Spain. *Phycologia* 37: 379-387
- Qi H., Zhao T., Zhang Q., Li Z., Zhao Z. and Xing R. 2005. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 17: 527-534.
- Ragan MA, Glombitza K-W .1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progr Phycol Res* 4:129-241
- Rahman, A.U., Ahmad, V.J., Bano, S., Abbas, S.A., Alvi, K.A., Ali, M.S., Lu, H.S.M., Clardy, J., 1988. Pinnatazane, a bridged cyclic ether sesquiterpene from *Laurencia pinnatifida* (= *Osmundea pinnatifida*). *Phytochemistry* 27, 3879-3880.
- Raven, J.A .1974. Carbon dioxide fixation. In: W.D.P. Stewart (ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.443-445
- Melissa dos Santos Raymundo, Paulo Horta, Roseane Fett. 2004. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Rev. Bras. Cienc. Farm. Braz. J. Pharm. Sci.* vol. 40, n. 4.

- Rochas, C., Rinaudo, M., Landry, S. 1989. Relation between the molecular-structure and mechanical-properties of carrageenan gels. *Carbohydr Polym*, 10, 115-127.
- Rochas, C., Lahaye, M., and Yaphe, W. 1986. Sulphate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. *Bot Mar* 29: 335-340.
- Ruperez, P., Ahrazem, O, Leal, J.A.2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 840-845.
- Ryther, J. H. N., Corwin, T. A. de Busk and Williams, L.D. 1981. Nitrogen uptake and storage in red alga *Gracilaria tikvahiae*. *Aquaculture* 26:107-115.
- Ryther, J. H. y Dunstan, W.M.1971. Science Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment. 1009-1013, 171
- Sabina, H., R. Aliya. 2009. Seaweed as a new source of flavone. *Pak. J. Bot.* 41: 1927 1930.
- Santos Raymundo, M., Horta, P., Fett, R.2004. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil).*Rev. Bras. Cienc. Farm.*vol. 40,4.
- Schmidt, B.M., A.B. Howell, B. McEniry, C.T. Knight, D. Seigler, J.W. Erdman, Lila, M.A. 2004. Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fruits. *J. Agr. Food Chem.* 52:6433–6442.
- Shahidi, F.; Naczki, M. 1995. Food phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application. Technomic, Publishing CO., INC eds. Lancaster, Pennsylvania, USA
- Shahidi, F.; Han, X.; Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.*, 53, 285-293.
- Shanmugan, M. & Mody K. H. 2000. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science*, 79:1672-1683
- Shibata T, Nagayama K, Tanaka R, Yamaguchi K, Nakamura T. 2003. Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase A2s, lipoxygenases and cyclooxygenases. *JAppl Phycol* 15: 61-66
- Shick, J. M., Dunlap, W. C. 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation and UV protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 64:223–62.
- Shick, J. M., W. C. Dunlap, J. S. Pearse, and V. B. Pearse. 2002. Mycosporine-like amino acid content in four species of sea anemones in the genus *Anthopleura* reflects phylogenetic but not environmental or symbiotic relationships. *Biol. Bull.* 203: 315-330.
- Shin, H.C., Hwang, H.J., Kang, K.J., Lee, B.H. 2006. An antioxidative and antiinflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from *Ecklonia cava*. *Arch. Pharmacol Res.* 29, 165-171.
- Takano, R., K. Shiimoto, K. Kamei, S. Hara, S. Hirase.2003. Occurrence of carrageenan structure in an agar from the red seaweed *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales) with a short review of carrageenan-agarocolloid hybrid in the Florideophycidae. *Bot Mar*, 46:142-150.

## Capítulo IV

---

- Takano, S., Uemura, D. and Hirata, Y. 1978: Isolation and structure of new aminoacids, palythanol and palythene, from zoanthid *Palythoa tuberculosa*. Tetrahedron Lett. 49: 4909-4912.
- Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Van-Moppes, D., Grossman, S. & Arad, S.M. 2005. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. J. App. Phycol., 17:215-222.
- Tako, M., E. Yoza & S. Tohma .2000. Chemical charactetization of acetyl fucoidan and alginate from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. Bot Mar, 43:393-398
- Targett, N.M., Arnold, T.M. 1998. Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. J Phycol 34: 195-205.
- Tsimidou, M. 1998. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. Ital. J. Food Sci. 2 (10):99-116.
- Toida, T.A. Chaidedgumjom & R.J. Linhardt. 2003. Structure and bioactivity of sulfated polysaccharides. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 15 (81):29-46
- Tsujino, I., K. Yabe and I. Sekikawa, 1980. Isolation and structure of a new amino acid, shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. Bot. Mar., 23: 65-68.
- Usov, A.I 1984. NMR Spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars carrageenans and xyans. Bot.Mar. 27:189-202
- Usov, A. I. and N. G. Klochkova. 1992. Polysaccharides of algae. 45. Polysaccharide composition of red seaweeds from Kamchatka coastal waters (Northwestern Pacific) studied by reductive hydrolysis of biomass. Bot. Mar. 55:371-378
- Usov, A. I. 1992. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. Food Hydrocolloids 6: 9–23 Wang 2009
- Valiela, I.1984. "Marine Ecological Processes". Springer-Verlag, New York.
- Wang, X.F., Zhang, Y.P., Chen, H., Yang, X., Chen, J.M. 2009. Particulate Nitrate Formation in a Highly Polluted Urban Area: A Case Study by Single-particle Mass Spectrometry in Shanghai. Environ. Sci. Technol. 43: 3061–3066.
- Whyte, J.N.C.1970. Extraction procedure for plants: extracts from the red alga *Rhodomela larix*. Phytochemistry 9, 1159–1161.
- Xue T., Hartikainen H., Piironen V. 2001. Antioxidative and growth promoting effect of selenium in senescing lettuce. Plant Soil, 237: 55–61.
- Yalpani, M .1988. Studies in organic chemistry 36. Polysaccharides. Syntheses, modifications and structure/property relations. Elsevier Science Publishers, New York. 499
- Zhang, Q., P. Yu, Z. Li, H. Zhang, Z. Xu, P.Li. 2003. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides fractions from *Porphyra haitanesis*. J.appl Phycology 15:305-310
- Zertuche-González , J.A .1988. In situ life history, growth and carrageenan characteristics of *Euclima uncinatum* (Setchell and Gardner) Daw. From the Gulf of California. Ph.D. Dissertation, State University of New York at Stony Brook, 162 pp.
- Zhou, G., Sun, Y., Xin, H., Zhang, Y., Li, Z., Xu, Z. 2004 In vivo antitumor and

immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacol Res* 50:47–53

Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrin Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl Phycol* 19: 449-458.

Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., Deslandes, E. 2009. Antioxidant and antitumor activities of some Phaeophyta from Brittany Coasts. *Food Chem.* 116: 693-701.

Zundel, G. 1969. *Hydration and Intermolecular Interaction*. Academic Press, New York.



## **DISCUSIÓN GENERAL**

---

## DISCUSIÓN GENERAL

Los antioxidantes se han convertido en estrategia terapéutica de interés para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Rice-Evans, 2001) y en ingredientes multifuncionales en alimentación (Diplock et al., 1999) entre otras aplicaciones. Además, la preferencia de los consumidores por ingredientes funcionales de origen natural en lugar de producidos sintéticamente va en aumento (Herrero et al., 2006). En este contexto, se ha propuesto el uso de extractos de plantas u otras fuentes naturales, siempre que contengan compuestos que pueden actuar como antioxidantes, con diferentes mecanismos de acción, sobre las complejas vías en que participan los radicales libres (Ou et al., 2002). De modo que, la capacidad antioxidante de los extractos de algas, constituye un campo de interés creciente para la comunidad científica internacional (Matsukawa et al., 1997; Zhang et al., 2007; Zubia et al 2007, 2009; Tierney et al., 2010). Una limitación importante para la obtención y ensayo de los productos derivados de las algas es la propia dificultad para la producción sostenible de biomasa con características estables o reproducibles. Esta limitación ha sido superada con el desarrollo de las técnicas para el cultivo de macroalgas en sistemas intensivos bajo un alto grado de control (Bidwell et al., 1985; Friedlander y Levy, 1995). Más recientemente, mediante el diseño de los sistemas multitrófico, denominados en inglés como “Integrated multitrophic aquaculture” (IMTA) para el aprovechamiento de los efluentes de la acuicultura intensiva de peces, las técnicas de cultivo han sido modernizadas a través de una apropiada selección y diversificación de especies que desarrollan las diferentes funciones dentro del sistema (Shpigel y Friedman, 1990; Neori y Shpigel, 1999, Neori et al., 2001; Chopin et al., 2008). En los sistemas IMTA, las especies producidas pueden, además de biofiltrar, tener un valor comercial añadido (Neori et al., 2004; Neori, 2008; Nobre et al., 2010). Además, los compuestos bioactivos de interés, producidos por las macroalgas, son a menudo inducidos por causas de estrés y tienden a poseer un amplio rango de posibilidades.

La presente investigación, estuvo dirigida a la evaluación de la actividad antioxidante mediante el uso de modelos experimentales *in vitro* en macroalgas procedentes del medio natural y producidas bajo condiciones controladas de cultivo y a la cuantificación y/o identificación de las posibles moléculas responsables de estas propiedades. El punto de partida, consistió en el estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de diferente polaridad (metanólicos e

hidroalcohólicos) preparados a partir de diez especies de macroalgas, pertenecientes a los tres Phylum (Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta), recolectadas del medio natural y cultivadas con aporte continuo de N-amonio, ya sea añadido en forma de  $\text{CINH}_4$  o en forma efluentes de peces . Para ello se tomaron en consideración:

i) La elección de especies representativas de las distintas zonas de la zona intermareal con el fin de profundizar en el comportamiento que cada especie presenta ante el estrés generado por las variaciones ambientales (alta exposición a la radiación solar, hidrodinamismo y concentración de oxígeno entre otros);

ii) La selección de una especie por su capacidad de adaptación al sistema de cultivo establecido, por su capacidad biofiltradora y alta actividad antioxidante, tras un periodo experimental corto, no superior a un mes dentro de un sistema de policultivo integrado;

iii) Las metodologías de evaluación antioxidante propuestas en la literatura seleccionando aquellas que fueran sencillas, rápidas y reproducibles para la caracterización de la actividad antioxidante *in vitro* así como la cuantificación de componentes con propiedades antioxidantes conocidos (polifenoles, clorofila, carotenoides y ficoeritrina).

Los experimentos iniciales, realizados en especies de algas procedentes del intermareal y cultivadas bajo alto aporte de N-amonio mostraron la habilidad que poseen los antioxidantes para donar protones presentes en los extractos, metanólicos e hidroalcohólicos, mediante el ensayo del DPPH y del poder reductor. Las mayores actividades antioxidantes, superiores al 90% de barrido de radical libre y significativamente superiores al resto de los extractos ensayados, se detectaron en el alga roja *Halopithys incurva* y en las pardas *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina*. El segundo método, indicó la actividad antioxidante más alta en extractos hidroalcohólicos de *H. incurva*, con una actividad equivalente a  $53.15 \mu\text{g AA mg}^{-1}$ . Al expresar el % de barrido de radicales libres como EC50 (índice de oxidación), *C. abies-marina* (en ambos tipos de extractos) y el alga verde *Caulerpa racemosa* (en extractos ETOH50) exhibieron las mayores actividades, con EC50 de  $1.97 \pm 0.03$ ,  $2.03 \pm 0.01$  y  $1.88 \pm 0.03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  respectivamente. Otras especies de algas pardas, *F. spiralis* y rojas, *H. incurva* y *Laurencia majuscula*, exhibieron valores de EC50 cercanos a los anteriores ( $2.21 \pm 0.02$ ;  $2.47 \pm 0.01$  y  $2.48 \pm 0.01 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , respectivamente). Especies pertenecientes a estos géneros procedentes de la naturaleza, han sido señalados por diversos autores como especies con alta capacidad antioxidante la actividad de las mismas en la naturaleza (Conan et al.,

2008; Zubia et al., 2009). Entre las rojas destacan géneros (*Polysiphonia*, *Heterosiphonia*, y *Bryothamnion*) pertenecientes al Orden Ceramiales y entre las pardas géneros pertenecientes al Orden de las Fucales (*Cystoseira*, *Fucus*, *Sargassum*) (Yan et al., 1998; Zubia et al., 2007). En algas rojas los resultados más revelantes han sido descritos en dos especies pertenecientes al Orden Ceramiales, *Brongniartella byssoides* ( $0.14 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y *Polysiphonia lanosa* ( $2.71 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y una especie perteneciente al orden Gigartinales, *Furcellaria fastigiata* ( $1.39 \pm 0.04 \text{ mg ml}^{-1}$ ) (Zubia et al., 2009). En cambio no existe información sobre la capacidad antioxidante en especies de macroalgas cultivadas en efluentes de piscifactorías (sistemas IMTA). Nuestro estudio sugiere una alta capacidad en las especies cultivadas y que los mecanismos antioxidantes que desempeñan estos extractos se basan principalmente en el barrido de radical.

