

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales naturales procedentes de algas



Merichel Plaza del Moral

Tesis doctoral
Madrid, Octubre de 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales naturales procedentes de algas

Memoria presentada por:

Merichel Plaza del Moral

Para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. Elena Ibáñez Ezequiel

Dr. Miguel Herrero Calleja



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



ELENA IBÁÑEZ EZEQUIEL, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN DEL CSIC Y MIGUEL HERRERO CALLEJA, CONTRATADO JUAN DE LA CIERVA.

CERTIFICAN,

Que la presente Memoria titulada “BÚSQUEDA DE NUEVOS INGREDIENTES FUNCIONALES NATURALES PROCEDENTES DE ALGAS” que presenta **Merichel Plaza del Moral**, Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC.

Y para que conste firmamos el presente certificado a 07 de Octubre de 2010.

Dra. Elena Ibáñez Ezequiel

Dr. Miguel Herrero Calleja

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que hayan pasado ya cuatro años. Al principio parecían muchos y ahora noto que han pasado muy rápido, quizá demasiado. Es posible que sea porque el balance ha sido muy positivo y, como se suele decir, los buenos momentos siempre pasan sin que te des cuenta. Sin duda, ese es mi caso y ha ocurrido gracias a todos los que, durante este tiempo, han estado a mi lado ayudándome y trabajando conmigo.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores, la Dra. Elena Ibáñez y el Dr. Miguel Herrero. Ellos me concedieron la oportunidad de comenzar este trabajo. Muchísimas gracias por vuestro esfuerzo, dedicación, paciencia y apoyo para llevarlo a cabo, y por transmitirme vuestros conocimientos pues de vosotros he aprendido todo durante este tiempo. Gracias por vuestros sabios consejos (científicos y no científicos), que tanto me han ayudado, me han orientado y me han animado a continuar en todo momento. Por su amistad y su cariño, miles de gracias.

Agradecer de forma muy especial y sincera al Dr. Alejandro Cifuentes el haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y, cómo no, agradecerle el haberme dirigido durante algún tiempo, quien también me ha aportado conocimientos y ha estado disponible en todo momento para darme su ayuda. Cómo no, a las Dras. Carolina Simó y Virginia García Cañas por su franco y sincero apoyo en todo momento.

También quiero expresar mi gratitud por la acogida recibida en todo momento, a todo el personal del Instituto de Fermentaciones Industriales, ahora Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, lugar donde se ha desarrollado este trabajo, en especial a sus directoras las Dras. Lourdes Amigo y M^a Victoria Moreno, así como a todos los integrantes del Área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Madrid, con los que también he colaborado muy de cerca, sobre todo con Laura y Susana. Sin olvidar, al Dr. Guillermo Reglero, que ha sido el tutor de este trabajo.

Del mismo modo, quiero agradecer al Consejo Superior de Investigaciones Científicas la concesión de la beca predoctoral I3P, que ha supuesto la financiación para haber podido llevar a cabo esta Tesis.

A la Dra. M^a Dolores Del Castillo y a la Dra. Miryam Amigo, por haber participado en este trabajo, haberme enseñado tanto sobre Maillard y como no, por su ayuda. Al Dr. José Bernal (Pepe) y a la Dra. Irene Rodríguez por su inestimable ayuda en este trabajo, por su paciencia para la resolución de mis múltiples dudas (tanto técnicas como conceptuales), así como por su tan valiosa amistad.

Quiero expresar el más sincero agradecimiento a los integrantes de mi grupo que aún no he nombrado pero que siempre han estado ahí cuando los he necesitado, Carlos, Marina, Fernando, Jose, Clara,..., así como al resto de personas que han ido pasando por el laboratorio en todo este tiempo.

Y por supuesto a mis compañeros y compañeras de laboratorio, sobre todo a Almudena (que no me imagino el laboratorio sin ella, por todo el apoyo que me da...) y Carolina, que me han alegrado la estancia en el laboratorio del IFI. A todos los compañeros del laboratorio de arriba en el IFI, Yoli (por su sinceridad en todo momento), M^a del Mar (que es única), Wilman, Paqui, Inma, Miriam, Rosa, Eva, David, Dani, Eva, Carol Muñoz, Rodrigo, Gustavo, Marcos, y Constanza, que siempre han estado dispuestos a echarme una mano. Es impagable haber podido compartir lugar de trabajo con todos ellos, cafés, compañía, preocupaciones y, sobre todo, muy buenos ratos. Porque realmente todo se hace más sencillo cuando se tiene la posibilidad de trabajar entre amigos. También agradecer al grupo de prebióticos, en especial a Marta. Seguro que me olvido de alguien, pero lo hago sin acritud.

Al Dr. Borivoj Klejdus, así como a la gente del laboratorio Marie, Dagma, Min, Isaac y Vilen, por haber hecho de la estancia en su laboratorio de Brno una experiencia inolvidable.

Y el agradecimiento más especial a mi familia, en particular a mis padres y a mis hermanos que siempre me han apoyado en todas mis decisiones, me han animado y siempre han estado ahí.

Y cómo no, a David, quien creo que en estos últimos meses ha sufrido tanto como yo o más. Siempre estas ahí cuando te necesito, me animas día a día y demuestras eterna confianza en mí. Muchas gracias.

MUCHAS GRACIAS A TODOS !!!!!!!!!!!!!!!

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS | VII |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XIII |
| CAPÍTULO I: Introducción | 1 |
| I.1. ALIMENTOS FUNCIONALES | 3 |
| I.2. POTENTES FUENTES NATURALES DE INGREDIENTES FUNCIONALES: ALGAS | 8 |
| I.2.1. Carotenoides y otros pigmentos | 10 |
| I.2.2. Fracción lipídica | 12 |
| I.2.3. Proteínas | 16 |
| I.2.4. Polisacáridos y fibra dietética | 19 |
| I.2.5. Vitaminas | 21 |
| I.2.6. Compuestos fenólicos | 22 |
| I.2.7. Compuestos volátiles bioactivos | 23 |
| I.2.8 Otros compuestos bioactivos | 24 |
| I.3. TECNOLOGÍAS LIMPIAS DE EXTRACCIÓN | 26 |
| I.3.1. Extracción con fluidos presurizados y extracción con agua subcrítica | 26 |
| I.3.2. Extracción con fluidos supercríticos | 30 |
| I.3.3. Extracción asistida por ultrasonidos | 34 |
| I.3.4. Extracción de compuestos bioactivos de algas mediante tecnologías limpias de extracción | 36 |
| I.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL | 38 |
| I.4.1. Determinación de la actividad antioxidante | 38 |
| I.4.1.1. Método de equivalentes de trolox (TEAC, <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>) | 41 |
| I.4.1.2. Ensayo de la capacidad de absorción de radicales libres (ORAC _{FL} , <i>Oxygen Radical Absorbance capacity</i>) | 43 |
| I.4.1.3. Capacidad de captación de radicales superóxido | 44 |
| I.4.2. Determinación de la actividad antimicrobiana | 45 |
| I.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA | 47 |
| I.5.1. Espectrometría de masas | 48 |
| I.5.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC) | 49 |
| I.5.3. Cromatografía de Gases (GC) | 52 |
| BIBLIOGRAFÍA | 55 |

PRIMERA PARTE

| | |
|--|----|
| Introducción general a la Primera Parte | 77 |
| CAPÍTULO II: Extracción de compuestos antioxidantes y antimicrobianos con líquidos presurizados y con ultrasonidos a partir de <i>Chlorella vulgaris</i>. Caracterización química y funcional | 83 |
| II.1. INTRODUCCIÓN | 85 |
| II.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 87 |
| II.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 88 |
| II.3.1. Muestras y reactivos | 88 |
| II.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE) | 89 |
| II.3.3. Extracción asistida con ultrasonidos (UAE) | 91 |
| II.3.4. Caracterización funcional | 92 |
| II.3.4.1. Capacidad antioxidante | 92 |
| II.3.4.2. Actividad antimicrobiana | 93 |
| II.3.4.2.1. Cepas utilizadas | 93 |
| II.3.4.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y las concentraciones bactericidas (MBC) y fungicidas mínimas (MFC) | 93 |
| II.3.5. Caracterización química | 94 |
| II.3.5.1. Análisis mediante cromatografía de líquidos (HPLC-DAD) | 94 |
| II.3.5.2. Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .. | 96 |
| II.3.5.2.1. Análisis de la fracción volátil | 96 |
| II.3.5.2.2. Análisis de ácidos grasos | 97 |
| II.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 98 |

| | |
|--|-----|
| II.4.1. Extracción por PLE y UAE | 98 |
| II.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos | 100 |
| II.4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos | 102 |
| II.4.4. Caracterización química de los extractos por HPLC-DAD | 103 |
| II.4.5. Análisis de los extractos por GC-MS | 107 |
| II.4.5.1. Análisis de la fracción volátil | 107 |
| II.4.5.2. Análisis de los ácidos grasos | 111 |
| II.5. CONCLUSIONES | 115 |
| | |
| CAPÍTULO III: Obtención de extractos de <i>Synechocystis</i> sp. con actividad antioxidante y antimicrobiana obtenidos mediante extracción con líquidos presurizados (PLE). Caracterización química y funcional | 117 |
| III.1. INTRODUCCIÓN | 119 |
| III.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 121 |
| III.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 122 |
| III.3.1. Muestras y reactivos | 122 |
| III.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE) | 122 |
| III.3.3. Caracterización funcional | 123 |
| III.3.3.1. Capacidad antioxidante | 123 |
| III.3.3.2. Actividad antimicrobiana | 123 |
| III.3.4. Caracterización química | 123 |
| III.3.4.1. Análisis mediante cromatografía de líquidos (HPLC-DAD) | 123 |
| III.3.4.2. Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas | 124 |
| III.3.4.2.1. Análisis de la fracción volátil | 124 |
| III.3.4.2.2. Análisis de ácidos grasos | 124 |
| III.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 125 |
| III.4.1. Extracción por PLE | 125 |
| III.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos | 126 |
| III.4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos | 126 |
| III.4.4. Caracterización química de los extractos por HPLC-DAD | 127 |
| III.4.5. Caracterización química de los extractos por GC-MS | 130 |
| III.4.5.1. Análisis de la fracción volátil | 130 |
| III.4.5.2. Análisis de los ácidos grasos | 133 |
| III.5. CONCLUSIONES | 135 |
| | |
| CAPÍTULO IV: Obtención de extractos con actividad antioxidante y antimicrobiana de <i>Cystoseira abies-marina</i> mediante el empleo de extracción con líquidos presurizados. Caracterización química y funcional | 137 |
| IV.1. INTRODUCCIÓN | 139 |
| IV.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 140 |
| IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 141 |
| IV.3.1. Muestras y reactivos | 141 |
| IV.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE) | 142 |
| IV.3.3. Caracterización funcional | 142 |
| IV.3.3.1. Capacidad antioxidante | 142 |
| IV.3.3.2. Actividad antimicrobiana | 142 |
| IV.3.4. Caracterización química | 142 |
| IV.3.4.1. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) | 142 |
| IV.3.4.2. Análisis mediante cromatografía de líquidos (HPLC-DAD) | 143 |
| IV.3.4.3. Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas | 144 |
| IV.3.4.3.1. Análisis de la fracción volátil | 144 |
| IV.3.4.3.2. Análisis de ácidos grasos | 144 |
| IV.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 144 |
| IV.4.1. Extracción por PLE | 144 |
| IV.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos | 145 |
| IV.4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos | 146 |
| IV.4.4. Caracterización química de los extractos por TLC y HPLC-DAD | 147 |
| IV.4.5. Caracterización química de los extractos por GC-MS | 150 |
| IV.4.5.1. Análisis de la fracción volátil | 150 |
| IV.4.5.2. Análisis de los ácidos grasos | 155 |

| | |
|--|------------|
| IV.5. CONCLUSIONES | 157 |
| CAPÍTULO V: Obtención de extractos de <i>Himanthalia elongata</i> con actividad antioxidante y antimicrobiana mediante el empleo de extracción con líquidos presurizados. Caracterización química y funcional | 159 |
| V.1. INTRODUCCIÓN | 161 |
| V.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 163 |
| V.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 164 |
| V.3.1. Muestras y reactivos | 164 |
| V.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE) | 164 |
| V.3.3. Caracterización funcional | 165 |
| V.3.3.1. Capacidad antioxidante | 165 |
| V.3.3.2. Actividad antimicrobiana | 165 |
| V.3.4. Caracterización química | 165 |
| V.3.4.1. Análisis mediante cromatografía de líquidos (HPLC-DAD) | 165 |
| V.3.4.2. Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .. | 166 |
| V.3.4.2.1. Análisis de la fracción volátil | 166 |
| V.3.4.2.2. Análisis de ácidos grasos | 167 |
| V.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 167 |
| V.4.1. Extracción por PLE | 167 |
| V.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos | 168 |
| V.4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos | 169 |
| V.4.4. Caracterización química de los extractos por HPLC-DAD | 169 |
| V.4.5. Análisis de los extractos por GC-MS | 173 |
| V.4.5.1. Análisis de la fracción volátil | 173 |
| V.4.5.2. Análisis de los ácidos grasos | 176 |
| V.5. CONCLUSIONES | 178 |
| Discusión general a la Primera Parte | 179 |
| Bibliografía | 185 |
| SEGUNDA PARTE | |
| Introducción general a la Segunda Parte | 197 |
| CAPÍTULO VI: Determinación de ácidos fenólicos en extractos obtenidos mediante PLE a partir de diferentes tipos de algas | 203 |
| VI.1. INTRODUCCIÓN | 205 |
| VI.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 207 |
| VI.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 208 |
| VI.3.1. Muestras y reactivos | 208 |
| VI.3.2. Procedimiento de extracción (PLE-SPE) | 209 |
| VI.3.2.1. Extracción con líquidos presurizados (PLE) | 209 |
| VI.3.2.2. Hidrólisis ácida | 210 |
| VI.3.2.3. Extracción de fase sólida (SPE) | 210 |
| VI.3.3. Cromatografía de líquidos de resolución rápida y espectrometría de masas en tándem | 210 |
| VI.3.4. Validación del método de análisis | 213 |
| VI.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 213 |
| VI.4.1. Optimización y validación del método de análisis por RRLC-MS/MS | 213 |
| VI.4.2. Extracción de compuestos fenólicos por PLE-SPE | 216 |
| VI.5. CONCLUSIONES | 220 |
| CAPÍTULO VII: Búsqueda de isoflavonas presentes en diferentes especies de algas | 221 |
| VII.1. INTRODUCCIÓN | 223 |
| VII.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 227 |
| VII.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 228 |
| VII.3.1. Muestras y reactivos | 228 |
| VII.3.2. Pretratamiento de la muestra con ultrasonidos | 229 |

| | |
|--|-----|
| VII.3.3. Extracción con fluidos supercríticos (SFE) | 229 |
| VII.3.4. Cromatografía de líquidos de resolución rápida y MS/MS | 232 |
| VII.3.5. Validación del método de análisis | 234 |
| VII.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 234 |
| VII.4.1. Estudio de las condiciones de optimización de la extracción por SFE | 234 |
| VII.4.2. Optimización y validación del método de análisis por RRLC-MS/MS | 239 |
| VII.4.3. Análisis de isoflavonas en algas | 241 |
| VII.5. CONCLUSIONES | 246 |
| Discusión general a la Segunda Parte | 247 |
| Bibliografía | 253 |

TERCERA PARTE

| | |
|---|-----|
| Introducción general a la Tercera Parte | 261 |
| CAPÍTULO VIII: Formación de nuevos compuestos con capacidad antioxidante mediante la extracción con agua subcrítica de sistemas modelos de glicación | 271 |
| VIII.1. INTRODUCCIÓN | 273 |
| VIII.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 273 |
| VIII.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 274 |
| VIII.3.1. Productos químicos y reactivos | 274 |
| VIII.3.2. Preparación de los sistemas modelos | 275 |
| VIII.3.3. Extracción con agua subcrítica (SWE) | 275 |
| VIII.3.4. Fraccionamiento de las muestras | 276 |
| VIII.3.5. Determinación de los productos iniciales de la reacción de Maillard (compuestos de Amadori) | 276 |
| VIII.3.6. Determinación de grupos amino primarios libres (OPA) | 276 |
| VIII.3.7. Determinación de productos avanzados de la reacción de Maillard (productos fluorescentes) (AGEs) | 278 |
| VIII.3.8. Determinación de los productos finales de la reacción de Maillard (melanoidinas) .. | 278 |
| VIII.3.9. Evaluación de la capacidad antioxidante | 278 |
| VIII.3.9.1. Ensayo TEAC | 278 |
| VIII.3.9.2. Ensayo ORAC _{FL} | 279 |
| VIII.3.10. Análisis de los resultados | 280 |
| VIII.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 281 |
| VIII.4.1. Cambios de pH | 281 |
| VIII.4.2. Aminoácidos disponibles | 282 |
| VIII.4.3. Productos iniciales de la reacción de Maillard | 283 |
| VIII.4.4. Determinación de los productos avanzados de la reacción de Maillard (compuestos fluorescentes) | 286 |
| VIII.4.5. Productos de pardeamiento | 286 |
| VIII.4.6. Capacidad antioxidante | 287 |
| VIII.4.7. Fraccionamiento de los productos de la reacción de Maillard | 288 |
| VIII.5. CONCLUSIONES | 290 |
| CAPÍTULO IX: Búsqueda de nuevos compuestos con actividad antioxidantes formados durante la extracción con agua subcrítica en micro- y macroalgas | 293 |
| IX.1. INTRODUCCIÓN | 295 |
| IX.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO | 295 |
| IX.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 297 |
| IX.3.1. Productos químicos y reactivos | 297 |
| IX.3.2. Muestras | 298 |
| IX.3.3. Extracción con agua subcrítica (SWE) | 298 |
| IX.3.4. Fraccionamiento de las muestras | 298 |
| IX.3.5. Contenido total en proteínas | 300 |
| IX.3.6. Determinación de grupos amino primarios libres (OPA) | 301 |
| IX.3.7. Determinación del contenido en azúcares (Método colorimétrico del fenol sulfúrico). .. | 301 |
| IX.3.8. Determinación del contenido total de fenoles (Método Folin-Ciocalteu)..... | 302 |

| | |
|---|------------|
| IX.3.9. Determinación de productos avanzados de la reacción de Maillard fluorescentes | 303 |
| IX.3.10. Determinación de los MRPs finales (melanoidinas) | 303 |
| IX.3.11. Evaluación de la capacidad antioxidante | 304 |
| IX.3.11.1. Ensayo ABTS | 304 |
| IX.3.11.2. Ensayo ORAC _{FL} | 304 |
| IX.3.11.3. Capacidad de captación de radicales superóxido (O ₂ ^{•-}) | 304 |
| IX.3.12. Análisis de los resultados | 305 |
| IX.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 306 |
| IX.4.1. Extracción con agua subcrítica (SWE) | 306 |
| IX.4.2. Caracterización química de los extractos | 307 |
| IX.4.2.1. Fenoles totales | 307 |
| IX.4.2.2. Compuestos nitrogenados | 309 |
| IX.4.2.3. Azúcares disponibles | 309 |
| IX.4.2.4. Cambios de pH | 310 |
| IX.4.2.5. Productos avanzados de la reacción de Maillard (compuestos fluorescentes) ... | 311 |
| IX.4.2.6. Productos de pardeamiento | 314 |
| IX.4.3. Capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por SWE | 315 |
| IX.4.4. Fraccionamiento de los extractos | 318 |
| IX.5. CONCLUSIONES | 321 |
| Discusión general a la Tercera Parte | 325 |
| Bibliografía | 329 |
| CAPÍTULO X: Conclusiones finales | 339 |
| ANEXO: Publicaciones relacionadas | 343 |

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

En la presente Memoria se exponen los resultados más relevantes obtenidos durante la realización del trabajo de investigación titulado “Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales naturales procedentes de algas”. Hoy en día, existe una clara tendencia en la sociedad hacia la mejora de la alimentación, no sólo desde el punto nutritivo, sino para transformar ésta en una herramienta válida y eficaz para la prevención de enfermedades. Los alimentos funcionales, definidos como aquellos que son capaces de aportar algún beneficio fisiológico adicional comparados con sus análogos convencionales, están ganando una importancia cada vez mayor en este sentido. Así, una de las grandes tendencias en investigación relacionada con la Ciencia y Tecnología de Alimentos, es la búsqueda de nuevos ingredientes funcionales que puedan servir para la obtención de esta nueva clase de alimentos funcionales.

Una de las líneas de investigación de nuestro grupo en los últimos años se basa en la búsqueda de potenciales ingredientes funcionales a partir de matrices naturales, como plantas o algas. Dentro de esta línea de investigación se enmarcó el proyecto “Microalgas y cianobacterias como fuente de ingredientes alimentarios funcionales. Desarrollo de procesos limpios empleando extracción con fluidos subcríticos y caracterización química” en el cual se ha llevado a cabo la presente Tesis Doctoral. Este proyecto tenía como objetivo principal la obtención de nuevos ingredientes alimentarios funcionales (antioxidantes, antivirales, etc.) a partir de nuevas cepas de microalgas mediante el desarrollo de procesos de extracción basados en el empleo de la tecnología de fluidos sub- y supercríticos. De esta forma, el presente trabajo se centra en el estudio de la composición de diferentes tipos de micro- y macroalgas con el objetivo de obtener y caracterizar, empleando técnicas de extracción avanzadas respetuosas con el medioambiente y metodologías de análisis avanzado, nuevos potenciales ingredientes funcionales.

La presente Memoria está dividida en diez capítulos, que a su vez se agrupan en tres partes. En el Capítulo I se recoge una introducción general que engloba las principales características y aplicaciones de las tecnologías limpias de extracción en Ciencia y Tecnología de Alimentos así como la definición de alimentos funcionales, su marco regulatorio y una breve descripción de los ingredientes funcionales más novedosos. Además se presenta una revisión bibliográfica sobre los diferentes

compuestos bioactivos que se han descrito en algas y se introducen brevemente las técnicas de caracterización química y funcional empleadas en este trabajo.

La Primera Parte de este trabajo engloba los Capítulos II, III, IV y V. En esta Primera Parte se llevó a cabo un *screening* de ingredientes funcionales presentes en diferentes especies de macro- y microalgas, concretamente una microalga verde (*Chlorella vulgaris*), una microalga verde-azulada (*Synechocystis* sp.) y en dos macroalgas marrones (*Cystoseira abies-marina* e *Himanthalia elongata*). Para ello, se desarrolló un plan de trabajo en el que, en primer lugar, se realizó la optimización de las condiciones de extracción por líquidos presurizados (PLE), mediante el empleo de diferentes disolventes y distintas temperaturas de extracción. Posteriormente, se procedió a la caracterización funcional de los extractos obtenidos por PLE, determinándose la capacidad antioxidante y la actividad antimicrobiana mediante el empleo de ensayos *in vitro* que permitían realizar una primera selección de los extractos producidos en función de sus bioactividades. Los extractos considerados más activos se seleccionaron para continuar con su caracterización química posterior mediante el empleo de diferentes métodos analíticos tales como HPLC-DAD y GC-MS, con el objetivo de correlacionar la presencia de determinados compuestos con la capacidad antioxidante y antimicrobiana medida.

La Segunda Parte de la presente Memoria esta compuesta por los Capítulos VI y VII. En esta parte se llevó a cabo un estudio en profundidad de diferentes macro-y microalgas, para confirmar la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos. A estos compuestos se les ha atribuido capacidad antioxidante, entre otras muchas propiedades, por lo que sería de interés demostrar su presencia en extractos complejos de algas. En concreto, en el Capítulo VI se describe la aplicación de la extracción con líquidos presurizados (PLE) para la extracción de diferentes ácidos fenólicos procedentes de algas. Además, se describe la puesta a punto de un método de análisis por RRLC-MS/MS con el que se pudieron identificar y cuantificar diferentes ácidos fenólicos en todas las algas estudiadas. Por su parte, en el Capítulo VII se describe la optimización de la extracción con fluidos supercríticos (SFE) para la obtención de isoflavonas, compuestos que nunca antes se habían descrito en algas, a partir de un amplio número de micro- y macroalgas incluidas en los principales grupos de algas.

Asimismo, se muestra la aplicación de un método de análisis por RRLC-MS/MS gracias al cual se pudieron identificar y cuantificar estos analitos en todas las algas estudiadas.

La Tercera Parte de la presente Memoria está compuesta por los Capítulos VIII y IX. En esta Tercera Parte se lleva a cabo el estudio de diferentes eventos químicos, como son la reacción de Maillard y caramelización, que podrían tener lugar durante la extracción con agua subcrítica (SWE) de compuestos bioactivos a partir de matrices naturales, como son las algas. Los compuestos derivados de estos procesos químicos podrían influir positivamente en la bioactividad del extracto, concretamente en la capacidad antioxidante, ya que los productos derivados de las reacciones de Maillard y caramelización se han descrito como potentes antioxidantes. En el Capítulo VIII se describe el estudio del efecto de las diferentes condiciones de extracción con agua subcrítica en diferentes sistemas modelo azúcar-aminoácido. Una vez confirmada la presencia de productos derivados de estas reacciones, en el Capítulo IX se presentan los resultados obtenidos tras la extracción con agua a altas temperaturas a partir de diferentes tipos de algas. Para llevar a cabo el estudio de la evolución de la reacción de Maillard y/o caramelización, tanto en los sistemas modelo como en las muestras de algas, se realizó una caracterización química de los extractos en la que se midieron grupos amino libres, azúcares, compuestos fenólicos, compuestos iniciales y compuestos avanzados de la reacción de Maillard (compuestos fluorescentes y pardos), entre otros. Asimismo, se determinó la capacidad antioxidante de los extractos mediante diferentes técnicas *in vitro*, pudiéndose correlacionar los nuevos compuestos formados con la capacidad antioxidante de los extractos.

Por último, en el Capítulo X, se describen las conclusiones generales que se derivan de los diferentes trabajos presentados en esta Memoria de Tesis Doctoral. Además, se incluye al final de esta Memoria un Anexo que contiene las publicaciones científicas a las que ha dado lugar la presente Tesis Doctoral hasta el momento.

Por tanto, el **objetivo general** del presente trabajo ha sido la obtención de ingredientes funcionales procedentes de algas mediante la aplicación de técnicas avanzadas de extracción, así como la puesta a punto de diferentes metodologías analíticas para la identificación de dichos ingredientes.

Para llevar a cabo el objetivo general planteado, se abordaron los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo de nuevos métodos de extracción de compuestos bioactivos (antioxidantes y antimicrobianos) procedentes de diferentes algas, basados en el empleo de la extracción con líquidos presurizados (empleando diferentes disolventes, así como distintas temperaturas de extracción), extracción con agua subcrítica y extracción con fluidos supercríticos.
- Desarrollo de nuevos métodos de caracterización química para la determinación de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante y antimicrobiana observada en los extractos, tanto existentes en las matrices estudiadas como formados durante los procesos de extracción realizados.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| AA | Ácido araquidónico |
| AAPH | 2,2-azobis(2-amidopropano) |
| Abs | Absorbancia |
| ABTS | 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) |
| AGEs | Productos finales de glicación avanzada |
| APCI | Ionización química a presión atmosférica |
| ASE | Extracción acelerada con disolventes |
| AUC | Área bajo la curva |
| CFA | Ácidos grasos conjugados |
| CLA | Ácido linoleico conjugado |
| DAD | Detector de haz de diodos |
| DGDG | Digalactosil diacilglicerol |
| DHA | Ácido docosahexaenoico |
| DHE | Dihidroetidio |
| DPPH | Captación de radicales 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl |
| EDTA | Ácido Etileno Diamino Tetra-acético |
| EI | Impacto electrónico |
| ELSD | Detector evaporativo de dispersión de luz |
| EPA | Ácido eicosapentaenoico |
| ESI | Electrospray |
| F | Furfural |
| FD | Detector de fluorescencia |
| FID | Detector de ionización de llama |
| FOSHU | Foods Of Specific Health Use |
| FPLC | Fast Protein Liquid Chromatography |
| FU | Unidades arbitrarias de fluorescencia |
| FUFOSE | Functional Food Science in Europe |
| GAE | Equivalentes de ácido gálico |
| GC | Cromatografía de gases |
| GRAS | Disolvente generalmente considerado seguro |
| HAT | Métodos de transferencia de átomos de hidrógeno |
| HMF | Hidroximetil-furfural |
| HMW | Alto peso molecular |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta eficacia |
| ILSI | International Life Science Institute |
| JCBN | Joint Commission of Biochemical Nomenclature |
| kDa | kiloDalton |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| LLE | Extracción líquido-líquido |
| LMW | Bajo peso molecular |
| LOD | Límite de detección |
| LOQ | Límite de cuantificación |
| MAE | Extracción Asistida por Microondas |
| MBC | Concentración mínima bactericida |
| MFC | Concentración mínima fungicida |
| MGDG | Monogalactosil diacilgliceridos |

| | |
|--------------------------|--|
| MIC | Concentración mínima inhibitoria |
| MRPs | Productos de la reacción de Maillard |
| MS | Espectrometría de masas |
| NBT | Azul de nitrotetrazolio |
| OPA | o-Ftaldehído |
| ORAC_{FL} | Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno |
| PBS | Tampón Fosfato Salino |
| PLE | Extracción presurizada con disolventes |
| PUFA | Acido graso poliinsaturado |
| RI | Índices de retención |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| RP-HPLC | Cromatografía de líquidos en fase inversa |
| RRLC | Cromatografía de líquidos de resolución rápida |
| RSD | Desviación estándar residual |
| SET | Métodos basados en la transferencia electrónica |
| SFE | Extracción con fluidos supercríticos |
| SHWE | Extracción con Agua Sobrecalentada |
| SLE | Extracción sólido-líquido |
| SOD | Enzima superóxido dismutasa |
| SPE | Extracción en fase sólida |
| SWE | Extracción con agua subcrítica |
| TEAC | Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox |
| TLC | Cromatografía en capa fina |
| UV/Vis | Ultravioleta/Visible |

CAPÍTULO I:

“Introducción”

I.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

El desarrollo económico, cultural y científico de nuestra sociedad ha traído consigo importantes cambios en los hábitos alimentarios y de estilo de vida. En los países desarrollados se consumen dietas con alta densidad calórica, ricas en grasas saturadas y azúcares añadidos, mientras que ha descendido el consumo de carbohidratos complejos y fibra dietética. Todo esto se ha acompañado de un descenso en la actividad física. Como consecuencia, se ha incrementado la problemática de la obesidad en la población, y con ello las enfermedades cardiovasculares, diabetes e hipertensión (Geslain-Lanéelle, 2006), entre otras enfermedades altamente relacionadas con la dieta.

El creciente número de trabajos científicos publicados en las dos últimas décadas sobre la relación entre la dieta y la incidencia de enfermedades crónicas, ha puesto de manifiesto las extraordinarias posibilidades que ofrecen los alimentos para mantener, e incluso mejorar, el estado de salud (Palanca y col., 2006). Todo esto ha suscitado un elevado interés entre los consumidores y la industria alimentaria, buscando nuevos productos que contribuyan a la salud y al bienestar. Este nuevo tipo de alimentos, que promueven el correcto mantenimiento y/o la mejora de la salud, se vienen denominando genéricamente alimentos funcionales, y las empresas que los producen presentan una rápida expansión mundial (Sloan, 1999).

La idea de elaborar alimentos no sólo para cubrir las necesidades nutricionales, sino también para proteger la salud de la población, fue desarrollada a principios de los años 80 en Japón, en concreto a través de su Ministerio para la Salud, como respuesta a una creciente preocupación por los elevados gastos en salud de la población japonesa, con alta expectativa de vida. Es así como se creó un marco regulatorio que favorecía el desarrollo de estos alimentos, que en la actualidad se conocen como FOSHU (*Foods Of Specific Health Use*) (Arai, 1996). En Europa, en la segunda mitad de los años 90, un grupo de trabajo coordinado por el International Life Science Institute (ILSI), y patrocinado por la Comisión Europea, promovió dentro del 4º Programa Marco la Acción Concertada FUFOSE (*Functional Food Science in Europe*) para estimular el estudio científico de los alimentos funcionales.

A partir de este proyecto surgió un primer concepto de alimento funcional para

Europa. Se propuso que un alimento podría considerarse “funcional” si “demuestra satisfactoriamente que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo de modo que mejore el estado de salud o bienestar y reduzca el riesgo de padecer alguna enfermedad” (Diplock y col., 1999). Cabe destacar tres aspectos importantes y novedosos en esta definición: a) el efecto funcional es distinto que el nutritivo; b) debe demostrarse satisfactoriamente; c) puede consistir en una mejoría de funciones fisiológicas o en una reducción de riesgo de desarrollar patologías. Además, el alimento funcional debe poseer una serie de características adicionales, como ejercer su función beneficiosa en el organismo cuando se ingiere en cantidades normales de consumo, y mantener tanto una estructura como una forma similar a la de su correspondiente alimento análogo no funcional.

Al no existir consenso a nivel mundial sobre la definición de alimento funcional y sobre su legislación, han aparecido muchos términos además del más extendido “alimentos funcionales” como son: “alimentos de diseño”, “nutracéuticos”, “alimentos”, “farmalimentos”, etc. Todos pueden considerarse sinónimos a efectos prácticos aunque a veces se apliquen con matices específicos. Por ejemplo, los nutracéuticos, a diferencia de los alimentos funcionales, son preparados que también poseen actividad funcional beneficiosa para el organismo, pero éstos no respetan la presentación ni la estructura de un alimento convencional. Por ello los nutracéuticos son empleados comúnmente como suplementos alimenticios, en forma de comprimidos, cápsulas, preparados, etc.

Actualmente, dentro de la Unión Europea, los alimentos funcionales deben acogerse al Reglamento aprobado en diciembre de 2006 por la Comisión Europea (Reglamento CE nº 1924/2006) relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (DO404 de 30 de diciembre de 2006, p. 9). Su entrada en vigor en febrero de 2007 llena el vacío legal existente en la Unión Europea con el fin de proteger tanto los intereses de los consumidores como de la industria alimentaria, y ayuda a definir claramente qué alimentos pueden ser efectivamente considerados alimentos funcionales. En este reglamento se regulan las alegaciones nutricionales y de propiedades saludables de los nuevos productos alimenticios que deben ser fundamentadas científicamente, norma que afectará a la presentación, etiquetado y a la publicidad de los mismos.

El objetivo principal de la ciencia de la alimentación funcional es identificar las interacciones beneficiosas entre un alimento o ingrediente concreto y una o más funciones del organismo, obteniendo, si es posible, evidencias sobre los mecanismos implicados en la interacción. Este objetivo primario se debe basar en investigaciones *in vitro* o *ex vivo* en líneas celulares o tejidos en cultivo que demuestren una eficaz acción beneficiosa, seguidas por estudios en modelos animales y finalmente deben ser corroborados en estudios de observación o intervención en humanos (ensayos clínicos).

El diseño riguroso de un alimento funcional requiere conocer a nivel molecular los mecanismos de la actividad biológica de sus componentes y las bases de la enfermedad, o enfermedades, a la que se dirige. La ciencia de reciente aparición que estudia la interacción entre los genes y las sustancias presentes en la dieta, se llama genómica nutricional. La genómica nutricional pretende aportar el conocimiento que permita hacer diagnóstico y establecer un tratamiento nutricional basado en el genotipo individual, mediante dos ramas principales: la nutrigenética y la nutrigenómica. La nutrigenética hace referencia al análisis de variaciones genéticas entre individuos y su respuesta clínica a nutrientes específicos, mientras que, la nutrigenómica pretende proporcionar un conocimiento molecular de los componentes de la dieta que contribuyen a la salud mediante la alteración de la expresión y/o estructuras, según la constitución genética individual (Gómez-Ayala, 2007). Teóricamente, podríamos llegar a seleccionar una dieta según nuestro genoma con el objetivo de reducir el riesgo genético de padecer ciertas enfermedades o para encontrar en el mercado productos diseñados específicamente para “días difíciles” o para competiciones deportivas o para cuando necesitemos sentirnos relajados, etc (Marriott, 2000).

La pauta principal que debe seguirse en el diseño de un alimento funcional es aumentar lo máximo posible la relación beneficio/riesgo, actuando simultáneamente sobre ambos: tratando de aumentar al máximo el beneficio y reduciendo al mínimo el riesgo. El aumentar el beneficio implica buscar un efecto fisiológico amplio, asegurar que existe biodisponibilidad y que dicha biodisponibilidad se va a mantener a lo largo de toda la vida útil del alimento. Para reducir el riesgo es necesario llevar a cabo estudios de toxicidad, añadir los ingredientes funcionales en las dosis mínimas efectivas y utilizar como ingredientes funcionales productos que se encuentren de forma natural

en alimentos de uso habitual, existiendo una gran preferencia de éstos sobre los componentes de origen sintético.

La acción beneficiosa que ejerce un alimento funcional (ver Tabla I.1 para algunos ejemplos) se debe a una serie de ingredientes que, en principio, o no se encuentran en el alimento análogo convencional, o se encuentran en bajas concentraciones, insuficientes para ejercer dichos efectos. Estos ingredientes son los denominados *ingredientes funcionales*. Al principio se enriquecieron alimentos con vitaminas y/o minerales, como la vitamina C, vitamina E, ácido fólico, zinc, hierro o calcio (Sloan, 2000). Posteriormente, el enfoque cambió a alimentos enriquecidos con varios micronutrientes como ácidos grasos omega-3, ácido linoleico conjugado (CLA), fitosteroles, o fibra soluble (inulina y fructooligosacáridos), estos últimos conocidos como alimentos prebióticos. Con estos micronutrientes se pretende mejorar la salud o prevenir enfermedades, incluidos algunos tipos de cáncer (Hasler 1998; Unnevehr y Hasler 2000; Sloan 2002). También se han enriquecido alimentos con microorganismos viables que son beneficiosos para la salud humana (anticancerígenos, mejoran la función del tracto intestinal y la función inmune,...); estos productos son los llamados probióticos, y los microorganismos que se suelen incorporar son bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii* La1, *L. reuteri*, *L. casei* Shirota, etc. (Sanders, 1999; Gursoy y Kinik, 2006).

Tabla I.1. Algunos ejemplos de ingredientes funcionales junto con su posible efecto sobre la salud y ejemplos de alimentos convencionales donde se encuentran de forma natural (según Hasler y col., 2002.).

| Ingredientes funcionales | Posible efecto sobre la salud | Alimento convencional en el que se encuentra de forma natural |
|---------------------------------|--|--|
| Flavonoides (procianidinas) | Reducen el estrés oxidativo en el LDL-colesterol | Chocolate |
| Catequinas | Reducen el riesgo de padecer cáncer | Té verde |
| Licopeno | Reduce el riesgo de padecer cáncer | Tomate |
| Compuestos polifenólicos | Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares | Vino tinto |
| Ácidos grasos (n-3) | Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares | Pescado |
| Probióticos | Mejoran la función del tracto intestinal y la función inmune | Productos lácteos fermentados |
| Glucosinolatos, indoles | Reducen el riesgo de padecer ciertos tipos de cánceres | Crucíferas |
| Ácido linoleico conjugado (CLA) | Reduce el riesgo de padecer cáncer de mama | Carne de pavo, cordero, vaca, y lácteos |
| Proantocianidinas | Reducen las infecciones del tracto urinario | Zumo de arándanos |
| Esteroles y esteres de estanol | Reducen el colesterol total y el LDL-colesterol | Algas |
| Fibra soluble | Reduce el colesterol total y el LDL-colesterol | Cereales integrales |
| Compuestos azufrados | Reducen el colesterol total y el LDL-colesterol | Ajo |

Debido a que la demanda de los alimentos funcionales por parte de los consumidores aumenta continuamente, existe cada vez más una necesidad de la industria alimentaria de encontrar ingredientes con nuevas actividades beneficiosas. El origen natural de estos ingredientes funcionales es preferido claramente por los consumidores, en comparación con posibles ingredientes sintéticos. Por ello, hoy en día, la búsqueda de nuevas fuentes naturales de este tipo de compuestos, es de gran interés. Así pues, en el presente trabajo se ha investigado la obtención de nuevos ingredientes alimentarios funcionales a partir de fuentes naturales como son las algas. Otro aspecto relevante relacionado con la obtención de estos ingredientes funcionales, y que también se ha abordado en la presente Memoria, es el empleo de técnicas de extracción avanzadas que impliquen beneficios adicionales tanto para la salud como para el medio ambiente. Ambos aspectos, el empleo de algas como fuente natural de ingredientes funcionales y las tecnologías “verdes” de extracción de estos compuestos bioactivos son clave en la presente Memoria y, como tal, se discuten con detalle a continuación.

I.2. POTENTES FUENTES NATURALES DE INGREDIENTES FUNCIONALES: ALGAS.