Una vez evaluadas las propiedades antioxidantes de los extractos de macroalgas procedentes tanto de la naturaleza como cultivadas dentro de un sistema de policultivo, actuando como biofiltros, el trabajo fue dirigido hacia el estudio de sus componentes químicos, que podrían ser responsables del potencial antioxidante evaluado. Los parámetros de cultivo y la disponibilidad de N-amonio tras un mes en cultivo provocaron cambios en la acumulación de compuestos en la biomasa producida, fuente de los extractos ensayados. Esta observación se confirmó con los resultados obtenidos de los componentes químicos con actividad antioxidante de naturaleza liposoluble (clorofila *a* y carotenoides) e hidrosoluble (polifenoles y ficoeritrina), así como las relaciones C:N, que disminuyeron sustancialmente respecto a los resultados obtenidos en especies provenientes de la naturaleza. El contenido de clorofila *a* en la naturaleza frente a las especies cultivadas es acusadamente menor en todas las especies excepto en las algas pardas, *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies marina*, donde se observó una disminución de la concentración de clorofila *a* en cultivo de aprox. 20 % y 2 % respectivamente. La especie *U. rigida* mostró el mayor aumento en la concentración de pigmentos liposolubles tras el cultivo, la clorofila *a* aumentó un 81 % y los carotenoides un 85 % respecto a la detectada en el medio natural. Los resultados mostraron que las diez especies contenían compuestos fenólicos. *H. incurva* mostró el contenido más alto (4.86 % de su peso seco), mientras que los valores más bajos se observaron en *G. dichotoma* (0.73 %) (Capítulo I, Tabla 1.7). Tras un mes en cultivo con alto aporte de N-amonio y baja irradiación (PAR), el contenido en compuestos fenólicos totales varió significativamente entre todas las especies analizadas, llegando a disminuir un 27 % en *H. incurva*, 28% en *C. abies marina* y

63 % en *F. spiralis*, en comparación al contenido exhibido en el medio natural. En general, los niveles medios determinados en todas las especies fueron bajos, inferiores a 1.52 % exceptuando (*Halopithys incurva*, *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina*) y sólo en estas tres especies de la naturaleza se detectaron niveles interesantes (4.86%, 3.07% y 3.90% respectivamente). En la variante del ensayo con la adición de PVPP, polímero específico de los compuestos polifenólicos disueltos en medio ácido, sólo se cuantificaron polifenoles en las especies de algas pardas (*F. spiralis* y *C. abies-marina*) y la especie de alga roja (*H. incurva*) con concentraciones de 2.19%, 3.15% y 1.46% de su peso seco, respectivamente. Estos resultados disminuyeron tras el cultivo un 37 % en *H. incurva*, un 35 % *C. abies-marina* y un 88 % en *F. spiralis*. Además, confirmaron la sobreestimación sugerida por diversos autores al analizar en contenido mediante el método de Folin Ciocalteu, por la posible reacción con todos los compuestos oxidantes con un ciclo aromático (fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido ascórbico) (Ragan y Glombitza, 1986). El contenido en compuestos fenólicos de las algas pertenecientes a la división Rhodophyta, Phaeophyta y Chlorophyta oscila generalmente entre 0 y 5% del peso seco, aunque hay estudios que muestran niveles de hasta 15-20% para las algas pertenecientes a la división Phaeophyta (Ragan y Jensen, 1977; Geiselman, 1980; Anderson y Velimirov, 1982; Steinberg, 1985, 1986; Ragan y Glombitza, 1986). En general los valores obtenidos en este trabajo son comparables a los de las algas pardas clasificadas como pobres en compuestos fenólicos (0-2% del peso seco) (Stein 1985,1986; Targett et al, 1992). El extracto de *Fucus spiralis* mostró un contenido en compuestos fenólicos inferior al valor publicado por Denton et al. (1990) para esta misma especie (8.14%) recolectada en Nova Scotia (Canadá). Sin embargo, ejemplares de *Cystoseira abies-marina* de la isla de Gran Canaria recolectados en una zona diferente, presentaron un contenido medio menor 0.5%, (Granado, 1996) que el obtenido en este trabajo siendo, 3.90 % en algas recolectadas y 2.80 % en cultivadas. Los valores para éste género van desde 0.3% en *Cystoseira trinodis* del norte australiano (Steinberg y Paul, 1990) hasta 4.4% en *C. osmundacea* recolectada en California (Steinberg, 1985). Las referencias en algas rojas indican contenidos en *Polysiphonia lanosa*, *Brongniartella byssoides*, *Heterosiphonia plumosa* y *Furcellaria fastigiata*, (5.73 % PS, 3.64 % PS, 3.45 % PS, 3.29 % PS, 3.25 % PS, respectivamente)(Zubia et al., 2009). La variación en el contenido en polifenoles puede ser la respuesta a cambios ambientales e incluso a la divergencia genética entre las poblaciones naturales, como ha sido descrito en *Fucus vesiculosus* (Jormalainen y Honkanen, 2004).

Otros factores que influyen en la acumulación de compuestos fenólicos están relacionados con la estacionalidad o la localización de estos elementos en la planta (Conan et al., 2007; Abdala et al., 2011). Como ha sido discutido previamente, las situaciones de estrés bajo las condiciones de cultivo establecidas podrían explicar la síntesis, acumulación y exudación al medio de este tipo de elementos, como fue observado en el alga roja *Halopithys incurva*, y como también ha sido observado en el caso de algas verdes en ambientes variables como los charcos intermareales, donde se ha descrito la presencia de trihidroxycumarina (Pérez-Rodríguez et al., 2003). El aumento más significativo en el contenido de ficoeritrina se midió en *H. incurva* (92 %). Este hecho ha sido descrito trabajos anteriores, apuntando que el contenido de la ficoeritrina en algas rojas, está positivamente correlacionado con el aporte de nitrógeno y la cantidad y calidad de la radiación (Lapointe, 1981; Bird et al., 1982; Vergara y Niell, 1993; Figueroa et al., 1995).