Las algas son organismos fotosintéticos que poseen estructuras reproductoras simples. Las algas se pueden encontrar en casi cualquier hábitat acuático y terrestre, ya que poseen una gran biodiversidad así como diferentes morfologías, que pueden ir desde especies de fitoplancton, organismos unicelulares microscópicos (microalgas), hasta pluricelulares de gran tamaño (macroalgas) (Norton y col., 1996). El número de especies existentes de algas se desconoce, aunque se ha estimado que existen entre uno y diez millones de especies (Metting, 1996). Una de las características de las microalgas es, por ejemplo, su mayor eficiencia fotosintética puesto que son capaces de usar la energía de la luz y el dióxido de carbono más eficazmente que las plantas para la producción de biomasa (Benemann, 1997; Miao y Wu, 2006). Además, las algas han demostrado ser una buena fuente para la producción de biocombustibles, útiles para la purificación de aguas residuales (Orús y col., 1991; Muñoz y Guieysse, 2006), como alimento en acuicultura, así como para la producción de extractos que pueden ser utilizados para la elaboración de alimentos de alto valor añadido y productos farmacéuticos (Spolaore y col., 2006).

Las algas se clasifican en diferentes grupos: algas marrones (Phaeophyta), algas rojas (Rhodophyta), algas verdes (Chlorophyta), y algas verde-azuladas (Cyanophyta).

El uso de algas en alimentación dentro de diferentes culturas es bien conocido. En Asia, las algas se consumen, en gran medida, como un vegetal más. Por ejemplo, los japoneses consumen de media 1.4 kg de algas por persona y año. En general, el consumo de algas verdes (5%), marrones (66.5%) y rojas (33%) es alto en Asia, principalmente en Japón, China y Corea (Dawes, 1998). La tradición antigua y los hábitos alimenticios en dichas sociedades han hecho posible un gran número de estudios epidemiológicos que ponen de manifiesto los efectos beneficiosos de las algas (Teas, 1981; Funahashi, et al., 1999; Hiqashi-Okaj et al., 1999). En la sociedad occidental, la utilización de las algas ha estado históricamente más limitada, pero hoy en día las algas están despertando un gran interés como fuente natural de valiosos compuestos de interés alimentario.

Por ejemplo, las algas marinas son organismos que viven en un hábitat complejo y que están sometidas a condiciones extremas (cambios de salinidad, temperatura, variación en la irradiación, periodos de emersión por efecto de las mareas, oleajes y predadores, etc.), por lo que deben adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones ambientales para sobrevivir, produciendo para ello una gran variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos, con estructuras moleculares únicas, no encontradas en otros organismos (Carlucci y col., 1999). También es importante considerar su gran diversidad taxonómica y bioquímica, por lo que las investigaciones relacionadas con la búsqueda de productos biológicamente activos procedentes de algas pueden encontrar en estos organismos un campo casi inagotable.

Además de su carácter natural, otro de los aspectos importantes relacionados con las algas es su fácil cultivo, su rápido crecimiento (para muchas de las especies) y la posibilidad de manipular la producción de algunos de los compuestos bioactivos mediante el control de las condiciones de cultivo. Se convierten así en auténticos reactores naturales que pueden ser, en algunos casos, alternativos a la síntesis química para la obtención, a gran escala, de determinados compuestos o grupos de compuestos. Este es el caso, por ejemplo, de *Dunaliella salina*, una microalga muy conocida por ser capaz, en determinadas condiciones de cultivo, de producir grandes cantidades de β -caroteno a escala industrial (Zhu y Jiang, 2008; Ye y col., 2008; Hejazi y col., 2004a; Mojaat y col., 2008a; Hejazi y col., 2004b; Hejazi y col., 2003). Uno de los aspectos menos estudiados, y en el que se centra el trabajo que se lleva a cabo en nuestro grupo de investigación, es el desarrollo de procedimientos de extracción medioambientalmente limpios que permitan el aislamiento a gran escala de los compuestos o grupos de compuestos de interés para la industria alimentaria.

En este trabajo se han explorado cinco microalgas, tres verdes (*Chlorella vulgaris*, *Spongiochloris spongiosa* y *Scenedesmus*) y dos verde-azuladas (*Synechocystis* sp. y *Nostoc* 17); y nueve macroalgas, incluyendo cinco algas marrones (*Cystoseira abies marina*, *Himantalia elongata*, *Sargassum vulgare*, *Sargassum muticum*, y *Undaria pinnatifida*) y cuatro algas rojas (*Chondrus crispus*, *Halopitys incurvus*, *Hypnea spinella*, y *Porphyra* spp.) como potentes fuentes naturales de ingredientes funcionales. Muchas de estas especies son bien conocidas ya que algunas de ellas pertenecen al grupo de las algas comestibles más comúnmente consumidas.

A continuación se presenta una revisión bibliográfica sobre los diferentes compuestos bioactivos que se han descrito en las algas como son: carotenoides, compuestos lipídicos, proteínas, compuestos fenólicos, polisacáridos, vitaminas, etc. Estos compuestos son de interés ya que podrían ser empleados potencialmente como ingredientes funcionales.

I.2.1. Carotenoides y otros pigmentos.

Los carotenoides son una familia de pigmentos sintetizados por matrices naturales, responsables de los colores amarillo, naranja y rojo de frutas y verduras. Los carotenoides destacan por su amplia distribución en la naturaleza, su diversidad estructural, y por presentar diversas funciones. En la naturaleza se conocen más de 600 carotenoides diferentes, no incluyendo en esta clasificación los diferentes isómeros en los que algunos de ellos pueden estar naturalmente presentes. Su estructura química se caracteriza por estar formada por ocho unidades isoprenoides C_5 , formando un esqueleto simétrico, el cual contiene una larga cadena de dobles enlaces conjugados, que constituye, de hecho, el cromóforo de estos pigmentos. Las diferencias entre los carotenoides se derivan de la modificación de la estructura básica, incluyendo procesos de ciclación en uno o ambos extremos de la cadena, adición de grupos laterales, hidrogenación ó deshidrogenación, entre otros. En la bibliografía se ha descrito el aislamiento y la caracterización de diferentes carotenoides a partir de fuentes naturales como plantas (González-Molina y col., 2010; Tanaka y col., 2008), algas (Plaza y col., 2009; Plaza y col., 2010), bacterias (Stafsnes y col., 2010; Ukibe y col., 2009), levaduras (Moliné y col., 2009) y hongos (Jim y col., 2010).

Los carotenoides juegan un papel importante en la fotosíntesis, como pigmentos para captar la luz, o formando complejos pigmento-proteínas que mantienen a carotenoides y clorofilas en posiciones adecuadas para los procesos de transferencia de energía que tienen lugar durante la fotosíntesis. Los carotenoides se han descrito como potentes antioxidantes (Rao y Rao, 2007; De Spirt y col., 2010) y sus efectos beneficiosos para la salud se han investigado a partir de numerosos estudios clínicos y epidemiológicos. Debido a su elevada actividad antioxidante, este tipo de metabolitos han demostrado poseer actividad anticancerígena (Silberstein y Parsons, 2010), prevenir la formación de úlceras (Kamath y col., 2008) y la aparición de enfermedades

cardiovasculares (Riccioni y col., 2008; Voutilainen y col., 2006).

Una forma de clasificar las algas puede ser por su distribución en carotenoides mayoritarios. Por ejemplo, los carotenoides mayoritarios (Figura I.1) en las algas verdes (Chlorophyta) son generalmente β -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina y zeaxantina; en las algas rojas (Rhodophyta) son α - y β -caroteno, luteína y zeaxantina; y en las algas marrones (Phaeophyta) son β -caroteno, violaxantina, y fucoxantina.

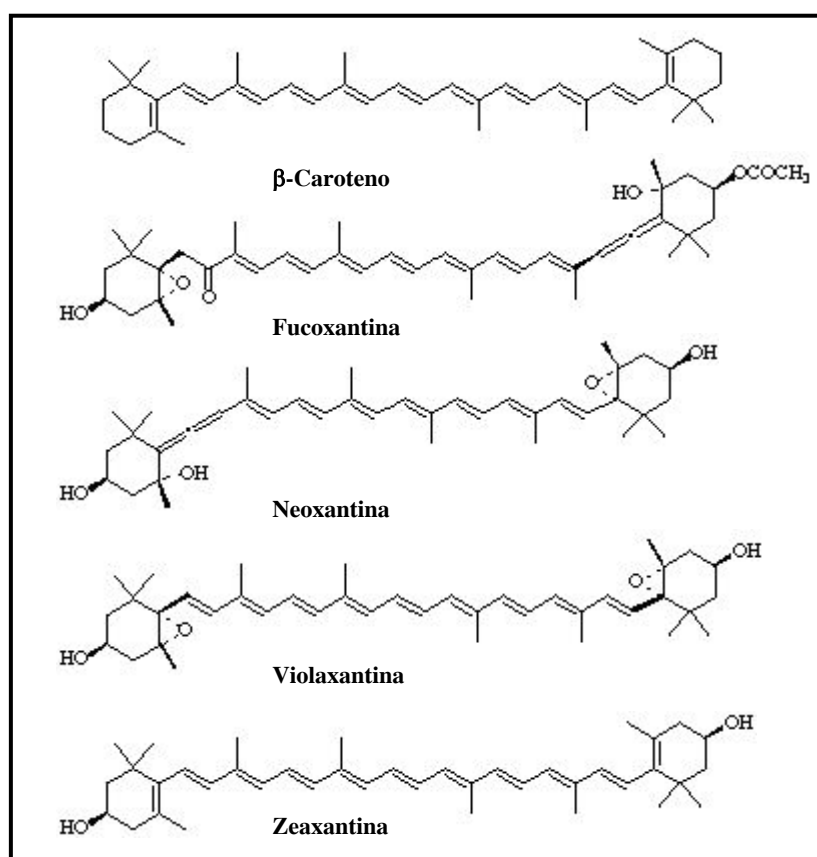


Figura I.1. Estructura química de los principales carotenoides encontrados en algas.

La composición de carotenoides en las algas puede presentar una gran variación relacionada principalmente con factores medioambientales, como son, la temperatura del agua donde se desarrollan, la salinidad del medio ó la disponibilidad de luz, así como con la disponibilidad de nutrientes. Muchos de los parámetros medioambientales varían de acuerdo con la estación del año, y los cambios en las condiciones ecológicas pueden estimular o inhibir la biosíntesis de varios metabolitos, como son los carotenoides. Por ejemplo, *Dunaliella salina* es una microalga verde, pero es muy conocida por ser una de las principales fuentes de β -caroteno, debido a que en unas

determinadas condiciones de cultivo esta microalga es capaz de producir este compuesto llegando a niveles de hasta un 14% de su peso seco (Metting, 1996). En este sentido, se han estudiado las condiciones particulares de cultivo a escala industrial para maximizar la producción de β -caroteno procedente de esta microalga (Zhu y Jiang, 2008; Ye y col., 2008; Hejazi y col., 2004a; Mojaat y col., 2008a; Hejazi y col., 2004b; Hejazi y col., 2003).

Otro ejemplo es la microalga verde *Haematococcus pluvialis* que produce clorofilas *a* y *b*, y carotenoides primarios, como β -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina, y zeaxantina en su ciclo normal de vida; sin embargo, cuando se cultiva en condiciones de estrés (elevada luminosidad y bajo contenido en nutrientes) posee la capacidad de acumular grandes cantidades de astaxantina (2-3% de su peso seco) (Rao y col., 2007). Este pigmento posee importantes actividades biológicas, como actividad antioxidante (Cerón y col. 2007), prevención en la formación de úlceras (Kamath y col., 2008) y actividad inmunomoduladora y anticancerígena (Okai y Higashi-Okai, 1996).

Por su parte, el pigmento más característico de las algas marrones es la fucoxantina, que es uno de los carotenoides más abundantes en la naturaleza (Hosokawa y col., 2004), representando más del 10% de la producción natural de carotenoides (Matsuno, 2001). Este carotenoide oxigenado ha demostrado ser muy efectivo inhibiendo el crecimiento celular e induciendo apoptosis en células cancerígenas humanas (Hosokawa y col., 1999; Kotate-Nara y col., 2001). También posee propiedades antiinflamatorias (Shiratori y col., 2005), antioxidantes (Sachindra y col., 2007), antidiabéticas (Maeda y col., 2007), y previene la obesidad (Maeda y col., 2005).

Otros pigmentos que se pueden encontrar en las algas son las clorofilas. Las clorofilas y sus metabolitos intermedios han demostrado contribuir a la actividad antioxidante y antimicrobiana de algunos extractos naturales (Mendiola y col., 2005).

1.2.2. Fracción lipídica.

El contenido y la composición lipídica de las algas varían según la especie, la localización geográfica, la estación del año, la temperatura, la salinidad, la intensidad lumínica o una combinación de estos factores. En general, las algas contienen alrededor

de un 1-3% del peso seco en lípidos, siendo los mayoritarios en todas las clases de algas los glicolípidos, seguido de lípidos neutros y fosfolípidos.

Entre los lípidos polares mayoritarios descritos en microalgas, destacan los monogalactosil diacilgliceroles (MGDGs), los digalactosil diacilgliceroles (DGDGs) y los fosfatidilgliceroles (PG) (Antonopoulou y col., 2005). Aunque estos compuestos, fundamentalmente los MGDGs y los DGDGs, son conocidos desde hace más de 40 años, recientemente se ha descubierto que poseen importantes funciones, principalmente actividad antiinflamatoria (Bruno y col., 2005). Los análogos glicoles de ceramidas y de PG provenientes de cianobacterias han demostrado tener actividad antitrombótica y antiinflamatoria (Antonopoulou y col., 2005). Estos lípidos polares se han encontrado entre otros, en *Spirulina platensis* (Herrero y col., 2007), en *Croococcidiopsis* sp. (Antonopoulou y col., 2005), en *Sargassum thunbergii* (Kim y col., 2007a) y en *Phormidium tenue* (Murakami y col., 1992).

Una gran parte del contenido lipídico presente en algas son ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Su mayor o menor concentración va a depender principalmente de factores ambientales. Un ejemplo de ello es que las algas acumulan más PUFAs a temperaturas más bajas (Khotimchenko, 1991). En este sentido, se ha descrito que las especies tropicales contienen menos lípidos (<1% del peso total) que las especies de aguas frías (1.6% del peso total) (Narayan y col., 2005).

Puesto que los humanos no pueden sintetizar dobles enlaces en la posición 6 o menor de 6, los PUFAs omega-3 (ω -3) y omega-6 (ω -6), aún siendo esenciales para la salud, deben obtenerse a través de la dieta. Los PUFAs de cadena larga, ω -3 y ω -6, son componentes estructurales y funcionales de las membranas celulares. La proporción ω -6: ω -3 debe ajustarse entre 3:1 hasta 5:1 (Stanley y col., 2007) para un correcto equilibrio en el organismo. En este sentido, una concentración excesiva de PUFA omega-6 y una relación muy elevada ω -6: ω -3 puede afectar al equilibrio redox celular (desplazándolo hacia condiciones más oxidantes) alterando la expresión de proteínas reguladoras y, por tanto, promoviendo la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, cáncer, y enfermedades inflamatorias o autoinmunes (Simopoulou, 2004; Kromann y Green, 1980; Burr y col., 1989; Von Schacky, 1988). En definitiva, un equilibrio adecuado entre la relación de ácidos grasos

ω -6 y ω -3 proporciona el mejor estado fisiológico en términos de expresión génica, metabolismo de eicosanoides y producción de citoquinas (Simopoulos, 1996).

En los últimos años, las propiedades de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ω -3, como son el ácido eicosapentaenoico (EPA) (ω -3, C_{20:5}) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (ω -3, C_{22:6}), se han estudiado con mucho interés, ya que se ha observado una influencia positiva en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Calzolari y col., 2009; Schuchardt y col., 2010; Zuliani y col., 2009).

Las algas verdes presentan niveles interesantes de ácido α -linolénico (ω -3, C_{18:3}), mientras que las algas rojas y marrones son ricas en ácidos grasos con 20 átomos de carbono tales como EPA y ácido araquidónico (AA) (ω -6, C_{20:4}). *Spirulina platensis* es una microalga que pertenece al grupo de las cianobacterias (o algas verde-azuladas) y es una importante fuente natural de DHA, pudiendo contener hasta un 9.1 % del total de ácidos grasos (Yukino y col., 2005).

En la Tabla I.2 (Sánchez-Machado y col., 2004; Ortiz y col., 2006) se muestra la composición típica de diferentes ácidos grasos presentes en algas. Como se puede observar, en todas las algas estudiadas, excepto *Undaria pinnatifida* y *Ulva lactuca*, el ácido graso más abundante es el ácido palmítico, llegando a suponer en *Phorphyra sp.* más del 63% del total de ácidos grasos. En *U. pinnatifida* el contenido en este ácido graso (17%) es superado sólo por el ácido octadecatetraenoico (ω -3, C_{18:4}) (23%), mientras que en *Ulva lactuca* el contenido en ácido palmítico (14%) tan sólo es superado por el ácido oleico (ω -9, C_{18:1}) (27%). Todas las algas contienen los ácidos grasos esenciales linoleico (ω -6, C_{18:2}) y linolénico (ω -3, C_{18:3}), y los precursores de eicosanoides, el ácido araquidónico y EPA. Además, la relación ω -6: ω -3 en las algas no supera el 1.49, por lo que podrían utilizarse para reducir la relación ω -6: ω -3 en la dieta. El contenido en ácidos grasos saturados es mayor en algas rojas (*Palmaria sp.* y *Porphyra sp.*) que en algas marrones y verdes, y sucede lo contrario en lo relativo a los ácidos grasos insaturados. Además, las algas rojas presentan de 8 a 12 veces más PUFAs C₂₀ que C₁₈. Por el contrario, las algas verdes contienen más PUFAs C₁₈, mientras que en las algas marrones se observan las mismas proporciones de PUFAs C₂₀ y C₁₈. El contenido en ácidos grasos esenciales es más alto generalmente en algas marrones y verdes que en algas rojas.

Tabla I.2. Perfil de ácidos grasos presentes en diferentes especies de algas. (Sánchez-Machado y col., 2004; Ortiz y col., 2006).

| Ácidos grasos | Chlorophytas | Phaeophyta | | | Rhodophyta | |
|------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|
| | <i>Ulva lactuca</i> | <i>Himanthalia elongata</i> | <i>Undaria pinnatifida</i> | <i>Laminaria ochroleuca</i> | <i>Palmaria sp.</i> | <i>Porphyra sp.</i> |
| C14:0 | 1.14 ± 0.22 | 5.85 ± 0.35 | 3.17 ± 0.31 | 4.97 ± 0.20 | 13.76 ± 0.61 | 0.53 ± 0.21 |
| C16:0 | 14.00 ± 1.12 | 32.53 ± 1.61 | 16.51 ± 1.35 | 28.51 ± 1.87 | 45.44 ± 1.84 | 63.19 ± 1.93 |
| C16:1 ω7 | 1.87 ± 0.21 | 2.79 ± 0.25 | 3.70 ± 0.88 | 5.62 ± 0.71 | 5.26 ± 0.63 | 6.22 ± 0.70 |
| C16:3 ω4 | - | 4.38 ± 1.33 | 2.31 ± 1.94 | 0.87 ± 0.10 | 1.20 ± 0.16 | 1.56 ± 0.51 |
| C18:0 | 8.39 ± 0.12 | 0.68 ± 0.15 | 0.69 ± 0.08 | 0.34 ± 0.14 | 1.28 ± 0.12 | 1.23 ± 0.10 |
| C18:1 ω9 | 27.43 ± 1.91 | 19.96 ± 2.01 | 6.79 ± 0.90 | 13.62 ± 1.24 | 3.13 ± 0.47 | 6.70 ± 1.16 |
| C18:1 ω7 | - | - | - | - | 2.08 ± 0.68 | 1.29 ± 0.68 |
| C18:2 ω6 | 8.31 ± 1.21 | 4.39 ± 0.34 | 6.23 ± 0.32 | 6.79 ± 0.61 | 0.69 ± 0.13 | 1.17 ± 0.13 |
| C18:3 ω3 | 4.38 ± 0.31 | 8.79 ± 0.71 | 11.97 ± 1.75 | 5.15 ± 0.71 | 0.59 ± 0.26 | 0.23 ± 0.16 |
| C18:4 ω3 | 0.41 ± 0.01 | 3.53 ± 0.56 | 22.60 ± 2.48 | 10.77 ± 1.85 | 0.74 ± 0.47 | 0.24 ± 0.35 |
| C20:1 ω9 | 4.21 ± 0.50 | - | - | - | 0.20 ± 0.10 | 4.70 ± 0.26 |
| C20:4 ω6 | 0.34 ± 0.01 | 10.69 ± 1.30 | 15.87 ± 1.68 | 14.20 ± 0.66 | 1.45 ± 0.31 | 6.80 ± 1.18 |
| C20:4 ω3 | - | 0.88 ± 1.80 | 0.70 ± 0.14 | 0.54 ± 0.90 | 0.14 ± 0.03 | 0.07 ± 0.02 |
| C20:5 ω3 | 1.01 ± 0.01 | 5.50 ± 1.78 | 9.43 ± 0.69 | 8.62 ± 0.56 | 24.05 ± 2.59 | 6.03 ± 0.95 |
| Saturados | 23.53 ± 1.46 | 30.06 ± 2.11 | 20.39 ± 1.73 | 33.82 ± 2.21 | 60.48 ± 2.58 | 64.95 ± 2.24 |
| Monoinsaturados | 33.51 ± 2.62 | 22.75 ± 2.26 | 10.50 ± 1.78 | 19.23 ± 1.99 | 10.67 ± 1.55 | 18.91 ± 2.81 |
| PUFAs | 14.45 ± 1.55 | 38.16 ± 7.84 | 69.11 ± 9.01 | 46.94 ± 4.58 | 28.86 ± 3.94 | 16.10 ± 3.31 |
| PUFAs ω6 | 8.65 ± 1.22 | 15.08 ± 1.64 | 22.10 ± 2.00 | 20.99 ± 1.27 | 2.14 ± 0.45 | 7.97 ± 1.31 |
| PUFAs ω3 | 5.80 ± 0.33 | 18.70 ± 4.84 | 44.70 ± 5.05 | 25.08 ± 3.21 | 25.52 ± 3.34 | 7.20 ± 1.48 |
| Relación ω6:ω3 | 1.49 | 0.81 | 0.49 | 0.83 | 0.13 | 1.21 |

Asimismo las algas contienen ácidos grasos conjugados (CFA) con cadenas largas de átomos de carbonos (desde 16 a 20) como constituyentes naturales de sus lípidos, pudiéndose encontrar trienos y tetraenos. No existe mucha información sobre los CFA en la bibliografía, habiéndose identificado en *Tydemanina expeditionis*, *Hydrolithon reinboldii* (Jiang y col., 2008) *Ptilota* (Zheng y col., 2002), *Acanthophora* (Bhaskar y col., 2004) y *Anadyomene stellata* (Bemis y col., 1996). Recientemente se ha comprobado que los PUFAs conjugados, como EPA conjugado, AA conjugado y DHA conjugado, poseen efecto citotóxico en líneas celulares cancerígenas en humanos (Matsumoto y col., 2001).

Además de los ácidos grasos, la fracción insaponificable de las algas contiene carotenoides (ver apartado I.2.1), tocoferoles (ver apartado I.2.5) y esteroides. Para la clasificación quimiotaxonómica de las algas se ha utilizado la distribución de la composición mayoritaria de esteroides. Recientemente, diferentes estudios biológicos han demostrado que los esteroides y sus derivados poseen importantes funciones biológicas (Brull y col., 2009; John y col., 2007; Bradford y Awad, 2007). Los fitosteroides (esteroides C₂₈ y C₂₉) juegan un papel importante en las industrias farmacéuticas y nutracéuticas, ya que estos compuestos son precursores de moléculas bioactivas (por ejemplo, el ergosterol es un precursor de la vitamina D₂, por lo que se usa para la producción de la hormona flavona y cortisona, presentando aplicaciones

terapéuticas para tratar la hipercolesterolemia). Los fitosteroles han demostrado un efecto de reducción en los niveles de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) y colesterol total en humanos, debido a que inhiben la absorción del colesterol en el intestino (Francavilla y col., 2010). En los países desarrollados, las concentraciones altas en sangre del colesterol total o LDL representan un mayor riesgo de sufrir enfermedades coronarias, una mayor causa de morbilidad y de mortalidad. Además de sus propiedades hipocolesterolémicas, los fitosteroles poseen actividad antiinflamatoria y antiaterogénica, pudiendo poseer actividad anticancerígena y antioxidante (Francavilla y col., 2010).

Desde el punto de vista quimiotaxonómico, en la bibliografía se describen como esteroides mayoritarios en algas rojas los compuestos con 27 átomos de carbono y el colesterol. Aun siendo el colesterol el principal esteroide presente en estas algas, es posible encontrar también altas concentraciones de desmosterol y 22E-dehidrocolesterol. Un ejemplo de ello es *Chondrus crispus*, que presenta altas concentraciones de colesterol (<94% de los esteroides totales), bajas cantidades de 7-dehidrocolesterol y estigmasterol, y mínimas cantidades de campesterol, sitosterol y 22-dehidrocolesterol (Tasende, 2000). En las algas verdes el contenido en esteroides es muy similar al de las plantas superiores, y además contienen cantidades elevadas de colesterol (Ackman, 1981), aunque en estas algas el esteroide predominante dependerá de la variedad, el orden o la familia. Por ejemplo, los esteroides principales de la alga verde *Ulva lactuca* son el colesterol y el isofucoesterol, mientras que, en *Codium dichotomum*, que también es un alga verde, es el clerosterol (Kapetanovic y col., 2005). Sin embargo, en las algas marrones como *Himanthalia elongata*, *Undaria pinnatifida*, *Cystoseira abies marina* y *Fucus virsioides*, el principal esteroide es el fucoesterol (Sánchez-Machado y col., 2004c; Moreno y col., 1998; Kapetanovic y col., 2005).

1.2.3. Proteínas.

El contenido proteico de las algas puede llegar a suponer un 47% de su peso seco (Fleurence, 1999), aunque estos niveles varían dependiendo de la estación de año y de la especie, pudiendo llegar a niveles incluso mayores puntualmente. El contenido proteico de las algas marrones es generalmente bajo (5-15 % del peso seco), excepto en la alga marrón *Undaria pinnatifida*, que presenta unos niveles de proteína entre 11 y

24% del peso seco (Fleurence, 1999), mientras que las algas verdes y rojas contienen altas concentraciones (generalmente 10-30% del peso seco), siendo las algas rojas las que presentan los niveles más altos; por ejemplo, *Porphyra tenera*, 33-47% del peso seco (Fleurence, 1999), o *Palmaria palmata*, 8-35% del peso seco (Morgan y col., 1980). Estos niveles son comparables a los encontrados en vegetales ricos en proteínas, como la soja.

La digestibilidad de las proteínas de las algas *in vivo* no está muy documentada, y los estudios que existen sobre su asimilación por humanos no presentan resultados muy concluyentes. Varios estudios *in vitro* han observado una alta degradación de las proteínas por el uso de enzimas proteolíticas. De hecho, la digestibilidad relativa de las proteínas en *Porphyra tenera* es mayor del 70 % (Fujiwara-Arasaki y col., 1984). En general, las algas poseen proteínas de alto valor nutricional ya que contienen todos los aminoácidos esenciales y en cantidades significativas. Por otro lado, algunos compuestos limitan la digestibilidad de las proteínas de las algas, como son los compuestos fenólicos o los polisacáridos que pueden encontrarse unidos a ellas. Se ha observado que, en algas marrones, la presencia de fibra soluble es un fuerte inhibidor de la actividad de la pepsina, proporcionando por tanto, efectos negativos para la digestibilidad de sus proteínas (Horie, 1995).

En cuanto a sus aminoácidos, la composición típica en estos compuestos de diferentes especies de algas se puede observar en la Tabla I.3 (Dawczynski y col., 2007). La calidad de las proteínas de los alimentos depende de la presencia de los aminoácidos esenciales. Estas algas presentan altas concentraciones de arginina, lisina, treonina, isoleucina, glicina y alanina, aunque, como se puede observar, los aminoácidos predominantes son glutamina y aspargina.

Tabla I.3. Perfil de aminoácidos presentes en diferentes algas (Dawczynski y col., 2007) (g/16 g N).

| Áminoácidos | <i>Porphyra sp.</i> | <i>Undaria pinnatifida</i> | <i>Laminaria sp.</i> | <i>Hizikia fusiforme</i> |
|---|---------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------|
| <u>Aminoácidos esenciales</u> | | | | |
| Histidina | 2.6 ± 0.4 | 2.5 ± 0.3 | 2.2 ± 0.4 | 2.6 ± 0.4 |
| Isoleucina | 3.1 ± 0.5 | 4.1 ± 0.3 | 2.7 ± 0.9 | 4.0 ± 0.4 |
| Leucina | 5.5 ± 0.9 | 7.4 ± 0.6 | 4.9 ± 1.7 | 6.7 ± 0.6 |
| Lisina | 4.9 ± 0.9 | 5.6 ± 0.4 | 3.9 ± 1.4 | 3.1 ± 0.3 |
| Metionina | 1.8 ± 0.7 | 1.7 ± 0.5 | 0.9 ± 0.2 | 1.6 ± 0.1 |
| Fenilalanina | 3.3 ± 0.4 | 4.7 ± 0.3 | 3.2 ± 1.0 | 4.6 ± 0.4 |
| Tirosina | 3.4 ± 2.1 | 2.9 ± 0.5 | 1.7 ± 0.5 | 2.8 ± 0.4 |
| Treonina | 5.3 ± 0.8 | 4.4 ± 0.6 | 3.5 ± 0.6 | 4.1 ± 0.5 |
| Triptófano | 0.7 ± 0.1 | 0.7 ± 0.1 | 0.5 ± 0.5 | 0.4 ± 0.0 |
| Arginina | 5.9 ± 0.4 | 5.2 ± 0.2 | 3.3 ± 1.1 | 4.5 ± 0.3 |
| Cisteína | 1.2 ± 0.2 | 0.9 ± 0.2 | 1.2 ± 0.3 | 0.9 ± 0.1 |
| Valina | 5.2 ± 1.0 | 5.2 ± 0.5 | 3.8 ± 1.0 | 4.9 ± 0.5 |
| <u>Aminoácidos no esenciales</u> | | | | |
| Aspargina/aspartato | 8.5 ± 1.0 | 8.7 ± 1.1 | 12.5 ± 2.8 | 9.1 ± 1.0 |
| Glutamina/glutamato | 10.2 ± 2.6 | 14.5 ± 3.2 | 23.8 ± 7.5 | 18.7 ± 2.4 |
| Serina | 4.0 ± 0.5 | 4.0 ± 0.4 | 3.3 ± 0.6 | 3.7 ± 0.3 |
| Glicina | 5.1 ± 1.3 | 5.1 ± 0.7 | 4.0 ± 1.1 | 4.8 ± 0.5 |
| Alanina | 6.2 ± 2.2 | 4.7 ± 0.6 | 5.7 ± 2.8 | 4.3 ± 0.4 |
| Prolina | 3.5 ± 1.0 | 3.6 ± 1.6 | 3.1 ± 1.1 | 3.8 ± 0.4 |
| Taurina | 4.3 ± 2.1 | 0.1 ± 0.1 | 0.3 ± 0.2 | 0.6 ± 0.2 |

Otras proteínas que sólo se encuentran en algas rojas y verdes-azuladas son las ficobiliproteínas (ficocianina en algas verdes-azuladas, ficoeritrina en algas rojas), que son un grupo de proteínas involucradas en la fotosíntesis. Las ficobiliproteínas purificadas pueden usarse en cosmética, como colorantes alimentarios, ó como sondas fluorescentes en diferentes técnicas analíticas (Eriksen, 2008; Patil y col., 2008). Estas proteínas se caracterizan por poseer un pigmento tetrapirrólico denominado ficobilina, unido covalentemente a su estructura. La presencia de ficobilina les confiere importantes propiedades médicas y farmacológicas, como propiedades hepatoprotectivas, antiinflamatorias y antioxidantes (Bhat y col., 1998; Romay y col., 2003; Bhat y Madyastha, 2000). Además, las ficobiliproteínas pueden desempeñar un papel importante en terapias fotodinámicas para varios cánceres, tumores y en el tratamiento de la leucemia (Sabhasshini y col., 2004). Por tanto, este tipo de proteínas podrían utilizarse como ingredientes funcionales. En la microalga roja *Porphyridium* spp. se ha descrito la presencia del pigmento rojo, denominado ficoeritrina (Wang y col., 2007; Huang y col., 2006), mientras que se han encontrado diferentes ficocianinas en *Spirulina platensis* (Herrero y col., 2005; Simó y col., 2005).

I.2.4. Polisacáridos y fibra dietética.

Las algas contienen grandes cantidades de polisacáridos que forman, entre otras, la estructura de la pared celular. Algunos de éstos son utilizados por la industria como hidrocoloides (alginatos procedentes de algas marrones, y carragenanos y agar de algas rojas). Las algas comestibles contienen un 33-50% de fibra total, un valor más elevado que en las plantas superiores. Otros polisacáridos minoritarios que se pueden encontrar en la pared celular son los fucoïdanos (algas marrones), xilanos (varias algas rojas y verdes), ulvanos (algas verdes) y celulosa (en todas las algas en general, pero a más bajos niveles que los que se encuentran en plantas superiores). Las algas también presentan polisacáridos de almacenamiento, como laminarina (α -1,3 glucanos) en algas marrones y almidones florideanos (amilopectina como glucanos) en algas rojas (Burtin, 2003a). La mayoría de los polisacáridos no son digeribles y pueden ser considerados como fibra dietética.

En la Tabla I.4. se puede observar el contenido en fibra de algunas algas y su comparación con algunas plantas superiores (Mabeu y Fleurence, 1993). La alga roja *Kappaphycus* presenta los niveles más altos de fibra total (70.7% del peso seco).

Tabla I.4. Contenido en fibra de algunas algas y plantas superiores (Mabeu y Fleurence, 1993).

| Fuente | Fibra (% peso seco) | | Total |
|-----------------------------------|---------------------|-----------|-------|
| | Soluble | Insoluble | |
| <u>Phacophyta:</u> | | | |
| <i>Undaria pinnatifida</i> | 30.0 | 5.3 | 35.3 |
| <i>Hizikia fusiforme</i> | 32.9 | 16.3 | 49.2 |
| <i>Himanthalia elongata</i> | 25.7 | 7.0 | 32.7 |
| <i>Laminaria digitata</i> | 32.6 | 4.7 | 37.3 |
| <u>Chlorophyta:</u> | | | |
| <i>Ulva lactuca</i> | 21.3 | 16.8 | 38.1 |
| <i>Enteromorpha</i> spp. | 17.2 | 16.2 | 33.4 |
| <u>Rhodophyta:</u> | | | |
| <i>Porphyra tenera</i> | 17.9 | 6.8 | 34.7 |
| <i>Kappaphycus</i> | 41.5 | 29.2 | 70.7 |
| <u>Plantas superiores:</u> | | | |
| Manzana | 5.9 | 8.3 | 14.2 |
| Repollo | 16.8 | 17.5 | 34.3 |

Algunas algas pueden presentar polisacáridos sulfatados, los cuales poseen importantes propiedades funcionales. De hecho, los fucoïdanos (fibra soluble), son polisacáridos que contienen porcentajes sustanciales de L-fucosa y grupos ester sulfato, y suelen encontrarse en algas marrones. Estos polisacáridos sulfatados han sido muy estudiados debido a que presentan diversas actividades biológicas, como anticoagulante,

antitrombótica, antiviral, antitumoral, inmunomoduladora, antiinflamatoria, antioxidante y de reducción de niveles de lípidos en sangre, además, pueden utilizarse en el tratamiento contra hepatopatías, uropatías y renalpatías, y presentan efecto de protector gástrico (Li y col., 2008). En los últimos años, los fucoidanos se han investigado como fuente natural de fármacos e ingredientes funcionales. Estos polisacáridos sulfatados han sido aislados de diferentes algas marrones, como, *Undaria pinnatifida* (Lee y col., 2004), *Laminaria angustata* (Kitamura y col., 1991), *Sargassum stenophyllum* (Durate y col., 2001), *Hizikia fusiforme* (Li y col., 2006), *Adenocytis utricularis* (Ponce y col., 2003), y *Cystoseira canariensis* (Ramazanov y col., 2003).

Las algas rojas contienen polisacáridos sulfatados, como son los galactanos, agar y carragenanos. De estos polisacáridos sulfatados, los galactanos son los que presentan mayores actividades funcionales. En general, los galactanos sulfatados son polímeros de unidades α -L- y α -D- o β -D-galactopiranosil, que poseen importantes y potentes acciones farmacológicas. En ellas se incluyen propiedades antivirales, antitumorales, inmunomodulatorias, antiangiogénicas, antiinflamatorias, anticoagulantes y antitrombóticas (Pomin, 2010). Estos polisacáridos han sido identificados en varias algas rojas, como *Grateloupia elliptica*, *Sinkoraena lancifolia*, *Halymenia dilatata*, *Grateloupia lanceolata*, *Lomentaria catenata*, *Martensia denticulata*, *Schizymenia dubyi*, y *Chondrus crispus* (Lee y Athukorala, 2005).

Otro tipo de polisacáridos sulfatados son los porfiranos. Estos se encuentran principalmente en el alga roja *Porphyra*. Estructuralmente presentan una cadena lineal que alterna unidades de galactosa y 3,6-anhidro-galactosa, esta última, a veces, puede ser sustituida por galactosa-6-sulfato y 6-O-metil-galactosa. Existen diferentes trabajos acerca de la estructura y de la función de los porfiranos aislados a partir de diferentes especies (Morrice y col., 1983; Zhang y col., 2005), en general se observa que, aunque la composición química y la estructura de los porfiranos es muy variada, todos ellos presentan actividad immunoreguladora, antitumoral y antioxidante (Osumi y col., 1998; Noda, 1993; Zhao y col., 2006).

Por otro lado, las algas verdes Ulvales (*Ulva* y *Enteromorpha*), contienen heteropolisacáridos sulfatados en su matriz mucilaginosa, denominados ulvanos (Jiménez-Escrig y Sánchez-Miniz, 2000). Los ulvanos están compuestos principalmente

de ramnosa, xilosa, glucosa, ácido glucurónico, ácido idurónico, y sulfato, y en pequeñas cantidades se encuentran manosa, arabinosa y galactosa (Pengzhan y col., 2003). Los ulvanos poseen características fisicoquímicas y biológicas de interés para aplicaciones alimentarias, farmacéuticas, agrícolas y químicas, ya que pueden presentar actividad antioxidante (Qi y col., 2005), anticarcinogénica (Mayer y Lehmann, 2001), y antihiperlipidémica (Pengzhan y col., 2003).

I.2.5. Vitaminas.

Dado que las algas marinas son capaces de realizar la fotosíntesis, son capaces de producir, al igual que las plantas superiores, todas las vitaminas. El perfil vitamínico de las algas puede variar dependiendo de la especie, la estación del año, las condiciones de cultivo y los parámetros medioambientales. Las algas comestibles (especialmente *Porphyra* spp.) contienen grandes cantidades de vitaminas hidrosolubles C y del complejo B, y de vitaminas liposolubles A y E (Jiménez- Escrig y Goñi, 1999). Las algas también son buenas fuentes de pro-vitamina A (ver apartado 1.2.1).

En las algas se pueden encontrar altas concentraciones de vitamina C, cuyos niveles medios, en algas verdes y marrones, oscilan entre 500 y 3000 mg/kg de peso seco; estas concentraciones son comparables a las descritas en alimentos ricos en vitamina C, como el perejil, las moras y los pimientos; además, las algas rojas contienen niveles nada despreciables, entre 100 y 800 mg/kg (Burtin, 2003b). Esta vitamina es interesante por muchas razones, entre ellas, porque fortalece las defensas del sistema inmune, activa la absorción de hierro en el intestino, controla la formación de tejido conjuntivo y de matrices protéicas del tejido óseo, y también actúa atrapando los radicales libres y regenerando la vitamina E (Burtin, 2003b).

En cuanto a la vitamina E (tocoferoles), las algas marrones contienen mayores niveles (23-412 mg/kg de peso seco) que las algas rojas y verdes (8 mg/kg de peso seco). Los niveles más altos de vitamina E en las algas marrones se encuentran en las Fucaceae (como *Ascophyllum* y *Fucus* sp.), que contienen niveles entre 200 y 600 mg de tocoferol/kg de peso seco (MacArtain y col., 2007). Los tocoferoles son potentes antioxidantes liposolubles (Vismara y col., 2003). Debido a esta actividad, la vitamina E está generando mucho interés como ingrediente funcional, ya que previene muchas

enfermedades, como la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, y también, enfermedades degenerativas como la esclerosis múltiple (Johanson, 2000; Jialal y col., 2001).

Las algas son también una fuente importante de vitaminas del grupo B, de hecho, las algas son una de las pocas fuentes vegetales que contienen vitamina B₁₂, siendo *Spirulina* la mayor fuente de vitamina B₁₂ de origen algal. En este sentido, la ingestión diaria de 1 g de *Spirulina* es suficiente para cubrir los requerimientos diarios de esta vitamina (Watanabe y col., 1999), pudiendo suponer una fuente alternativa de vitamina B₁₂ para los vegetarianos o veganos.

En general se puede decir que las algas tienen un perfil vitamínico tal que podría complementar el perfil vitamínico de las plantas superiores.

I.2.6. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son un grupo importante de metabolitos secundarios que presentan actividad antioxidante, entre otras funciones biológicas. Estos compuestos juegan un papel importante en la defensa celular de las algas contra estrés abiótico y biótico. En las algas se pueden encontrar compuestos fenólicos simples (ácidos fenólicos, por ejemplo), así como otros más complejos, como florotaninos. Estos compuestos se encuentran en algas marrones, y están formados a partir de estructuras oligoméricas de floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) y los derivados polimerizados del mismo (Parys y col., 2007), cuya actividad antioxidante es semejante a la del α -tocoferol (Pavia y Aberg, 1996). La intensidad de este efecto depende del grado de polimerización, presentando mayor eficacia los compuestos menos polimerizados. Estos compuestos se han mostrado como potentes antioxidantes. Además de poseer actividad antioxidante, los florotaninos pueden presentar un gran número de actividades biológicas, como son antibacteriana (Nagayama y col., 2002), quimiopreventiva contra factores de riesgo cardiovasculares (Kang y col., 2003), detoxificadora de metales pesados (Eide y col., 1980) y protectora contra la luz UV (Swanson y Druehl, 2002). Los florotaninos se pueden encontrar a concentraciones de 20-250 mg/g de peso seco en las algas *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Sargassum spinuligerum*, y *Cystophora retroflexa* (Ragan y Glombitza, 1986). Los

compuestos fenólicos presentes en algas se pueden encontrar conjugados con otros compuestos, como azúcares, esto se puede observar en algunas algas de agua dulce que presentan flavanonas glicosiladas (Konishi y col., 2003).

La principal bioactividad asociada a los compuestos fenólicos, como se ha mencionado anteriormente, es la actividad antioxidante (Kumar, 2008). Duan y col. (2006) han demostrado que el potencial antioxidante del extracto crudo a partir de algas rojas (*Polysiphoma urceoiata*) está correlacionado con el contenido fenólico total. Existe una correlación positiva entre el contenido polifenólico y la captación de radicales 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) por parte de diferentes extractos de la alga *Hizikia fusiformis* (Siriwardhana y col., 2003). Como todos los componentes químicos en estos organismos, el contenido cuantitativo, así como el perfil de sustancias fenólicas en algas marinas, varía con la especie.

Algunos compuestos fenólicos se han asociado con una cierta actividad antiinflamatoria, como rutina, hesperidina, morina, ácido cafeico, catecol, catequina y galato de epigalactocatequina, estos compuestos se han encontrado en *Porphyra* spp. Recientemente, Kazłowska y col. (2010) han estudiado los compuestos fenólicos presentes en *Porphyra dentata*, identificando catecol, rutina y hesperidina, y demostrando que los extractos y los compuestos fenólicos inhiben la producción de óxido nítrico en las células.

I.2.7. Compuestos volátiles bioactivos.

Es muy común que las microalgas compartan el nicho ecológico con bacterias y otros microorganismos, por lo que producen compuestos defensivos que poseen actividades antifúngicas, antibacterianas y antiprotozoos. Las microalgas han sido estudiadas por su potencial actividad antimicrobiana, la cual se ha atribuido a diferentes compuestos pertenecientes a una clase química, que incluye indoles, terpenos, aterogeninas, fenoles, ácidos grasos e hidrocarburos halogenados volátiles (Mayer y col., 2009).

Otros compuestos de naturaleza terpénica procedentes de algas presentan actividad antiviral, por ejemplo, *Dictyota menstrualis* produce dos compuestos

terpénicos, denominados (6R)-6-hidroxicotoma-3,14-dieno-1,17-dial y (6R)-6-acetoxicotoma-3,14-dieno-1,17-dial, que inhiben la transcriptasa reversa HIV-1 (Souza y col., 2005). Asimismo, los compuestos terpénicos derivados de plastoquinonas que produce *Sargassum* sp. inhiben el crecimiento de citomegalovirus (Iwashima y col., 2005).

Los ácidos grasos de cadena corta son también compuestos volátiles asociados con la actividad antibacteriana. La presencia de este tipo de compuestos también se ha confirmado en microalgas. Por ejemplo, se ha observado que la actividad antimicrobiana en extractos de *Haematococcus pluvialis* se debe fundamentalmente a la presencia de ácidos grasos de cadena corta (butanoico, hexadecanoico, etc.) (Santoyo y col., 2009).

I.2.8. Otros compuestos bioactivos.

Las algas son conocidas por su alto contenido en minerales. Más del 30% del peso seco de las algas marinas son cenizas. Algunos de los minerales son necesarios para la salud, mientras que otros son tóxicos. La mayoría de las macroalgas presentan altas concentraciones de Ca, Mg, P, K, Na y Fe (Mišurcová y col., 2009), como se puede observar en la Tabla I.5. El contenido en Fe presente en las algas es generalmente elevado, siendo el alga roja *Phorphyra tenera* (Nori), seguida por las microalgas *Spirulina* y *Chlorella*, las que presentan mayores concentraciones de este mineral.

Tabla I.5. Contenido en minerales de algunas algas comestibles (Mišurcová y col., 2009). Los resultados se expresan en mg/kg de peso seco (†) o µg/kg de peso seco (*).

| Algas | Na [†] | K [†] | Mg [†] | Ca [†] | P [†] | Fe [*] | Zn [*] | Cu [*] | Mn [*] | Cr [*] | B [*] |
|-----------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Chlorella | 10.4 | 11.0 | 3.53 | 2.30 | 19.2 | 1185 | 24.7 | 6.21 | 77.8 | 1.38 | 27.5 |
| Spirulina | 10.1 | 14.9 | 4.76 | 2.96 | 12.6 | 1480 | 59.2 | 7.26 | 240 | 1.08 | 33.0 |
| Arame | 12.0 | 14.5 | 6.55 | 6.79 | 0.78 | 63.4 | 27.2 | 4.30 | 3.94 | 0.77 | 37.0 |
| Hijiki | 16.2 | 54.5 | 6.85 | 6.49 | 1.02 | 56.4 | 16.2 | 2.02 | 6.20 | 0.55 | 117 |
| Kombu | 27.1 | 90.9 | 6.72 | 5.74 | 4.76 | 73.8 | 18.2 | 1.64 | 4.67 | 0.71 | 89.5 |
| Kombu-Kelp | 21.2 | 48.7 | 5.61 | 4.52 | 2.35 | 76.4 | 19.3 | 1.95 | 3.90 | 0.43 | 87.5 |
| Wakame | 62.6 | 64.8 | 12.0 | 4.94 | 6.04 | 70.9 | 22.5 | 3.41 | 6.94 | 0.40 | 69.0 |
| Wakame-instant | 74.9 | 1.49 | 9.43 | 5.31 | 3.52 | 304 | 50.7 | 3.07 | 11.4 | 0.93 | 33.0 |
| Dulse | 22.8 | 105 | 3.46 | 2.08 | 4.97 | 717 | 37.0 | 4.60 | 27.5 | 0.98 | 52.0 |
| Korzický čaj | 20.8 | 20.4 | 11.4 | 52.8 | 0.60 | 283 | 16.4 | 4.70 | 20.0 | 8.01 | 107 |
| Nori | 8.55 | 26.0 | 40.6 | 5.72 | 2.02 | 1833 | 19.4 | 15.8 | 360 | 4.90 | 69.5 |

En comparación con las plantas superiores, las algas son una buena fuente de yodo (Kumar, 2008), siendo la mejor fuente natural de este mineral y proporcionando diyodotirosina (I₂T), que es el precursor de las hormonas esenciales del tiroides, tiroxina (T₄) y triyodotironina (T₃) (Bravarmand y Utigar, 1991).

Sin embargo, la unión de ciertos minerales con polisacáridos aniónicos (alginato, agar, o carragenano) puede limitar la absorción y la extracción de estos minerales. Desde un punto de vista nutricional, esta gran afinidad puede compensarse por el alto contenido en minerales de las algas (Mabeau y Fleurence, 1993).

Por otro lado, se han aislado ciertos alcaloides a partir de algas. Entre los muchos compuestos químicos presentes en las diferentes especies de plantas, los alcaloides destacan por ser compuestos muy importantes para el desarrollo de nuevas medicinas y alimentos funcionales, debido a que poseen una amplia variedad de estructuras químicas y han sido identificados como responsables de muchas de las propiedades beneficiosas de plantas y algas. Por ejemplo, de la alga verde *Caulerpa racemosa* se ha aislado un alcaloide bidindole, denominado caulerpin (De Souza y col., 2009). Este alcaloide posee una baja toxicidad y una gran variedad de importantes actividades biológicas, como antitumoral y antiinflamatoria (De Souza y col., 2009); en plantas este alcaloide regula y estimula el crecimiento.

I.3. TECNOLOGÍAS LIMPIAS DE EXTRACCIÓN.

Es conocido que el empleo de técnicas de extracción basadas en métodos tradicionales, como la extracción con Soxhlet, la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción sólido-líquido (SLE) y otras técnicas basadas en el uso de disolventes orgánicos, requieren mucho tiempo, son laboriosas, carecen de automatización y además presentan baja reproducibilidad, baja selectividad y bajos rendimientos de extracción, a lo que se suma el empleo de grandes cantidades de disolventes orgánicos, frecuentemente tóxicos (Wang y Weller, 2006). Debido a estos inconvenientes hay una creciente demanda de nuevas técnicas de extracción, que sean capaces de superar dichos problemas, proporcionando más rapidez, reproducibilidad y selectividad. Además, hoy en día se valora enormemente el desarrollo de procesos de extracción más respetuosos con el medioambiente, denominados “*green processes*”. Con este objetivo han aparecido nuevos métodos de extracción como son: la Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE, Ultrasound-Assisted Extraction), la Extracción Asistida por Microondas (MAE, Microwave-Assisted Extraction), la Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE, Supercritical Fluid Extraction), y la Extracción con Líquidos Presurizados (PLE, Pressurized Liquid Extraction), entre otros. En comparación con los métodos tradicionales, estos métodos de extracción son más rápidos y eficientes para obtener sustancias químicas a partir de matrices sólidas, presentando una mayor selectividad para los compuestos que están siendo extraídos. Estas técnicas tienen la posibilidad de trabajar con temperaturas y/o presiones elevadas, disminuyendo así enormemente el tiempo de extracción.

En el trabajo descrito en esta Memoria, algunas de éstas nuevas técnicas de extracción, como PLE, UAE, y SFE, se han estudiado para la obtención, a partir de diversas macro- y microalgas, de distintos extractos potencialmente utilizables como ingredientes funcionales.

I.3.1. Extracción con fluidos presurizados y extracción con agua subcrítica.

La PLE (también denominada Extracción con Líquidos Presurizados o Extracción Acelerada con Disolventes, ASE) es una técnica de extracción relativamente nueva que permite obtener una gran variedad de compuestos orgánicos a partir de

muestras sólidas complejas. La PLE se basa en el empleo de disolventes a altas temperaturas y presiones de extracción, de tal forma que el disolvente se encuentre en estado líquido durante todo el proceso de extracción.

Comparada con los procesos de extracción convencionales, la PLE usa menos volúmenes de disolvente y es una técnica más rápida, que además está automatizada. Adicionalmente, la muestra se mantiene en todo momento en condiciones libres de luz y oxígeno (Luque de Castro y col., 1999). A estas ventajas se le suma el que pueden emplearse disolventes considerados GRAS (Generally Recognise As Safe), como son etanol y agua.

El empleo de esta técnica utilizando agua como disolvente para la extracción da lugar al proceso conocido como Extracción con Agua Subcrítica (Subcritical Water Extraction, SWE) o Extracción con Agua Sobrecalentada (Superheated Water Extraction, SHWE). SWE es una técnica de extracción medioambientalmente limpia que puede proporcionar altos rendimientos de extracción en matrices sólidas (Luque de Castro y col., 1999), evitando completamente el uso de disolventes orgánicos tóxicos. Este nuevo procedimiento de extracción se lleva a cabo con agua sometida a altas temperaturas, entre 100 y 374°C (es decir, por encima de su punto de ebullición y por debajo de su temperatura crítica) y en condiciones de presión suficientes (desde 10 hasta 60 bares) para que el agua permanezca en estado líquido durante todo el proceso de extracción (ver Figura I.2).

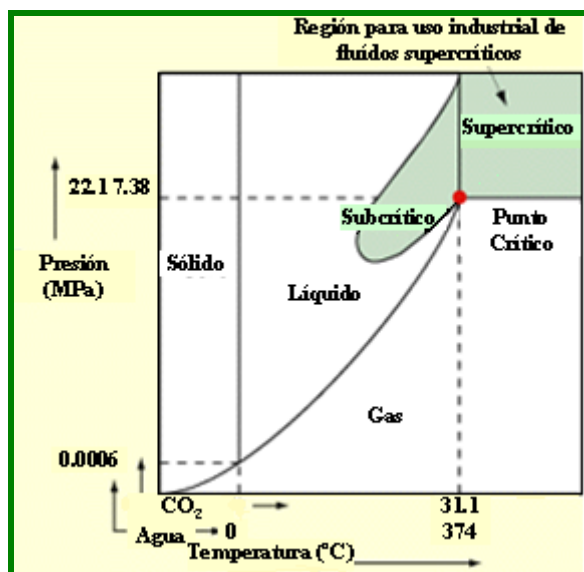


Figura I.2. Diagrama de fases para el agua y el dióxido de carbono.

El agua es una molécula polar con un elevado momento dipolar y una elevada constante dieléctrica (ϵ) a temperatura ambiente. Esta constante dieléctrica depende del momento dipolar y del elevado grado de asociación entre las moléculas de agua. Cuando la temperatura aumenta desde condiciones ambientales, y siempre que se mantenga en estado líquido, la estructura del agua se modifica y su constante dieléctrica disminuye, pasando de valores en torno a 80 a 25°C, a valores cercanos a 25 cuando el agua líquida se somete a temperaturas cercanas a 250°C (ver Figura I.3). En la Figura I.3 se pueden observar como varían los valores de la constante dieléctrica del agua en estado líquido a medida que aumenta la temperatura (agua sobrecalentada o subcrítica), así como las constantes dieléctricas de algunos disolventes orgánicos a temperatura ambiente.

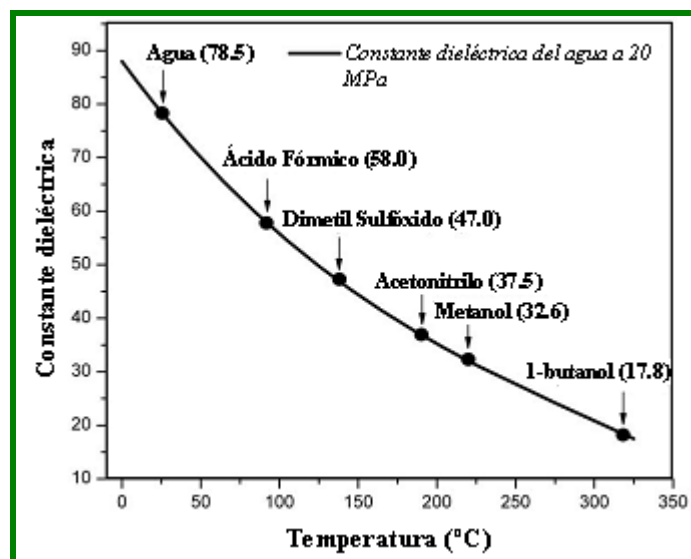


Figura I.3. Constante dieléctrica del agua en función de la temperatura a presión constante (20 MPa). Superpuesto al diagrama se presentan las constantes dieléctricas (circulo negro) de varios disolventes orgánicos; en paréntesis se pueden observar los valores de las constantes dieléctricas de estos disolventes (incluyendo el agua) a 25 °C y 0.1 MPa.

Este comportamiento tiene su origen en el cambio de las interacciones moleculares a elevadas temperaturas, especialmente en la modificación de la red de enlaces de puentes de hidrógeno (Yoshii y col., 2001). Alrededor de los 200°C (ver Figura I.3), la constante dieléctrica del agua se aproxima a la de algunos disolventes orgánicos comúnmente empleados, como acetonitrilo o metanol, adquiriendo por tanto, propiedades solventes similares a las de éstos. En toda la región de agua sobrecalentada, el agua tiene la polaridad de mezclas metanol/agua.

Estas extraordinarias propiedades del agua subcrítica la convierten en un buen solvente para la extracción de compuestos relativamente poco polares y de polaridad media, siempre que existan algunos grupos polares o polarizables, como anillos aromáticos. La solubilidad de compuestos orgánicos en agua subcrítica es mayor, en varios órdenes de magnitud, a la de los mismos compuestos a temperatura ambiente. Por ello, el empleo de SWE puede ser considerado como una alternativa al uso de determinados disolventes orgánicos en algunas aplicaciones.

En este sentido, el agua subcrítica se ha utilizado para extraer compuestos orgánicos, por ejemplo, contaminantes (PAH, PCBs y pesticidas) en alimentos (Mendiola y col., 2007; Curren y King, 2001a; Curren y King, 2001b), así como para el aislamiento de compuestos de alto valor añadido y/o biológicamente activos (como

antioxidantes y aceites esenciales) de plantas y microalgas (Herrero y col., 2010; Herrero y col., 2006; Ghoreishi y Shahrestani, 2009; Rodríguez-Meizoso y col., 2010; Rodríguez-Meizoso y col., 2006, García-Marino y col., 2006).

Los requisitos instrumentales para llevar a cabo la PLE son bastante sencillos, como se muestra esquemáticamente en la Figura I.4. Básicamente, consiste en un depósito de disolventes, una bomba de alta presión encargada de introducir el disolvente dentro del sistema, una celda de extracción situada dentro de un horno, y varias válvulas que regulan la presión en el sistema. La extracción tiene lugar en la celda de extracción a la temperatura seleccionada y, al final de la misma, el extracto es recogido en un vial. También puede incluirse un circuito de nitrógeno que sirve para purgar el sistema limpiando el mismo una vez finalizada la extracción.

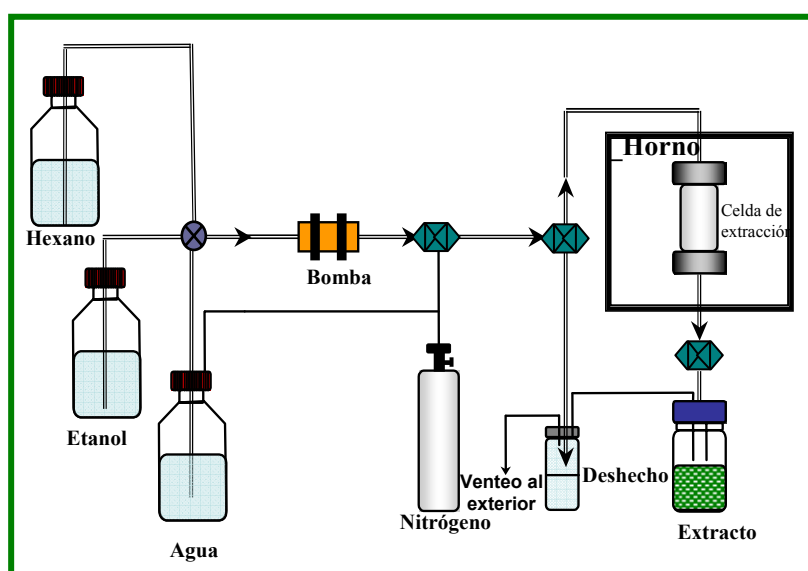


Figura I.4. Esquema del funcionamiento de un equipo de Extracción con Líquidos Presurizados.

I.3.2. Extracción con fluidos supercríticos.

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) se basa en el empleo de disolventes a temperaturas y presiones por encima de su punto crítico, condiciones en las que los fluidos supercríticos adquieren propiedades intermedias entre las de los gases y las de los líquidos (ver Figura I.2). Esta técnica ha sido empleada para la extracción de una gran variedad de compuestos interesantes a partir de alimentos (Herrero y col., 2010; Mendiola y col., 2007), plantas y algas (Herrero y col., 2006).

Una de las características más apreciadas de la SFE es el reducido empleo de disolventes tóxicos.

En cuanto a tipos de disolventes, el dióxido de carbono es el más utilizado debido a sus moderadas temperatura (31.3°C) y presión (72.9 atm) críticas. El bajo coste del CO_2 , resultante de su abundancia y facilidad de obtención y de recuperación, compensa en parte los mayores costes del equipamiento necesario para comprimirlo y mantenerlo en condiciones supercríticas. El CO_2 es un disolvente medioambientalmente limpio, considerado GRAS y, por tanto, susceptible de ser utilizado por la industria alimentaria. Cuando el CO_2 está sometido a condiciones supercríticas presenta una baja viscosidad y una alta difusividad, que le permite penetrar en materiales sólidos porosos de manera más efectiva. La transferencia de materia es más rápida, por lo que las extracciones duran minutos frente a los largos procesos de extracción convencionales. Además, si se varía la presión y la temperatura dentro de la región supercrítica se modifica la densidad del CO_2 (ver Figura I.5). Esta propiedad permite controlar la capacidad de extracción del CO_2 puesto que en función de su densidad será capaz de extraer de una misma matriz distintos tipos de compuestos. Esta característica hace que el CO_2 supercrítico sea particularmente útil para la extracción selectiva de diferentes compuestos de una muestra compleja como son los alimentos y las matrices naturales. Otra característica importante de esta técnica, cuando se lleva a cabo la extracción con CO_2 supercrítico, es la posibilidad de obtener extractos sin disolvente, ya que una vez finalizado el proceso de extracción, los compuestos disueltos en CO_2 supercrítico se pueden separar fácilmente por simple despresurización del sistema con la consiguiente evaporación del CO_2 sin dejar residuos, con lo que se elimina el posterior proceso de concentración, minimizando así la pérdida de compuestos volátiles y lábiles. Estas interesantes propiedades son las responsables del gran uso del CO_2 supercrítico para la extracción de compuestos bioactivos.

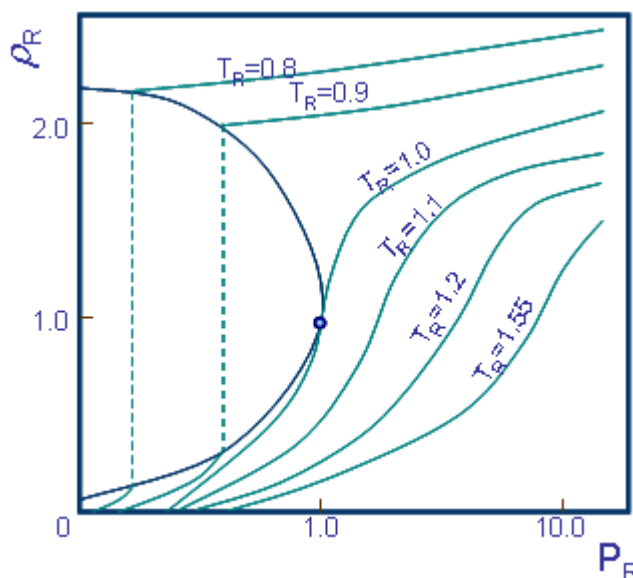


Figura I.5. Variación de la densidad en función de la presión y temperatura en la proximidad del punto crítico. P_R , T_R , ρ_R son las variables reducidas ($P_R=P/P_C$, $T_R=T/T_C$ y $\rho_R=\rho/\rho_C$).

Una limitación del CO_2 supercrítico es su carácter apolar, por lo que generalmente se emplea para la extracción de compuestos de polaridad baja; esta desventaja se puede compensar parcialmente empleando pequeñas proporciones de algún disolvente orgánico más polar junto con el CO_2 . El empleo de estos cosolventes o modificadores (como etanol, metanol, o acetona, entre otros) permite la extracción selectiva de compuestos de mayor polaridad, incrementándose así el número de potenciales aplicaciones de la SFE.

Los elementos instrumentales mínimos que debe incluir un equipo de extracción supercrítica se pueden ver en el esquema de la Figura I.6. El CO_2 líquido procedente de la botella es impulsado por la bomba hacia la celda de extracción. El CO_2 puede mezclarse con un modificador que es, a su vez, impulsado por su correspondiente bomba. Una vez mezclados, el fluido resultante se calienta a la temperatura de extracción y se introduce en la celda de extracción, donde se encuentra la materia prima a extraer, y donde se alcanza la presión de trabajo. La celda de extracción se encuentra termostatazada para poder operar en condiciones de temperatura controlada (superior a la temperatura crítica). Los componentes de la materia prima disueltos o arrastrados por el CO_2 precipitan en la celda de expansión debido a la disminución del poder solvente del CO_2 al reducir la presión.

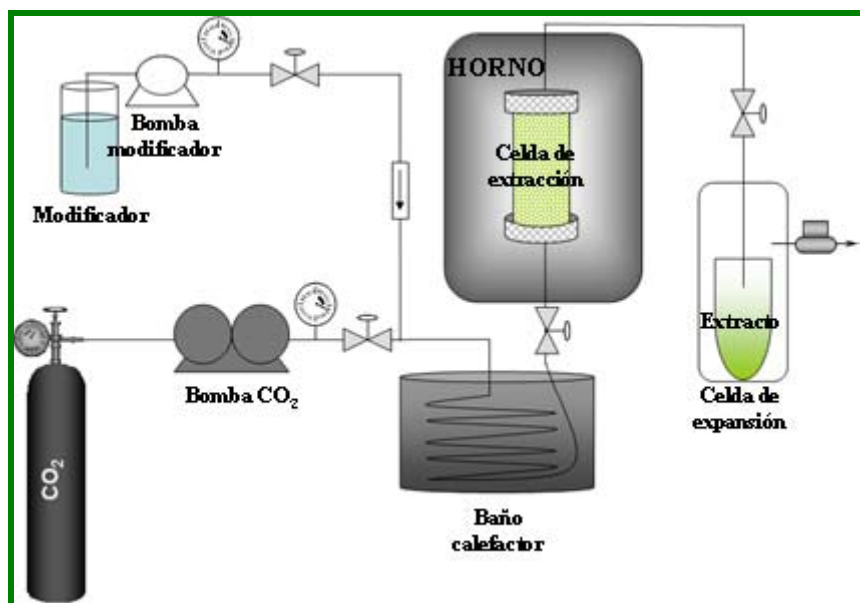


Figura 1.6. Esquema básico de un equipo de Extracción con Fluidos Supercríticos.

Debido a que los alimentos suelen ser mezclas altamente complejas, lo más habitual es que los extractos obtenidos también lo sean. Por ello es muy frecuente tener que realizar un fraccionamiento de extractos. El fraccionamiento en condiciones supercríticas consiste en una despresurización en cascada empleando dos o más separadores en los que se disminuye la presión y/o la temperatura secuencialmente, provocando la consiguiente precipitación en cascada de los compuestos extraídos en cada uno de los separadores, donde se produce una disminución de densidad (disminución del poder disolvente).

Probablemente, el uso más extendido de la SFE es en el campo de los alimentos. La industria alimentaria está siempre buscando la mejor tecnología de separación para obtener compuestos naturales de alta pureza, productos saludables de alta calidad con varias aplicaciones industriales. SFE ha sido muy utilizado para la extracción de aceites esenciales (Sahena y col., 2009; Freitas y col. 2008; Gouveia y col., 2007; Abbasi y col., 2008), ácidos grasos (Guil-Guerrero y col., 2008; Gouveia y col., 2007), y/o compuestos bioactivos (Ligor y col., 2008; Liza y col., 2010; Casas y col., 2009; Herrero y col., 2010; Klejdus y col., 2009; Goli y col., 2005) a partir de frutas y vegetales. La SFE también ha sido muy empleada para la extracción de ingredientes funcionales a partir de macro- y micro-algas, como son ácidos grasos (Sajilata y col., 2008), carotenoides y otros pigmentos (Rodríguez-Meizoso y col, 2008; Macías-

Sánchez y col., 2009; Kitada y col., 2009), compuestos volátiles (Hattab y col., 2007) y compuestos fenólicos (Klejdus y col., 2009).

I.3.3. Extracción asistida por ultrasonidos.

Los ultrasonidos son ondas sonoras que se propagan a una frecuencia superior a la perceptible por el oído humano (16 kHz aproximadamente). Sin embargo, estas frecuencias elevadas no producen cambios significativos en las características de las ondas, por lo que su absorción y propagación a través de líquidos, sólidos o gases es similar a la transmisión del sonido. Al igual que cualquier otro movimiento ondulatorio, los ultrasonidos se caracterizan por su frecuencia o número de oscilaciones por segundo, su amplitud o valor máximo de elongación y su longitud de onda o distancia entre dos puntos consecutivos que se encuentran vibrando en fase. Para los ultrasonidos ésta oscila entre 0.01 y 10 cm.

Los ultrasonidos se utilizan en la industria alimentaria con distintos propósitos. En función de su intensidad pueden clasificarse en dos grupos: ultrasonidos de baja intensidad y ultrasonidos de alta intensidad (McClements, 1995). La frecuencia de los ultrasonidos de baja intensidad es superior a 100 kHz y su potencia inferior a 1 Wcm^2 , por lo que no producen modificaciones en las propiedades de los materiales a través de los que se propagan. Los ultrasonidos de baja intensidad se utilizan como técnica analítica no destructiva para obtener datos sobre distintas propiedades físico-químicas de los alimentos como su composición, espesor, etc.; o para controlar diversos procesos de la industria alimentaria como el flujo de fluidos o el nivel de un contenido líquido.

Los ultrasonidos de alta intensidad se transmiten a una frecuencia inferior (20-100 kHz) y su potencia se encuentra en el rango de $10\text{-}1000 \text{ Wcm}^2$. Se aplican en la industria alimentaria para el control de cristalización de grasas y azúcares, promoción de reacciones de oxidación, para la inactivación de microorganismos y enzimas, etc, así como para la extracción de compuestos de interés. Los efectos que este tipo de ultrasonidos provocan en el medio que se transmiten son debidos al fenómeno de cavitación.

La cavitación consiste en la formación, crecimiento e implosión de burbujas en

un medio líquido (Pagán y col., 2000). Cuando los ultrasonidos se transmiten en un medio líquido generan ondas de compresión y descompresión. Durante la fase de descompresión, la presión negativa puede ser lo suficientemente intensa para vencer las fuerzas de atracción intermoleculares y provocar la formación de burbujas. El crecimiento de las burbujas depende de la intensidad del tratamiento. A bajas intensidades, las burbujas formadas aumentan progresivamente de tamaño en los sucesivos ciclos de compresión y descompresión hasta alcanzar un tamaño crítico (tamaño de resonancia) a partir del cual experimenta un rápido crecimiento seguido de una implosión. A elevadas intensidades ultrasónicas, las burbujas implosionan prácticamente de forma instantánea tras su formación. La intensidad de la cavitación depende de distintos parámetros relacionados con las condiciones de tratamiento (amplitud, frecuencia ultrasónica, presión hidrostática, temperatura), así como de las características del medio de tratamiento (tensión superficial, viscosidad, gases disueltos, presión de vapor). Algunos de ellos la favorecen, mientras que otros la inhiben, por lo que para optimizar un proceso es necesario conocer con precisión la influencia de los mismos (Berlan y Masón, 1992).

Los principales equipos ultrasónicos disponibles a escala de laboratorio son los baños de ultrasonidos y las sondas de ultrasonidos. En los baños de ultrasonidos se sumerge la muestra, dentro de un vial, en el baño. En las sondas de ultrasonidos el transductor se une a una sonda con objeto de amplificar la vibración (Figura I.7). Estos últimos sistemas, además de aplicar tratamientos mucho más intensos, del orden de cientos de Wcm^2 , permiten modificar la amplitud de la onda lo que está directamente relacionado con la intensidad del tratamiento ultrasónico, la temperatura y el tiempo real de extracción.

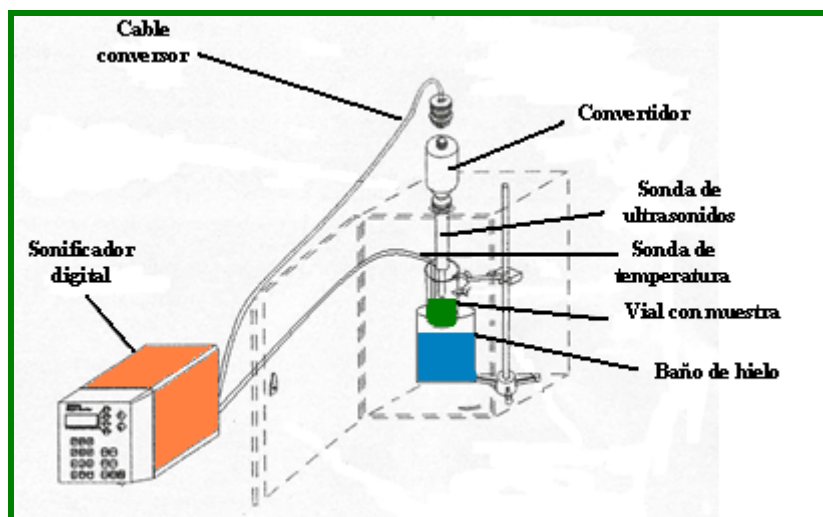


Figura I.7. Esquema básico de un equipo de Extracción Asistida por Ultrasonidos.

Se ha comprobado que la Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE) es una técnica que disminuye los tiempos de extracción e incrementa los rendimientos de extracción (Ma y col., 2008). La transferencia de materia durante la extracción por ultrasonidos de compuestos orgánicos procedentes de matrices naturales puede aumentar significativamente debido al efecto mecánico que se produce al aumentar la penetración del disolvente dentro de la célula, como resultado de la destrucción de las paredes celulares, facilitando así la liberación del contenido celular. Hay numerosos estudios en los que se pone de manifiesto el uso de los ultrasonidos para la extracción de compuestos bioactivos a partir de matrices vegetales (Vinatoru y col., 2001; Rostagno y col., 2003; Zu y col., 2006; Herrera y Luque de Castro, 2005) y macro- y micro-algas (Macías-Sánchez y col., 2009; Wiltshire y col., 2000; Simon y Helliwell, 1998).

I.3.4. Extracción de compuestos bioactivos de algas mediante tecnologías limpias de extracción.

Las técnicas limpias de extracción descritas en la presente Memoria se han empleado para la extracción de multitud de compuestos bioactivos procedentes de macro- y microalgas, tales como pigmentos, tocoferoles, compuestos fenólicos, etc. Por ejemplo, en *Dunaliella salina* no se ha estudiado sólo la producción de β -caroteno, sino también las condiciones óptimas para su extracción y aislamiento (Mendes y col., 2003; Jaime y col., 2007; Mojaat y col., 2008b; Macias-Sanchez y col., 2009a). La técnica de

extracción más empleada para la obtención del β -caroteno a partir de esta microalga es la extracción con fluidos supercríticos (SFE), dado que la baja polaridad que presenta el CO₂ supercrítico hace que sea el disolvente más apropiado para la extracción de β -caroteno (Mendes y col., 2003; Jaime y col., 2007; Mojaat y col., 2008b; Macias-Sanchez y col., 2009a).

Asimismo se ha estudiado la extracción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*, probándose para ello diferentes técnicas de extracción, como son la extracción con CO₂ supercrítico (Thana y col., 2008; Mendes, 2006) ó CO₂ supercrítico con diferentes co-solventes (Nobre y col., 2006), extracción con líquidos presurizados (Jaime y col., 2010; Denery y col., 2004), y extracción asistida por microondas (Zhang y col., 2009),

Otros pigmentos, extraídos también con CO₂ supercrítico, y que pueden contribuir a la actividad antioxidante presente en los extractos de *Spirulina platensis*, son la clorofila *a*, feofitina *a*, feofitina *a* O-alomero y pirofeofitina *a* (Mendiola y col., 2005). Además, con esta misma técnica de extracción se obtuvo fitol a partir de *Dunaliella salina*. Este compuesto es un metabolito secundario de la clorofila el cual podría presentar actividad bactericida (Mendiola y col., 2008).

Otro compuesto bioactivo presente en las algas es la vitamina E, por lo que se han estudiado diferentes técnicas de extracción, como la SFE, para el aislamiento de este compuesto a partir de diferentes especies de algas como *Spirulina platensis* (Mendiola y col., 2008).

Asimismo se han podido identificar algunos ácidos fenólicos en diferentes extractos de macro- y microalgas obtenidos por extracción con líquidos presurizados (PLE), relacionándose la presencia de dichos compuestos con la actividad antioxidante que presentaron los extractos (Onofrejová y col., 2010).

En general, como se puede observar, la valoración en profundidad de la posibilidad de aprovechamiento de este tipo de organismos, no se ha llevado a cabo aún exhaustivamente. Sin embargo, los resultados que se muestran en esta sección permiten vislumbrar un gran potencial en cuanto a la aplicación de novedosas técnicas de

extracción avanzada para la obtención de un gran número y variedad de compuestos funcionales de interés a partir de estas inexploradas matrices naturales.

I.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL.

I.4.1. Determinación de la actividad antioxidante.

El oxígeno, que es necesario para la vida, es también indirectamente responsable de muchos efectos negativos sobre la salud. Éstos son debidos a la producción de las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS), que son tóxicas para las células, y entre las que se encuentran el anión superóxido, el radical hidroxilo, el peroxilo, el peróxido de hidrógeno, los hidroperóxidos y los peroxinitritos (Tabla I.6). Estas especies de oxígeno reactivas, incluidos los radicales libres, son responsables del daño celular que se podría producir indirectamente por procesos oxidativos sobre ácidos grasos insaturados, proteínas y ADN. El organismo presenta mecanismos de defensa antioxidantes que catalizan los radicales libres, que comprenden determinadas enzimas (como la superóxido dismutasa, catalasa, y glutatión peroxidasa), neutralizadores de radicales libres (como las vitaminas E, C, A y β -caroteno), y otros captadores de radicales no vitamínicos de la dieta (entre los que destacan los polifenoles) (Valco y col., 2006).

Tabla I.6. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

| | Radicales | No radicales |
|-------------|--|--|
| ROS | Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) Hidroxilo (OH^{\bullet}) Alcoxilo (RO^{\bullet}) Peroxilo (ROO^{\bullet}) | Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) Ácido hipocloroso ($HClO$) Ozono (O_3) Oxígeno singlete (O_2) |
| RNOS | Óxido nítrico (NO^{\bullet}) Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}) | Anión nitrosilo (NO^-) Cation nitrosilo (NO^+) Ácido nitroso (HNO_2) Alquil peroxinitrilo ($ROONO$) |

Por tanto, los antioxidantes pueden jugar un papel importante en la prevención del daño oxidativo. En el organismo, los enzimas antioxidantes, las vitaminas E y C, el selenio y los antioxidantes procedentes de la dieta, neutralizan los radicales libres y así

controlan las enfermedades relacionadas con la edad y enfermedades crónicas. De hecho, los estudios epidemiológicos sugieren que los antioxidantes de la dieta pueden tener un efecto beneficioso en muchas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como son la arteriosclerosis, cáncer, algunas enfermedades neurodegenerativas e incluso en enfermedades respiratorias (Cicerale y col., 2010; Guo y col., 2009; Shaheen y col., 2002). En los alimentos, los antioxidantes juegan un papel crucial en la prevención o retraso de la autooxidación y formación de sabores y olores, así como de la pérdida de la calidad y de los valores nutricionales, pudiendo afectar a la seguridad y salubridad del alimento. Debido a que los mecanismos involucrados en la oxidación son diferentes, existen asimismo un gran número de mecanismos por el cual los antioxidantes proporcionan sus efectos. Igualmente, existe una gran variedad de métodos disponibles que miden la actividad antioxidante. Esto supone un problema a efectos comparativos, ya que no se ha encontrado un método universal que mida esta actividad y que se pueda aplicar a cualquier tipo de antioxidante y de matriz.

La necesidad de estandarizar los métodos antioxidantes usados en alimentos, extractos vegetales, nutraceúticos u otros suplementos dietéticos ha derivado en una clasificación de los métodos antioxidantes en función del mecanismo de actuación (ver Tabla I.7).

Los *métodos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)* son los más comunes y miden la capacidad de un antioxidante para neutralizar un radical donándole un átomo de hidrógeno. Las reacciones HAT son independientes del pH y del disolvente. Generalmente, los métodos que miden la transferencia de átomos de hidrógeno son rápidos debido a que las reacciones se completan en minutos.

Por el contrario, los *métodos basados en la transferencia electrónica (SET)* miden la eficacia de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto. Las reacciones SET dependen del pH y son lentas, por ello, los resultados de estos métodos se basan, generalmente, en el porcentaje de disminución del radical.