Los análisis estadísticos revelaron que los factores (especies, naturaleza, cultivo y solvente) afectan de manera significativa ( $p < 0.05$ ) a los resultados de la actividad antioxidante de los extractos. Además, el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) indicó que la actividad antioxidante en las especies está directamente relacionada con el contenido en polifenoles. No hay referencias sobre el contenido de fenoles totales en algas cultivadas en alto contenido de N-amonio, pero los resultados muestran una disminución en su contenido frente a las recolectadas en la naturaleza, lo que indica que las condiciones de cultivo en el sistema de biofiltración influyen en su síntesis. Las propiedades antioxidantes de estos compuestos, tanto en lo referido al atrapamiento de radicales libres como a la quelación de  $Fe_2^+$ , han sido bien documentadas (Rice-Evans et al., 1995; 1996; Bravo, 1998). De hecho, entre todos los componentes antioxidantes que fueron referidos anteriormente, los compuestos fenólicos han sido ampliamente relacionados con las propiedades antioxidantes de las macroalgas (Fujimoto y Kaneda, 1984; Yan et al., 1996; Zubia et al., 2007, 2009).

La capacidad de adaptación al sistema de cultivo establecido de la mayoría de las especies ensayadas y los porcentajes de biofiltración de amonio determinados, muestran que durante periodos experimentales cortos, no superiores a un mes, estas especies son capaces de responder a situaciones de cultivo libre (sin fijación a ninguna estructura) en la columna de agua bajo elevadas concentraciones de nutrientes, funcionando como trampas de N-amonio y eliminando la carga de nutrientes proveniente de los efluentes, tal y como anteriormente ha sido descrito en otros trabajos con diferentes especies (Neori et

al., 1991; Shpigel et al., 1993; Jiménez del Río et al., 1996; Neori, 1996). Las especies que son morfológicamente más simples y que presentan altas relaciones superficie/volumen muestran una tasa de absorción de amonio mayor (Wallentinus, 1984; Hein et al., 1995; Taylor et al., 1998), lo que queda demostrado con especies como *Ulva rigida* (Chlorophyta) y *Grateloupia dichotoma* (Rhodophyta), con eficiencias de biofiltración medias cercanas al 50% en las condiciones ensayadas. No ocurrió así con las especies pertenecientes a la División Phaeophyta, que mostraron poca adaptación a la hidrodinámica del sistema con valores de eficiencia de eliminación de amonio entre el 17 y el 27%, poco representativos en comparación a los obtenidos con el resto de especies. Estos resultados obtenidos con algas pardas concuerdan con los obtenidos en otros experimentos en los que especies no pertenecientes a los géneros conocidos como *kelps* (*Laminaria*, *Undaria*, *Macrocystis*), muestran poca capacidad de adaptación a los sistemas de cultivo en los que las condiciones de estrés a las que son sometidas (rotación libre en la columna agua con desarrollo de morfologías pseudo-esféricas, ausencia de estructuras de fijación, altas irradiaciones o elevada disponibilidad de nutrientes) conducen a la excreción de metabolitos que producen el colapso del sistema (Pedersen et al., 1996).

Al analizar los resultados de los Capítulos I y II en su conjunto, podemos destacar que los extractos, los metanólicos e hidroalcohólicos, obtenidos a partir de las especies *Halopithys incurva*, *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina* fueron los más activos. Considerando los pobres resultados obtenidos con las especies de algas pardas, en cuanto a la capacidad biofiltradora se refiere, en los siguientes ensayos planteados nos centramos en el estudio exhaustivo de la asimilación de nutrientes, el cultivo y la actividad antioxidante del alga roja *Halopithys incurva*.

Estos ensayos se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones de radiación (PAR, PAR+UV) dentro de un sistema IMTA simple, peces-algas. La combinación de tanques, densidades de cultivo y tasas de renovación en los sistemas de cultivo en cascada permitieron maximizar la calidad de los efluentes, sin reducir los valores de producción de la especie cultivada. Los resultados tras la aplicación de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en forma de pulsos (Capítulo III, experimento 1), revelaron incrementos tanto en la producción como en la tasa de crecimiento a mayores concentraciones de N-amonio tras un periodo prolongado de cultivo, alcanzando valores medios de 9.08 ± 1.90 g PS m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> y 3.30 ± 0.60 % d<sup>-1</sup> respectivamente. El aporte de pulsos de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, afectó las relaciones C:N que mostraron una disminución fundamentalmente por el incremento de Nitrógeno interno.. En cambio los valores del contenido interno de

C no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos a excepción de las algas que recibieron pulsos de  $\text{NH}_4^+$  de 60  $\mu\text{M}$ , indicando que en los tanques de cultivo siempre tienen carbono disponible, mientras el N está sujeto al aporte externo. Los resultados del cultivo de *Halopithys incurva* en tanques dispuestos en cascada (Capítulo III, experimento 2), permitieron la optimización de la depuración de efluentes de cultivo de *Sparus aurata*, al tiempo que reduce los costes del cultivo en cuanto a bombeo de agua. La elección de tanques de volumen decreciente para los niveles más bajos de la cascada permitió aumentar la frecuencia de renovación del agua, reduciendo el riesgo de limitación por nutrientes y manteniendo los valores de producción. El cultivo en cascada de *Halopithys incurva* el flujo de agua procedente del primer nivel de la cascada (nivel 1) no produjo ningún tipo de limitación por nutrientes de la producción y tasa de crecimiento en los cultivos del nivel 2 (Capítulo III, Tabla 3.3.). La mayor tasa de crecimiento obtenida en este nivel (3.3 %  $\text{d}^{-1}$ ), fue probablemente resultado de una mayor eficiencia en la utilización de la luz condicionada por el diseño del tanque de cultivo ya que los tanques semicirculares (SCT) empleados para el cultivo en el 2º nivel tienen una mayor relación superficie:volumen que los circulares (CPT), y la mitad de profundidad que éstos. Las mayores eficiencias de eliminación de amonio (NUE) se obtuvieron en el primer nivel del sistema siendo este valor de 45.9 %. Esto se explica porque al ser menor la tasa de renovación en este tanque, aumenta el tiempo de residencia del agua, lo que facilita el consumo de un mayor % de  $\text{NH}_4^+$ . Por el contrario la NUE se reduce en el 2º nivel del BF. Los cultivos de este nivel reciben una menor concentración de amonio, y en principio un flujo de agua limitado en nutrientes de forma general (principalmente nitrógeno y fósforo) al proceder del 1º nivel del BF, sin embargo la mayor tasa de renovación de agua aumenta la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de las algas. Es un hecho ampliamente demostrado que el aumento de la tasa de renovación incrementa la producción de biomasa (Lapointe y Ryther, 1978; Friedlander y Ben-Amotz, 1991). Los resultados obtenidos para la tasas de consumo de  $\text{NH}_4^+$  (NUR) muestran un patrón contrario, obteniéndose mayores valores para los cultivos de 2º nivel del sistema. La relación inversa que existe entre la NUE y la tasa de renovación así como la directa entre la NUR y la tasas de renovación han sido descritas anteriormente en sistemas de cultivo de macroalgas (Jiménez del Río, et al., 1994; Muñoz y Varas, 1998; Buschmann et al., 2001; Hernández et al., 2002; Schuenhoff et al., 2006).