Tabla I.7. Descripción de las características más importantes de los distintos métodos de medida de capacidad antioxidante.

| Métodos | Especie iniciadora | Medida | Técnica | Cuantificación | Referencia | |
|--|--|-----------------------------|--|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| Ensayos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) | ORAC (<i>Oxygen Radical Absorbance Assay</i>) | AAPH (radicales peroxilo) | Inhibición caída fluorescencia de PE/FL* | Fluorimetría | Fluorescencia 493 nm (ex)/515 nm (em) | Davalos y col., 2004 |
| | TRAP (<i>Total Peroxyl Radical-trapping Antioxidant Parameter</i>) | AAPH (radicales peroxilo) | Oxígeno consumido | Fluorimetría | Fluorescencia 495 nm (ex)/575 nm (em) | Ghiselle y col., 1995 |
| | PHOTOCHEM (Fotoquimiluminiscencia) | Radical anión superóxido | Descenso de radicales | Quimiluminiscencia | | Popov y Lewin, 1999 |
| | Ensayo del blanqueamiento del carotenoide crocina (<i>Crocina bleaching assay</i>) | AAPH (radicales peroxilo) | Descenso de formación de crocina• | Espectrofotometría | Absorbancia a 450 nm | Bors y col., 1984 |
| Ensayos de transferencia de electrones (SET) | DPPH (<i>DPPH Radical Scavenging Capacity Assay</i>) | Radical DPPH• | Descenso DPPH• | Espectrofotometría | Absorbancia a 516 nm | Brand-Williams y col., 1995 |
| | TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay</i>) | Radical ABTS• | Descenso ABTS• | Espectrofotometría | Absorbancia a 734 nm | Re y col., 1999 |
| | FRAP (<i>Ferric ion Reducing Antioxidant Power Assay</i>) | Sal férrica (Reactivo FRAP) | Reducción: TPTZ-Fe ³⁺ a TPTZ Fe ²⁺ | Espectrofotometría | Absorbancia a 593 nm | Benzie y Strain, 199 |
| | Ensayo de potencial antioxidante usando Cu (II) como antioxidante | Complejo de Cu (II) | Formación de Cu (I) | Espectrofotometría | Absorbancia a 490 nm | Huang y col., 2005 |

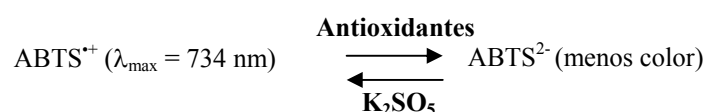
Por lo general, la actividad antioxidante ocurre simultáneamente por ambos mecanismos, y tal como se ha comentado anteriormente, la manifestación del mecanismo dominante estará en función de la estructura del antioxidante y del pH.

En las algas existen sustancias antioxidantes de distinta naturaleza (Herrero y col., 2004; Herrero y col., 2006c; Jaime y col., 2010); entre los compuestos liposolubles destacan la vitamina E (o alfa-tocoferol) y los carotenoides, mientras que los antioxidantes hidrosolubles más potentes encontrados en las algas son los polifenoles, las ficobiliproteínas y las vitaminas (vitamina C).

A continuación se describen brevemente los diferentes métodos que se han usado en el trabajo expuesto en la presente Memoria para determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos procedentes de macro- y microalgas.

I.4.1.1. Método de equivalentes de trolox (TEAC, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*).

Como se ha comentado, la gran diversidad de métodos empleados para determinar la capacidad antioxidante ha proporcionado resultados numéricos muy distintos y difíciles de comparar. Para solventar este problema, en la mayoría de los estudios científicos en los que se valora la actividad antioxidante bien de compuestos puros, bien de extractos vegetales, se utiliza el antioxidante sintético Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como patrón de referencia. Esta sustancia se caracteriza por ser un análogo hidrosoluble de la vitamina E. El ensayo para medir la actividad antioxidante total o la actividad antioxidante expresada en equivalentes Trolox (TEAC, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) constituye uno de los métodos que aparece referenciado con gran frecuencia en la bibliografía científica para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos (Miller y Rice-Evans, 1997). Miller y Rice-Evans (1997) fueron los primeros que presentaron el ensayo de TEAC, en el que se medía la capacidad de los antioxidantes para captar el catión radical estable $ABTS^{•+}$. En el ensayo de TEAC original, se emplearon la metamioglobina y el peróxido de hidrógeno para generar el radical ferrilmioglobina, el cual reacciona con el ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) para producir $ABTS^{•+}$. Este radical presenta un color intenso, con un máximo de absorción a 734 nm. La acumulación de $ABTS^{•+}$ puede inhibirse, hasta cierto punto, por la presencia de antioxidantes (Antolovich y col., 2002). Ha habido propuestas de modificación del ensayo original en muchos aspectos, incluyendo los métodos para la generación de $ABTS^{•+}$, la longitud de onda para monitorizar la reacción o mejoras relativas a la manera de cuantificación, entre otras (Prior y col., 2005). En una versión mejorada del método, el oxidante $ABTS^{•+}$, se genera por la oxidación de $ABTS^{2-}$ usando persulfato potásico, y el radical catión $ABTS^{•+}$ puede ser reducido por los antioxidantes liberando el producto con menor color $ABTS^{2-}$ y por tanto, menor absorción a la longitud de onda indicada (Huang y col., 2005). El esquema de la reacción es el siguiente:



A continuación, se calcula el cambio porcentual de la absorbancia y los resultados se expresan como equivalentes de Trolox, es decir mmoles de trolox que serían necesarios para obtener una actividad antioxidante similar a la que presenta la muestra a una concentración determinada.

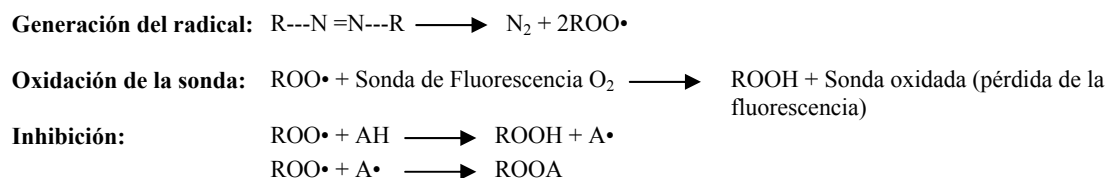
Así pues, el valor TEAC se define como la concentración de una solución de Trolox con un potencial antioxidante equivalente a una concentración 1 mM del compuesto o muestra a estudiar. Por tanto, el TEAC refleja la capacidad de los compuestos antioxidantes para secuestrar el catión radical $ABTS^{*+}$.

El método TEAC es simple de realizar, puede ser automatizado y adaptado a microplacas (Kampa y col., 2002). El radical catión $ABTS^{*+}$ presenta la ventaja de que es soluble tanto en medios acuosos como orgánicos, lo cual convierte al ensayo TEAC en un método apto para determinar la capacidad antioxidante en soluciones químicas, extractos de plantas y también en fluidos biológicos (Awika y col., 2003; Jaime y col., 2007). Aunque el método TEAC se clasifica como un método de actividad antioxidante basado en la transferencia de electrones, el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno también puede aplicarse puesto que los radicales pueden ser neutralizados por cualquiera de los dos, bien por reducción directa vía transferencia de electrones o por captación de radicales vía transferencia de átomos de hidrógeno. El balance de estos dos mecanismos viene generalmente determinado por la estructura del antioxidante o el valor de pH (Prior y col., 2005). Como punto final del ensayo, el método TEAC requiere determinaciones fiables del punto final de la reacción para cuantificar la actividad antioxidante, ya que la velocidad de reacción no viene reflejada en el valor TEAC (Prior y col., 2005; Huang y col., 2005). Además, la principal ventaja que presenta este método para medir la capacidad antioxidante se centra en el máximo de absorción de longitud de onda del radical $ABTS$, que es 734 nm, a esta longitud de onda se elimina la interferencia de color que podría presentar la presencia de algunos compuestos antioxidantes como los carotenoides, clorofilas o compuestos fenólicos.

I.4.1.2. Ensayo de la capacidad de absorción de radicales libres (ORAC_{FL}, *Oxygen Radical Absorbance capacity*).

Este método permite medir la inhibición de radicales peroxilo (ROO•) generados mediante la descomposición térmica de un compuesto azo, generalmente AAPH (2,2'-azo-bis (2-aminodinopropano) dihidrocloruro). En este ensayo, el radical peroxilo reacciona con una sonda fluorescente, provocando una pérdida en su fluorescencia la cual es detectada en un fluorímetro. En las primeras versiones de este método se hacía reaccionar el radical peroxilo con la proteína fluorescente β-ficoeritrina, que es una proteína aislada a partir de la microalga *Porphyridium cruentum*. Esta proteína fue inicialmente empleada como sonda fluorescente en los primeros estudios del ensayo de ORAC, antes de encontrarse que presentaba varias desventajas, como la gran variabilidad en la reactividad con los radicales peroxilo, así como su interacción con polifenoles debido a que es una proteína con unión no específica, y el hecho de que es fotoblanqueante cuando se excita por la luz (Prior y col., 2005; Huang y col., 2005). La β-ficoeritrina fue reemplazada por una sonda más estable y una no-proteína menos reactiva, como es la fluoresceína (3'6'-dihidroxispiro [isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona). Los productos de oxidación de la fluoresceína con los radicales peroxilo se han caracterizado, y los mecanismos de reacción se han verificado como un clásico mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (Ou y col., 2001).

De esta manera, los antioxidantes añadidos pueden reaccionar rápidamente con los radicales peroxilo e inhibir la pérdida de la intensidad de fluorescencia, siendo esta inhibición proporcional a la actividad antioxidante (Antolovich y col., 2002). El esquema de las reacciones químicas involucradas en el ensayo de ORAC es el siguiente:



El resultado de estos ensayos se presenta como una curva de fluorescencia frente a tiempo en la cual se observará una progresiva caída de la misma (ver Figura I.8). El efecto antioxidante (AOX) se calcula a partir del área neta integrada bajo la curva de

fluorescencia (AUC) [$AUC_{AOX} - AUC_{no\ AOX}$], como se muestra en la Figura I.8, y representa el intervalo de tiempo, velocidad inicial y la extensión total de inhibición en un solo valor.

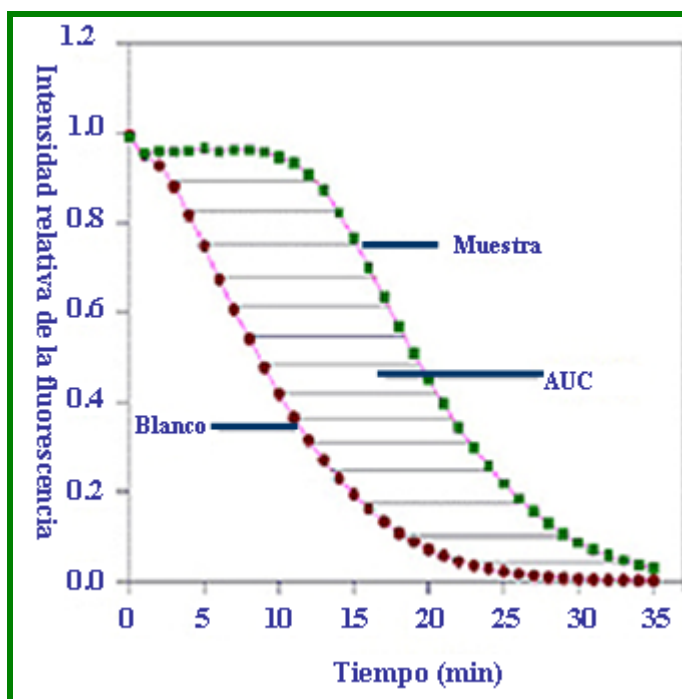


Figura I.8. Curva cinética del ensayo de ORAC.

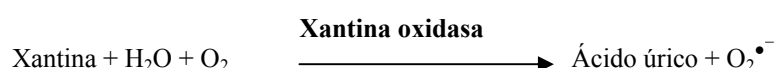
Aunque originariamente este método se desarrolló para medir la actividad de los compuestos antioxidantes hidrofílicos, recientemente se ha adaptado para valorar simultáneamente la actividad de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos cambiando la fuente del radical y el disolvente (Prior y col., 2005). El método ORAC puede ser fácilmente automatizado en un lector de fluorescencia de microplacas (Prior y col., 2005).

1.4.1.3. Capacidad de captación de radicales superóxido.

El anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) se crea por la adición de un electrón a la molécula de oxígeno, dando lugar a una especie altamente reactiva capaz de provocar oxidación lipídica, peroxidación y daño al ADN. Las fuentes de anión superóxido son numerosas siendo la más importante la mitocondria, y en menor orden reacciones enzimáticas catalizadas por la xantina oxidasa, flavina oxidasa, NADPH oxidasa y monoamina oxidasa. La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la conversión de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 .

y O_2 , representando la primera línea de defensa contra $O_2^{\bullet-}$. Estudios preclínicos han revelado que la enzima SOD presenta un efecto protector probado contra varias enfermedades en animales (Wang y col., 2010; Ciarcia y col., 2010).

La enzima xantina oxidasa (XO), pertenece al grupo de las oxido reductasas, cataliza la oxidación de xantina (X) e hipoxantina en presencia de moléculas de oxígeno para producir ácido úrico y anión superóxido como productos de reacción:



En este trabajo, para estudiar la capacidad de captación de radicales superóxido se ha empleado el método xantina/xantina oxidasa/nitroazul de tetrazolio (X/XO/NBT) (método colorimétrico). Se utiliza el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante de radical superóxido, el cual, al entrar en contacto con el NBT lo reduce y forma un producto llamado formazan, que se detecta mediante espectrofotometría. Los compuestos captadores de radicales superóxido (antioxidantes) inhiben la reducción del NBT y la consecuente formación de formazan (Beauchamp y Fridovich, 1971). También se puede usar un método fluorimétrico, denominado método xantina/xantina oxidasa/dihidroetidio (X/XO/DHE), para medir la capacidad de captación de estos radicales superóxido. En el ensayo DHE, el dihidroetidio es oxidado por el radical superóxido, dando un compuesto fluorescente. La emisión de fluorescencia está relacionada con la cantidad de aniones superóxido presentes en el ensayo (Fernandes y col., 2007).

I.4.2. Determinación de la actividad antimicrobiana.

En la actualidad se han identificado serios problemas relacionados directamente con las limitadas formas de conservación de los alimentos frescos y con el empleo de conservantes químicos y antimicrobianos artificiales que inhiben el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos. En numerosas publicaciones se han descrito efectos adversos que pueden causar este tipo de compuestos en la salud del consumidor (Arques y col., 2008; Aslim y Yucel, 2007; Brandi y col., 2006; Cushnie y Lamb, 2005; Murdak y col., 2007); por tanto, se está limitando cada vez más su uso y los compuestos

antimicrobianos naturales se presentan como una buena alternativa y con una gran aceptación por parte de la industria alimentaria.

Los antimicrobianos se emplean en alimentos por dos razones principales: (i) para controlar los procesos naturales de deterioro (conservación de alimentos); (ii) para prevenir/controlar el crecimiento de los microorganismos, incluyendo los microorganismos patógenos (seguridad alimentaria).

Los antimicrobianos naturales provienen de plantas, animales y fuentes microbianas. Existe la posibilidad de la utilización de antimicrobianos naturales en alimentos, especialmente en frutas y vegetales frescos. Sin embargo, los métodos y mecanismos de acción, así como la toxicidad y los efectos sensoriales de los antimicrobianos, no se conocen completamente (Burt, 2004; Ponce y col., 2008; Gutierrez y col., 2008; Raybaudi y col., 2008). A pesar de ello, se está realizando un gran esfuerzo para desarrollar nuevos métodos efectivos que permitan aumentar la seguridad alimentaria (Ayala-Zavala y col., 2008; Chen y col., 2008; Pellegrini, 2003; Murdak y col., 2007; Vagahasiva y Chanda, 2007). Por ejemplo, recientemente se han desarrollado métodos de incorporación de antimicrobianos naturales dentro del material de empaquetado, protegiéndose así la superficie de los alimentos (Abou-Taleb y Kawai, 2008; Fisher y Phillips, 2008; Ponce y col., 2008; Periago y col., 2006; Lanciotti y col., 2004).

Los agentes antimicrobianos naturales derivados de plantas son conocidos y se han empleado durante siglos en la conservación de alimentos. Los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana presentes en matrices naturales suelen ser terpenos, sesquiterpenos, glucósidos, saponinas, taninos, alcaloides, ácidos orgánicos, y otros que forman parte del sistema de defensa de las plantas contra infecciones microbianas (Bajpai y col., 2008; Ceylan y Fung, 2004). En este sentido las algas pueden ser una interesante fuente natural de este tipo de compuestos con actividad antimicrobiana. Actualmente, se pueden consultar algunos estudios en la bibliografía que evidencian la capacidad antimicrobiana de los extractos de algunas micro- (Santoyo y col., 2009; Ghasemi y col., 2007; Mendiola y col., 2007a; Mendiola y col., 2007b; Herrero y col., 2006a; Santoyo y col., 2006) y macroalgas (Vadlapudi y Naudi, 2009; Cox y col., 2010; Kantachumpoo y Chirapart, 2010; Manilal y col., 2009; Kotnala y

col., 2009; Shanmughapriya y col., 2008; Kim y Lee, 2008; Kim y col., 2007b; Salvador y col. 2007; Zinedine y col., 2004; Ozdemir y col., 2006).

Existen multitud de métodos para determinar la actividad antimicrobiana, que están generalmente basados en la medición de la inhibición del crecimiento microbiano que se obtiene cuando se añade, al medio de cultivo necesario para su desarrollo, la sustancia o sustancias antimicrobianas. Normalmente en el ensayo se incluyen controles negativos (con antibióticos de referencia) para confirmar la inhibición del crecimiento.

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos, a distintas condiciones, procedentes de macro- y microalgas. Para cubrir con amplitud el espectro de actividad de dichos extractos, se usaron diferentes tipos de microorganismos, lo que permite adicionalmente identificar algún tipo de actividad preferencial si la hubiere. Dicha actividad se determina normalmente frente a diferentes tipos de microorganismos incluyendo bacterias (tanto Gram (-) (*Escherichia coli*) como Gram (+) (*Staphylococcus aureus*)), levaduras (*Candida albicans*) y hongos (*Aspergillus niger*), determinando las concentraciones inhibitorias mínimas, tanto bactericidas (MBC, *Minimal Bactericidal Concentration*) como fungicidas (MFC, *Minimal Fungicidal Concentration*).

I.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.

Con objeto de caracterizar de manera precisa la composición química de los extractos naturales, así como para determinar los compuestos responsables de las actividades funcionales observadas, en el presente trabajo se han empleado diferentes técnicas de caracterización química avanzadas que se describen brevemente a continuación, junto con sus principales aplicaciones relacionadas con el tema de esta memoria.

I.5.1. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, separados por su relación masa/carga (m/z) y posteriormente detectados y registrados.

La importancia y proyección de la MS es debida a su potencial analítico. Las ventajas de esta técnica se pueden resumir en los siguientes aspectos: i) proporciona una insuperable especificidad en la determinación del peso molecular debido a la posibilidad de medir exactamente su masa molecular así como obtener información a partir de los fragmentos iónicos de un analito; ii) su sensibilidad es muy elevada y, en teoría, la MS permite detectar una única molécula. Se ha demostrado la detección de moléculas en cantidades de attomoles (10^{-18} moles) y femtomoles (10^{-15} moles); iii) es muy versátil, ya que permite determinar la estructura de tipos de compuestos muy diversos; iv) es aplicable a todo tipo de muestras, volátiles, no volátiles, polares y apolares, sólidos, líquidos y gases; v) además, en combinación con técnicas de separación de alta resolución, es la técnica más cualificada para analizar muestras complejas reales.

El análisis por espectrometría de masas se realiza en cuatro etapas básicas, como se puede apreciar en la Figura I.9:

1. Introducción de la muestra.
2. Ionización de la muestra, en la que se transforman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones.
3. Separación y análisis de los iones moleculares y de los fragmentos cargados producidos, según su relación m/z .
4. Obtención del espectro de masas, en el que se presenta la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación masa/carga.

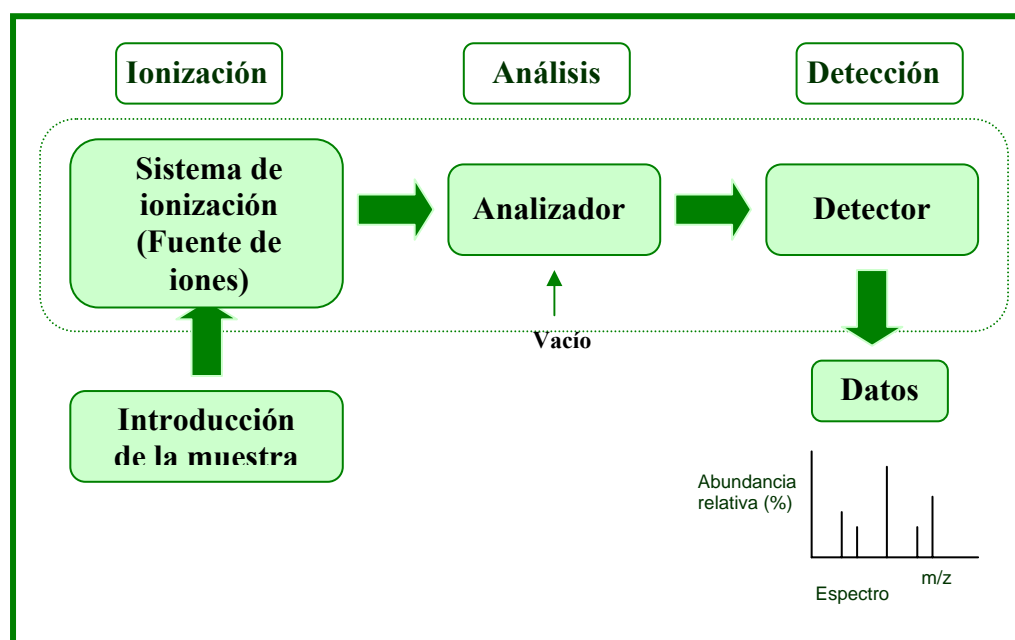


Figura I.9. Esquema básico de un espectrómetro de masas (MS).

El espectro de masas resultante es un gráfico que representa la abundancia relativa de los iones producidos (en %) respecto de su relación masa/carga (m/z). La señal correspondiente a un ión aparece en forma de varios picos que corresponden a la distribución estadística de los distintos isótopos del ión. La información obtenida por espectrometría de masas es esencialmente cualitativa, como es la determinación de masa molecular o la información sobre la estructura a partir de los fragmentos obtenidos, aunque también se pueden realizar análisis cuantitativos utilizando patrones internos o externos con límites de detección desde picomoles a femtomoles.

La MS ha sido muy aplicada en el ámbito del análisis de alimentos pero casi siempre acoplada a una técnica de separación; en los apartados siguientes de la presente memoria se describen brevemente los acoplamiento entre espectrometría de masas y diferentes tipos de cromatografía.

I.5.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC).

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) es la técnica analítica de separación más utilizada hoy en día, debido a su adecuada sensibilidad, su carácter cuantitativo, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, a su amplísimo número de

aplicaciones que incluye el análisis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas, ó sustancias inorgánicas, entre otras.

La separación de los compuestos se lleva a cabo en el interior de una columna de separación como resultado de la diferente distribución de dichos componentes entre una fase móvil que circula a través de la misma y la fase estacionaria que se encuentra empaquetada en el interior de la columna. Existen diferentes modos de separación, dependiendo del tipo de fase móvil y fase estacionaria empleadas, lo que proporciona una gran flexibilidad a la hora de aplicar esta técnica. Cuando se trabaja en fase normal, se utiliza una fase móvil apolar, mientras que la fase estacionaria posee una naturaleza polar. Este modo de separación de HPLC está especialmente recomendado para compuestos hidrófobos que sean solubles en disolventes apolares. Por el contrario, cuando se trabaja en fase reversa o fase inversa (RP-HPLC) se utilizan fases móviles polares y fases estacionarias de menor polaridad que la fase móvil. Este modo de HPLC está especialmente recomendado para compuestos polares, y es el más empleado.

La versatilidad de la cromatografía de líquidos se debe, en parte, a la gran cantidad de detectores disponibles que se pueden acoplar a esta técnica. Se han empleado satisfactoriamente detectores de longitud de onda discreta, detectores de haz de diodos, de fluorescencia, electroquímicos, o de índice de refracción, entre otros. Hoy en día, sin embargo, se observa un gran aumento en el empleo de espectrómetros de masas como detectores combinados con HPLC. Los detectores de espectrometría de masas (MS), especialmente con interfases de ionización por *electrospray* (ESI) y con ionización química a presión atmosférica (APCI), se están usando con mucha frecuencia en el análisis de alimentos debido a la valiosa información que permiten obtener (Figura I.10).

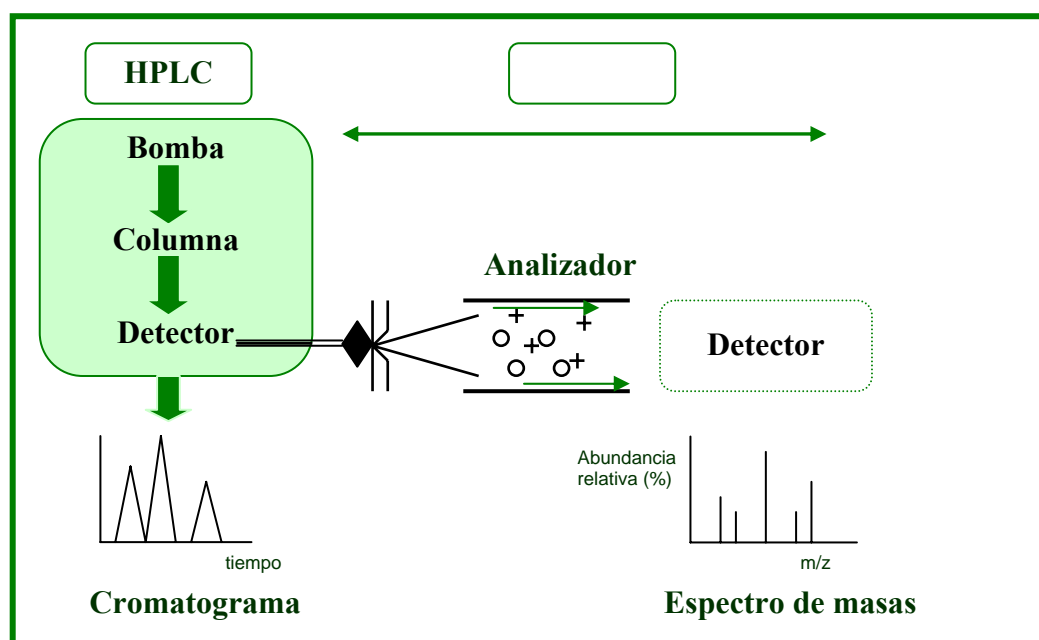


Figura I.10. Esquema de un equipo de LC acoplado a un espectrometro de masas (LC-MS).

La HPLC se ha aplicado ampliamente para el análisis de alimentos; en concreto, existen múltiples aplicaciones para el análisis de compuestos con actividad funcional procedentes de plantas (Herrero y col., 2010; Rodríguez-Meizoso y col., 2006; Yang y col., 2008; Sultana y col., 2008; Riggi y col., 2008; Kandlakunta y col., 2008; De Quirós y col., 2010; Donato y col., 2010; Meng y col., 2009; Wichitnithad y col., 2009...), y micro- y macroalgas (Onofrejová y col., 2010; Rodríguez-Meizoso y col., 2010; Herrero y col., 2006c; Rodríguez-Meizoso y col. 2008; Jaime y col., 2005; Mendiola y col, 2005; Koivikko y col, 2008). En la Tabla I.8, se muestra un resumen de algunas de las principales aplicaciones desarrolladas basadas en el empleo de HPLC para el análisis de compuestos con actividades funcionales procedentes de algas.

Tabla I.8. Ejemplos de las principales aplicaciones de HPLC al análisis de compuestos funcionales procedentes de algas.

| Tipo de compuesto | Especie | Separación | Columna | Fase móvil | Detector | Referencia |
|--|---|---------------------------|--|--|---------------------|---------------------------------|
| Carotenoides | | | | | | |
| Axtaxantina | <i>Haematoccus pluvialis</i> | Fase inversa (Gradiente) | C ₃₀ (5µm d.i., 250 x 4.6 mm) | A: Acetona B: Agua | DAD ¹ | Jaime y col., 2010 |
| Luteína | <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | Fase inversa (Gradiente) | C ₁₈ (4µm d.i., 150 x 3.9 mm) | A: Metanol/acetonitrilo/agua (8:1:1) B: Metanol/acetonitrilo (4:6) | DAD ¹ | Wu y col., 2007 |
| Violaxantina | <i>Chlorella ellipsoidea</i> | Fase inversa (Isocrático) | C ₁₈ (3.5µm d.i., 150 x 4.6 mm) | A: Acetonitrilo/metanol (0.1 M formiato de amonio)/diclorometano (71:22:7) | MS ⁵ | Cha y col., 2008 |
| β-caroteno, α-caroteno, zeaxantina y luteína | <i>Dunaliella salina</i> | Fase inversa (Gradiente) | C ₃₀ (5µm d.i., 250 x 4.6 mm) | A: metanol/acetonitrilo/agua (84:14:2) B: Diclorometano (75:25) | DAD ¹ | Hu y col., 2008 |
| Luteína y Zeaxantina | <i>Porphyra perforata</i> <i>Polysiphonia pacifica</i> <i>Boselliella orbignyana</i> | Fase inversa (Gradiente) | C ₁₈ (5µm d.i., 250 x 4.6 mm) | A: Acetonitrilo-agua (9/1) B: etilacetato | UV/Vis ² | Schubert y García-Mendoza, 2006 |
| Vitaminas | | | | | | |
| Tocoferoles (vitamina E) | <i>Porphyridium cruentum</i> | Fase normal (Isocrático) | Si 60-5 (250 x 3.0 mm) | Hexano/isopropanol (99.3:0.7) | FD ³ | Durmaz y col., 2007 |
| Vitamina B ₁ | <i>Alexandrium tamarense</i> | Fase inversa (Isocrático) | C ₁₈ (5µm d.i., 250 x 4.6 mm) | A: Metanol/acetato (40:60) | FD ³ | He y col., 2005 |
| Vitamina B ₁₂ | <i>Pleurochrysis carterae</i> | Fase inversa (Isocrático) | C ₁₈ (5µm d.i., 150 x 4.6 mm) | A: Metanol (1% ácido acético) | UV/Vis ² | Miyamoto y col., 2001 |
| Polisacáridos | | | | | | |
| Polisacáridos | <i>Porphyridium</i> sp. | Fase inversa (Gradiente) | C ₈ (10µm d.i.) | A: Agua (0.1% trifluoroacético) B: Acetonitrilo | DAD ¹ | Tannin-Spitz y col., 2005 |
| Compuestos fenólicos | | | | | | |
| Ácidos fenólicos | <i>Spongiochloris spongiosa</i> <i>Spirulina platensis</i> <i>Anabaena doliolum</i> <i>Cylindrospermum</i> sp. | Fase inversa (Gradiente) | C ₁₈ (3.5µm d.i., 75 x 4.6 mm) | A: Agua(0.2% ácido acético) B: Acetonitrilo | MS ⁵ | Klejduš y col., 2009 |
| Florotaninos | <i>Eisenia bicyclis</i> <i>Ecklonia kurome</i> | Fase inversa (Gradiente) | C ₁₈ (3 µm d.i., 150 x 6 mm) | A: Agua B: Metanol | UV/Vis ² | Shibata y col., 2002 |
| Fracción lipídica | | | | | | |
| Ácidos grasos | <i>Arthrospira platensis</i> | Fase inversa (Isocrático) | C ₁₈ (5µm d.i., 250 x 4.6 mm) | A: Metanol/agua (97:3) | ELSD ⁴ | Bravi y col., 2006 |
| PUFAs | <i>Scrippsiella</i> sp. | Fase inversa (Isocrático) | C ₁₈ (5µm d.i., 250 x 4.6 mm) | A: Acetonitrilo/agua (97.5:2.5) | ELSD ⁴ | Mansour, 2005 |

¹: DAD: detector de haz de diodos; ²: UV/Vis, detector ultravioleta; ³: FD, detector de fluorescencia; ⁴: ELSD, detector evaporativo de dispersión de luz; ⁵: MS, detector de espectrometría de masas.

I.5.3. Cromatografía de Gases (GC).

En cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*), la muestra se inyecta en fase líquida en un inyector donde pasa a fase gas transfiriéndose a la cabeza de la columna cromatográfica. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, en el caso de la GC la fase móvil o “gas portador” no interacciona con las moléculas del analito, siendo, su única función, la de transportar el analito a través de la columna donde se encuentra la fase estacionaria. De este modo, la retención de un compuesto

estará en función de la afinidad de un componente de la muestra por la fase estacionaria, así como de su presión de vapor. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido disperso sobre un sólido que actúa como soporte, de gran área superficial. Otra variable importante a tener en cuenta en cromatografía de gases es la temperatura de la columna, por ello la columna se introduce dentro de un horno de temperatura controlada. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido. Es común el empleo de gradiente de temperatura a lo largo del proceso separativo para aumentar el poder de separación de un método determinado.

El acoplamiento entre la cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) es actualmente una de las herramientas más utilizadas en los laboratorios de análisis. Esto se debe a su buena sensibilidad (con límites de detección del orden de los picomoles), al gran número de compuestos analizables, y porque la combinación de ambas técnicas es capaz de separar mezclas compleja de sustancias volátiles proporcionando, a su vez, información sobre la masa molecular (e incluso su estructura molecular a través del perfil de fragmentación que se obtiene) de los diferentes compuestos que integran la muestra. Debido a la estandarización en la ionización por impacto electrónico (EI) en el espectrometro de masas acoplado a GC, y la gran reproducibilidad en cuanto a los iones producidos utilizando esta técnica de ionización, ha sido posible la aparición de multitud de base de datos o bibliotecas de espectros de masas que facilitan en gran manera la identificación de los compuestos separados por esta técnica, gracias a la comparación estadística de los espectros correspondientes a innumerables compuestos almacenados en dichas bases de datos y los espectros obtenidos en un análisis concreto. No obstante, para que un compuesto sea apto para el análisis por GC-MS, debe ser térmicamente estable a las temperaturas del inyector y de la columna, y debe ser lo suficientemente volátil como para estar en fase gaseosa durante la separación cromatográfica (punto de ebullición $< 250^{\circ}\text{C}$).

En resumen, las ventajas de la GC consisten principalmente en su elevada capacidad de separación, velocidad, reproducibilidad, sensibilidad y versatilidad, así como sus múltiples aplicaciones. Esta técnica se ha utilizado para el análisis de diversos tipos de compuestos en macro- y microalgas. En la Tabla I.9 se muestra un resumen de algunas de las aplicaciones desarrolladas para este fin.

Tabla I.9. Ejemplos de las principales aplicaciones de GC al análisis de compuestos funcionales procedentes de algas.

| Tipo de compuesto | Especie | Columna | Detector | Referencia |
|--|---|---|------------------|--|
| Ácidos grasos | | | | |
| Ácido eicosapentaenoico (EPA) y Ácido γ -linolénico | <i>Porphyridium cruentum</i> <i>Spirulina platensis</i> | Polietilenglicol (30 m x 0.32 mm) | FID ¹ | Cohen y col., 2002 |
| Ácido oleico | <i>Haematococcus pluvialis</i> | Polietilenglicol (30 m x 0.25 mm) | FID ¹ | Ceron y col., 2007 |
| Ácido oleico | <i>Chlorella vulgaris</i> | Polietilenglicol (30 m x 0.32 mm) | FID ¹ | Mendes y col. 1995 |
| Ácido linoleico | <i>Dunaliella salina</i> | Polietilenglicol (60 m x 0.25 mm) | MS ² | Herrero y col., 2006a |
| Ácido palmitoleico | <i>Spirulina platensis</i> | Polietilenglicol (30 m x 0.25 mm) | FID ¹ | Mendiola y col., 2007a |
| Azúcares | | | | |
| Polisacáridos sulfatados | <i>Porphyridium</i> | 100% Dimetilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm) | FID ¹ | Geresh y col., 2002 |
| Polisacáridos sulfatados | <i>Ulva conglobata</i> | (5%-Fenil)(1%-Vinil)-metilpolisiloxano (50 m x 0.32 mm) | FID ¹ | Mao y col., 2006 |
| Arabinogalactanos | <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | 70% Cianopropil polisilfenileno-siloxano (30 m x 0.25 mm) | MS ² | Reyes-Suarez y col., 2005 |
| Galactanos sulfatados | <i>Codium cylindricum</i> | Cianopropil polisiloxano (25 m x 0.25 mm) | MS ² | Matsubara y col., 2001 |
| Compuestos volátiles | | | | |
| Neofitadieno, fitol,... | <i>Spirulina platensis</i> <i>Dunaliella salina</i> <i>Phormidium</i> sp. | (95% dimetil) 5% difenil polisiloxano (30 m x 0.25 mm) | MS ² | Santoyo y col., 2006 Herrero y col. 2006a Rodríguez-Meizoso y col., 2008 |

¹: FID, detector de ionización de llama; ²:MS, detector de espectrometría de masas.

Bibliografía

Abbasi, H., Rezaei, K., Rashidi, L. (2008). Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO₂. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists Society* 85: 83-89.

Abou-taleb, M., Kawai, Y. (2008). Shelf life of semi fried tuna slices coated with essential oil compounds after treatment with anodic electrolyzed NaCl solution. *J. Food Prot.* 71: 770-774.

Ackman, R.G. (1981). Algae as source for edible lipids. In: New sources of oils and fats. Pyrdé EH, Princen LH, Mukerjee KD (eds). AOAC Press, Illinois. P 28.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* 127: 183-198.

Antonopoulou, S., Karantonis, H.C., Nomikos, T., Oikonomou, A., Fragopoulou, E., Pantazidou, A. (2005). Bioactive polar lipids from *Croococidiopsis* sp. (Cyanobacteria). *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 142: 269-282.

Arai, S. (1996). Studies of functional foods in Japan - State of the art. *Biosci. Biotech. Biochem.*; 60: 9-15.

Arques, J.L., Rodriguez, E., Nunez, M., Medina, M. (2008). Inactivation of gram negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *Eur. Food Res. Technol.* 227: 77-82.

Aslim, B., Yucel, N. (2007). In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. *Food Chem.* 107: 602-606.

Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6657-6662.

Ayala-Zavala, J.F., Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Gonzalez-Aguilar, G.A., Alvarez-Parrilla, E., Martin-Belloso, O. (2008). Bio-preservation of fresh-cut tomatoes using natural antimicrobials. *Eur. Food Res. Technol.* 226: 1047-1055.

Bajpai, V.K., Rahman, A., Kang, S.C. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 117-122.

Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.

Bemis, D.L., Jacobs, R.S., Bailcy, T.G. (1996). Production of arachidonic acid metabolites in chloroplasts isolated from the green alga, *Anadyomene stellata*. *FASEB J.* 10: A150.

Benemann, J.R. (1997). CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy Convers Manage* 38: 475-479.

Berlan, J., Mason, T.J. (1992). Sonochemistry from research laboratories to industrial plants. *Ultrasonics*, 30: 203-212.

Bhaskar, N., Kinami, T., Miyashita, K., Park, S.B., Endo, Y., Fujimoto, K. (2004). Occurrence of conjugated polyenoic fatty acids in seaweeds from the Indian Ocean. *Zeitschrift fur Naturforschung-Section C J. Biosci.* 59: 310-314.

- Bhat, B.V., Gaikwad, N.W., Madyastha, K.M. (1998). Hepatoprotective effect of C-phycoyanin. Protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 428-431.
- Bhat, B.V., Madyastha, K.M. (2000). C-Phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 20-25.
- Bradford, P.G., Awad, A.B. (2007). Phytosterols as anticancer compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 161-170.
- Bravarmand, L.E., Utigar, R.D. (1991). The thyroid. A fundamental and clinical text, Lippincott Publ, Philadelphia.
- Bravi, E., Perretti, G., Montanari, L. (2006). Fatty acids by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detector. *J. Chromatogr. A* 1134: 210-214
- Brull, R., Mensink, R.P., Plat, J. (2009). Plant sterols functional lipids in immune function and inflammation?. *Clinical Lipidology* 4: 355-365.
- Bruno, A., Rossi, C., Marcolongo, G., Di Lena, A., Venzo, A., Berrie, C.H., Corda, D. (2005). Selective *in vivo* anti-inflammatory action of the galactolipid monogalactosyldiacylglycerol. *Eur. J. Pharmacol.* 524: 159-168.
- Burr, M.L., Fehily, A.M., Gilbert, J.F., Rogers, S., Holliday, R.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C., Deadman, N.M. (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 2: 757-761.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- Burtin, P. (2003a). Nutritional value of seaweeds. *Elec. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2: 498-503.
- Burtin, P. (2003b). Nutritional value of seaweeds. *Elec. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2: 24-28.
- C**alzolari, I., Fumagalli, S., Marchionni, N., Di Bari, M. (2009). Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des.* 15: 4149-4156.
- Carlucci, M.J., Scolaro, L.A., Damonte, E.B. (1999). Inhibitory action of natural carrageenans on Herpes simplex virus infection of mouse astrocytes. *Chemotherapy* 45: 429-436.
- Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., Torres, A., Macías, F.A., de la Ossa, E.J.M. (2009). SFE Kinetics of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. *J. Sep. Sci.* 32: 1445-1453.
- Cerón, M.C., García-Malea, M.C., Rivas, J., Acien, F.G., Fernandez, J.M., Del Río, E., Guerrero, M.G., Molina, E. (2007). Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1112-1119.
- Ceylan, E., Fung, D.Y.C. (2004). Antimicrobial activity of spices. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 12: 1-55.
- Cha, K.H., Koo, S.Y., Lee D.U. (2008). Antiproliferative effects of carotenoids extracts from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10521-10526.
- Chen, N., Chang, C.C., Ng, C.C., Wang, C.Y., Shyu, Y.T., Chang, T.L. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of Zingiberaceae plants in Taiwan. *Plant Food. Hum. Nutr.* 63: 15-20.

Ciarcia, R., d'Angelo, D., Pacilio, C., Pagnini, D., Galdiero, M., Fiorito, F., Damiano, S., Mattioli, E., Lucchetti, C., Florio, S., Giordano, A. (2010). Dysregulated calcium homeostasis and oxidative stress in chronic myeloid leukemia (CML) cells. *J. Cell. Physiol.* 224: 443-453.

Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 458-479.

Cohen, Z., Didi, S., Heimer, Y.M. (1992). Overproduction of α -linolenic and eicosapentaenoic acids by algae. *Plant Physiol.* 98:569-572.

Cox, S., Abu-Ghannam, N., Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Int. Food Res. J.* 17: 205-220.

Curren, M.S.S., King, J.W. (2001a). Ethanol-modified subcritical water extraction combined with solid-phase microextraction for determining atrazine in beef kidney. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2175-2180.

Curren, M.S.S., King, J.W. (2001b). Solubility of triazine pesticides in pure and modified subcritical water. *Anal. Chem.* 73: 740-745.

Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26: 343-356.

Dawczynski, C., Schubert, R., Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.* 103: 891-899.

Dawes, C.J. (1998). Marine botany. John Wiley & Sons, Inc., New York. P480.

Denery, J.R., Dragull, K., Tang, C.S., Li, Q.X. (2004). Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal. Chim. Acta*, 501: 175-181.

De Quirós, A.R.B., Frech-Ferreiro, S., Vidal-Pérez, A.M., López-Hernández, J. (2010). Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 495-498.

De Souza, P.H., Leao-Ferreira, L.R., Moussatché, N., Teixeira, V.L., Cavalcanti, D.N., Da Costa, L.J., Diaz, R. Frugulhetti, I.C. (2005). Effects of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* on HIV-1 reverse transcriptase. *Planta Med.* 71: 1019-1024.

De Souza, E.T., De Lira, D.P., De Queiroz, A.C., Da Silva, D.J.C., De Aquino, A.B., Campessato Mella, E.A., Lorenzo, V.P., De Miranda, G.C.E., De Araújo-Júnior, J.X., De Oliveira Chaves, M.C., Barbosa-Folho, J.M., De Athayde-Filho, P.F., De Oliveira Santos, B.V., Alexandre-Moreira, M.S. (2009). The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. *Mar. Drugs* 7: 689-704.

De Spirt, S., Lutter, K., Stahl, W. (2010). Carotenoids in photooxidative stress. *Curr. Nutr. Food Sci.* 6: 36-43.

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B, Roberfroid, M.B. (1999). Scientific concepts of functional Foods in Europe: Consensus Document. *Brit. J. Nutr.* 81: S1-S27.

Donato, P., Fanali, C., Santi, L., Dugo, P., Mondello, L. (2010). LC-MS techniques for the detection and characterization of bioactive compounds in food. *Food Sci. Technol.* 24: 53-55.

Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., Wang, B.G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem.* 95: 37-43.

Durmaz, Y., Monteiro, M., Bandarra, N., Gökpınar, S., Isik, O. (2007). The effect of low temperature on fatty composition and tocopherols of the red microalgae, *Porphyridium cruentum*. *J. Appl. Phycol.* 19: 223-227.

Eide, I., Mykkestad, S., Melson, S. (1980). Longterm uptake and release of heavy metals by *Ascophyllum nodosum* (L.). *Environ. Pollut.* 23:19-28.

Eriksen, N.T. (2008). Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 1-14.

Fernandes, A. S., Gaspar, J., Cabral, M. F., Caneiras, C., Guedes, R., Rueff, J., Castro, M., Costa, J., Oliveira, N. G. (2007). Macrocyclic copper (II) complexes: Superoxide scavenging activity, structural Studies and cytotoxicity evaluation. *J. Inorg. Biochem.* 101: 849-858.

Fisher, K., Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer?. *Trends Food Sci. Technol.* 19: 156-164.

Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 25-28.

Francavilla, M., Trotta, P., Luque, R. (2010). Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. *Bioresour. Technol.* 101: 4144-4150.

Freitas, L.D.S., De Oliveira, J.V., Dariva, C., Jacques, R.A., Caramão, E.B. (2008). Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxides and propane: Extraction yields and characterization of free glycerol compounds. *J. Agric. Food Chem.* 56: 2558-2564.

Fujiwara-Arasaki, T., Mino, N., Kuroda, M. (1984). The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Hydrobiologia* 116/117: 513-516.

Funahashi, H., Imai, T., Tanaka, Y., Tsukamura, K., Hayakawa, Y., Kikumori, T., Mase, T., Itoh, T., Nishikawa, M., Hayashi, H., Shibata, A., Hibi, Y., Takahashi, M., Narita, T. (1999). Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumours in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 922-927.

García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Ibáñez, E., García-Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Anal. Chim. Acta* 563: 44-50.

Geresh, S., Adin, I., Yarmolinsky, E., Karpasas, M. (2002). Characterization of the extracellular polysaccharides of *Porphyridium sp.*: molecular weight determination and rheological properties. *Carbohydrate Polymers* 50: 189-189.

Geslain-Lanéelle, C. (2006). Conference on nutrition and health claims. Bologna, Noviembre.

Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A., Shokravi, S., Morowvat, M.H. (2007). Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from paddy fields of Iran: Characterization of antimicrobial activity of *Chroococcus dispersus*. *J. Biol. Sci.* 7: 904-910.

Ghoreishi, S.M., Shahrestani, R.G. (2009). Subcritical water extraction of mannitol from olives leaves. *J. Food Eng.* 93: 474-481.

Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem.* 92: 521-525.

Gómez-Ayala, A.E. (2007). Nutrigenómica y nutrigenética. La relación entre la alimentación, la salud y la genómica. *OFFARM* 26: 78-85.

González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A., García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus lemon for food and health. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 327-345.

Gouveia, L., Nobre, B.P., Marcelo, F.M., Mrejen, S., Cardoso, M.T., Palabra, A.F., Mendes, R.L. (2007). Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Food Chem.* 101: 717-723.

Guil-Guerrero, J.L., López-Martínez, J.C., Campa-Madrid, P. (2008). Gamma-linolenic extraction from seed by SCF and several solvent systems. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43: 1176-1180.

Guo, W., Kong, E., Meydani, M. (2009). Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutr. Cancer* 61: 807-810.

Gursoy, O., Kinik, O. (2006). Probiotics: A new popular option for cancer inhibition. *Int. J. Dairy Sci.* 1: 100-103.

Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2008). Efficacy of plant essential oils against food borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. *J. Food Prot.* 71: 1846-1854.

Hasler, C.M. (1998). Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol.* 52: 63-70.

Hasler, C.M. (2002). Functional foods: Benefits, Concerns and Challenges- A position Paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.* 132: 3772-3778.

Hattab, M.E., Culioli, G., Piovetti, L., Chitour, S.E., Valls, R. (2007). Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*. *J. Chromatogr. A* 1143: 1-7.

Hejazi, M.A., Andrysiewicz, E., Tramper, J., Wijffels, R.H. (2003). Effect of mixing rate on β -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 84: 51-596.

Hejazi, M.A., Holwerda, E., Wijffels, R.H. (2004b). Milking microalga *Dunaliella salina* for β -carotene production in two-phase bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 475-481.

He, H.Z., Li, H.B., Chen, F. (2005). Determination of vitamin B1 in seawater and microalgal fermentation media by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 383: 875-879.

Herrera, M.C., Luque de Castro, M.D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* 1100: 1-7.

Herrero, M., Ibáñez, E., Señoráns, J., Cifuentes, A. (2004). Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga: Determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 1047: 195-203.

Herrero, M., Simó, C., Ibáñez, E., Cifuentes, A. (2005). Capillary electrophoresis-mass spectrometry of *Spirulina platensis* proteins obtained by pressurized liquid extraction. *Electrophoresis* 26: 4215-4224.

Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., Reglero, G., Santoyo, S. (2006a). *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. *J. Food Prot.* 69: 2471-247.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006b). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae-A review. *Food Chem.* 98: 136-148.

Herrero, M., Jaime, L., Martín-Álvarez, P.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006c). Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *J. Agric. Food. Chem.* 54: 5597-5603.

Herrero, M., Vicente, M.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2007). Characterization by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry of the lipid fraction of *Spirulina platensis* pressurized ethanol extract. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 21: 1729-1738.

Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010a). Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J. Chromatogr. A* 1217: 2512-2520.

Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010b). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J. Chromatogr. A* 1217: 2495-2511.

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: 21-25.

Horie, Y., Sugase, K., Horie, K. (1995). Physiological differences of soluble and insoluble dietary fibre fractions of brown algae and mushrooms in pepsin activity in vitro and protein digestibility. *Asian Pacific J. Clin. Nutr.* 4: 251-255.

Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., Kawabata, J., Odashima, S., Takahashi, K. (1999). Apoptosis inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell HL-60. *Food Sci. Technol. Res.* 5: 243-246.

Hosokawa, M., Kudo, M., Maeda, H., Kohno, H., Tanaka, T., Myashita, K. (2004). Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR α ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1675: 113-119.

Hu, C.C., Lin, J.T., Lu, F.J., Chou, F.P., Yang, D.J. (2008). Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chem.* 109: 439-446.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.

Huang, J., Wang, J., Chen, B.L., Wang, M.Z., Liang, S.Z. (2006). Isolation and purification of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* and its spectrum characteristics. *J. Plant Resour. Environ.* 15: 20-24.

Jaime, L., Mendiola, J.A., Herrero, M., Soler, C., Santoyo, S., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2005). Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC and HPLC-DAD. *J. Sep. Sci.* 28: 2111-2119.

Jaime, L., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., Martín-Álvarez, P.J., Cifuentes, A., Reglero, G., Señorans, F.J. (2007). Beta-carotene Isomer Composition of Sub- and Supercritical Carbon Dioxide Extracts. Antioxidant Activity Measurement. *J. Agric. Food Chem.* 55: 10585-10590.

Jaime, L., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Santoyo, S., Suarez, S., Ibáñez, E., Señorans, F.J. (2010). Pressurized liquid as an alternative process to antioxidant carotenoids extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT-Food Sci. Technol.* 43:105-112.

- Jialal, I., Traber, M., Devaraj, S. (2001). Is there a vitamin E paradox?. *Curr. Opin. Lipidol.* 12: 49-53.
- Jiang, R.A., Hay, M.E., Fairchild, C.R., Prudhomme, J., Le Roch, K., Aalbersberg, W., Kubanek, J. (2008). Antineoplastic unsaturated fatty acids from Fijian macroalgae. *Phytochemistry* 69: 2495-2500.
- Jim, J.M., Lee, J., Lee, Y.W. (2010). Characterization of carotenoids biosynthetic genes in the ascomycete *Gibberella zeae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 302:197-202.
- Jiménez-Escrig, A., Goñi, I. (1999). Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de macroalgas marinas comestibles. *Arch. Latinoam. Nutr.* 49: 114-120.
- Jiménez-Escrig, A., Sánchez-Muniz, F.J. (2000). Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr. Res.* 20: 585-598.
- Johanson, S. (2000). The possible role of gradual accumulation of copper, cadmium, lead and iron and gradual depletion of zinc, magnesium, selenium, vitamins B2, B6, D and E and essential fatty acids in multiple sclerosis. *Med. Hypotheses.* 55: 239-241.
- John, S., Sorokin, A.V., Thompson, P.D. (2007). Phytosterols and vascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 18: 35-40.
- K**amath, B.S., Srikanta, B.M., Dharmesh, S.M., Sarada, R., Ravishankar, G.A. (2008). Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur. J. Pharmacol.* 590: 387-395.
- Kampa, M., Nistikaki, A., Tsaousis, V., Maliataki, N., Notas, G., Castanas, E. (2002). A new automated method for the determination of the total antioxidant capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clin. Pathol.* 2: 1472-1473.
- Kandlakunta, B., Rajendran, A., Thingnganing, L. (2008). Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin. *Food Chem.* 106: 85-89.
- Kang, K., Park, Y., Hwang, H.J., Kim, S.H., Lee, J.G., Shin, H.C. (2003). Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agent against vascular risk factors. *Arch. Pharm. Res.* 26:286-293.
- Kantachumpoo, A., Chirapart, A. (2010). Components and antimicrobial activity of polysaccharides extracted from thai brown seaweeds. *Kasetsart J. (Natural Science)* 44: 220-233.
- Kapetanovic, R., Sladic, D., Popov, S., Zlatovic, M., Kljajic, Z., Gasic, M.J. (2005). Sterol composition of the Adriatic sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomium*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. *J. Serb. Chem. Soc.* 70: 1395-1400.
- Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C.C., Yang, W.C., Tsai, G.J. (2010). Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentate*. *J. Ethnopharmacol.* 128: 123-130.
- Khotimchenko, S.V. (1991). Fatty acid composition of seven *Sargassum* species. *Phytochemistry* 30: 2639-2641.
- Kim, Y.H., Kim, E.H., Lee, C., Kim, M.H., Rho, J.R. (2007a). Two new monogalactosyl diacylglycerols from brown alga *Sargassum thunbergii*. *Lipids* 42: 395-399.
- Kim, I.H., Lee, D.G., Lee, S.H., Ha, J.M., Ha, B.J., Kim, S.K., Lee, J.H. (2007b). Antibacterial activity of *Ulva lactuca* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 579-582.
- Kim, I.H., Lee, J.H. (2008). Antimicrobial activities against methicillin-resistant *Ataphylococcus aureus*

from macroalgae. *J. Ind. Eng. Chem.* 14: 568-572.

Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S., Hasegawa, T. (2009). Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84: 657-661.

Kitamura, K., Matsuo, M., Yasui, T. (1991). Fucoïdan from brown seaweed *Laminaria angusta* var. *longissima*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 615-616.

Klejdus, B., Kopecký, J., Benešová, L., Vacek, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *J. Chromatogr. A* 1216: 763-771.

Koivikko, R., Eränen, J.K., Lopenen, J., Jormalainen, V. (2008). Variation of phlorotannins among three populations of *Fucus vesiculosus* as revealed by HPLC and colorimetric quantification. *J. Chem. Ecol.* 34: 57-64.

Konishi, T., Yamazoe, K., Kanzato, M., Konoshima, T., Fujiwara, Y. (2003). Three diterpenoids (excoecarins V1-V3) and a flavanone glycoside from the fresh stem of *Excoecaria agallocha*. *Chem. Pharm. Bull.* 51: 1142-1146.

Kotate-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sagawara, T., Miyashita, K., Nagao, A. (2001). Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J. Nutr.* 131: 3303-3306.

Kotnala, S., Garg, A., Chatterji, A. (2009). Screening for the presence of antimicrobial activity in few Indian seaweeds. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 32: 69-75.

Kromann, N., Green, A. (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950–1974. *Acta Med. Scand.* 208: 401–406.

Kumar, C.S., Ganesan, P., Suresh, P.V., Bhaskar, N. (2008). Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds - A review. *J. Food Sci. Technol.* 45: 1-13.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M.E., Gardin, F. (2004). Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 201-208.

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.

Lee, S.H., Athukorala, Y. (2008). Simple separation of anticoagulant sulfates galactan from marine red algae. *J. Appl. Phycol.* 20: 1053-1059.

Li, B., Xin, J.W., Sun, J.L., Xu, S.Y. (2006). Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res.* 341: 1135-1146.

Li, H.B., Jiang, Y., Wong, C.C., Cheng, K.W., Chen, F. (2007). Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 388: 483-488.

Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* 13: 1671-1695.

Ligor, M., Kornyšova, O., Maruška, A., Buszewski, B. (2008). Determination of flavonoids in tea and Rooibos extracts by TLC and HPLC. *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC* 21: 355-360.

Liza, M.S., Abdul-Rahman, R., Mandana, B., Jinap, S., Rahmat, A., Zaidul, I.S.M., Hamid, A. (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca). *Food Bioprod. Process.* 88: 319-326.

Luque De Castro, M.D., Jiménez-Carmona, M.M., Fernández-Pérez, V. (1999). Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends Anal. Chem.* 18: 708-716.

Ma, Y., Ye, X., Xu, G., Xu, G., Liu, D. (2008) Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason. Sonochem.* 15: 227-232.

Mabeu, S., Fleurence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 4: 103-107.

MacArtain, P., Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R., Rowland, I.R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutr. Rev.* 65: 535-543.

Macías-Sánchez, M.D., Mantell-Serrano, C., Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L.M., Montero, O. (2009a). Comparison of supercritical liquid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta* 77: 948-952.

Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332: 392-397.

Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Miyashita, K. (2007). Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-A^y mice. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7701-7706.

Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G.S., Selvin, J., Shakir, C., Gandhimathi, R., Lipton, A.P. (2009). Antimicrobial potential and seasonality of red algae collected from the southwest coast of India tested against shrimp, human and phytopathogens. *Ann. Microbiol.* 59: 207-219.

Mansour, M.P. (2005). Reversed-phase high-performance liquid chromatography purification of methyl esters of C16-C28 polyunsaturated fatty acids in microalgae, including octacosaoctanoic acid [28:8(n-3)]. *J. Chromatogr. A* 1097: 54-58.

Mao, W., Zang, X., Li, Y., Zhang, H. (2006). Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *J. Appl. Phycol.* 18: 9-14.

Marriott, B.M. (2000). Functional foods: an ecologic perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1728S-34S.

Matsubara, K., Matsuura, Y., Bacic, A., Liao, M.L., Hori, K., Miyazawa, K. (2001). Anticoagulant properties of a sulphated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cuyimdricum*. *Int. J. Biolog. Macromolecules.* 28: 395-399.

Matsumoto, N., Endo, Y., Fujimoto, K., Koike, S., Matsumoto, W. (2001). The inhibitory effect of conjugated and polyunsaturated fatty acids on the growth of human cancer cell lines. *Tohoku J. Agric. Res.* 52: 1-12.

Matsuno, T. (2001). Aquatic animal carotenoids. *Fish. Sci.* 67: 771-783.

Mayer, A.M.S, Lehmann, V.K.S. (2001). Marine pharmacology in 1999: Antitumor and cytotoxic compounds. *Anticancer Res.* 21: 2489-2500.

McClements, J.D. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 293-299.

Mendes, R.L., Fernandes, H.L., Coelho, J.P., Reis, E.C., Cabral, J.M.S., Novais, J.M., Palabra, A.F. (1995). Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chem.* 53: 99-103.

- Mendes, R.L., Nobre, B.P., Carodoso, M.T., Pereira, A.P., Palavra, A.F. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorg. Chim. Acta* 356: 328-334.
- Mendes, R. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Eur. Food Technol.* 223: 787-790.
- Mendiola, J.A., Marín, F.R., Hernández, S.F., Arredondo B.O., Señoráns, F.J., Ibañez E., Reglero, G. (2005). Characterization via liquid chromatography coupled to diode array detector and tandem mass spectrometry of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga. *J. Sep. Sci.* 28: 1031-1038.
- Mendiola, J.A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E., Señoráns, F.J. (2007a). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chem.* 102: 1357-1367.
- Mendiola, J.A., Torres, C.F., Toré, A., Martín-Álvarez, P.J., Santoyo, S., Arredondo, B.O., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2007b). Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content. *Eur. Food Res. Technol.* 224: 505-510.
- Mendiola, J.A., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2007c). Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *J. Chromatogr. A* 1152: 234-246.
- Mendiola, J.A., García-Martínez, D, Rupérez, F.J., Martínez-Álvarez, P.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Barbas, C., Ibañez, E., Señoráns, F.J. (2008a). Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *J. Supercrit. Fluids* 43: 484-489.
- Mendiola, J.A., Santoyo, S., Cifuentes, A., Reglero, G., Ibañez, E., Señoráns, F.J. (2008b). Antimicrobial activity of sub- and supercritical CO₂ extracts of the green alga *Dunaliella salina*. *J. Food Protect.* 71: 2138-2143.
- Meng, J., Leung, K.S.Y., Dong, X.P., Zhou, Y.S., Jiang, Z.H., Zhao, Z.Z. (2009). Simultaneous quantification of eight bioactive components of *Hauttuynia cordata* and related Saururaceae medicinal plants by on-line high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray mass spectrometry. *Fitoterapia* 80: 468-474.
- Metting Jr., F.B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17: 477-489.
- Miao, X., Wu, Q. (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* 97: 841-846.
- Miller, N.J. & Rice-Evans, C.A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay. *Free Radical Res.* 26: 195-199.
- Mišurcová, L., Stratilová, I., Kráčmar, S. (2009). Mineral contents in food products from freshwater algae and seaweed. *Chemické Listy* 103: 1027-1033.
- Miyamoto, E., Watanabe, F., Ebara, S., Takenaka, S., Takenava, H., Yamaguchi, Y., Tanaka, N., Inui, H., Nakano, Y. (2001). Characterization of a vitamin B12 compound from unicellular Coccolithophoric Alga (*Pleurochrysis carterae*). *J. Agric. Food Chem.* 49: 3486-3489.
- Mojaat, M., Pruvost, J., Focault, A., Legrand, J. (2008a). Effect of organic carbon sources and Fe²⁺ ions on growth and β -carotene accumulation by *Dunaliella salina*. *Biochem. Eng. J.* 39: 177-184.
- Mojaat M., Focault A., Pruvost, J., Legrand, J. (2008b). Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of β -carotene from *Dunaliella salina*. *J. Biotechnol.* 133: 433-441.

Moliné, M., Libkind, D., Diéguez, M.C., van Broock, M. (2009). Photoprotective role of carotenoids in yeast: Response to Uv-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *J. Photochem. Photobiol. B* 95: 156-161.

Moreno, P., Petkov, G., Ramazanov, Z., Garsia, G. (1998). Lipids, fatty acids and sterols of *Cystoseira abies-marina*. *Bot. Mar.* 41: 375-378.

Morgan, K.C., Wright, J.L.C., Simpson, F.J. (1980). Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmata* (Dulse). *Econ. Bot.* 34: 27-50.

Morrice, L.M., MacLean, M.W., Long, W.F., Williamson, F.B. (1983). Porphyrin primary structure. *Eur. J. Biochem.* 133: 673-684.

Muñoz, R., Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res.* 40: 2799-2815.

Murakami, N., Morimoto, T., Ueda, T., Nagai, S.I., Sakakibara, J., Yamada, N. (1992). Release of monogalactosyl diacylglycerols from cyanobacterium, *Phormidium tenue*, into its growth medium. *Phytochemistry* 31: 3043-3044.

Murdak, C.A., Cleveland, J., Matthews, K.R., Chikindas, M.L. (2007). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 255-261.

Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., Nakamura, T. (2002). Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 889-893.

Narayan, B., Miyashita, K., Hosakawa, M. (2005). Comparative evaluation of fatty acid composition of different *Sargassum* (Fucales, Phaeophyta) species harvested from temperate and tropical waters. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 13: 53-70.

Nobre, B., Marcelo, F., Passos, R., Beirão, L., Palabra, A., Gouveia, L., Mendes, R. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Eur. Foods Technol.* 223: 787-790.

Noda, H. (1993). Health benefits and nutritional properties of nori. *J. Appl. Phycol.* 5: 255-258.

Norton, T.A., Melkonian, M., Andersen, R.A. (1996). Algal biodiversity. *Phycologia* 35: 308-326.

Okai, Y., Higashi-Okai, K. (1996). Possible immunomodulating activities of carotenoids in vitro cell culture experiments. *Int. J. Immunopharmacol.* 18:753-758.

Onofrejová, L., Vašičková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S., Kopecký, J., Vacek, J. (2009). Bioactive phenols in algae: The applications of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 464-470.

Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernandez, J., Bozzo, C., Navarrete, E., Osorio, A., Rios, A. (2006). Dietary fibre, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chem.* 99:98-104.

Orús, M.I., Marco, E., Martínez, F. (1991). Suitability of *Chlorella vulgaris* UAM 101 for heterotrophic biomass production. *Bioresour. Technol.* 38: 179-184.

Osumi, Y., Kawai, M., Amano, H., Noda, H. (1998). Antitumor activity of oligosaccharides derived from *Porphyra yezoensis* porphyran. *Nippon Suisan Gakk.* 64:847-853.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4619-4626.

Ozdemir, G., Horzum, Z., Sukatar, A., Karabay-Yavasoglu, N.U. (2006). Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Dictyopteris membranacea* and *Cystoseira barbata* from the Coast of Izmir, Turkey. *Pharmaceut. Biol.* 44: 183-188.

Pagán, R., Virto, R., Alvarez, I., Raso, J. (2000). Inactivación microbiana por ultrasonidos. Aplicaciones en la conservación de alimentos. *Alimentación, equipos y tecnología* 19: 77-86.

Palanca, V., Rodriguez, E., Señorans, J., Reglero, G. (2006). Bases científicas para el desarrollo de productos cárnicos funcionales con actividad biológica combinada. *Nutr. Hosp.* 21: 199-202.

Parys, S., Rosenbaum, A., Kehraus, S., Reher, G., 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.

Patil, G., Chethana, S., Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S. (2008). Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* 99: 7393-7396.

Pavia, H., Aberg, P. (1996). Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta). *Hydrobiol.* 326-327: 199-203.

Pellegrini, A. (2003). Antimicrobial peptides from food proteins. *Curr. Pharm. Des.* 9: 1225-1238.

Pengzhan, Y., Ning, L., Xiguang, L., Gefei, Z., Quanbin, Z., Pengcheng, L. (2003). Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulphated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacol. Res.* 48: 543-549.

Periago, P.M., Conesa, R., Delgado, B., Fernández, P.S., Palop, A. (2006). *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 17-23.

Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2009). Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7159-7170.

Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F.J., Ibáñez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 450-455.

Pomin, V.H. (2010). Structural and functional insights into sulphated galactans: a systematic review. *Glycoconj. J.* 27: 1-12.

Ponce, N.M.A., Pujol, C.A., Damonte, E.B. (2003). Fucoidans from the brown seaweed *Adenocytis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* 338: 153-165.

Ponce, A.G., Roura, S.I., Del Valle, C.E., Moreira, M.R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 294-300.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.J. (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 sulphate content derivatives of polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 17: 527-534.

- R**agan, M.A., Glombitza, K.W. (1986). Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog. Phycol. Res.* 4: 129-241.
- Ramazanov, Z., Jimenez del Rio, M., Ziegenfuss, T. (2003). Sulphated polysaccharides of brown seaweed *Cystoseira canariensis* bind to serum myostatin protein. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* 27: 101-106.
- Rao, A.R., Sarada, R., Ravishankar, A. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *J. Sci. Food Agric.* 87: 957-965.
- Rao, A.V., Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* 55: 207-216.
- Raybaudi, R.M.M., Mosqueda-Melgar, J., Martin-Belloso, O. (2008). Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 313-327.
- Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (2006). *PE-CONS 3616/06 de 1 de septiembre*.
- Řezanka, T., Nedbalová, L., Sigler, K. (2008). Unusual medium-chain polyunsaturated fatty acids from the snow alga *Chloromonas brevispina*. *Microbiol. Res.* 163: 373-379.
- Reyes-Suarez, E., Kralovec, J.A., Nosedá, M.D., Ewart, H.S., Barrow, C.J., Lumsden, M.D., Grindley, T.B. (2005). Isolation, characterization and structural determination of a unique type of arabinogalactan from an immunostimulatory extract of *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydrate Res.* 340: 1489-1498.
- Riccioni, G., Mancini, B., Di Ilio, E., Bucciarelli, T., D'Orazio, N. (2008). Protective effect of lycopene in cardiovascular disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 12: 183-190.
- Riggi, E., Patané, C., Ruberto, G. (2008). Content of carotenoids at different ripening stages in processing tomato in relation to soil water availability. *Aust. J. Agric. Res.* 59: 348-353.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Castro de Ron, C., López-Hernández, J., Lage-Yusty, M.A. (2004). Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1032: 135-139.
- Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 1560-1565.
- Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Cifuentes, A., García-Blairsy Reina, G., Señoráns, F.J., Ibáñez, E. (2008). Pressurized fluid extraction of bioactive compounds from *Phormidium* species. *J. Agric. Food. Chem.* 56: 3517-3523.
- Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 456-463.
- Roginsky, V., Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92: 235-254.
- Romay, C.H., González, R., Ledón, N., Ramirez, D., Rimbau, V. (2003). C-Phycocyanin; A biliprotein with antioxidative, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein. Pept. Sci.* 4: 207-216.
- Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr. A* 1012: 119-128.

- Sabhashini, J., Mahipal, S.V.K., Reddy, M.C., Reddy, M.M., Rachamalla, A., Reddanna, P. (2004). Molecular mechanisms in C-phycoerythrin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem. Pharmacol.* 68: 453-462.
- Sachindra, N. M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M., Miyashita, K. (2007). Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8516-8522.
- Sanders, M.E. (1999). Probiotics. *Food Technol.*, 53: 67-77.
- Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2009a). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *J. Food Eng.* 95:240-253.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kamat, M.Y. (2008). Supercritical CO₂ extraction of α -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis* ARM 740 using response surface methodology. *J. Food Eng.* 84:321-326.
- Salvador, N., Gómez Garreta, A., Lavelli, L., Ribera, M.A. (2007). Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Sci. Mar.* 71: 101-113.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P. (2002). High-performance liquid chromatographic determination of α -tocopherol in macroalgae. *J. Chromatogr. A* 976: 277-284.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P. (2004a). Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in edible marine seaweeds by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 42: 117-120.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P. (2004b). Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* 85: 439-444.
- Sánchez-Machado, D.I., López-Hernández, J., Paseiro-Losada, P., López-Cervantes, J. (2004c). An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed. Chromatogr.* 18: 183-190.
- Santoyo, S., Herrero, M., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Jaime, L. (2006). Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. *Eur. Food Res. Technol.*, 224: 75-81.
- Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Señorans, F.J., Ibáñez, E. (2009). Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT Food Sci. Technol.* 42:1213-1218.
- Schubert, N., García-Mendoza, E., Pacheco-Ruiz, I. (2006). Carotenoid composition of marine algae. *J. Phycol.* 42:1208-1216.
- Schuchardt, J.P., Huss, M., Stauss-Grabo, M., Hahn, A. (2010). Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *Eur. J. Pediatr.* 169: 149-164.
- Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., Ercisli, S. (2009). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22: 102-106.
- Shaheen, S.O., Sterne, J.A., Thomson, R.L., Songhurst, C.E., Mergetts, B.M., Burney, P.G. (2002). Dietary antioxidants and asthma in adults: population-based case-control study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:1823-1828.
- Shanmughapriya, S., Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G.S., Natarajaseenivasan, K. (2008). Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Ann. Microbiol.* 58:535-541.
- Shibata, T., Fujimoto, K., Nagayama, K., Yamaguchi, K., Nakamura, T. (2002). Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against hyaluronidase. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37: 703-709.

- Shiratori, K., Ohgami, K., Ilieva, I., Jin, X. H., Koyama, Y., Miyashita, K., Kase, S., Ohno, S. (2005). Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Eye Res.* 81:422–428.
- Silberstein, J.L., Parsons, J.K. (2010). Evidence-based principles of bladder cancer and diet. *Curr. Nutr. Food Sci.* 6:2-12.
- Simmonds, M. (2003). Novel drugs from botanical sources. *Drug Discov. Today* 8: 721-722.
- Simó, C., Herrero, M., Neusüb, C., Pelzing, M., Kenndler, E., Barbas, C., Ibáñez, E., Cifuentes A. (2005). Characterization of proteins from *Spirulina platensis* microalga using capillary electrophoresis-ion trap-mass spectrometry and capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26: 2674-2683.
- Simon, D., Helliwell, S. (1998). Extraction and quantification of chlorophyll a from freshwater green algae. *Water Res.* 32:2220-2223.
- Simopoulos, A.P. (1996). The role of fatty acids in gene expression: Health implications. *Ann. Nutr. Metab.* 40: 303-311.
- Simopoulos, A.P. (2004). Omega 6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Rev. Int.* 20: 77-90.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299: 152-178.
- Siriwardhana, N., Lee, K.W., Kim, S.K., Ha, J.W., Jeon, Y.J. (2003). Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci. Technol. Int.* 9: 339-346.
- Sloan, E. (1999). The new market: foods for the not-so-healthy. *Food Technol*; 53: 54-60.
- Sloan, A.E. (2000). The top ten functional food trends. *Food Technol*, 54: 33-62.
- Sloan, A.E. (2002). The top ten functional food trends: the next generation. *Food Technol*, 56: 32-56.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 87-96.
- Stafsnes, M.H., Josefsen, K.D., Kildahl-Andersen, G., Valla, S., Ellingsen, T.E., Bruheim, P.(2010). Isolation and characterization of marine pigmented bacteria from Norwegian coastal waters and screening for carotenoids with UVA-blue light absorbing properties. *J. Microbiol.* 48:16-23.
- Stanley, J.C., Elsom, R.L., Calderm P.C., Griffin, B.A., Harris, W.S., Jebb, S.A., Lovegrove, J.A., Moore, C.S., Riemersma, R.A., Sanders, T.A.B. (2007). UK Food Standards Agency Workshop Report: the effects of the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. *Br. J. Nutr.* 98: 1305-1310.
- Sultana, B., Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem.* 108: 879-884.
- Swanson, A.K., Druehl, L.D. (2002). Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic. Bot.* 73:241-253.

Takamatsu, S., Hodges, T.W., Rajbhandari, I., Gerwick, W.H., Hamann, M.T., Nagle, D.G. (2003). Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *J. Nat. Prod.* 66: 605-608.

Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54: 733-749.

Tannin-Spitz, T., Bergman, M., Van-Moppes, D., Grossman, S., Arad, S. (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Appl. Phycol.* 17: 215-222.

Tasende, M.G. (2000). Fatty acid and sterol composition of gametophytes and sporophytes of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyta). *Sci. Mar.* 64: 421-426.

Teas, J. (1981). The consumption of seaweed as a protective factor in the etiology of breast cancer. *Med. Hypotheses* 7: 601-613.

Temina, M., Rezankova, H., Rezanka, T., Dembitsky, V.M. (2007). Diversity of the fatty acids of the Nostoc species and their statistical analysis. *Microbiol. Res.* 162: 308-321.

Thana, P., Machmudah, S., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., Shotipruk, A. (2008) Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Biores. Technol.* 99: 3110-3115.

Ukibe, K., Hashida, K., Yoshida, N., Takagi, H. (2009). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7205-7211.

Uma, B., Prabhakar, K., Rajendran, S., Lakshmi Sarayu, Y. (2009). Studies on GC/MS spectroscopic analysis of some bioactive antimicrobial compounds from *Cinnamomum zeylanicum*. *J. Med. Plants* 8: 125-131.

Unnevehr L, Hasler C. (2000). Health claims and labeling regulation: how will consumers learn about functional foods?. *Ag Bio Forum*, 3: 10-13.

Vadlapudi, V., Naidu, K.C. (2009). In Vitro antimicrobial potentiality of some marine algae against selected phytopathogens. *Biomed. Pharmacol. J.* 2: 277-280.

Vaghasiya, Y., Chanda, S. (2007). Screening of methanol and acetone extracts of fourteen Indian medicinal plants for antimicrobial Activity. *Turk. J. Biol.* 31: 243-248.

Valco, M., Rhodes, C.J, Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160: 1-40.

Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidante capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 111: 816-823.

Vinatoru, M., Toma, M., Mason, T.J. (1999). Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plantes and their constituents. In *Advances in Sonochemistry, vol 5(T.J.MASON, ed.) pp. 209-248, JAI Press, U.K.*

Vismara, R., Vestir, S., Kusmic, C., Barsanti, L., Gualtieri, P. (2003). Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* red freshwater and marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 15: 75-80.

Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., Rissanen, T.H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *Am. J. Clin. Nutr.* 83:1265-1271.

Wang, L., Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17: 300-312.

Wang, J., Chen, B., Rao, X., Huang, J., Li, M. (2007). Optimization of culturing conditions of *Porphyridium cruentum* using uniform design. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1345-1350.

Wang, V., Chen, S.Y., Chuang, T.C., Shan, D.E., Soong, B.W., Kao, M.C. (2010). Val-9Ala and Ile+58Thr polymorphism of MnSOD in Parkinson's disease. *Clin. Biochem.* 43: 979-982.

Watanabe, F., Takenaka, S., Katsura, H., Zakir Hussain Masumder, S.A.M., Abe, K., Tamura, Y., Nakamo, Y. (1999). Dried green and purple lavers (Nori) contain substantial amounts of biologically active vitamin B12 but less of dietary iodine relative to other edible seaweeds. *J. Agric. Food. Chem.* 47: 2341-2343.

Watanabe, F., Miyamoto, E. (2002). TLC separation and analysis of vitamin B12 and related compounds in food. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 25: 1561-1577.

Wen, W., Li, F., Ji, N.Y., Li, X.M., Cui, C.M., Li, X.D., Zhang, L.N., Xue, Q.Z., Wang, B.G. (2009). A new cardinane sesquiterpene from the marine brown alga *Dictyopteris divaricata*. *Molecules* 14: 2273-2277.

Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura, S., Rojsitthisak, P. (2009). A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochem. Anal.* 20: 314-319.

Wijngaard, H.H., Röble, C., Brunton, N. (2009). A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 116: 202-207.

Wiltshire, K.H., Boersma, M., Möller, A., Buhtz, H. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). (2000). *Aquat. Ecol.* 34: 119-126.

Wu, Z., Wu, S., & Shi, X. (2007). Supercritical fluid extraction and determination of lutein in heterotrophically cultivated *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Food Process Eng.* 30: 174-185.

Xu, Y.J., Zhao, D.X., Fu, C.X. Cheng, L.Q., Wang, N.F., Han, L.J., Ma, F.S. (2009). Determination of flavonoid compounds from *Saussurea involucre* by liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry. *Nat. Prod. Res.* 23: 1689-1698.

Yang, R.Y., Lin, S., Kuo, G. (2008). Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17: 275-279.

Ye, Z.W., Jiang, J.G., Wu, G.H. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnol. Adv.* 26:352-360.

Yoshii, N., Miura, S., Okazaki, S. (2001). A molecular dynamics study of dielectric constant of water from ambient to sub- and supercritical conditions using a fluctuating-charge potential model. *Chem. Phys. Lett.* 345:195-200.

Yukino, T., Hayashi, M., Inoue, Y., Imamura, J., Nagano, N., Murata, H. (2005). Preparation of docosahexaenoic acid fortified *Spirulina platensis* and its lipid and fatty acid compositions. *Nippon Suisan Gakk.* 71: 74-79.

- Z**eb, A.; Murkovic, M. (2010). Thin-layer chromatographic analysis of carotenoids in plants and animal samples. *J. Planar Chromatogr. –Mod. TLC* 23: 94-103.
- Zhang, Q., Qi, H., Zhao, T., Deslandes, E., Ismaeli, N.B., Molloy, F., Critchley, T. (2005). Chemical characteristic of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* 340: 2447-2450.
- Zhang, L.Y., Chen, G.T., Zhao, G.H., Hu, H.S. (2009). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis* by Response Surface Methodology and Antioxidant Activities of the Extracts. *Sep. Sci. Technol.*, 44:243-262.
- Zhao, T., Zhang, Q., Qi, H., Zhang, H., Niu, X., Xu Z., Li, Z. (2006). Degradation of porphyran from *Porphyra haitanensis* and the antioxidant activities of the degraded porphyrans with different molecular weight. *Int. J. Biol. Macromol.* 38: 45–50.
- Zheng, W., Wise, M.L., Wyrick, A., Metz, J.G., Yuan, L., Gerwick, W.H. (2002). Polyenoic fatty acid isomerase from the marine red alga *Ptilota filicina*: Protein characterization and functional expression of the cloned cDNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 401: 11-20.
- Zhu, Y.H., Jiang, J.G. (2008). Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of β -carotene. *Eur Food Res Technol.* 227:953-959.
- Zinedine, A., Elakhdari, S., Faid, M., Benlemlih, M. (2004). Antifungal and anti-aflatoxinogenic activity of the brown algae *Cystoseira tamariscifolia*. *J. Mycol. Med.* 14: 201-205.
- Zu, Y., Li, C., Fu, Y., Zhao, C.H. (2006). Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (3): 714-719.
- Zuliani, G., Galvani, M., Leitersdorf, E., Volpato, S., Cavelieri, M., Fellin, R. (2009). The role of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the treatment of dyslipidemias. *Curr. Pharm. Des.* 15: 4173-4185.