El co-cultivo de *Halopithys incurva* y *Jania adhaerens* (Capítulo III, experimento 3) en el sistema de biofiltración bajo las condiciones ensayadas, irradiación y aporte de nutrientes, confirmó la capacidad de adaptación y respuesta de ambas especies al crecimiento conjunto sin competencia. Las producciones más altas se obtuvieron en condiciones de alta irradiación (PAR+UV) con y sin aporte de nutrientes, obteniéndose en estas últimas condiciones, valores de producción cercanos a  $54.5 (\pm 22.2) \text{ g PS m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . La producción en condiciones de baja irradiación fue significativamente inferior, resultado que corrobora la importancia que juega la luz en los sistemas de cultivo de macroalgas (Lobban y Harrison, 1997; Lüning, 1990) junto con la temperatura. Aunque en nuestros experimentos, este último parámetro no es determinante debido a sus estrechas variaciones, de 19 a 24 ° C, uno de los primeros trabajos al respecto, mostró una relación positiva entre la tasa de crecimiento y la temperatura en cultivo en tanques de *Gracilaria tenuistipitata* (Haglund y Pedersen, 1993). La capacidad de *H. incurva* para sostener el crecimiento quedó reflejada en la tasa de crecimiento experimentada a lo largo de las 6 semanas de duración del ensayo. Una vez más, las mayores tasas de crecimiento se relacionan de forma directa con la cantidad de luz (PAR+UV) que reciben los cultivos. *H. incurva* presentó tasas de crecimiento  $3.6 \% \text{ d}^{-1}$  (con aporte de nutrientes) y  $3.2 \% \text{ d}^{-1}$  (sin aporte de nutrientes). Los resultados de este experimento muestran que *H. incurva* puede actuar como un eficiente biofiltrador de los efluentes procedentes del cultivo intensivo de dorada, con valores de NUE del 100 % a los flujos de  $\text{NH}_4^+$  ensayados ( $4.5 \pm 2.6 \text{ mmoles h}^{-1}$ ). Al igual que con otras especies de algas rojas ensayadas durante el desarrollo del proyecto Bifaro, como *Gracilaria cornea* o *Hypnea spinella*, se han mostrado eficiencias de biofiltración de hasta el 90 % (Gil Jeréz, 2010) similares a las obtenidas en sistemas integrados combinados de animales y macroalgas (Chow et al., 2001).

La biomasa producida se evaluó empleando diferentes métodos *in vitro*, con el fin de completar el conocimiento de su potencial como fuente de antioxidantes. Los extractos empleados en estos ensayos fueron hidroalcohólicos (ETOH50) ya que es menos tóxico que el metanol resultando una opción mejor para la extracción de compuestos con fines alimentarios, nutracéuticos o funcionales (Hamburger et al., 2004). Los porcentajes de inhibición antirradical del ensayo DPPH fueron mayores que las del ensayo ABTS•+. El extracto más activo en ambos métodos fue el de *H. incurva* crecidas durante cuatro semanas bajo radiación PAR y aporte de N-amonio (Capítulo III, Ver tabla 3.9 y 3.10). La capacidad de los extractos de *H. incurva* para reducir el radical DPPH mediante la

donación de un átomo de hidrógeno o electrones ha sido entre aproximadamente 2 y 22 veces más débil que el ácido ascórbico y el propil galato. La concentración EC50 (índice de oxidación) del extracto de *H. incurva* fue aproximadamente 97.5 y 94 veces mayor que la requerida para el ácido ascórbico y el propil galato, respectivamente. El valor más bajo ( $2.42 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) correspondió a la biomasa de *H. incurva* obtenida tras cuatro semanas en cultivo bajo radiación PAR y aporte de N-amonio. Los resultados de EC50 más relevantes en algas rojas han sido descritos para dos especies pertenecientes al Orden Ceramiales, *Brongniartella byssoides* ( $0.14 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y *Polysiphonia lanosa* ( $2.71 \pm 0.01 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y una especie perteneciente al orden Gigartinales, *Furcellaria fastigiata* ( $1.39 \pm 0.04 \text{ mg ml}^{-1}$ ) (Zubia et al., 2010).

La disponibilidad de nitrógeno, como nutriente esencial, es uno de los factores importantes para evaluar los estados fisiológico y bioquímico de las macroalgas crecidas en sistemas de cultivo intensivo. El efecto de la adición y limitación de nitrógeno sobre los cambios en los componentes de especies del género *Gracilaria* cultivadas en sistemas intensivos durante periodos de tiempo prolongados, han sido investigados ampliamente (Bird et al. 1981; 1982; Lapointe 1981; Lapointe y Duke, 1984; Levy y Friedlander, 1990; Friedlander et al., 1991; Haglund y Pedersen, 1993). Sin embargo, existe poca información sobre los procesos bioquímicos que la disponibilidad de N tiene sobre la activación de las defensas antioxidantes. Los resultados obtenidos en los ensayos descritos sugieren que la fuente y la concentración de nitrógeno han mostrado un efecto directo sobre los cambios en las actividades antioxidantes detectadas, principalmente debido a los cambios en la composición bioquímica de las especies estudiadas. Los extractos hidroalcohólicos de *H. incurva* mostraron escasa capacidad antioxidante a nivel de inhibición de peroxidación lipídica (Capítulo III, Figura 3.14) presentando un comportamiento similar al control. La oxidación del  $\beta$ -caroteno se completó a los 15 min de comenzar la reacción a diferencia de los resultados del control positivo, vitamina E (a concentraciones de  $1 \mu\text{M}$  y  $10 \mu\text{M}$ ). La capacidad para atrapar el radical superóxido en el sistema PMS/NADH-NBT fue negativa y poco reproducible. Trabajos previos han indicado una fuerte actividad en varias especies de algas pardas (Siriwardhana et al., 2003.; Kim et al., 2005; Kuda et al., 2005; Zubia et al., 2007). Trabajos posteriores describieron actividades de captación de radicales aniones bajos (<5%) para diversos extractos de algas Rhodophytas (Kim et al., 2005).