PRIMERA PARTE

Introducción General a la Primera Parte

En la Primera Parte de esta Memoria de Tesis Doctoral se presentan los resultados obtenidos de la realización de un primer *screening* de ingredientes funcionales presentes en diferentes especies de macro- y microalgas. Este primer paso se diseñó de manera que, de forma relativamente rápida, se pudieran estudiar diferentes tipos de algas con el fin de valorar su potencialidad para producir extractos complejos con actividades funcionales, en concreto con actividades antioxidantes y/o antimicrobianas.

Por ello se desarrolló un esquema de trabajo similar para las diferentes especies, de forma que se pudiera poner a punto la metodología común necesaria para realizar dicho *screening* de la manera más eficaz posible. Dicho esquema de trabajo se puede observar en la Figura 1.1, y se aplicó a cuatro especies diferentes de algas. Como se puede apreciar, el primer paso fue la selección de las macro- o microalgas objeto de estudio. Dicha selección se llevó a cabo teniendo en cuenta la información bibliográfica existente, así como la disponibilidad de las muestras. A continuación se optimizaron las condiciones de extracción por líquidos presurizados (PLE). Debido a que la posibilidad de extraer compuestos bioactivos a partir de una fuente natural está directamente relacionada con la naturaleza y solubilidad de los diferentes compuestos presentes en la muestra, se estudió la posibilidad de obtener extractos bioactivos empleando tres disolventes de diferente polaridad (etanol, hexano y agua). De esta manera se podía evaluar su capacidad para extraer compuestos antioxidantes y/o antimicrobianos procedentes de las distintas algas. Además, las extracciones se llevaron a cabo a cuatro temperaturas diferentes de extracción (50, 100, 150 y 200°C); estos valores permitían cubrir de forma escalonada todo el intervalo de temperaturas permitido por el equipo de extracción utilizado. Para todos los procesos el tiempo de extracción se mantuvo constante e igual a 20 minutos, ya que previamente se había demostrado que la principal variable involucrada en el proceso de PLE era la temperatura, particularmente cuando se empleaba agua como disolvente de extracción, mientras que el tiempo no tenía un efecto significativo sobre el resultado de la extracción (Santoyo y col., 2006; Herrero y col., 2006a; Mendiola y col., 2007c). Una vez obtenidos los extractos, éstos se analizaron en términos de rendimientos de extracción alcanzados.

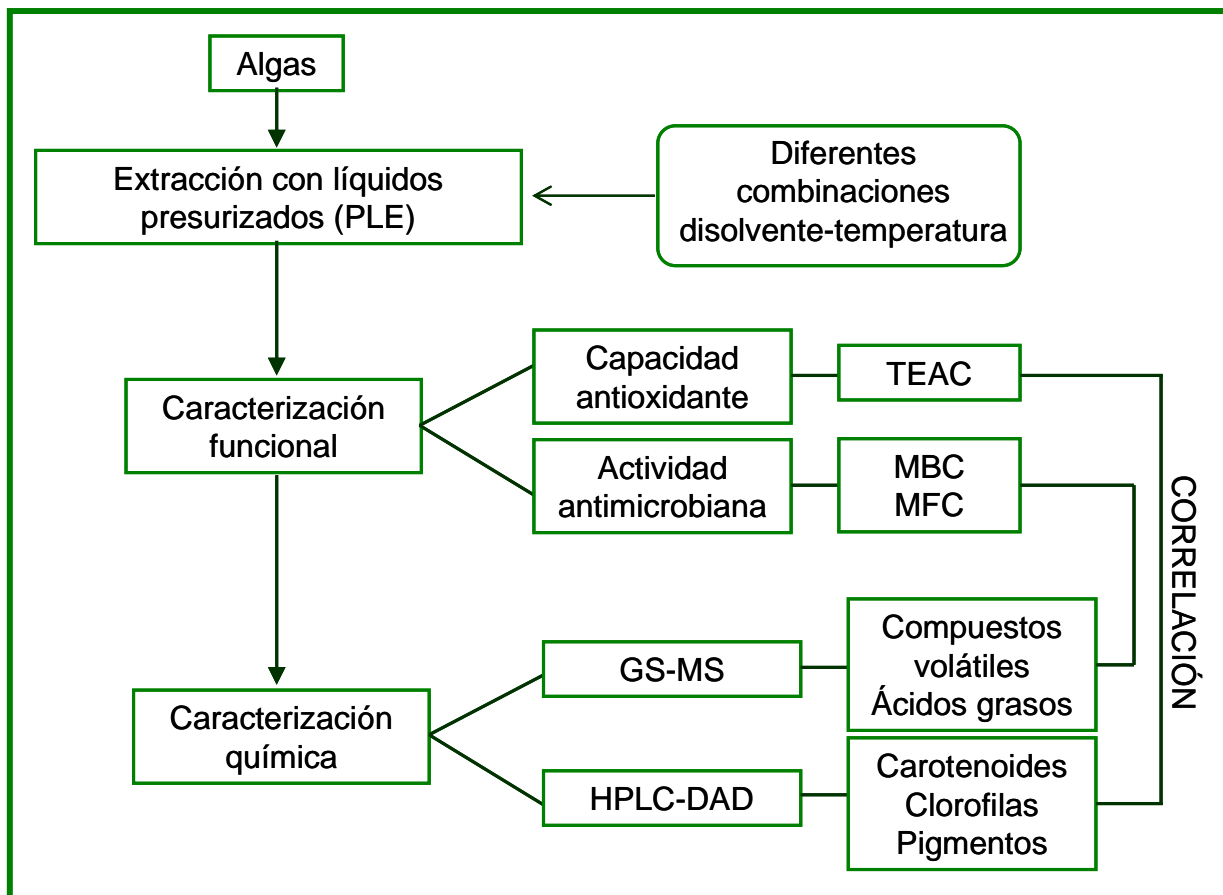


Figura 1.1. Esquema de trabajo realizado para la búsqueda de nuevos ingredientes funcionales a partir de macro- y microalgas.

Posteriormente se procedió a la caracterización de los extractos obtenidos a partir de las diferentes especies de algas estudiadas. En primer lugar se llevó a cabo la caracterización funcional de estos extractos. Para ello, se determinaron la capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos obtenidos por PLE mediante ensayos *in vitro* que permitieron realizar una primera criba de extractos en función de sus bioactividades, pudiéndose de esta manera seleccionar los más activos para continuar con su caracterización posterior. Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó el ensayo TEAC. Este método se ha empleado en muchos laboratorios de investigación para estudiar propiedades antioxidantes; en este sentido, existen numerosas referencias de valores TEAC de muchos compuestos en muestras de alimentos y en extractos de plantas (Magalhaes y col., 2008; Tabart y col., 2009; Ahmed y col., 2010; Nantitanon y col., 2010; Muller y col., 2010; Onofrejova y col., 2010; Zulueta y col., 2009). Por lo tanto, los valores TEAC se pueden utilizar para establecer una comparación real entre diferentes muestras.

Asimismo, la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por PLE se determinó frente a cuatro microorganismos diferentes, una bacteria gram negativa (*Escherichia coli*), una gram positiva (*Staphylococcus aureus*), una levadura (*Candida albicans*) y un hongo (*Aspergillus niger*). La actividad antimicrobiana se evaluó cuantitativamente mediante la determinación de los valores de concentración mínima bactericida (MBC) y fungicida (MFC).

Con el objetivo de correlacionar la actividad funcional (antimicrobiana y/o antioxidante) observada con la composición química de los extractos obtenidos, se pusieron a punto diferentes métodos analíticos tales como HPLC-DAD y GC-MS. En concreto, para la determinación de la composición química de los extractos que presentaron una buena capacidad antioxidante, se empleó un método de HPLC-DAD especialmente desarrollado para la separación de pigmentos (carotenoides y clorofilas) antioxidantes. La GC-MS se empleó para analizar tanto los compuestos volátiles como los ácidos grasos presentes en los extractos que mostraron una mayor actividad antimicrobiana, dado que previamente ya se había observado que dichos compuestos podían presentar actividad antimicrobiana (Mayer y Hamann, 2005; Herrero y col., 2006a, Rodríguez-Meizoso y col., 2010).

Así pues, en los capítulos II, III, IV y V de esta Parte I se muestran los resultados correspondientes al *screening* realizado, siguiendo la metodología anteriormente descrita, de los compuestos bioactivos presentes en una microalga verde (*Chlorella vulgaris*), una microalga verde-azulada (*Synechocystis* sp.), y en dos macroalgas marrones (*Cystoseira abies-marina* e *Himanthalia elongata*).

CAPÍTULO II:

“Extracción de compuestos antioxidantes y antimicrobianos con líquidos presurizados y con ultrasonidos a partir de *Chlorella vulgaris*. Caracterización química y funcional”

II.1. INTRODUCCIÓN.

Chlorella spp. son algas unicelulares (microalgas) que pertenecen al grupo de las algas verdes, que se engloba dentro del orden Chlorococcales, familia Oocystaceae, clase Chlorophyceae, género *Chlorella*. *Chlorella* spp. contiene en el interior de sus cloroplastos, pigmentos verdes fotosintéticos, principalmente clorofila *a* y *b*. La microalga *Chlorella vulgaris* (Figura II.1) contiene muchas sustancias bioactivas con propiedades funcionales. Se ha demostrado en diferentes estudios que *Chlorella* posee sustancias con actividad antitumoral (Sheng y col., 2007), hepatoprotectiva (Singh y col., 1998), antioxidante (Rodríguez-García y Guil-Guerrero, 2008), hipocolesterolémica (Shibata y col., 2007), antibacteriana (Vijayavel y col., 2007), o incluso actividad inmunoestimulante (Morris y col., 2007). En este último trabajo, los autores propusieron el empleo de hidrolizados de proteínas enzimáticas presentes en esta microalga para el desarrollo de alimentos funcionales con actividad inmunopotenciadora, demostrando su actividad *in vivo* (Morris y col., 2007). El mecanismo hipocolesterolémico de *Chlorella* en polvo ha sido investigado por Shibata y col. (2007); en este estudio se demostró que el polvo de *Chlorella* aumentaba la degradación hepática de colesterol en ratas, independientemente de que se les administrara o no una dieta que indujera hipercolesterolemia, debido a la regulación de la expresión de la enzima colesterol 7 α -hidroxilasa. La fracción no digerible de esta microalga, podría ser, en parte, la responsable de la regulación de la expresión de esta enzima.



Figura II.1. Microfotografía de la microalga *Chlorella vulgaris*.

En la composición química de *Chlorella* se han identificado diversos compuestos con carácter antioxidante, como son luteína, α -caroteno, β -caroteno, ácido ascórbico y α -tocoferol. De acuerdo con Wu y col. (2007), *Chlorella* contiene de 2 a 4

mg/g de peso seco de luteína. Este compuesto no es sólo un importante colorante alimentario natural, sino que también posee una fuerte actividad antioxidante, y podría utilizarse para reducir la incidencia de cáncer (Park y col., 1998) y prevenir la degeneración macular (Zhao y Sweet, 2008). De hecho, se ha demostrado la actividad antiproliferativa de los carotenoides procedentes de *Chlorella ellipsoidea* y *Chlorella vulgaris* en células de cáncer de colon humano (Cha y col., 2008). Los principales carotenoides encontrados en *C. ellipsoidea* fueron violaxantina junto con otros dos xantofilas, anteraxantina y zeaxantina, mientras que el principal carotenoide encontrado en *C. vulgaris* fue luteína. Asimismo, se ha confirmado que bajo determinadas condiciones de crecimiento (alta salinidad, entre otros factores), es posible aumentar la carotenogénesis en células de *Chlorella* (Mendes y col., 1995; Gouveia y col., 2006) y, por tanto, favorecer la acumulación de dichos pigmentos carotenoides.

En relación a su fracción lipídica, la composición aproximada en *C. vulgaris*, por cada 100g de peso seco, es la siguiente: 24.5 g de lípidos, 133 mg de carotenoides y 12.1 g de ácidos grasos (Mendes y col., 1995). En este sentido, los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linolénico se han determinado como los principales ácidos grasos de dicha fracción lipídica (Bertoldi y col., 2006; Mendes y col., 1995)

En relación a la búsqueda de nuevos procesos de extracción medioambientalmente limpios para la obtención de compuestos bioactivos a partir de *Chlorella vulgaris*, en la bibliografía se han descrito varios procesos como, por ejemplo, la extracción con fluidos supercríticos (SFE) para la extracción de carotenoides, principalmente cantaxantina y astaxantina, a partir de *Chlorella vulgaris* (Mendes y col., 1995a, Mendes y col., 1995b; Mendes y col., 2003), o el empleo de la extracción con líquidos presurizados (PLE) para la obtención de compuestos antioxidantes a partir de esta microalga (Cha y col., 2010a; Cha y col., 2010b). De igual manera se ha descrito la posibilidad de obtener compuestos con actividad antiviral, frente al virus del herpes simple de tipo 1 (HSV-1), de extractos de *Chlorella vulgaris* obtenidos por PLE con acetona, etanol y agua. Los resultados mostraron que el pretratamiento de las células Vero con 75µl/ml de los extractos de etanol y agua antes de la adición del virus inhibió en un 70 % la infección. También los extractos de agua y etanol inhibieron significativamente la replicación del virus *in vitro*, obteniéndose valores de IC₅₀ de 61.05 y 80.23 µg/ml, respectivamente. En estos extractos se encontró una correlación

positiva entre la actividad observada y la presencia de polisacáridos, ya que las fracciones ricas en polisacáridos (46%) mostraron mayor actividad antiviral que los extractos de agua completos (Santoyo y col., 2010).

En el presente trabajo se propone el empleo de la PLE como una técnica limpia de extracción, para la obtención de compuestos bioactivos de la microalga *C. vulgaris*. Asimismo se emplea con fines comparativos la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), dado el éxito que ha tenido esta técnica para la extracción de matrices vegetales (Ma y col., 2008).

II.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El objetivo del presente trabajo fue el estudio de la capacidad de dos diferentes técnicas limpias de extracción, PLE y UAE, para la obtención de potenciales ingredientes funcionales a partir de *Chlorella vulgaris*.

Para alcanzar este objetivo general, se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Obtención de los extractos de *Chlorella vulgaris* mediante PLE con diferentes condiciones de extracción, incluyendo diferentes combinaciones disolvente-temperatura (como son, agua, etanol y acetona a 50, 100, 150 y 200°C).
2. Obtención de diferentes extractos de *C. vulgaris* mediante UAE utilizando diferentes disolventes (acetona, etanol, hexano) con una amplitud de onda del 20%.
3. Evaluación funcional de los extractos obtenidos mediante el empleo de ensayos *in vitro* que permiten la determinación de su capacidad antioxidante y de su actividad antimicrobiana.
4. Caracterización química de los extractos considerados activos mediante el empleo de HPLC-DAD y GC-MS para la detección e identificación de los compuestos que puedan ser responsables de las actividades observadas, tales como carotenoides, clorofilas, compuestos volátiles ó ácidos grasos.

5. Comparación crítica de ambas técnicas de extracción.

II.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

II.3.1. Muestras y reactivos.

Chlorella vulgaris (Figura II.2) (BNA 10-007, Banco Nacional de Algas, Islas Canarias, España) se cultivó en un medio básico de Bold (Nichols y Bold, 1965) modificado, enriquecido con NaNO_3 (0.75 g/l). Las células (fase verde) fueron cultivadas fototróficamente en 20 l de burbujas con aire, a 25°C en ciclos de luz/oscuridad (16:8) con lámparas fluorescentes blancas que proporcionan una intensidad de luz de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las células se recogieron por centrifugación, se liofilizaron y se almacenaron en atmósfera inerte hasta la extracción, protegiéndolas de esta manera, tanto del oxígeno, como de la humedad y la luz.



Figura II.2. Imagen de la microalga *Chlorella vulgaris* liofilizada empleada en este trabajo.

Todos los disolventes utilizados fueron de calidad HPLC. Acetona, hexano, éter de petróleo, acetato de etilo y metanol fueron suministrados por Lab Scan (Dublin, Irlanda), mientras que el etanol se obtuvo de VWR BDH Prolabo (Madrid, España) y el cloroformo era proporcionado por Merck (Darmstadt, Alemania). El metilato sódico 0.5 N (CH_3ONa), así como los patrones de ácidos grasos poliinsaturados empleados (PUFA, No. 2, fuente animal) fueron suministrados por Supelco (Belfonte, USA). El sulfato de sodio fue comprado a Fluka Chemie AG (Buchs, Suiza), mientras que el acetato amónico fue proporcionado por Panreac (Barcelona, España). Los patrones de carotenoides aislados a partir de fitoplancton usados para los análisis por LC-DAD (β -criptoxantina, mixoxantofila, cantaxantina, equinenona, fucoxantina, luteína, neoxantina, violaxantina y zeaxantina) y las clorofilas (*a* y *b*) fueron comprados a DHI

Water and Environment (Hoersholm, Dinamarca). Por su parte el β -caroteno fue obtenido de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El agua ultrapura usada se obtuvo utilizando un equipo Milli-Q Water (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). La arena de mar empleada para las extracciones con agua se adquirió de Panreac Química (Barcelona, España).

Para calcular los índices de retención de Kovats correspondientes a los análisis de GC-MS, se emplearon mezclas de patrones de alcanos, desde *n*-undecano a *n*-octacosano proporcionados por Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

Para los análisis de la actividad antioxidante se emplearon ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonato sal diamónica), trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), y persulfato potásico de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

II.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE).

Para llevar a cabo las extracciones de la microalga *Chlorella vulgaris* se utilizaron diferentes disolventes (etanol, agua, y acetona) empleando un equipo de Extracción Acelerada con Disolvente ASE 200 de Dionex Corp. (Sunnyvale, CA, USA), equipado con una unidad controladora de disolventes que permite la obtención de mezclas de forma automática (Figura II.3). Las extracciones se realizaron a 4 temperaturas diferentes de extracción (50, 100, 150, y 200°C), manteniendo un tiempo de extracción estática de 20 minutos.



Figura II.3. Imagen del equipo de extracción con líquidos presurizados (ASE 200, Dionex) utilizado en este trabajo.

El procedimiento global de extracción consistió en las siguientes etapas:

1. La muestra de *Chlorella* (1.5 g en las extracciones con etanol y 0.8 g en las extracciones con agua y acetona) se depositó en el interior de la celda de extracción de 11 ml de capacidad. En el caso de las extracciones llevadas a cabo con agua, para evitar la obstrucción del sistema de extracción, la muestra se introdujo mezclada con arena de mar, empleando una disposición de tipo sándwich (colocando 6 g de arena de mar, después la muestra, y por último 2 g de arena de mar).

2. La celda se llenó con disolvente hasta que se alcanzó una presión de 1500 psi.

3. Previa a la etapa de extracción, tuvo lugar una etapa de calentamiento; este tiempo, denominado *heat-up time*, es específico del sistema y no se puede modificar puesto que es el tiempo mínimo necesario para alcanzar las condiciones de temperatura del interior de la celda de extracción. El tiempo de calentamiento fue de 5 minutos cuando la temperatura de extracción era 50 ó 100°C, 7 minutos si era de 150°C y 9 minutos si la temperatura seleccionada era 200°C.

4. Tiempo de extracción estático: es equivalente al tiempo de extracción y se define como el tiempo en el que la muestra permanece en contacto con el disolvente líquido a la temperatura y presión de extracción seleccionados. Durante ese tiempo todas las válvulas del sistema están cerradas.

5. El disolvente de extracción se eliminó de la celda y se recogió en un vial junto con un determinado volumen de lavado. Para ello la celda se lavó con una cantidad del mismo disolvente utilizado para la extracción, equivalente al 60% de la capacidad de la celda empleada.

6. El disolvente residual se purgó de la celda de extracción mediante la aplicación de un flujo de N₂ durante un minuto.

7. Por último, tuvo lugar la despresurización del sistema.

Entre extracciones se llevó a cabo un protocolo de limpieza del sistema, para evitar contaminaciones de un extracto a otro, consistente en la extracción sin muestra empleando las mismas condiciones utilizadas en la extracción anterior.

Una vez obtenidos los extractos, se evaporó el disolvente de extracción. Para las

extracciones en las que se empleaban disolventes orgánicos, éste se evaporó utilizando un Rotavapor R-210 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). Los extractos obtenidos con agua se congelaron y el agua se eliminó mediante liofilización a 5°C empleando un equipo Freeze Dry System (Model 79480, Labconco Corporation, Missouri, EEUU). Los extractos secos se mantuvieron a 4°C y protegidos de la luz en todo momento hasta el momento de su análisis.

II.3.3. Extracción asistida con ultrasonidos (UAE).

La extracción asistida con ultrasonidos se empleó asimismo para la extracción de los compuestos de la microalga *C. vulgaris*, con el objetivo fundamental de realizar una comparación entre ésta técnica y la PLE. Para llevar a cabo la extracción mediante UAE se utilizó un extractor asistido con ultrasonidos (BRANSON Digital Sonifier) (Figura II.4).



Figura II.4. Imagen del equipo de Extracción Asistida con Ultrasonidos utilizado en este trabajo.

Para estas extracciones se utilizaron tres disolventes (acetona, hexano y etanol) de manera que se cubriera un amplio intervalo de constantes dieléctricas para observar la influencia de este parámetro en la extracción de compuestos bioactivos. El proceso de extracción mediante UAE utilizado se describe a continuación:

1. La muestra (0.5 g) se colocó dentro de un tubo falcon con 15 ml de disolvente.
2. El tubo falcon con la muestra y el disolvente se situó dentro de un

baño de hielo, para controlar mejor la temperatura.

3. Dentro del tubo falcon se colocó la sonda de ultrasonidos y la sonda de control de temperatura (para evitar el calentamiento a más de 25°C).

4. La muestra se sometió a ultrasonidos (US) durante periodos de 25 minutos, en las extracciones realizadas con etanol y hexano, y de 30 minutos en las extracciones con acetona. La amplitud de onda utilizada fue del 20 %.

5. Después de la extracción, el tubo falcon se sacó del baño de hielo, y se centrifugó a 3000 g, recogiendo posteriormente el sobrenadante.

Una vez obtenidos los extractos, el disolvente se evaporó empleando un Rotavapor R-210 de Büchi Labortechnik AG (Flawil, Suiza). Los extractos secos se mantuvieron protegidos de la luz y a 4°C hasta su análisis posterior.

II.3.4. Caracterización funcional.

II.3.4.1. Capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de los extractos de *C. vulgaris* obtenidos por PLE y UAE, se determinó empleando el método TEAC (Re y col., 1999). Este método, basado en la generación de radicales de ABTS^{•+}, se correlaciona directamente con la capacidad antioxidante, es decir, un mayor valor TEAC supone una mayor capacidad antioxidante del extracto.

En el método TEAC usado, el catión radical ABTS^{•+} se generó haciendo reaccionar en una disolución 7 mM de ABTS con 2.45 mM de persulfato potásico (concentraciones finales de reacción) durante 16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Esta solución de radical ABTS se diluyó con etanol (en el caso de los extractos de agua se disolvieron en 5 mM de buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4) hasta lograr una absorbancia en torno a 0.79 AU medida a 734 nm. Posteriormente, se añadieron 10 µl del extracto de *C. vulgaris* disuelto a diferentes concentraciones (empleando un mínimo de 4 concentraciones diferentes) a 990 µl de la disolución diluida de ABTS. La mezcla de reacción se dejó incubar a temperatura ambiente y en ausencia de luz, tiempo tras el cual se midió la absorbancia a 734 nm. El trolox se usó como patrón de referencia, de forma que los resultados se pudieron expresar como

capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (valor TEAC). Como ya se ha mencionado, estos valores se determinaron para al menos cuatro concentraciones diferentes de cada uno de los extractos estudiados, proporcionando una respuesta lineal. Además, todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

II.3.4.2. Actividad antimicrobiana.

II.3.4.2.1. Cepas utilizadas.

Los extractos de *C. vulgaris* obtenidos por PLE y UAE, se estudiaron individualmente frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Candida albicans* ATCC 60193 y *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Los cultivos madre de cada una de las cepas bacterianas se mantuvieron almacenados en agar a 4°C. Por su parte, *Candida albicans* se mantuvo en agar dextrosa a 4°C, mientras que las esporas de *Aspergillus niger* se obtuvieron de cultivos incubados en agar dextrosa de patata (7 días, 24°C) y se mantuvieron en agua destilada con 0.1% de Tween 80 a 4°C hasta su empleo como inóculos.

II.3.4.2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y las concentraciones bactericidas (MBC) y fungicidas mínimas (MFC).

La concentración mínima inhibitoria (MIC), es decir, la cantidad de extracto capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos, así como las concentraciones mínimas bactericidas (MBC) y fungicidas (MFC), definidas como la cantidad de extracto necesaria para eliminar al microorganismo (además de inhibir su crecimiento), se determinaron como se describe a continuación.

Para determinar la MIC se empleó un método de microdilución en medio de cultivo, tal y como recomienda la NCCLS (*National Comitee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS, 1999*). A su vez, todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando un medio Mueller-Hinton suplementado con 0.5 % de Tween 20, con la excepción de la

levadura y el hongo (medio Saboraud con 0.5 % de Tween 20). Por su parte los inóculos de las cepas bacterianas se prepararon a partir de cultivos en medio Mueller-Hinton a 37°C. De la misma manera, la levadura y el hongo se cultivaron durante la noche en medio dextrosa Saboraud a 25°C. Por último, las cepas se suspendieron en medios Mueller-Hinton (bacterias) y dextrosa Saboraud (hongo y levadura) para obtener una densidad final de 10^7 cfu/ml (unidades formadoras de colonia por ml).

Se utilizaron placas multipocillo (96 minipocillos) añadiendo en cada pocillo 165 μ l de medio de cultivo, 5 μ l de inóculo y 30 μ l de cada una de las diferentes disoluciones de los extractos obtenidos. Las concentraciones de los extractos de las diferentes algas oscilaron entre 250 mg/ml a 10 mg/ml en DMSO. Por tanto, el volumen final en cada pocillo fue de 200 μ l. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h en el caso de las bacterias y a 24°C durante 48 horas para levaduras y hongos. También se incluyeron controles negativos, en los cuales se sustituyeron los extractos de PLE y UAE por 30 μ l de DMSO que fue el disolvente empleado para disolver los extractos de PLE y UAE. Por otra parte, para determinar la sensibilidad de las diferentes cepas utilizadas, se emplearon cloranfenicol y anfotericina B, como patrones positivos de referencia.

Una vez concluido el tiempo de incubación, se comprobó visualmente la inhibición del crecimiento, y se determinó el valor MIC mediante la presencia de un precipitado blanco en el fondo de los pocillos. La concentración más baja de extracto capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos se estableció como la MIC. Las concentraciones bactericidas y fungicidas mínimas (MBC y MFC, respectivamente) se determinaron realizando subcultivos a partir de los pocillos que no mostraron ningún crecimiento. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado en la misma placa, y se repitió de nuevo en una placa diferente.

II.3.5. Caracterización química.

II.3.5.1. Análisis mediante cromatografía de líquidos (HPLC-DAD).

Los extractos secos se disolvieron antes de ser analizados por HPLC con detector de haz de diodos (DAD); los extractos obtenidos con etanol y agua se

disolvieron en etanol mientras que los obtenidos con hexano y acetona se prepararon en acetona, todos a la misma concentración de 10 mg/ml.

La composición de pigmentos de los extractos se evaluó empleando un equipo HPLC Hewlett-Packard HP 1100 equipado con un detector de haz de diodos (DAD). El método empleado es una modificación del desarrollado por Vidussi y col (Vidussi, y col., 1996). La separación se realizó en una columna de fase inversa Novapack C18 de 150×3.9 mm y 4 μm de diámetro de partícula (Waters, Irlanda), empleando como fases móviles metanol/0.1 M acetato amónico (70:30, v:v) (fase móvil A) y metanol (fase móvil B), de acuerdo con el siguiente gradiente: inicialmente la composición fue 25% de B, en el minuto 1 se alcanzó un 50% de B y este aumentó linealmente hasta 100% de B en el minuto 10. Esta composición se mantuvo constante hasta el minuto 35 donde se volvió a las condiciones iniciales. El flujo de fase móvil se mantuvo constante a 0.9 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 μl. La identificación de los pigmentos se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención y sus espectros UV-Vis con aquellos obtenidos para los patrones comerciales correspondientes, y/o con los datos existentes en la bibliografía en caso de no disponer de éstos.

Para la cuantificación de los diferentes carotenoides y clorofilas identificados presentes en las muestras, se llevó a cabo la obtención de diferentes curvas de calibrado. Para ello se inyectaron cuatro cantidades diferentes (de 0.02 a 0.08 μg) de cada uno de los patrones de violaxantina, neoxantina, luteína, zeaxantina, clorofila *a* y clorofila *b* y cuatro cantidades (de 0.15 a 18 μg) de all-trans-β-caroteno. Cada patrón se disolvió en el disolvente apropiado: violaxantina, neoxantina, zeaxantina y luteína en etanol; clorofila *a* y *b* en acetona; y β-caroteno en diclorometano. La ecuación de la recta de regresión para cada curva patrón se obtuvo representando la concentración de cada patrón inyectado frente al área del pico correspondiente a este compuesto. Las ecuaciones obtenidas para los diferentes compuestos así como sus respectivos coeficientes de correlación se muestran en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Ecuación de la recta de regresión de los patrones de carotenoides y clorofilas.

| Compuesto | Ecuación de la recta de regresión ^a | Coefficiente de correlación (r^2) |
|---------------------------------|--|---------------------------------------|
| Violaxantina ^b | $Y = 1816187x + 82.9$ | 1 |
| Neoxantina ^b | $Y = 2093904x + 98.5$ | 0.9737 |
| Luteína ^b | $Y = 13635300x + 15.2$ | 0.9986 |
| β -caroteno ^b | $Y = 992031x - 109.4$ | 0.9999 |
| Clorofila <i>b</i> ^b | $Y = 4042366x + 33.3$ | 0.9905 |
| Zeaxantina ^b | $Y = 12189189x + 5.6$ | 0.9993 |
| Clorofila <i>a</i> ^c | $Y = 4004070x - 0.2$ | 0.9999 |

^a Y es el valor del área del pico. X es el valor de la cantidad de muestra inyectada (mg). ^b Detección a 450 nm. ^c Detección a 660 nm.

II.3.5.2. Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

II.3.5.2.1. Análisis de la fracción volátil.

Con el objeto de caracterizar los compuestos volátiles presentes en los extractos, algunos de los cuales podrían ser parcialmente responsables de la actividad antimicrobiana observada, los extractos obtenidos a diferentes condiciones de extracción se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para ello, se empleó un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con un inyector automático con divisor de flujo (*Split/splitless*) acoplado a un espectrómetro de masas con un analizador de cuadrupolo Agilent 5973N (Agilent, Palo Alto, CA, EEUU). El sistema estaba controlado por el programa informático Agilent MSD Chemstation.

La columna empleada para analizar la fracción volátil de los diferentes extractos obtenidos fue una columna capilar de sílice fundida de 30 metros de longitud con un diámetro interno de 0.25 mm y un espesor de fase estacionaria apolar SE-54 (HP-5MS, Agilent) 0.25 μ m. La inyección se llevó a cabo en modo *split* (1:20) y el volumen de extracto inyectado fue de 1 μ l a una concentración de 10 mg/ml. Se empleó helio como gas portador a una presión de 7 psi. La separación tuvo lugar con temperatura programada de acuerdo con la rampa de temperaturas siguiente: temperatura inicial de 40°C mantenida durante 2 minutos, seguida por un aumento a 5°C/min hasta 150°C en el minuto 24, concluyendo finalmente en un aumento de la temperatura a 15°C/min hasta 300°C. Los espectros de masas se obtuvieron trabajando en modo scan a una velocidad de adquisición de 1.79 scan/seg, utilizando un intervalo de masas de 35 a 450 Da. Los

espectros de masas se compararon con los de una librería de espectros (Wiley Registry of Mass Spectral Data) y con datos encontrados en la bibliografía. Además, para identificar los compuestos de manera más precisa, se calcularon sus índices de retención de Kovats (RI), utilizando para ello mezclas de patrones de alcanos, de n-undecano a n-octacosano disueltos en hexano. Dichos compuestos se analizaron en idénticas condiciones de manera que, conforme a sus respectivos tiempos de retención y de acuerdo a sus diferentes RI teóricos (dependientes del número de átomos de carbonos), se pudieron calcular los RI de los diferentes compuestos presentes en los extractos. Para ello se tuvieron en cuenta sus tiempos de retención, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$I = \left[\frac{t_{r(\text{desconocido})} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] * (100 \times z) + (100 \times n)$$

donde I = índice de retención de Kovats, n = número de átomos de carbono en los alcanos más pequeños, N = número de átomos de carbono en los alcanos más grandes, z = diferencia del número de átomos de carbono entre alcano más pequeño y el más grande, t_r = tiempo de retención.

II.3.5.2.2. Análisis de ácidos grasos.

Para llevar a cabo el análisis por GC-MS de los ácidos grasos de los extractos de *C. vulgaris* obtenidos por PLE y UAE, se llevó a cabo la derivatización previa de las muestras, de forma que los ácidos grasos presentes fueran transformados en metil-ésteres. Para llevar a cabo la metilación de los ácidos grasos libres y esterificados presentes en estos extractos, se prepararon diluciones de las muestras en cloroformo-metanol (2:1 v/v) a una concentración conocida (2 mg/ml). Estas disoluciones se metilaron mediante la adición de 1 ml de una disolución 0.5 M de metilato sódico. La mezcla se dejó reaccionar durante 45 minutos a una temperatura de 65°C. Posteriormente se añadió 0.5 ml de agua, y la mezcla resultante se extrajo con dos volúmenes de 1 ml de hexano. Por último, al extracto final se le añadió sulfato sódico para asegurar su completo secado.

Los análisis se llevaron a cabo empleando la misma instrumentación analítica

anteriormente descrita para determinar los compuestos volátiles. Se empleó una columna Carbowax (Polietilenglicol) proporcionada por Quadrex (Woodbridge, Conn.) de 30 metros de longitud total y 0.25 mm de diámetro interno (0.5 μm de espesor). El horno se programó de tal manera que la temperatura inicial fuera 100°C y alcanzara 220°C a una velocidad de 20°C/min, manteniéndose esta temperatura durante 25 minutos para luego ascender a 270°C a 15°C/min. La inyección se llevó a cabo a 250°C en modo *split* (1:20) y el volumen inyectado fue de 3 μl . Esta temperatura final se mantuvo durante 10 minutos. El resto de las condiciones de análisis fueron similares a las del análisis de la fracción volátil.

II.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

II.4.1. Extracción por PLE y UAE.

Con el objetivo de obtener potenciales ingredientes funcionales a partir de *Chlorella vulgaris* de forma lo más respetuosa posible con el medio ambiente, se emplearon dos métodos de extracción avanzados diferentes (PLE y UAE) de manera que los resultados obtenidos con ambas técnicas pudieran compararse directamente.

UAE. Las extracciones mediante UAE se realizaron teniendo en cuenta tres disolventes diferentes y manteniendo una temperatura fija de extracción (<25°C). De esta manera, se seleccionaron etanol y acetona de forma que estos extractos se pudieran comparar directamente con los extractos obtenidos por PLE. Debido a los bajos rendimientos de extracción con agua a partir de matrices naturales a temperatura ambiente (Basile y col., 1998), el agua no se consideró para su uso en extracciones mediante UAE. Por el contrario, se seleccionó asimismo el hexano por ser un disolvente altamente apolar con poder para extraer potencialmente compuestos bioactivos no polares, como el β -caroteno. Las muestras de microalga *C. vulgaris* se trataron empleando un sonicador y utilizando el protocolo descrito en la sección II.3.3. Para determinar el tiempo de contacto requerido para conseguir los máximos rendimientos empleando cada uno de los tres disolventes utilizados, se estudiaron diferentes tiempos de extracción, desde 5 a 40 minutos en incrementos de 5 minutos. Los resultados preliminares mostraron que el tiempo de extracción más idóneo era de 25 minutos para

las extracciones con etanol y hexano, y de 30 minutos para las que empleaban acetona como disolvente. Los resultados se muestran en la Tabla II.2.

PLE. Por otro lado, los 3 disolventes (acetona, etanol y agua) que se emplearon en estas extracciones se eligieron de manera que se cubriera un amplio intervalo de constantes dieléctricas de forma que, posteriormente, pudiera relacionarse la polaridad del disolvente empleado con la actividad y composición de los extractos obtenidos (ver Tabla II.2). Además, se llevaron a cabo extracciones a diferentes temperaturas (50, 100, 150 y 200°C), ya que éste es el factor con mayor influencia en el proceso de extracción mediante PLE. El tiempo de extracción se mantuvo constante (20 minutos) en todas las extracciones, de acuerdo con los resultados previos obtenidos en nuestro grupo (Herrero y col., 2005); en estos trabajos previos los resultados indicaban que, para la extracción de algas y microalgas, el factor tiempo durante el proceso de extracción por PLE no tenía una influencia estadísticamente significativa ni en el rendimiento total de extracción, ni en la actividad antioxidante de los extractos obtenidos.

Tabla II.2. Condiciones de extracción por PLE y UAE (disolvente, temperatura y tiempo de extracción) y rendimientos obtenidos (% peso seco) en los extractos de *Chlorella vulgaris*.

| Técnica de extracción | Disolvente (constante dieléctrica) | Temperatura de extracción (°C) | Tiempo de extracción (min) | Rendimiento (%) |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|-----------------|
| PLE | Acetona (20.7) | 50 | 20 | 0.9 |
| | | 100 | 20 | 3.2 |
| | | 150 | 20 | 9.9 |
| | | 200 | 20 | 32.2 |
| | Etanol (24.3) | 50 | 20 | 1.8 |
| | | 100 | 20 | 8.1 |
| | | 150 | 20 | 17.6 |
| | | 200 | 20 | 36.4 |
| | Agua (78.5) | 50 | 20 | 8.6 |
| | | 100 | 20 | 6.8 |
| | | 150 | 20 | 13.8 |
| | | 200 | 20 | 39.3 |
| UAE | Acetona (20.7) | 25 | 30 | 2.7 |
| | Etanol (24.3) | 25 | 25 | 4.8 |
| | Hexano (1.9) | 25 | 25 | 0.7 |

En la Tabla II.2 se muestran las condiciones de extracción así como los rendimientos obtenidos en cada extracción. Como se puede observar, los rendimientos de extracción (expresado como % extracto seco respecto a la cantidad inicial de microalga) fueron máximos utilizando PLE, independientemente del disolvente empleado. Los rendimientos más elevados en valor absoluto se obtuvieron por PLE cuando se utilizaba agua como disolvente de extracción, mientras que empleando

acetona, los rendimientos obtenidos fueron ligeramente menores. Dado los bajísimos rendimientos obtenidos por UAE cuando se utilizó hexano como disolvente de extracción, y comparando estos datos con los proporcionados por el etanol y la acetona cuando se empleaba esa misma técnica, se descartó la posibilidad de utilizar hexano para llevar a cabo extracciones mediante PLE, esperando un comportamiento similar. Estos resultados parecen indicar cierta correlación entre la cantidad recuperada tras la extracción y la constante dieléctrica del disolvente orgánico empleado en la extracción. Asimismo, se puede observar un claro aumento del rendimiento de extracción con la temperatura (Tabla II.2), siendo esta tendencia independiente del disolvente empleado. Esto puede explicarse por un incremento en la transferencia de la materia de la muestra hacia el disolvente de extracción a medida que aumenta la temperatura, como resultado, entre otras posibles razones, de un aumento de la presión de vapor de los compuestos y una disminución de la viscosidad del disolvente con la temperatura. Como resumen de este apartado, se puede concluir que por PLE se obtuvieron rendimientos mucho más altos que con UAE, y que la microalga *C. vulgaris* contiene principalmente compuestos químicos de polaridad media-alta.

II.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos.

La capacidad antioxidante de los extractos de la microalga *Chlorella vulgaris* obtenidos por PLE y UAE se determinó utilizando el método TEAC. Los resultados obtenidos en estas determinaciones se muestran en las Tablas II.3 y II.4.