Una vez estudiadas las propiedades antioxidantes de los extracto de *H.*

*incurva* procedentes de diferentes condiciones de radiación y el aporte de N-amonio, los ensayos se dirigieron hacia el estudio de los componentes químicos que podrían ser responsables de las propiedades detectadas en la biomasa procedente de los experimentos de co-cultivo. Los procedimientos empleados para la cuantificación y caracterización del extracto de *H. incurva* permitieron determinar la concentración de polifenoles que osciló entre 30.6 y 62.2 mg g<sup>-1</sup> PS en condiciones PAR y bajo aporte de N-amonio.

Del análisis cromatográfico para su caracterización, realizado por HPLC, pudo concluirse que la actividad antioxidante de *H. incurva*, está relacionada, al menos parcialmente, con la presencia de pirogalol. Las concentraciones detectadas, dependiendo de la procedencia del tratamiento de cultivo, oscilaron entre 3.6 y 24.9 mg de pirogalol g<sup>-1</sup> PS, lo cual nos indica que hay una parte del contenido de polifenoles sin identificar en las muestras analizadas. Aparentemente, los tipos y cantidades de los ácidos fenólicos en las algas dependen de la especie en cuestión (Whitfield et al., 1999). López et al. (2010) observaron resultados similares al analizar los polifenoles de *S. scoparium*. Algunos compuestos pueden permanecer sin ser detectados o insuficientemente representados en la cromatografía líquida de alta afinidad, como ya se ha discutido, debido a su baja respuesta a la radiación UV en relación a la concentración, la estructura molecular, la superposición de isómeros, o una polaridad inadecuada para la determinación cromatográfica (Adamson et al, 1999;. Lázaro et al, 1999). Hasta el momento existen pocos trabajos disponibles en la caracterización de polifenoles mediante técnicas de HPLC a partir de algas en general, y tampoco hemos encontrado trabajos sobre algas rojas al respecto para comparar los resultados obtenidos. El presente análisis no mostró la presencia de moléculas de florotaninos en nuestras muestras. Este hallazgo apoya la sugerencia hecha por Ragan y Glombitza (1986) de que los florotaninos son un grupo fenólico exclusivo en las algas pardas. Entre las principales clases estructurales de compuestos fenólicos marinos aislados hasta el momento en la División Rhodophyta, podemos citar los bromofenoles (Ragan y Glombitza, 1986), compuestos estructuralmente diferentes a los taninos en algas verdes y pardas. El bromofenol C-7-hidroxílico ha sido detectado exclusivamente en especies del orden Ceramiales. El más distribuido en todos ellos es el 2,3-dibromo-4,5- dihidroxibenzyl alcohol (lanosol) que también ha sido detectado en algas pardas. Los métodos químicos para el análisis de polifenoles en estudios ecológicos fueron revisados hace dos décadas (Ragan y Glombitza, 1986). A partir

de entonces, rara vez han sido publicados métodos químicos adicionales para investigar este tipo de compuestos.

En relación a los polisacáridos ácidos, el cese de los aportes de  $\text{NH}_4^+$  a los 28 días de cultivo no dio lugar a un aumento significativo de la concentración de polisacáridos aunque el hecho de que disminuyera en condiciones de menor irradiancia y ausencia de UV (dentro del invernadero) y se mantuviera en algas crecidas fuera del invernadero (PAR+UVR) sugiere que tienden hacia la ruta del carbono en ausencia de nutrientes, presencia de UV y dosis más altas de PAR. Mientras que el contenido en polisacáridos ácidos de las algas cultivadas fuera del invernadero (PAR+UVR) se mantuvo similar tanto en muestras cultivadas en agua de mar como en las producidas con las aguas de los efluentes (ricas en amonio). Los polisacáridos ácidos se acumularon drásticamente a los 42 días (PAR+UV) aumentando de manera significativa un 59.1 % respecto al muestreo del día 7 de cultivo.

Este comportamiento es diferente al descrito en otras algas rojas, ya que cuando existe crecimiento rápido se espera una baja acumulación, atribuible a que en un medio rico en nutrientes, el carbono producido en la fotosíntesis y que entra al ciclo de Krebs, es destinado principalmente a la síntesis de compuestos precursores de aminoácidos y en menor medida a la biosíntesis de carbohidratos (Raven, 1974; Neish et al. 1977, DeBoer, 1979). No obstante el hecho de que el contenido de polisacáridos sea mayor en algas cultivadas fuera del invernadero nos puede indicar que la radiación UV puede estar provocando situaciones de estrés que conducen a una disminución de la actividad fotosintética y en consecuencia a una acumulación de carbohidratos a costa de disminuir la tasa de crecimiento. Algunos trabajos en algas carragenofitas apuntan a una variación estacional en el rendimiento atribuida a condiciones ambientales tales como la temperatura y la salinidad (Fogg 1964; Neish y Shacklock, 1971; Dawes et al., 1977a; Zertuche-Gonzalez, 1988). La caracterización de los espectros de éstos, mediante FT-IR, no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de cultivo ( $p < 0.05$ ). Recientemente se ha identificado, mediante la comparación con los datos de la biblioteca de Thermo Fischer que la fracción de polisacáridos de *Halopithys incurva* tuvo el mayor porcentaje de similitud con P800 Pullulan (86%) (Abdala et al., 2011). Pullulan es un  $\alpha$  (1-6) maltotriosa, polímero soluble en agua obtenido a partir del almidón por fermentación. Su uso más importante es para la fabricación de películas comestibles y cápsulas para la industria farmacéutica y nutracéutica. Los fotoprotectores y sustancias antioxidantes amino ácidos tipo micosporina