Como se puede observar en la Tabla II.3, para los extractos de PLE la mayor capacidad antioxidante se obtuvo empleando agua a 200°C. Esto puede deberse a la disminución de polaridad que se obtiene a estas temperaturas cuando el agua se mantiene en estado líquido, permitiendo, por tanto, la extracción de compuestos de polaridad media que tendrían una mayor actividad antioxidante, así como a la formación de nuevos compuestos antioxidantes en medio acuoso a elevadas temperaturas. Los valores TEAC que se obtuvieron cuando se utilizaba acetona como disolvente de extracción fueron elevados, y muy similares a los valores obtenidos con etanol. Con estos dos disolventes la mayor capacidad antioxidante se obtiene a 50°C, con una disminución discreta de la capacidad a medida que aumenta la temperatura hasta 150°C, disminuyendo en mayor medida al aumentar la temperatura de 150 a 200°C. Por el

contrario, en los extractos obtenidos con agua la capacidad antioxidante a temperaturas de 50-150°C (0.158-0.248 mmol Trolox/g extracto) es muy baja, aumentando bruscamente a 200°C (1.913 mmol Trolox/g extracto).

Tabla II.3. Valores medios de la capacidad antioxidante TEAC (mmol Trolox/g extracto) de los diferentes extractos obtenidos mediante PLE de *Chlorella vulgaris*. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

| Temperatura (°C) | TEAC (mmol Trolox/g extracto)* | | |
|---------------------|--------------------------------|---------------|---------------|
| | Agua | Etanol | Acetona |
| 50 | 0.158 ± 0.006 | 0.346 ± 0.007 | 0.479 ± 0.009 |
| 100 | 0.140 ± 0.003 | 0.322 ± 0.003 | 0.374 ± 0.006 |
| 150 | 0.248 ± 0.014 | 0.309 ± 0.004 | 0.305 ± 0.004 |
| 200 | 1.913 ± 0.099 | 0.196 ± 0.003 | 0.217 ± 0.004 |

*Valores mostrados como media ± sd.

En los extractos obtenidos por UAE (ver Tabla II.4), los valores de capacidad antioxidante más altos se encontraron en los extractos de etanol, seguidos por acetona, mientras que los obtenidos con hexano presentaron el valor TEAC más bajo.

Tabla II.4. Valores medios de la capacidad antioxidante TEAC (mmol Trolox/g extracto) de los diferentes extractos obtenidos mediante UAE de *Chlorella vulgaris*. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

| Disolvente | TEAC (mmol Trolox/g extracto)* |
|------------|--------------------------------|
| Acetona | 0.487 ± 0.011 |
| Etanol | 0.588 ± 0.021 |
| Hexano | 0.222 ± 0.009 |

*Valores mostrados como media ± sd.

No obstante, comparando las dos técnicas de extracción, los valores de capacidad antioxidante obtenidos por PLE a 50°C con acetona, fueron similares a los obtenidos por UAE con este mismo disolvente, mientras que los valores obtenidos por PLE a 50°C con etanol fueron menores que los obtenidos con este mismo disolvente por UAE. Este hecho podría deberse a una degradación de algunos de los compuestos antioxidantes obtenidos con etanol a medida que aumentaba la temperatura de extracción por PLE.

Sin embargo, en conjunto, el extracto obtenido con agua a 200°C por PLE fue el que proporcionó una capacidad antioxidante significativamente más elevada. Este dato, unido a que este extracto presenta el mejor rendimiento de extracción y que el agua es un disolvente considerado GRAS para la industria alimentaria, sugiere que dichas condiciones de extracción (uso de agua por PLE a 200°C) podrían ser las más favorables para la obtención de compuestos con capacidad antioxidante procedentes de la

microalga *C. vulgaris*.

II.4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos.

La actividad antimicrobiana (valores de MBC y MFC) de los extractos obtenidos por PLE y UAE se determinó tal y como se ha descrito en el apartado II.3.4.2. Un resumen de los resultados obtenidos se puede observar en la Tabla II.5. Los datos correspondientes a los valores MIC no se muestran en la Tabla II.5, ya que se considera que los valores MBC y MFC son más adecuados y precisos para describir y comparar las diferentes actividades antimicrobianas.

Tabla II.5. Actividad antimicrobiana de diferentes extractos de PLE y UAE de *Chlorella vulgaris*.

| Técnica de extracción | Disolvente | T(°C) | <i>Escherichia coli</i> MBC ^a | <i>Staphylococcus aureus</i> MBC | <i>Candida albicans</i> MFC ^b | <i>Aspergillus niger</i> MFC |
|---------------------------|------------|-------|---|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| PLE | Acetona | 50 | 11.0 | 12.0 | 10.0 | 14.5 |
| | | 100 | 11.0 | 12.0 | 10.0 | 14.0 |
| | | 150 | 10.5 | 12.0 | 9.5 | 13.0 |
| | | 200 | 10.5 | 11.5 | 9.5 | 13.0 |
| | Etanol | 50 | 7.0 | 8.5 | 9.0 | 13.0 |
| | | 100 | 7.0 | 8.5 | 9.0 | 13.0 |
| | | 150 | 7.0 | 9.0 | 9.5 | 13.0 |
| | | 200 | 7.0 | 9.0 | 9.5 | 13.0 |
| | Agua | 50 | 11.0 | 12.5 | 12.5 | 15.0 |
| | | 100 | 11.0 | 12.5 | 12.5 | 15.0 |
| | | 150 | 11.5 | 12.5 | 12.5 | 16.0 |
| | | 200 | 11.5 | 12.5 | 12.5 | 16.0 |
| UAE | Hexano | | 9.5 | 10.5 | 10.5 | 15.0 |
| | Acetona | | 9.0 | 10.0 | 9.5 | 14.0 |
| | Etanol | | 8.5 | 9.0 | 9.5 | 14.5 |
| Antibiótico de referencia | | | 10.0 | 10.0 | 100.0 | 150.0 |

^a: MBC: Concentración Mínima Bactericida. ^b: MFC: Concentración Mínima Fungicida. Los valores MBC y MFC son dados como mg/ml para las muestras y como µg/ml para el antibiótico.

Como se puede apreciar en la Tabla II.5, los extractos de etanol, hexano, agua y acetona presentaron actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, mientras que el crecimiento de *Aspergillus niger* prácticamente no se vio afectado.

En los extractos obtenidos por PLE con diferentes disolventes no se observaron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana al variar la temperatura de extracción. Por su parte, extractos de UAE y PLE obtenidos con etanol presentaron una actividad significativamente más antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, siendo, por lo tanto, los más activos entre los distintos extractos estudiados. Por el contrario, el disolvente cuyos extractos

presentaron peor actividad antimicrobiana frente a todos los microorganismos fue el agua, mientras que el hexano y la acetona presentaron actividad antimicrobiana semejante, siendo siempre ligeramente inferior a la proporcionada por los extractos obtenidos con etanol. Por tanto, de los datos expuestos en la Tabla II.5, se puede deducir, que la técnica de extracción utilizada no afectó significativamente a una mayor o menor presencia de actividad antimicrobiana o antifúngica.

Sin embargo, en este caso, la extracción de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana está claramente relacionada con la polaridad del disolvente empleado. De hecho, el etanol que es un disolvente con alta polaridad fue más efectivo en la extracción de compuestos con actividad antimicrobiana que el hexano que presenta una baja polaridad. Respecto a los microorganismos estudiados, la mayor inhibición en el crecimiento se observó para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; por el contrario, y como ya se ha comentado previamente, *Aspergillus niger* fue el microorganismo que mayor resistencia presentó frente a los extractos, por lo que se puede afirmar que los extractos obtenidos por PLE y UAE de *C. vulgaris* proporcionan principalmente un efecto bactericida.

Como resumen de este apartado, se puede concluir que el disolvente con mejor comportamiento antimicrobiano fue el etanol, independientemente de la técnica de extracción utilizada. Además, se pudo comprobar como la temperatura utilizada en la extracción no influía significativamente en dicha actividad.

II.4.4. Caracterización química de los extractos por HPLC-DAD.

Como ya se ha mencionado en la introducción del presente Capítulo, el alto contenido en carotenoides, principalmente en luteína (Park y col., 1998) en *C. vulgaris* es bien conocido. Por esta razón se adaptó un método anteriormente descrito por Vidussi y col (Vidussi, y col., 1996) para la detección de carotenoides mediante HPLC empleando una columna de fase inversa con partículas de fase estacionaria tipo C₁₈. Este método de análisis se aplicó a todos los extractos generados utilizando las dos técnicas de extracción estudiadas, identificándose en ellos algunos compuestos de interés, si bien para los extractos obtenidos empleando agua mediante PLE, este método no proporcionó una información satisfactoria, probablemente por la diferente

composición química de dichos extractos derivada de la alta polaridad del agua en relación con el resto de disolventes estudiados.

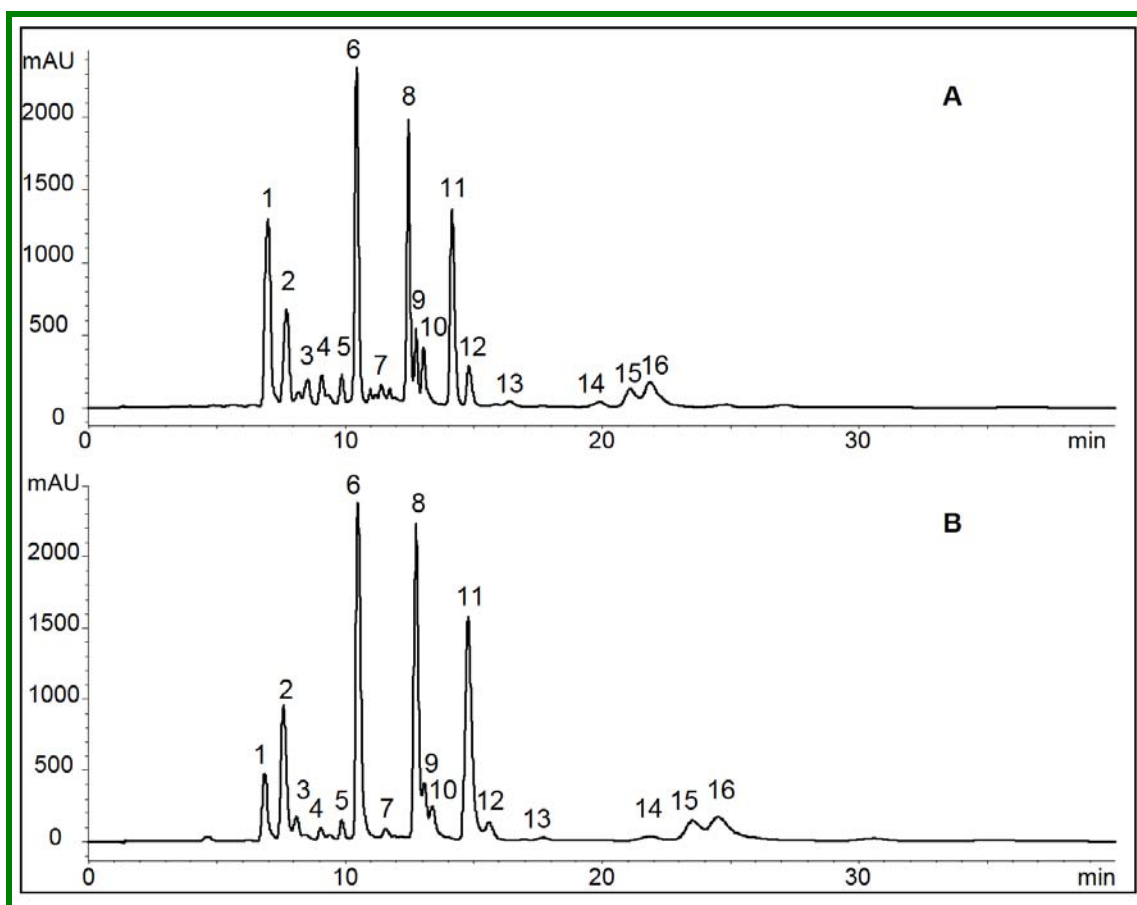


Figura II.5. Cromatogramas (450 nm) obtenidos mediante HPLC de extractos obtenidos con acetona mediante UAE (A) y PLE a 50°C (B). Identificación: 2, neoxantina; 3, violaxantina; 6, luteína; 8, clorofila *b*; 9, clorofila *b'*; 11, clorofila *a*; 12, clorofila *a'*; 15, α -caroteno; 16, β -caroteno; 1, 4, 5, 7, 10, 13 carotenoides no identificados; 14 clorofila no identificada.

La Figura II.5 muestra los cromatogramas de HPLC-DAD (a una longitud de onda de 450 nm) correspondientes al perfil de pigmentos de los extractos obtenidos con acetona mediante UAE (Figura II.5A) y utilizando PLE a 50°C (Figura II.5B). Como se puede apreciar, ambos perfiles son muy similares. En ambos se pudieron separar 16 diferentes compuestos en menos de 25 minutos. Gracias a la información ofrecida por el detector DAD, y de acuerdo con los datos de tiempos de retención y orden de elución así como gracias al uso de patrones comerciales y a la información reflejada en la bibliografía, se pudo identificar en estos extractos neoxantina (pico 2), violaxantina (pico 3), luteína (pico 6), clorofila *b* (pico 8), clorofila *b'* (pico 9), clorofila *a* (pico 11), clorofila *a'* (pico 12), α -caroteno (pico 15) y β -caroteno (pico 16).

Los carotenoides encontrados en los extractos obtenidos mediante PLE y UAE de *C. vulgaris* han sido descritos previamente en esta microalga (Vijayavel y col., 2007; Wu y col., 2007). De hecho, estos carotenoides pueden presentar importantes propiedades biológicas. Por ejemplo, la luteína es un compuesto efectivo para retardar la aparición de enfermedades crónicas, estimular la respuesta inmune y dificultar el desarrollo de cataratas y aterosclerosis (Ribaya-Mercado y col., 2004). Además, el β -caroteno, que es otro de los carotenoides encontrados en *C. vulgaris*, es convertido a retinol dentro del organismo, y por tanto, posee actividad provitamina A. Asimismo, debido a su actividad antioxidante, este compuesto podría jugar un papel importante en las enfermedades degenerativas (Nishino y col., 2002; Abe y col., 2007). Por otro lado, se pudieron identificar las clorofilas *a* (pico 11), *a'* (pico 12), *b* (pico 8) y *b'* (pico 9). Estos compuestos han demostrado contribuir, en cierta medida, a la capacidad antioxidante total de otros extractos naturales (Mendiola y col., 2005).

Los compuestos identificados para los cuales se contaba con patrones comerciales se cuantificaron en los diferentes extractos. En la Tabla II.6 se muestra la concentración de cada uno de estos pigmentos (mg/g de muestra) presente en los diferentes extractos obtenidos. La cuantificación se basó en las curvas de calibrado que se muestran en la Tabla II.1, que fueron obtenidas utilizando una calibración externa. Como se puede observar, no se muestra ninguna información relativa a los extractos de agua, ya que, como se ha mencionado anteriormente, en estas muestras no se encontraron cantidades significativas de estos pigmentos.

Tabla II.6. Contenido en carotenoides y clorofilas (mg compuesto/g muestra) en los extractos de *Chlorella vulgaris* obtenidos por PLE y UAE en las condiciones estudiadas.

| Técnica de extracción | Disolvente | T(°C) | Violaxantina | Neoxantina | Luteína | β -Caroteno | Clorofila <i>a</i> | Clorofila <i>b</i> |
|-----------------------|------------|-------|--------------|------------|---------|-------------------|--------------------|--------------------|
| PLE | Etanol | 50 | 1.52 | 11.35 | 11.74 | 38.97 | 11.02 | 12.41 |
| | | 100 | -- | 6.24 | 10.56 | 38.60 | 10.68 | 10.16 |
| | | 150 | -- | 6.07 | 6.05 | 26.54 | 2.48 | 3.48 |
| | | 200 | -- | 0.66 | 1.18 | 7.58 | 1.04 | 1.09 |
| | Acetona | 50 | 4.75 | 30.88 | 24.23 | 123.06 | 11.76 | 23.15 |
| | | 100 | -- | 15.55 | 17.81 | 52.24 | 8.73 | 9.37 |
| | | 150 | -- | 5.87 | 6.85 | 21.23 | 2.48 | 2.38 |
| | | 200 | -- | 0.35 | 1.22 | 8.49 | 2.41 | 0.39 |
| UAE | Etanol | | 0.92 | 9.83 | 9.22 | 28.82 | 79.17 | 2.10 |
| | Acetona | | 3.14 | 9.61 | 19.35 | 50.75 | 75.14 | 35.61 |
| | hexano | | 0.43 | 1.43 | 17.69 | 237.85 | 5.37 | 1.40 |

Los resultados muestran una disminución significativa en la concentración de carotenoides conforme aumenta la temperatura de extracción mediante PLE. En este

sentido, se observa que, por ejemplo, la violaxantina se degrada a temperaturas superiores a 50°C ya que sólo está presente en los extractos obtenidos por PLE a 50°C y en los extractos de UAE, puesto que en estos últimos la temperatura de extracción no supera los 25°C. También se puede apreciar que el disolvente más eficaz a la hora de extraer los diferentes carotenoides es la acetona, salvo en el caso del β -caroteno, donde la baja polaridad de este compuesto provoca que se extraiga más fácilmente empleando disolventes apolares como el hexano (238 mg/g de muestra). Aunque efectivamente el aumento de temperatura provoca una pérdida significativa de carotenoides, esta pérdida no puede correlacionarse directamente con la disminución de la capacidad antioxidante final, ya que, aunque ésta disminuye con la temperatura, lo hace de forma menos acusada y, únicamente cuando se emplean disolventes orgánicos (ver Tablas II.3 y II.6). Por lo tanto, la capacidad antioxidante debe asociarse también a otros compuestos presentes en estos extractos además de a la presencia de carotenoides. Esto puede apreciarse con claridad teniendo en cuenta que mientras que los extractos producidos con hexano mediante UAE no presentaron una muy alta capacidad antioxidante, su contenido en β -caroteno era el más elevado. Además, aunque como ya se ha mencionado, no se encontraron cantidades significativas de carotenoides y clorofilas en los extractos obtenidos con agua a diferentes temperaturas, la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a 200°C con este disolvente era, con gran diferencia, la más alta (1.916 mmolTrolox/g de extracto, ver Tabla II.3). Estos datos ratifican que, si bien los carotenoides presentes en los extractos tendrían un efecto positivo en la capacidad antioxidante total de los mismos, adicionalmente existirían otros compuestos en dichos extractos que tendrían una influencia significativa en dicha capacidad antioxidante. En este sentido, algunos autores (Klejdus y col. 2009; Onofrejová y col., 2010) han sugerido la presencia de fenoles simples en diferentes microalgas, lo que podría explicar la elevada capacidad antioxidante que presentaron los extractos acuosos. Además, dada la composición química general de esta microalga, con la presencia de carbohidratos junto con aminoácidos en las muestras, se podrían generar en la extracción con PLE a altas temperaturas algunos compuestos, como productos de la reacción de Maillard, que podrían influir significativamente en la capacidad antioxidante total de los extractos acuosos.

II.4.5. Análisis de los extractos por GC-MS.

Con el fin de intentar relacionar la actividad antimicrobiana mostrada por los diferentes extractos de *Chlorella vulgaris* obtenidos mediante PLE y UAE con la composición química de los mismos, los extractos se analizaron empleando GC-MS para estudiar su composición en compuestos volátiles y ácidos grasos. Estos dos grupos de compuestos se han descrito en la bibliografía como poseedores de cierta actividad antimicrobiana.

II.4.5.1. Análisis de la fracción volátil.

En la Tabla II.7 se muestran los compuestos volátiles identificados en los diferentes extractos, sus áreas relativas (porcentaje de la contribución del área de cada pico al área total), así como los índices de retención (RI) calculados para dichos compuestos. La identificación de los compuestos se llevó a cabo comparando sus espectros de masas con una biblioteca de espectros de MS, así como por sus RI (índices de retención) experimentales en comparación con los RI teóricos, y de acuerdo con la información encontrada en la bibliografía para cada uno de los compuestos identificados tentativamente. De esta manera se pudieron identificar 20 diferentes compuestos en los extractos de *C. vulgaris* estudiados (ver Figura II.6). Varios de estos compuestos identificados están relacionados con productos de degradación de carotenoides, como es el neofitadieno (pico 8) y su derivado (pico 11), que se encuentran en gran cantidad. Este hidrocarburo, perteneciente a la familia de los fitanos, ha sido detectado en aceites esenciales de hojas de tabaco (Stajanovic y col., 1999), así como en microalgas (Santoyo y col., 2009; Herrero y col., 2006a; Mendiola y col., 2007b) y se ha propuesto como poseedor de cierta actividad antimicrobiana. Otros compuestos también identificados en los extractos de *C. vulgaris* se han descrito previamente en algas verdes, como el ácido hexadecanoico y el 2-hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil (fitol) (Herrero y col., 2006a). Además, el fitol se ha encontrado en diversos aceites esenciales de plantas con actividad antimicrobiana (Couladis y col., 2002). De igual modo, algunos derivados de estos compuestos han mostrado actividad antioxidante (Ragassa y col., 2005) y antiviral. En este sentido el fitol presentó altos niveles de citotoxicidad; al tratar células Vero con 75 µg/ml de fitol, la infección vírica fue inhibida aproximadamente en un 65-70 % (Santoyo y col., 2010). Además del ácido hexadecanoico (pico 13), se

pueden encontrar otros ácidos grasos, como son el ácido 9,12,15-octadecatrienoico, metil ester (pico 12) y el ácido 9,12-octadecadienoico (pico 15), que han mostrado cierta actividad antimicrobiana (Huang y col., 2010b; Huang y Ebersole, 2010a). Por otro lado, la presencia de vitamina E (pico 16), a bajas concentraciones, presenta diversas actividades funcionales, como antioxidante (Maeda y col., 2005), efectos positivos en las enfermedades cardiovasculares (John y col., 2007) y actividad anticarcinogénica (Bradford y Awad, 2007). Otros compuestos que se encuentran en altas proporciones son los fitosteroles (picos 17-20), algunos de ellos han sido descritos previamente en esta microalga (Rzama y col., 1994). Estos compuestos están en auge en los últimos años debido a su actividad funcional, ya que son compuestos que previenen y reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares al alterar la biodisponibilidad metabólica del colesterol (John y col., 2007). Además, poseen actividad anticarcinogénica (Bradford y Awad, 2007).

Tabla II.7. Identificación de los compuestos separados por GC-MS de los extractos de *C. vulgaris* obtenidos mediante PLE y UAE. Área total (u.a. unidades de área), % área normalizada e índices de retención (RI)T.R., tiempo de retención; ID, Número de pico en la Figura II.6.

| ID | TR (min) | RI | Identificación | PLE | | | | | | | | UAE | | |
|-----------------------------|----------------|----------------|---|-------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | | | Etanol | | | | Acetona | | | | Etanol | Acetona | Hexano |
| | | | | 50°C | 100°C | 150°C | 200°C | 50°C | 100°C | 150°C | 200°C | | | |
| Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | | | | |
| 1 | 25.52 | 1546 | 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol | 1.30 | 0.92 | 0.89 | 1.84 | 2.36 | 0.88 | 1.66 | 1.62 | 2.27 | | 1.45 |
| 2 | 25.57 | 1549 | 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol (derivado) | 0.66 | 0.46 | 1.11 | | 1.23 | | | | | | |
| 3 | 27.32 | 1689 | (+)-(5)-6-Hidroxi-alpha-ionona | 0.42 | 0.41 | | | 0.24 | | | | | | |
| 4 | 27.88 | 1743 | Ciclododecano | 1.71 | 1.44 | 1.37 | 2.79 | 2.74 | 1.82 | 1.17 | 2.17 | | | 4.31 |
| 5 | 27.95 | 1750 | Heptadecano | 3.77 | 3.30 | 2.38 | 2.38 | 1.41 | 4.78 | 3.61 | 2.97 | | | 6.20 |
| 6 | 28.52 | 1807 | Ácido tetradecanoico | 1.32 | 0.70 | | | 0.70 | | | | | | |
| 7 | 28.71 | 1831 | Loliolide | 0.53 | 0.40 | | | 0.30 | | | | | | |
| 8 | 29.24 | 1897 | Neofitadieno | 9.29 | 13.26 | 15.86 | 23.93 | 9.77 | 15.38 | 20.99 | 31.95 | 28.14 | 30.92 | 2.65 |
| 9 | 29.30 | 1905 | 2-Hexadeceno, 3,7,11,15-tetrametil- | 2.00 | 2.24 | 2.11 | 3.05 | 1.83 | 2.80 | 3.78 | 5.40 | 4.79 | 5.29 | 1.19 |
| 10 | 29.44 | 1922 | 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil (derivado) | 1.96 | 2.19 | 2.62 | 3.76 | 1.57 | 2.33 | 3.45 | 5.55 | 4.47 | 5.03 | 1.75 |
| 11 | 29.59 | 1941 | Neofitadieno (derivado) | 3.03 | 3.78 | 4.43 | 7.17 | 2.77 | 4.49 | 6.02 | 10.84 | 7.37 | 8.23 | 0.92 |
| 12 | 30.05 | 1998 | Ácido 9,12,15-octadecatrienoico, metil ester, | 13.78 | 11.56 | 12.35 | 5.89 | 12.52 | 9.99 | 8.06 | 1.88 | 3.02 | | 3.16 |
| 13 | 30.19 | 2020 | Ácido hexadecanoico | 16.48 | 13.42 | 15.46 | 6.80 | 14.73 | 12.25 | 9.66 | 7.74 | 8.27 | | 9.14 |
| 14 | 31.25 | 2182 | 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil | 8.83 | 12.96 | 14.00 | 16.61 | 10.39 | 12.27 | 11.86 | 9.83 | 12.23 | 9.15 | 5.25 |
| 15 | 31.43 | 2211 | Ácido 9,12-octadecadienoico | 11.20 | 14.37 | 10.78 | 6.79 | 6.48 | 9.25 | 6.25 | 5.91 | 12.37 | 9.88 | 9.31 |
| 16 | 37.98 | >3600 | Vitamina E | 0.50 | 1.04 | 0.63 | | 2.42 | | 1.69 | | 0.29 | 1.78 | 0.62 |
| 17 | 38.08 | >3600 | Colest-5-en-3-ol, (3 beta)- | 5.93 | 3.60 | 3.35 | 5.55 | 8.24 | 6.47 | 4.81 | 2.49 | 0.65 | 5.31 | 0.84 |
| 18 | 38.58 | >3600 | Ergosta-5,22-dien-3-ol, (3 beta, 22E)- | 5.97 | 4.38 | 4.65 | 5.13 | 8.71 | 6.88 | 5.60 | 3.66 | 4.57 | 6.71 | 13.18 |
| 19 | 39.05 | >3600 | Ergosta-5,8,22-trien-3-ol, (3 beta, 22E)- | 9.08 | 8.61 | 8.00 | 8.32 | 7.96 | 10.41 | 11.40 | 7.98 | 11.56 | 17.71 | 35.76 |
| 20 | 39.32 | >3600 | Ergosta-5-en-3-ol | 2.21 | 0.97 | | | 3.66 | | | | | | 4.28 |
| AREAS TOTALES (u.a.) | | | | 1040172585 | 790822858 | 533068779 | 293462420 | 1322631810 | 758594650 | 551930145 | 286424399 | 164138777 | 229826555 | 786616071 |

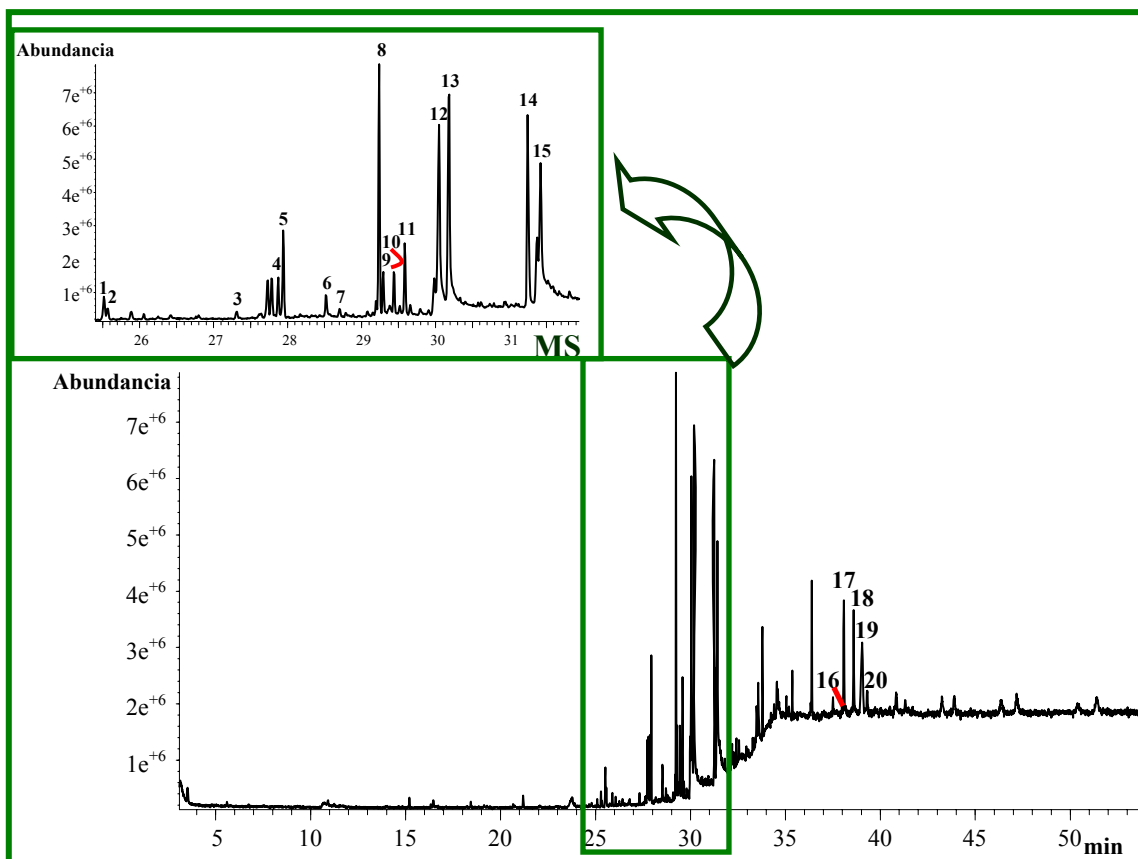


Figura II.6. Cromatograma de GC-MS en el que se indican los compuestos volátiles identificados. Extracto de etanol obtenido por PLE a 50°C. La numeración de los picos corresponde con la de la Tabla II.7.

Como se puede observar en esta Tabla II.7, la composición cualitativa de los diferentes extractos fue bastante parecida, tanto comparando diferentes disolventes como diferentes sistemas de extracción. La PLE fue la técnica que proporcionó una mayor cantidad de compuestos volátiles, fundamentalmente a bajas temperaturas (50°C). De hecho, se pudo confirmar cómo, a medida que aumentaba la temperatura de extracción mediante PLE, se producía una pérdida de compuestos volátiles independientemente del disolvente utilizado. Cabe destacar, asimismo, que no se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de los extractos obtenidos con agua mediante PLE, ya que en ellos no se pudieron identificar correctamente cantidades apreciables de estos compuestos. Por su parte, acetona y etanol se comportaron de una forma muy parecida como disolventes, extrayendo una cantidad similar de compuestos volátiles. Comparando ambas técnicas de extracción, se produjeron mayor cantidad de volátiles por PLE. Además, cuando se utilizaba UAE, el disolvente que extrajo mayor cantidad de volátiles fue el hexano, seguido por la acetona y el etanol.

II.4.5.2. Análisis de los ácidos grasos.

El consumo de ciertos ácidos grasos puede controlar diferentes situaciones patológicas en un individuo y actuar positivamente frente a enfermedades cardiovasculares, a la vez que poseer efecto anticarcinogénico, antiinflamatorio, actividad antimicrobiana, etc. (Flickinger y Huth, 2004). Por esta razón, la determinación de los ácidos grasos libres que se pudieran encontrar en los extractos producidos de *C. vulgaris* era de gran interés.

En la Tabla II.8, se muestran los ácidos grasos que se determinaron en los extractos obtenidos por PLE y UAE, a excepción de los extractos acuosos, en los cuales no se encontraron cantidades apreciables de dichos ácidos grasos. Los resultados obtenidos coinciden con los datos reflejados en la bibliografía (Petkov y García, 2007), ya que todos estos ácidos grasos se habían descrito previamente en esta microalga, en un porcentaje similar al obtenido en los presentes extractos. A modo de ejemplo, en la Figura II.7 se puede observar el cromatogramas del perfil de ácidos grasos metilados del extracto obtenido con etanol mediante PLE a 100°C.

Tabla II.8. Identificación mediante GC-MS de los ácidos grasos (metil ésteres) encontrados en los extractos de *C. vulgaris* producidos por PLE y UAE. Contribución de cada pico al área total (% área normalizada). ID: Número de pico en la Figura II.7. T.R., tiempo de retención.

| ID | TR (min) | Ácidos grasos (metil ésteres) | PLE | | | | | | | | UAE | | |
|-----------------------------|----------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|---------|
| | | | Etanol | | | | Acetona | | | | Etanol | Acetona | Hexano |
| | | | 50°C | 100°C | 150°C | 200°C | 50°C | 100°C | 150°C | 200°C | | | |
| 1 | 6.55 | Ácido tetradecanoico | | 2.67 | 0.39 | 1.85 | 3.45 | 5.24 | 1.86 | --- | 0.73 | 0.64 | --- |
| 2 | 7.96 | Ácido hexadecanoico | 16.34 | 19.41 | 18.94 | 23.76 | 14.76 | 15.57 | 15.77 | 22.07 | 20.09 | 11.74 | 28.87 |
| 3 | 8.18 | Ácido 9-hexadecenoico | 4.58 | 2.88 | 2.04 | 2.93 | 7.90 | 7.33 | 2.23 | 2.20 | 1.73 | 1.84 | 7.63 |
| 4 | 8.63 | Ácido 7,10-hexadecadienoico | 7.41 | 8.58 | 8.56 | 9.32 | --- | 11.63 | 8.82 | 7.39 | 6.96 | 9.81 | 3.89 |
| 5 | 9.34 | Ácido 7,10,13-hexadecatrienoico | 13.24 | 13.50 | 12.03 | 9.55 | 14.21 | 12.64 | 14.11 | 10.72 | 11.92 | 14.34 | 9.03 |
| 6 | 10.01 | Ácido octadecanoico | 2.64 | 1.31 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 0.60 | --- | --- |
| 7 | 10.42 | Ácido 9-octadecenoico | 4.14 | 3.63 | 3.90 | 3.73 | --- | 5.37 | 3.52 | 4.99 | 3.57 | 2.81 | 3.55 |
| 8 | 10.51 | Ácido 11-octadecenoico | 3.07 | 2.16 | 1.99 | 1.79 | --- | 4.72 | 2.10 | 2.37 | 1.46 | 1.07 | --- |
| 9 | 11.17 | Ácido 9,12-octadecadienoico | 14.26 | 16.46 | 19.64 | 20.47 | 15.30 | 11.62 | 17.86 | 20.65 | 17.97 | 17.57 | 17.39 |
| 10 | 12.35 | Ácido 9,12,15-octadecatrienoico | 13.38 | 14.87 | 16.50 | 15.02 | 16.87 | 13.37 | 16.47 | 14.62 | 17.39 | 18.51 | 21.36 |
| 11 | 13.11 | 2-Hexadecen-1-ol,3, 7, 11, 15-tetrametil- [R-(R*, R*(E))]- | 20.94 | 14.53 | 16.02 | 11.58 | 27.52 | 12.52 | 17.25 | 14.98 | 17.59 | 21.67 | 8.28 |
| ÁREAS TOTALES (u.a.) | | | 243143809 | 458480093 | 521608072 | 394758567 | 169439813 | 237495221 | 378880390 | 355904177 | 16680159 | 17552658 | 2232457 |

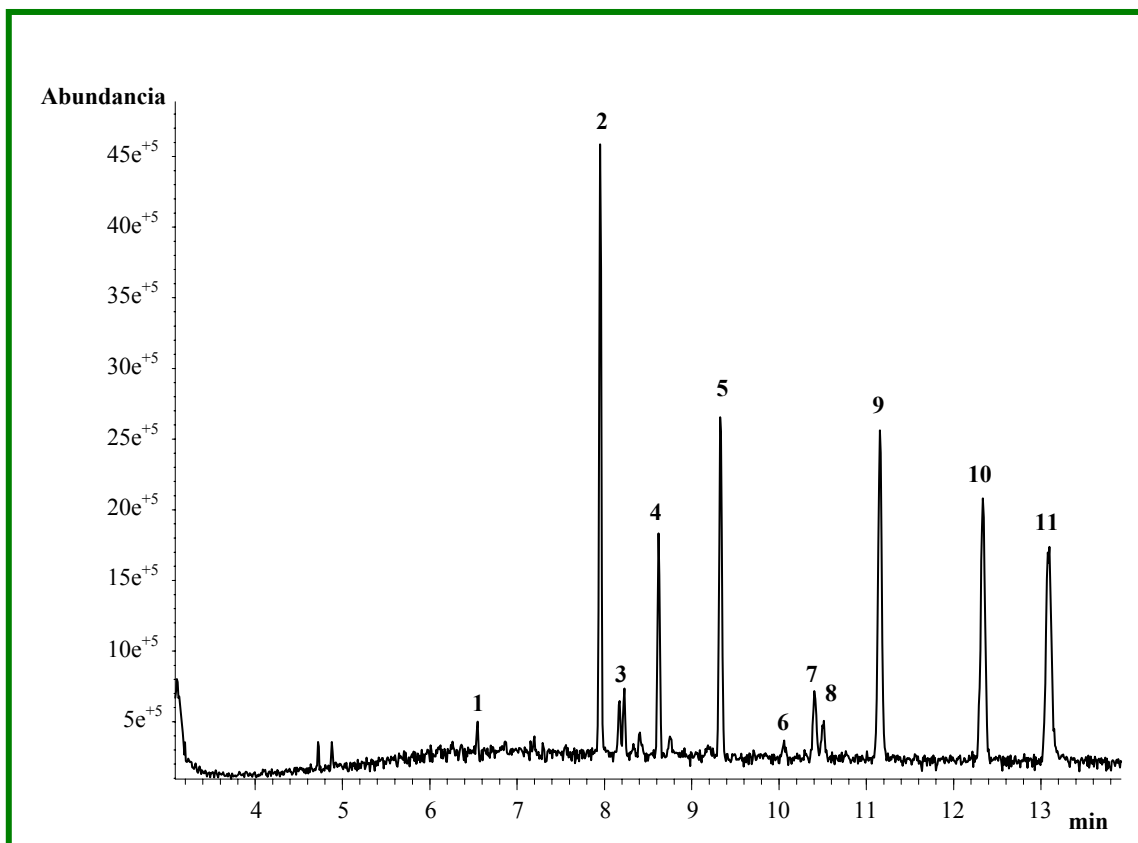


Figura II.7. Cromatograma de GC-MS correspondiente al perfil de ácidos grasos metilados del extracto obtenido con etanol mediante PLE a 100 °C. La numeración de los picos corresponde con la de la Tabla II.8.

Como se puede observar en la Tabla II.8, los compuestos mayoritarios determinados fueron los ácidos hexadecanoico (ácido palmítico), 7,10,13-hexadecatrienoico, 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico), 9,12,15-octadecatrienoico (ácido α -linolénico) y 9-octadecanoico (ácido oleico). Estos cinco ácidos grasos representan aproximadamente el 67% del área total de los cromatogramas de los diferentes extractos. Otros ácidos grasos presentes en menor concentración, pero también importantes, fueron los ácidos tetradecanoico (ácido mirístico), 9-hexadecanoico (ácido palmitoleico), 7,10-hexadecadienoico, octadecanoico (ácido esteárico), y 11-octadecanoico (ácido vacénico). Por tanto, *Chlorella vulgaris* es una microalga rica principalmente en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y monoinsaturados, siendo estos ácidos grasos beneficiosos para la salud (Rudkowska y Jones, 2007). Los ácidos grasos determinados en los extractos de PLE fueron los mismos que los detectados en los extractos de UAE, y el porcentaje en que se encuentra cada ácido graso es muy parecido para los extractos obtenidos empleando ambos sistemas de extracción. No obstante, las áreas totales en los extractos de PLE fueron

significativamente mayores que las obtenidas en los extractos de UAE, observándose un aumento de la extracción de ácidos grasos a 150°C.