(MAAs) incrementaron con la disponibilidad de nitrógeno como previamente se ha demostrado en distintas especies del género *Porphyra* (Korbee et al., 2005), *Grateloupia lanceola* (Huovinen et al., 2006), *Asparagopsis armata* (Figuerola et al., 2008) y *Gracilaria tenuistipitata* (Barufi Bonomi et al., 2011). El análisis del contenido e identificación de amino ácidos tipo micosporina (MAAs) mostró un comportamiento antagonista en las concentraciones de shinorine y porphyra-334 en biomasa producida con N-amonio, existiendo una correlación negativa entre ambas. En ausencia de este nutriente y presencia de radiación UV son las concentraciones de palythine y porphyra-334 las que muestran una correlación negativa, produciéndose un aumento de la concentración de palythine en detrimento de la porphyra-334. Se ha demostrado que las especies de algas rojas acumulan más MAAs que las especies de algas verdes y pardas (Singh et al., 2008). Estas mismas relaciones entre los tipos de MAAs ya fueron descritas en *Porphyra leucosticta* (Korbee, 2004) aunque no fueron detectadas en la especie *Grateloupia lanceola* (Huovinen et al., 2006). El aumento de un determinado amino ácido tipo micosporina y el aumento concomitante de otro ha sido relacionado con procesos de interconversión de unos MAAs por otros debido a condiciones ambientales (Dunlap y Shick, 1998; Conde et al., 2004) pero se desconoce con exactitud la ruta de síntesis e interconversión de todos los MAAs. Los cambios en composición de MAAs detectados en este estudio, puede relacionarse por cambios en las condiciones de cultivo. De la Coba et al. (2009) presentan que los extractos purificados a partir de las especies de algas rojas *Porphyra* y *Gelidium* contienen distintas micosporinas (Porphyra 334, shinorine, palythine y asterina 330) que presentan actividad antioxidante a nivel de inhibición de la peroxidación lipídica siendo estos dos últimos los que ofrecen mejores resultados. Un factor que contribuye a este hecho es la acidez relativa de estos compuestos y su grado de disociación en solución.

Ciertamente, la determinación de un modo de acción es particularmente compleja en el caso de un extracto crudo natural como el extracto hidroalcohólico de *Halopithys incurva*, y a pesar de mostrar una correlación alta en relación al contenido en polifenoles no se descarta que su efecto antioxidante pueda ser el resultado de la acción conjunta de sus componentes. Tras una extensa revisión de la literatura, no se han encontrado estudios similares al presente trabajo en lo que concierne al contenido en polifenoles de *Halophytis incurva* ni, en consiguiente, tampoco ha sido abordado el estudio sobre la capacidad antioxidante de los mismos. Además se desconocen estudios sobre la actividad antioxidante de algas

producidas en cultivos IMTA. La evaluación de la actividad antioxidante del pirogalol tampoco ha sido abordada previamente en este modelo, aunque existen estudios del efecto producido por otros compuestos fenólicos (Gasso *et al.*, 2001; Shanker y Aschner, 2003).

Se concluye que el alga *Halopithys incurva* es una excelente candidata para el cultivo en efluentes de piscifactorías ya sea en doble biofiltro (dos tanques conectados en cascada) y especialmente en cocultivo con *Jania adhaerens*. Presenta una alta capacidad de biofiltración y acumula en la biomasa compuestos bioactivos de interés como compuestos nitrogenados: aminoácidos tipo micosporina (fotoprotectores frente a la radiación UV con capacidad antioxidante) y compuestos carbonados: polisacáridos ácidos con potente actividad inmunoestimuladora. Además los compuestos polifenólicos se correlacionan con una alta actividad antioxidante.

**CONCLUSIONES**

---

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos y presentados en el presente trabajo, podemos extraer las conclusiones que se enumeran a continuación:

1. Las diez especies de macroalgas ensayadas, recolectadas de la naturaleza y pertenecientes a las Divisiones Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta, presentaron un amplio rango de actividad antioxidante, tal y como se determinó a través de los ensayos de barrido de radicales libres y poder reductor expresado como equivalentes de ácido ascórbico. Las actividades más altas fueron obtenidas en extractos hidroalcohólicos (ETOH 50%).
  - a. Los extractos con mayor actividad antioxidante correspondieron a las especies, *Halopithys incurva* (Rhodophyta), *Fucus spiralis* y *Cystoseira abies-marina* (Phaeophyta).
  - b. Se cuantificaron compuestos fenólicos en todas las especies analizadas siendo *Halopithys incurva* la que presentó el mayor contenido en polifenoles totales, alcanzando valores del 4.9 % de su peso seco previo a la aplicación de PVPP. Tras la aplicación de PVPP el contenido de polifenoles en *H.incurva* bajó a 1.46 % y los contenidos más altos se alcanzaron a las algas pardas *Fucus spiralis* (2.2%) y *Cystoseira abies-marina* (3.5%) indicando una sobrevaloración de la concentración de polifenoles si no se realiza la precipitación de sustancias que interfieren en la valoración de polifenoles
  - c. Los contenidos en pigmentos liposolubles e hidrosolubles de las especies recolectadas fueron bajos en general, lo que complementado con los valores medios obtenidos para las relaciones C:N indicó la fuerte limitación por nutrientes, típica de aguas oligotróficas, a la que están sometidas estas especies en su medio natural.
2. La actividad antioxidante de los extractos de la biomasa cultivada de forma intensiva en un sistema de biofiltración, con aporte continuo de nutrientes durante periodos cortos de tiempo, aumentó o se mantuvo estable en diferentes especies de algas verdes (*Caulerpa racemosa*), rojas (*Laurencia majuscula* o *Halopithys incurva*) y pardas (*Fucus spiralis* o *Cystoseira abies-marina*). Las principales respuestas a las condiciones de cultivo y la disponibilidad de N-amonio fueron una variación significativa en el contenido en compuestos

fenólicos totales y la acumulación de compuestos nitrogenados, a la vista de la disminución en las relaciones C:N, que condujo al aumento en la concentración de pigmentos liposolubles (clorofilas y carotenoides, p.e. en *Ulva rigida*) e hidrosolubles (ficoeritrina, p.e. en *Halopithys incurva*).

3. El análisis estadístico de los resultados reveló, de forma general, que los factores especie, naturaleza, cultivo y solvente, afectan de manera significativa la actividad antioxidante de los extractos evaluados. Además, la actividad antioxidante cuantificada es dependiente de la concentración de compuestos fenólicos. El análisis de correlación indicó que las especies con mayor capacidad de biofiltración de N-amonio presentan menor actividad antioxidante.
4. El cultivo de *Halopithys incurva* en tanques dispuestos en una cascada con dos niveles, optimizó la biofiltración de efluentes con alta concentración de N-amonio, provenientes del cultivo de *Sparus aurata*. La elección de tanques semicirculares (SCT) de volumen menor y relación Superficie:volumen mayor para los niveles más bajos de la cascada permite aumentar la frecuencia de renovación de agua reduciendo el riesgo de limitación por nutrientes y manteniendo estables los valores de producción.
5. El cultivo de *Halopithys incurva* durante periodos prolongados bajo diferentes condiciones de radiación (PAR y PAR+UV) y aporte de nutrientes (con enriquecimiento de N y P o únicamente con agua de mar) permitió confirmar que se pueden obtener producciones sostenibles principalmente en condiciones de alta irradiación natural (PAR+UV) y aporte de nutrientes, manteniendo valores elevados de eliminación de N-amonio y P-fosfato. La mayor disponibilidad de Nitrógeno produce un aumento del contenido interno de nitrógeno que va asociado a una caída en la proporción C:N:. Además, *Halopithys incurva* cultivada en los efluentes presenta rendimientos fotosintéticos superiores a los obtenidos con la biomasa cultivada en agua de mar, tanto bajo condiciones de exposición a la radiación PAR+UV como en condiciones de invernadero, sólo expuesta a la radiación PAR.
6. Los extractos de *Halopithys incurva* obtenidos de la biomasa producida en cocultivo tras un periodo prolongado bajo radiación PAR y aporte continuo de N-amonio, mostraron la mayor actividad antioxidante, tal y como fue determinado

por los ensayos del DPPH y del ABTS•+, siendo los porcentajes de inhibición antirradical inferiores en este último. El análisis cromatográfico comparativo entre extractos de algas y patrones de fenoles conocidos, permite concluir que la actividad antioxidante de *Halopithys incurva*, está relacionada, al menos parcialmente, con la presencia del pirogalol.

7. La acumulación de polisacáridos ácidos, fue en general baja, obteniéndose un aumento de la concentración tras 35 días de cultivo en condiciones de irradiación PAR+UV. Sin embargo, los espectros analizados mediante FT-IR no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de cultivo ensayados.

El análisis del contenido en aminoácidos tipo micosporina (MAAs) mostró un comportamiento antagonista entre las concentraciones de shinorine y porphyra-334 en presencia de N-amonio, existiendo una correlación negativa entre ambas.

8. A la vista de los resultados, el alga roja *Halopithys incurva* se postula como una especie de interés desde el punto de vista aplicado; (i) por su capacidad de respuesta en condiciones de cultivo intensivo bajo radiación natural, creciendo de forma unialgal o en co-cultivo con *Jania adhaerens*; (ii) su capacidad para biofiltrar N-amonio y P-fosfato de los efluentes producidos en los tanques de cultivo de dorada (*Sparus aurata*); y (iii) como fuente potencial de sustancias antioxidantes probablemente relacionado con sustancias de naturaleza fenólica, por su capacidad para acumular compuestos como aminoácidos tipo micosporina (fotoprotectores y antioxidantes), polisacáridos estructurales y ácidos con potencial actividad inmunoestimuladora.

## RESUMEN

El presente trabajo aborda el estudio de la acumulación de sustancias antioxidantes en macroalgas tanto recolectadas del medio natural como cultivadas, de forma intensiva, en un sistema de biofiltración de efluentes provenientes del cultivo de peces (IMTA). Se analizaron los efectos de las condiciones de cultivo, principalmente relacionadas con la radiación solar y el aporte de nutrientes, sobre el crecimiento y la calidad de la biomasa de las diferentes especies producidas. La biomasa obtenida de las diferentes fuentes y condiciones de cultivo fue utilizada en la preparación y caracterización de extractos para la evaluación de la actividad antioxidante mediante el uso de modelos experimentales *in vitro*. Los experimentos iniciales (Capítulos I y II), fueron realizados con especies de macroalgas de las Divisiones Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta, recolectadas en la zona intermareal de la costa de la isla de Gran Canaria (Islas Canarias, España) y cultivadas bajo condiciones de invernadero y alto aporte de N-amonio. Los extractos metanólicos (METOH) e hidroalcohólicos (ETOH50) obtenidos presentaban la habilidad de donar protones, característica de los compuestos antioxidantes, tal y como fue determinado por los ensayos del DPPH y del poder reductor. Entre las especies estudiadas, *Halopithys incurva* resultó un alga muy interesante por su elevada actividad antioxidante tanto en el medio natural como en condiciones de cultivo y su alto contenido en polifenoles. Así en los capítulos III y IV, se aborda en el estudio más detallado sobre la acuicultura de *H. incurva* bajo diferentes condiciones. Se analizaron la tasas de crecimiento, rendimiento de la biomasa o producción, capacidad de biofiltración expresada como eficiencia de biofiltración del N-amonio (NUE) y tasa de incorporación de N-amonio (NUR), calidad de la biomasa (acumulación de pigmentos, polifenoles y relaciones C:N) y la capacidad antioxidante de la biomasa producida mediante los ensayos DPPH y ABTS<sup>+</sup>. Además se determinaron mediante HPLC el contenido e identificación de fenoles y aminoácidos tipo micosporina (MAAs), así como la acumulación de polisacáridos ácidos. Se concluye que el alga *H. incurva* es un excelente candidato para el cultivo en efluentes de piscifactorías ya sea en doble biofiltro (dos tanques conectados en cascada) y especialmente en cocultivo con *Jania adhaerens*. Presenta una alta capacidad de biofiltración y acumula en la biomasa compuestos bioactivos de interés como compuestos nitrogenados: aminoácidos tipo micosporina (fotoprotectores frente a la radiación UV con capacidad antioxidante) y compuestos carbonados: polisacáridos ácidos con potente actividad inmunoestimuladora. Además los compuestos polifenólicos se correlacionan con una alta actividad antioxidante.