En un intento de relacionar las actividades antimicrobianas con la presencia de compuestos volátiles y ácidos grasos, se estudiaron las posibles tendencias en los resultados presentados. Como se puede apreciar en la Tabla II.7, si se realiza una comparación teniendo en cuenta las áreas totales (lo que puede asociarse con la cantidad total de volátiles de la muestra), se puede apreciar que las cantidades determinadas en los extractos de etanol y acetona obtenidos por PLE son más elevadas que las encontradas en los extractos de UAE. Esto parece corroborar los resultados de las actividades antimicrobianas para los extractos de etanol y acetona obtenidas por PLE, pero no se correlaciona con los extractos obtenidos por UAE, ya que se obtienen mayor cantidad de volátiles con hexano, siendo este extracto (como se puede ver en la Tabla II.7) el que peor actividad antimicrobiana presenta.

Por otra parte, sí que podría encontrarse cierta relación entre la cantidad y composición de ácidos grasos determinados en los extractos obtenidos con etanol por PLE, dado que dichos extractos presentaron tanto una buena actividad antimicrobiana como la mayor cantidad de ácidos grasos (Tablas II.5 Y II.8).

A la vista de estos resultados se puede concluir que dado que la cantidad de volátiles y ácidos grasos en los extractos de etanol obtenidos por PLE es ligeramente superior a la obtenida con acetona por PLE, y claramente superior a las obtenidas con etanol, acetona y hexano por UAE, y que la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos por etanol y acetona con ambas técnicas de extracción son muy parecidas (ver Tablas II.5, II.7 y II.8), deben existir otros compuestos en los extractos, no detectados por GC-MS, que contribuyen a la actividad antimicrobiana de los mismos, como podrían ser algunos sesquiterpenos, cuya presencia se ha descrito previamente en algas marrones (Kukovinets y col, 2006). Por otro lado, también cabría esperar sinergias de algún tipo entre los compuestos presentes en los extractos.

II.5. CONCLUSIONES.

En este estudio se ha demostrado la mayor capacidad de la PLE frente a la UAE para obtener extractos con capacidad antioxidante y antimicrobiana de la microalga *Chlorella vulgaris*. Empleando PLE es posible obtener elevados rendimientos de extracción a altas temperaturas, con valores muy superiores a los que presenta la UAE.

Gracias al ensayo de capacidad antioxidante realizado mediante el método TEAC se comprobó que empleando ambas técnicas de extracción (UAE y PLE a 50°C) usando etanol y acetona como disolventes, se podían obtener buenas capacidades antioxidantes. Por otro lado, es de destacar que el extracto obtenido mediante PLE con agua a 200°C presentó el valor TEAC más elevado.

Los extractos obtenidos con etanol mediante PLE presentaron una actividad antimicrobiana ligeramente superior al resto de extractos. Además se pudo comprobar cierta tendencia bactericida en los mismos.

Se llevó a cabo una caracterización exhaustiva de los extractos empleando HPLC-DAD, de forma que se pudieron detectar diferentes compuestos responsables de la capacidad antioxidante como son los carotenoides (tales como violaxantina, luteína, neoxantina, α -caroteno y β -caroteno). Los resultados demostraron que otros compuestos, además de los carotenoides, podrían tener una influencia positiva en la capacidad antioxidante de los extractos, sobre todo en el extracto obtenido con agua mediante PLE a 200°C, ya que éste presentó la mayor capacidad antioxidante y no se detectó la presencia de este tipo de compuestos.

Se determinó la presencia de compuestos volátiles y ácidos grasos mediante el empleo de diversos métodos de GC-MS en los extractos generados utilizando ambas técnicas de extracción, demostrándose que estos compuestos podrían contribuir a la actividad antimicrobiana asociada a los extractos, aunque su única presencia no sería suficiente para explicar la actividad asociada a los extractos obtenidos por UAE.

El rendimiento fue mayor con etanol por PLE, lo que podría aprovecharse, junto con su buena capacidad antimicrobiana y antioxidante y su consideración de seguro para

la industria alimentaria, para obtener extractos mediante PLE procedentes de la microalga *Chlorella vulgaris* potencialmente útiles como conservantes alimentarios naturales. Por su parte, el empleo de esta técnica utilizando como disolvente de extracción agua a altas temperaturas (200°C) permitiría la obtención de forma segura de extractos con alto poder antioxidante.

CAPÍTULO III:

“Obtención de extractos de *Synechocystis sp.* con actividad antioxidante y antimicrobiana obtenidos mediante extracción con líquidos presurizados (PLE). Caracterización química y funcional”

III.1. INTRODUCCIÓN.

Synechocystis sp. es una microalga verde azulada que se engloba dentro del orden Synechococcales, familia Merismopediaceae, clase Cyanophyceae, género *Synechocystis*. Las células, que se encuentran en solitario, son esféricas (4-8 μm) (Figura III.1). Esta microalga es una cianobacteria unicelular marina no fijadora de nitrógeno, que además tiene la peculiaridad de ser heterotrófica.

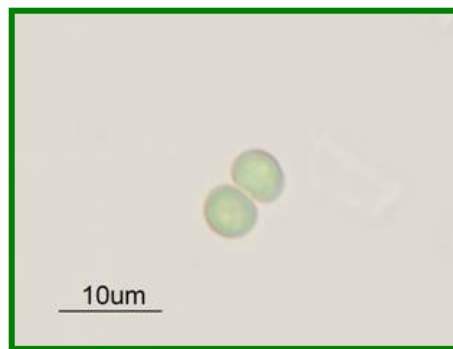


Figura.III.1 Microfotografía de la microalga *Synechocystis* sp.

Como muchas especies de cianobacterias, *Synechocystis* sp. todavía permanece poco estudiada en cuanto a su composición química y compuestos bioactivos presentes, aunque existen muchos trabajos en la bibliografía sobre esta microalga relacionados con su expresión génica (Mulo, y col., 2009; Korelusova y col., 2009; Cunningham y col., 2010; Kiss y col., 2009; Zhang y col., 2008; Boehm y col., 2009; Prakash y col., 2009). En uno de los pocos trabajos que describe la composición química y las posibles propiedades funcionales de los compuestos presentes en esta microalga, se observó que el extracto metanólico procedente de *Synechocystis* sp. presentaba actividad antioxidante contra el radical DPPH. En dicho trabajo se asoció esta actividad a la posible presencia de compuestos bioactivos solubles en metanol, como podrían ser carotenoides, ácidos grasos, tocoferoles, alcaloides y compuestos fenólicos, entre otros (Marxen y col., 2007).

Asimismo se ha estudiado la producción de potenciales compuestos bioactivos a partir de *Synechocystis* sp. (El Semary y Abb El Naby, 2010). De hecho, se ha determinado la composición en ácidos grasos, observándose que, en esta microalga, los ácidos grasos saturados predominaban sobre los poliinsaturados. Por otra parte, en el estudio de compuestos fotoquímicos presentes en esta microalga, se observó la

presencia de flavonoides, alcaloides y saponinas, así como se constató la ausencia de taninos, mientras que la vitamina C se encontró a una concentración considerable. Además, diferentes fracciones lipídicas de esta microalga presentaron actividad antimicrobiana frente a varios patógenos, observándose que el compuesto bioactivo predominante en estas fracciones era el ácido oleico (El Semary y Abb El Naby, 2010).

En cuanto a la posibilidad de encontrar carotenoides en esta microalga, cabe destacar que en *Synechocystis* sp. se han identificado varios genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides (Figura III.2), si bien sólo cuatro de estos compuestos se acumulan significativamente en esta microalga: mixoxantofila, β -caroteno, equinenona y zeaxantina (Lagarde y col., 2000). Identificando estas rutas metabólicas, gracias al empleo de técnicas de ingeniería genética, se ha conseguido una sobreproducción de zeaxantina y otros carotenoides, a partir de una cepa determinada de *Synechocystis* (Lagarde y col., 2000).

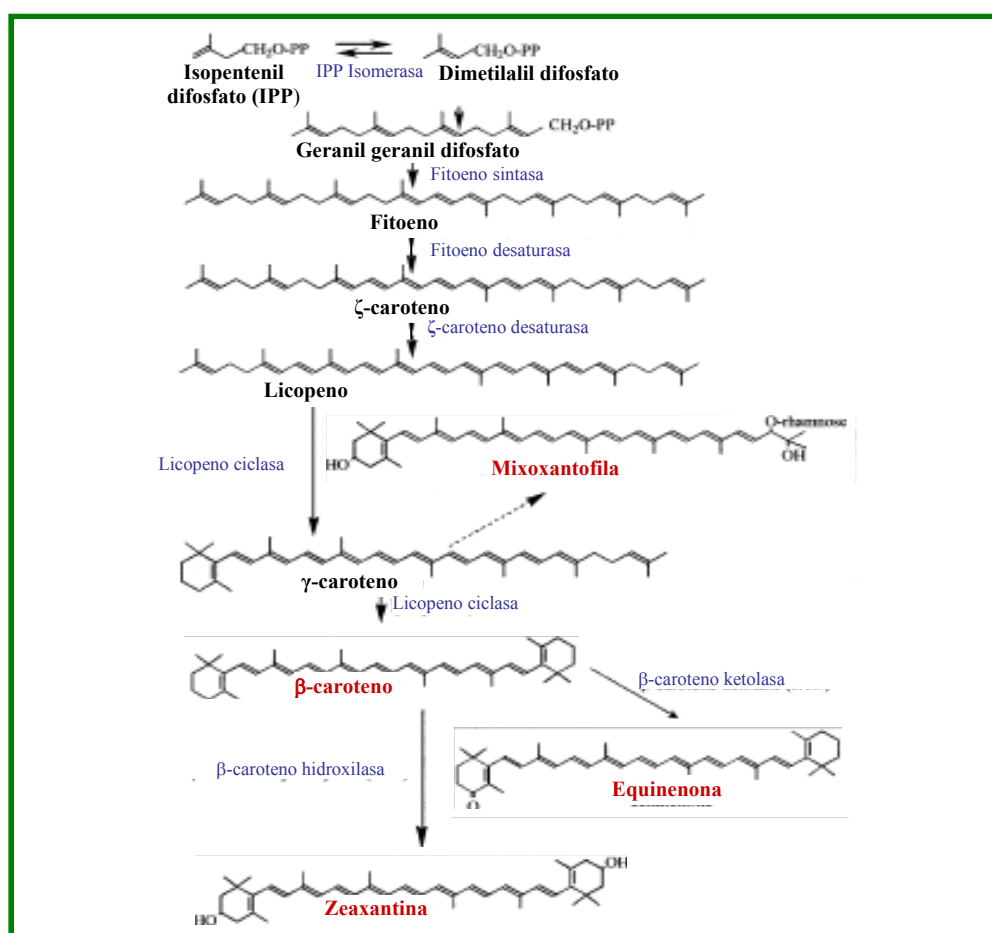


Figura III.2. Ruta simplificada de la biosíntesis de los carotenoides que se encuentran en mayor concentración en *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803.

Continuando con el *screening* de algas para la búsqueda y obtención de compuestos bioactivos, y considerando los resultados mostrados en el Capítulo II de la presente Memoria, en este capítulo se describe el estudio de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante y antimicrobiana en los extractos de *Synechocystis* sp. obtenidos por PLE.

III.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El objetivo del presente trabajo fue encontrar las condiciones de extracción mediante PLE más adecuadas para obtener extractos con una elevada capacidad antioxidante y antimicrobiana a partir de *Synechocystis* sp. Además, se llevó a cabo una caracterización exhaustiva de los compuestos presentes en estos extractos que pudieran asociarse con dichas actividades.

Para alcanzar este objetivo general, se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Obtención de los extractos de *Synechocystis* sp. mediante PLE, empleando diferentes condiciones de extracción, incluyendo diferentes combinaciones disolvente-temperatura (como son, agua, etanol y hexano a 50, 100, 150 y 200°C).
2. Evaluación funcional de los extractos obtenidos mediante el empleo de ensayos *in vitro*, para la determinación de su capacidad antioxidante y de su actividad antimicrobiana.
3. Caracterización química de los extractos considerados activos mediante el empleo de HPLC-DAD y GC-MS para la detección e identificación de los compuestos que pudieran ser responsables de la actividad observada, tales como carotenoides, clorofilas, compuestos volátiles ó ácidos grasos.

III.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

III.3.1. Muestras y reactivos.

Las muestras de *Synechocystis* sp. (BNA 20-039, Banco Nacional de Algas, Islas Canarias, España) proceden de una muestra recolectada en una camaronera de Guatemala, y ha sido aislada en el BNA. Las muestras fueron cultivadas en un medio básico de Bold (Nichols y Bold, 1965) modificado, enriquecido con NaNO_3 (0.75 g/l). Las células (fase verde) fueron cultivadas fototróficamente en 20 l de burbujas con aire, a 25°C en ciclos de luz/oscuridad (16:8) con lámparas fluorescentes blancas que proporcionan una intensidad de luz de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las células se recogieron por centrifugación, se liofilizaron y se almacenaron en atmósfera inerte hasta la extracción, protegiéndolas de esta manera, tanto del oxígeno, como de la humedad y la luz.

Los disolventes, reactivos y patrones de compuestos puros que se emplearon en el presente trabajo fueron equivalentes a los descritos en el Capítulo II.

III.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE).

Para llevar a cabo las extracciones de la cianobacteria *Synechocystis* sp. se utilizaron diferentes disolventes (etanol, agua, y hexano) con el fin de obtener extractos con diferente composición. Las extracciones se llevaron a cabo a cuatro temperaturas distintas de extracción (50, 100, 150, y 200°C) manteniendo un tiempo de extracción estático de 20 minutos en todos los procesos de extracción.

Todas las extracciones se realizaron en una celda de 11 ml de capacidad empleando 1 g de muestra. En el caso de las extracciones llevadas a cabo con agua, para evitar la obstrucción del sistema de extracción, la muestra se introdujo mezclada con arena de mar empleando una disposición de tipo sándwich (se colocaron 6 g de arena de mar, después la muestra, y por último 2 g de arena de mar).

Tanto el equipamiento utilizado para la extracción presurizada con disolventes, como el modo de funcionamiento del mismo fueron equivalentes a los ya descritos en el Capítulo II.

III.3.3. Caracterización funcional.

III.3.3.1. Capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de los extractos de *Synechocystis* sp. obtenidos por PLE, se determinó empleando el método TEAC, cuyos fundamentos se han expuesto en el Capítulo I, siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo II de la presente memoria.

III.3.3.2. Actividad antimicrobiana.

De igual manera, los extractos de *Synechocystis* sp. obtenidos por PLE empleando diferentes disolventes se estudiaron individualmente frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Candida albicans* ATCC 60193 y *Aspergillus niger* ATCC 16404, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo II.

III.3.4. Caracterización química.

III.3.4.1. Análisis mediante cromatografía de líquidos (HPLC-DAD).

Para su correcto análisis por HPLC-DAD, los extractos secos se disolvieron antes de ser analizados; los extractos obtenidos con etanol y agua se disolvieron en etanol mientras que los obtenidos con hexano se prepararon en acetona, todos a la misma concentración de 10 mg/ml.

Tanto el equipamiento utilizado para ver la composición de pigmentos, como el método de análisis empleado son los descritos en el Capítulo II.

Se llevó a cabo la obtención de curvas de calibrado para la cuantificación de los diferentes carotenoides y clorofilas presentes en las muestras. Para ello se inyectaron cuatro cantidades diferentes (de 0.01 a 0.08 μg) de cada uno de los patrones de equinenona, mixoxantofila y zeaxantina. Asimismo se utilizaron cuatro cantidades (de 0.15 a 18 μg) de *all-trans*- β -caroteno para elaborar la recta de calibrado para este compuesto. Cada patrón se preparó empleando en el disolvente apropiado: zeaxantina y

equinenona en etanol, mixoxantofila en acetona, y β -caroteno en diclorometano. La ecuación de la recta de regresión para cada curva patrón se obtuvo representando la concentración de cada patrón inyectado frente al área del pico correspondiente a ese compuesto. Las ecuaciones obtenidas para los diferentes compuestos así como sus respectivos coeficientes de correlación se muestran en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Ecuación de la recta de regresión de los patrones de carotenoides y clorofilas obtenidos por HPLC-DAD (450 nm).

| Compuesto | Ecuación de la recta de regresión ^a | Coefficiente de correlación (r^2) |
|------------------------------------|--|---------------------------------------|
| Echinenona | $Y = 12896282x - 2.7$ | 1 |
| Mixoxantofila | $Y = 7232170x + 35.1$ | 0.9945 |
| β-caroteno | $Y = 992031x - 109.4$ | 0.9999 |
| Zeaxantina | $Y = 12189189x + 5.6$ | 0.9993 |

^a Y es el valor del área del pico. X es el valor de la cantidad de muestra inyectada (mg).

III.3.4.2. Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

III.3.4.2.1. Análisis de la fracción volátil.

Con el objeto de caracterizar los compuestos volátiles presentes en los extractos, éstos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Tanto el equipamiento utilizado para estudiar la composición de la fracción volátil, como el método empleado están descritos en el Capítulo II.

III.3.4.2.2. Análisis de ácidos grasos.

Para llevar a cabo el análisis por GC-MS de los ácidos grasos de los extractos de *Synechocystis* sp. obtenidos por PLE, se llevó a cabo la derivatización previa de las muestras, de forma que los ácidos grasos presentes fueran transformados en metil-ésteres. Tanto el protocolo empleado para la metilación de los ácidos grasos, como el equipo y el método utilizados para el análisis de estos compuestos fueron idénticos a los anteriormente descritos en el Capítulo II.

III.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

III.4.1. Extracción por PLE.

Las condiciones de extracción empleadas, así como los resultados obtenidos en términos de rendimiento de extracción y capacidad antioxidante, se recogen en la Tabla III.2. Como se puede observar, el rendimiento de extracción (expresado como % de extracto seco respecto a la cantidad inicial de microalga) fue máximo cuando se empleó agua como disolvente de extracción, alcanzando el 63% de rendimiento a 200°C. Por otra parte, se puede observar como los extractos obtenidos con hexano proporcionaron los rendimientos más bajos (3% a 200°C), mientras que con etanol se obtuvieron valores intermedios (24% a 200°C). Independientemente del disolvente empleado, se puede apreciar un aumento significativo del rendimiento de extracción con el incremento de la temperatura utilizada. Este hecho, como ya se ha comentado en el capítulo anterior de la presente Memoria, puede deberse a varios factores que ejercen una influencia directa sobre el aumento de la transferencia de materia a elevadas temperaturas, como son el aumento de solubilidad de los analitos y la disminución en la viscosidad del disolvente, entre otros.

Tabla III.2. Condiciones de extracción por PLE (disolvente y temperatura de extracción), rendimientos obtenidos (% de peso seco) y capacidad antioxidante TEAC de los extractos obtenidos a partir de *Synechocystis* sp.

| Disolvente (Constante dieléctrica, ϵ) | Temperatura de extracción (°C) ¹ | Rendimiento (%) | Capacidad antioxidante ² |
|--|--|-----------------|--|
| Hexano (1.9) | 50 | 1.1 | 0.008 ± 0.000 |
| | 100 | 0.9 | 0.015 ± 0.001 |
| | 150 | 1.7 | 0.018 ± 0.001 |
| | 200 | 3.3 | 0.035 ± 0.000 |
| Etanol (24.3) | 50 | 6.0 | 0.263 ± 0.010 |
| | 100 | 13.2 | 0.407 ± 0.008 |
| | 150 | 12.8 | 0.466 ± 0.002 |
| | 200 | 24.0 | 0.092 ± 0.001 |
| Agua (78.5) | 50 | 11.0 | 0.015 ± 0.001 |
| | 100 | 16.5 | 0.017 ± 0.001 |
| | 150 | 33.1 | 0.037 ± 0.001 |
| | 200 | 63.4 | 0.330 ± 0.006 |

¹Tiempo de extracción 20 min. ²Capacidad antioxidante expresada como TEAC (mmol de Trolox/g de extracto).

Por otra parte, como se puede observar, el rendimiento total de extracción aumenta en gran medida cuando se emplea agua, y puede observarse una clara tendencia en relación a la polaridad del disolvente empleado. Esto es, cuanto más polar es el disolvente de extracción, mayor es el rendimiento que se obtiene. Este dato permite deducir que *Synechocystis* sp. está compuesta, principalmente, de compuestos de

polaridad media-alta (incluyendo proteínas e hidratos de carbono), que son preferentemente extraídos cuando se utiliza como disolvente de extracción el agua a 200°C.

III.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos.

En la Tabla III.2 se resumen los resultados de la capacidad antioxidante de los diferentes extractos obtenidos por PLE. Como se puede apreciar, la capacidad antioxidante de los extractos es diferente en función del disolvente de extracción utilizado. Así, el etanol es el disolvente que extrajo compuestos con mayor capacidad antioxidante, siendo los valores de TEAC máximos a temperaturas de 100 y 150°C (0.407 y 0.466 mmol de Trolox/g de extracto, respectivamente), y descendiendo bruscamente a 200°C (0.092 mmol de Trolox/g de extracto). Este descenso se debe, muy probablemente, a la degradación de compuestos antioxidantes a 200°C. La capacidad antioxidante fue más baja en los extractos de agua, siendo menor aún en los de hexano. A diferencia de los extractos obtenidos con disolventes orgánicos, los extractos producidos con agua mostraron una capacidad antioxidante mayor cuanto mayor era la temperatura de extracción, oscilando los valores entre 0.017 mmol de Trolox/g de extracto a 100°C y 0.330 mmol de Trolox/g de extracto a 200°C.

Por tanto, estos resultados sugieren la presencia, en esta microalga, de antioxidantes de polaridad media, dado que el etanol fue el disolvente que permitió la obtención de los extractos con mayor capacidad, entre todas las condiciones estudiadas. Además puede observarse como, a pesar de que el rendimiento de extracción obtenido empleando agua podía ser muy elevado, no todos los compuestos extraídos con este disolvente poseían una alta actividad antioxidante.

III.4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos.

La concentración mínima bactericida (MBC) y fungicida (MFC) de los extractos de *Synechocystis* sp. frente a los microorganismos seleccionados se muestran en la Tabla III.3.

Tabla III.3 . Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos por PLE a partir de *Synechocystis* sp.

| Disolvente | Temperatura (°C) | <i>Escherichia coli</i> MBC ^a | <i>Staphylococcus aureus</i> MBC | <i>Candida albicans</i> MFC ^b | <i>Aspergillus niger</i> MFC |
|---------------------------|------------------|---|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| Hexano | 50 | 8.0 | 9.0 | 13.5 | 15.0 |
| | 100 | 8.0 | 9.0 | 13.5 | 15.0 |
| | 150 | 7.0 | 8.5 | 13.5 | 14.0 |
| | 200 | 8.0 | 8.5 | 13.5 | 14.0 |
| Etanol | 50 | 7.0 | 7.0 | 12.5 | 14.0 |
| | 100 | 7.0 | 7.0 | 12.0 | 14.0 |
| | 150 | 7.0 | 6.5 | 12.0 | 14.0 |
| | 200 | 7.0 | 5.6 | 12.0 | 14.0 |
| Agua | 50 | 13.5 | 13.5 | 13.2 | 16.5 |
| | 100 | 13.5 | 13.5 | 13.2 | 16.5 |
| | 150 | 13.0 | 13.5 | 13.5 | 16.0 |
| | 200 | 13.0 | 13.5 | 13.5 | 16.0 |
| Antibiótico de referencia | | 10.0 | 10.0 | 100.0 | 150.0 |

^a: MBC: Concentración Mínima Bactericida. ^b MFC: Concentración Mínima Fungicida. Los valores MBC y MFC son dados como mg/ml para las muestras y como µg/ml para el antibiótico.

Como se puede observar en la Tabla III.3, en general las bacterias fueron los microorganismos más sensibles hacia los diferentes extractos estudiados, mientras que la actividad que presentaban frente a los hongos fue más baja, pudiéndose encontrar diferencias significativas en la actividad antimicrobiana en función del disolvente empleado. En general, los extractos obtenidos con etanol fueron ligeramente más activos que los obtenidos con hexano. En cuanto a los extractos de agua, su actividad frente a los microorganismos utilizados en el ensayo fue menor que los obtenidos con los disolventes orgánicos. Estos datos parecen indicar que la extracción de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana se relaciona con la polaridad del disolvente empleado. De hecho, el etanol, que es un disolvente orgánico relativamente polar, fue el disolvente más eficaz para la extracción de compuestos antimicrobianos procedentes de la microalga *Synechocystis* sp. El análisis de la actividad antimicrobiana de los extractos en función de la temperatura de extracción indica que, conforme aumenta la temperatura no se producen cambios significativos en la actividad antimicrobiana en la mayoría de los casos. Sin embargo, la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* de los extractos obtenidos con etanol y hexano tendió a aumentar conforme aumentaba la temperatura.

III.4.4. Caracterización química de los extractos por HPLC-DAD.

Como se ha mencionado en la introducción, en *Synechocystis* sp. se han identificado varios genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de diferentes carotenoides (Lagarde y col., 2000), por tanto, es de esperar que este tipo de

compuestos estén presentes y sean, al menos parcialmente, responsables de la capacidad antioxidante de los extractos. Dada la baja capacidad antioxidante mostrada por la mayor parte de los extractos obtenidos, fundamentalmente con hexano y con agua, se seleccionó, para su posterior caracterización química, el extracto obtenido con etanol a 100°C puesto que proporcionaba una elevada capacidad antioxidante. Asimismo, también se analizó por este método el extracto obtenido a 200°C con etanol, con el objetivo de estudiar comparativamente la evolución de la composición de los extractos en términos de pigmentos en función de la temperatura. De igual manera, considerando que los extractos obtenidos empleando agua a 200°C presentaron alta capacidad antioxidante, éstos se analizaron también por este método, no obteniéndose resultados satisfactorios. Este hecho refleja que probablemente existen en los extractos acuosos otros compuestos diferentes a carotenoides que podrían ser responsables de la capacidad antioxidante de los mismos, como fenoles (Klejduš y col., 2009; Onofrejová y col., 2010), terpenos (Johns y col., 2000), o compuestos generados durante el proceso de extracción a consecuencia de reacciones no enzimáticas, como es la reacción de Maillard o procesos de caramelización (Rodríguez-Meizoso y col., 2010)

En la Tabla III.4 y en la Figura III.3 se puede observar el perfil de carotenoides y otros pigmentos presentes en los extractos de etanol a 100 y 200°C a partir de esta microalga. De nuevo, gracias a la información ofrecida por el detector DAD, a la información cromatográfica (tiempos de retención, orden de elución) así como al uso de patrones comerciales y de acuerdo con los datos reflejados en la bibliografía, se pudieron identificar en estos extractos mixoxantofila (pico 1), zeaxantina (pico 2), derivado de la clorofila *a* (pico 8), equinenona (pico 12), feofitina *a* (pico 13) y β -caroteno (pico 14). El carotenoide principal fue el β -caroteno, seguido de zeaxantina, mixoxantofila y equinenona. Estos carotenoides coinciden con los descritos previamente en esta microalga (Lagarde y col., 2000). Como también se puede apreciar, *Synechocystis* sp. presentó una alta cantidad de clorofilas llegando a suponer aproximadamente el 68% del área total de los cromatogramas. Estas clorofilas podrían contribuir en cierta medida a la capacidad antioxidante que presentaron estos extractos (Mendiola y col., 2005). Como cabía esperar de una microalga verde-azulada, se encontraron derivados de la clorofila *a* y feofitina *a* en el extracto.

Tabla III.4. Identificación por HPLC-DAD, contribución de cada pico al área total (% área normalizada) y áreas totales (u.a., unidades arbitrarias), y concentración de carotenoides (mg/g) presentes en los extractos obtenidos con etanol mediante PLE (100 y 200°C) a partir de *Synechocystis* sp. TR: tiempo de retención, NI: no identificado.

| ID | TR (min) | Pigmentos | 100°C Etanol | | 200°C Etanol | | |
|--------------------------|----------|---|---|----------------|--------------|----------------|--------------|
| | | | Datos espectroscópicos λ max. | Área norm. (%) | Conc. (mg/g) | Área norm. (%) | Conc. (mg/g) |
| 1 | 9.03 | Mixoxantofila ^{ab} | 294, 446, 472, 500 | 5.74 | 0.58 | 3.93 | 0.3 |
| 2 | 10.39 | Zeaxantina ^{ab} | 284, 424, 448, 476 | 19.02 | 1.64 | 20.16 | 1.31 |
| 3 | 11.27 | Clorofila NI | 416, 474, 640, 660 | 10.67 | | 11.50 | |
| 4 | 11.51 | Clorofila NI | 336, 440, 618 | 11.65 | | 10.16 | |
| 5 | 11.82 | Clorofila NI | 256, 342, 400, 456 | 4.18 | | | |
| 6 | 12.24 | Clorofila NI | 388, 438, 654, 678 | 5.86 | | | |
| 7 | 12.62 | Clorofila NI | 364, 396, 436, 588, 634, 680 | 10.13 | | 21.16 | |
| 8 | 13.23 | Clorofila <i>a</i> derivado ^a | 340, 378, 416, 430, 574, 614, 656, 666 | 14.79 | | 7.30 | |
| 9 | 13.79 | Clorofila NI | 420, 656 | 4.84 | | 2.86 | |
| 10 | 14.06 | Clorofila NI | 296, 356, 416, 640, 660 | 2.05 | | 2.04 | |
| 11 | 14.43 | Carotenoide NI | 346, 418 | 2.16 | | | |
| 12 | 15.12 | Equinenona ^{ab} | 478, 422, 450, 474 | 3.08 | 0.24 | | -- |
| 13 | 18.08 | Feofitina <i>a</i> ^a | 330, 378, 408, 430, 574, 610, 656 | 3.92 | | 2.05 | |
| 14 | 22.43 | β-caroteno ^{ab} | 278, 420, 452, 478 | 1.91 | 2.04 | 18.84 | 11.7 |
| AREA TOTAL (u.a.) | | | | 12253.4 | | 11744.2 | |

^a Espectro similar al patrón. ^b Tiempo de retención igual al patrón.

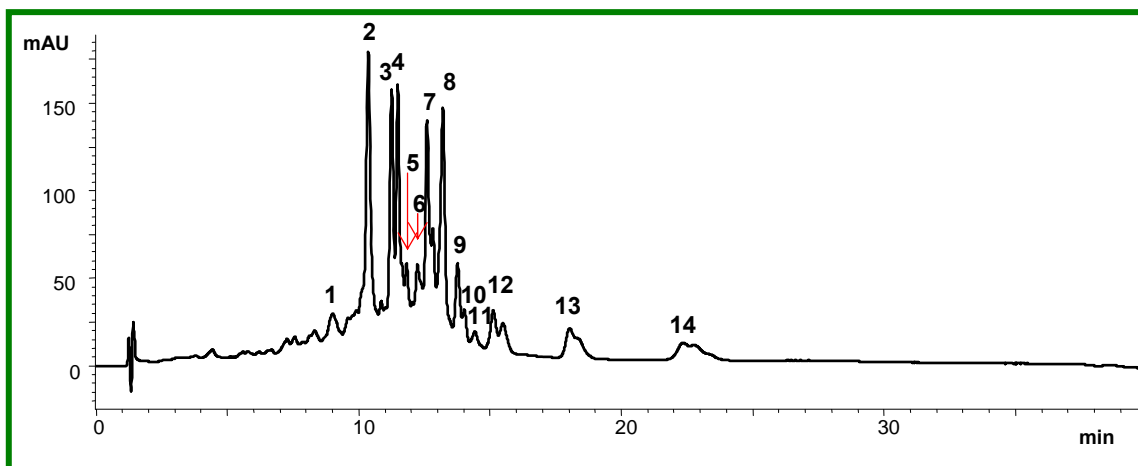


Figura III.3. Cromatograma (450 nm) del extracto de *Synechocystis* obtenido con etanol a 100 °C. La numeración de los picos se corresponde con la de la Tabla III.4.

Considerando los antecedentes bibliográficos que relacionan la capacidad antioxidante con la presencia de pigmentos como carotenoides, es de esperar que las mayores capacidades antioxidantes se encuentren en aquellos extractos con mayor contenido en carotenoides (Tablas III.2 y III.4). Cuantitativamente, el extracto de *Synechocystis* sp. obtenido con etanol a 100°C poseía un menor contenido de carotenoides comparado con el obtenido a 200°C, sobre todo en cuanto a su cantidad en β-caroteno (2.04 mg/g obtenido a 100°C frente a 11.7 mg/g obtenido a 200°C). Sin embargo, como es posible observar en la Tabla III.2, los extractos obtenidos a 100°C

con etanol presentan una mayor capacidad antioxidante (0.407 mmol de Trolox/g de extracto) que los obtenidos a 200°C (0.092 mmol de Trolox/g de extracto). Por tanto, se puede afirmar, que no existe una relación directa entre la capacidad antioxidante y la cantidad de carotenoides totales presentes en dichos extractos. A este respecto, debe considerarse que las algas son matrices complejas formadas por un gran número de compuestos diferentes, por lo que la capacidad antioxidante de un extracto puede no estar estrechamente relacionada con un grupo de compuestos específico, sino con una mezcla de componentes. Por otra parte, esta mezcla de compuestos puede presentar un efecto sinérgico, afectando por tanto a la capacidad antioxidante total. Por tanto, es necesario realizar un análisis más profundo de la presencia de otros compuestos antioxidantes (por ejemplo, tocoferoles o polifenoles), o de la posible acción sinérgica entre sus diferentes componentes (Le Tutour y col., 1998; Sánchez-Machado y col., 2002).

III.4.5. Caracterización química de los extractos por GC-MS.

Siguiendo la línea iniciada anteriormente para el análisis de los extractos más activos desde el punto de vista de su capacidad antioxidante, se seleccionaron algunos de los extractos producidos a partir de *Synechocystis* para el estudio de los posibles compuestos responsables de su actividad antimicrobiana. Considerando la escasa diferencia en actividades antimicrobianas que presentaron los extractos obtenidos a diferentes temperaturas, se seleccionaron los de 100 y 200°C con etanol, hexano y agua, con el objeto de poder observar diferencias en cuando a su composición, debidas a la variación de la temperatura de extracción. Estos extractos se analizaron por GC-MS para estudiar su composición en compuestos volátiles así como en ácidos grasos.

III.4.5.1. Análisis de la fracción volátil.

En la Tabla III.5 se muestra la composición de volátiles de los extractos mencionados anteriormente. Los datos que se presentan son: la identificación tentativa, las áreas absolutas, las áreas normalizadas (contribución relativa de cada compuesto) y los índices de retención (RI). Los compuestos se identificaron comparando sus espectros de masas con los de una biblioteca comercial de espectros de masas, así como comparando sus RI experimentales con los RI teóricos, y con la información encontrada

en la bibliografía para cada uno de los compuestos tentativamente identificados. Como se puede apreciar en la Tabla III.5, se pudieron identificar 33 diferentes compuestos volátiles en los extractos obtenidos con etanol y hexano a 100 y 200°C. Para los extractos acuosos no se obtuvieron resultados satisfactorios empleando esta técnica analítica, probablemente por que los compuestos volátiles analizados no fueron solubles en agua. Por esta razón, los datos correspondientes a los extractos acuosos se han omitido de las tablas. Unos de los compuestos que se presentaron en mayor proporción fueron el neofitadieno y sus derivados, así como, el fitol (2-hexadecen-1-ol, 3, 7, 11, 15-tetrametil) y sus derivados. Ambos se han descrito previamente como potenciales poseedores de cierta actividad antimicrobiana (Herrero y col., 2006a; Couladis y col., 2002). Otros compuestos también identificados, descritos como poseedores de cierta actividad antimicrobiana son alcanos (tetradecano, pentadecano, ciclododecano) (Ozdemir y col., 2004), iononas (4-Oxo, β -ionona) (Mihailovic y col., 2009), fenoles (fenol,2,4-bis (1,1-dimetiletil)-; y su derivado) (Mayer y Hamann, 2005), y ácidos grasos (estudiados más detalladamente en el apartado siguiente de la presente memoria). Los ácidos bencenodicarboxílicos también pueden contribuir a la actividad antimicrobiana que presentan los extractos (Rao y col., 2010; Kavitha y col., 2010), así como los compuestos pirrólicos (1H-pirrole-2,5-diona,3-etil-4-metil; y 2-pirrolidinona, 5 (-ciclohexilmetil)-) (Rodríguez-Meizoso y col., 2010; Husain y col., 2010) y los compuestos furánicos (2-furanmetanol; y 2-furancarboxaldehido 5-metil) (Mihailovic y col., 2009).

Tabla III.5. Identificación de los compuestos separados por GC-MS, área total (u.a. unidades de área), % área normalizada e índices de retención (RI) de los compuestos contenidos en los extractos de *Synechocystis sp.* obtenidos mediante PLE con etanol y hexano a 100 y 200 °C .T.R., tiempo de retención; ID, Número de picos.

| ID | TR (min) | RI | Identificación | Etanol | | Hexano | |
|------------------------------------|-------------|--------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | 100°C | 200°C | 100°C | 200°C |
| | | | | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) |
| 1 | 6.78 | < 900 | 2-Pentanona, 4-hidroxi-4-metil- | | | 12.69 | 3.49 |
| 2 | 7.19 | < 900 | 2-Furanmetanol | | | | 0.35 |
| 3 | 10.31 | 980.3 | Benzaldehido | | | | 0.20 |
| 4 | 10.42 | 983.9 | 2-Furancarboxaldehido 5-metil- | | | | 0.63 |
| 5 | 13.64 | 1087.7 | Etanona, 1-fenil- | | | 11.36 | |
| 6 | 14.49 | 1116.4 | 1,2,3-Propanetriol, 1-acetato | | | | 1.40 |
| 7 | 18.61 | 1261.1 | 1H-Pirrole-2,5-diona,3-etil-4-metil | | | | 1.74 |
| 8 | 23.15 | 1431.0 | Tetradecano | 0.83 | | | |
| 9 | 24.23 | 1477.0 | 2-Pirrolidinona, 5 (-ciclohexilmetil)- | | 6.28 | | |
| 10 | 24.48 | 1487.7 | Ácido 2-hexanedioico, bis (trimetilsilil)ester | | 4.84 | | |
| 11 | 25.40 | 1538.7 | Pentadecano | 62.65 | 28.26 | 0.55 | 46.55 |
| 12 | 25.64 | 1553.0 | 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol | | 1.40 | 10.79 | |
| 13 | 25.68 | 1555.7 | 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol (derivado) | | 0.83 | 3.85 | |
| 14 | 26.87 | 1645.0 | Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, dietil ester | | 0.97 | 3.43 | 0.79 |
| 15 | 27.39 | 1695.6 | 3,4,5,6-Tetrahidro-1,3-dimetil-2(1H)-pirimidinona | | | | 1.16 |
| 16 | 27.80 | 1735.4 | 4-Oxo, beta-ionona | | | 0.79 | |
| 17 | 28.00 | 1751.3 | Ciclododecano | | | 29.61 | |
| 18 | 28.92 | 1857.5 | Ácido tetradecanoico, etil ester | | 10.76 | | |
| 19 | 29.32 | 1906.9 | Neofitadieno | 8.20 | 4.68 | 0.65 | 11.09 |
| 20 | 29.38 | 1914.1 | 2-Hexadeceno,3,7,11,15-tetrametil- | | | 2.51 | 0.99 |
| 21 | 29.52 | 1932.0 | Neofitadieno (derivado) | 2.59 | 1.43 | | 1.96 |
| 22 | 29.60 | 1942.5 | Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis (2-metilpropil)ester | | | 2.46 | |
| 23 | 29.67 | 1950.6 | 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil, | 4.97 | 2.85 | | 6.62 |
| 24 | 29.75 | 1960.7 | Ácido hexadecanoico, etil ester | | 1.04 | | |
| 25 | 30.36 | 2045.0 | Etil 9-hexadecenoaeto | | 10.97 | | |
| 26 | 30.49 | 2065.9 | Ácido hexadecanoico, etil ester | | 12.43 | | |
| 27 | 30.51 | 2069.2 | Neofitadieno (derivado) | 1.81 | | | |
| 28 | 31.35 | 2197.5 | 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil, (derivado) | 18.95 | 13.26 | 1.87 | 5.55 |
| 29 | 32.50 | 2396.9 | Ácido tetradecanoico,2,3-dihidroxi-1-(hidroximetil) etil ester | | | | 11.24 |
| 30 | 32.65 | 2423.9 | Ácido 2-propenoico, 3-(4-metoxifenil)-, 2-etilhexil ester | | | 0.87 | |
| 31 | 33.66 | 2607.4 | Ácido hexadecanoico, 2,3-dihidroxi propil ester | | | | 5.75 |
| 32 | 33.88 | 2647.5 | Ácido 1,2- benzenodicarboxílico, bis (2-etilhexil)ester | | | 18.57 | |
| 33 | 34.69 | 2791.2 | Ácido 9-octadecenoico, metil ester | | | | 0.49 |
| ÁREAS TOTALES (area counts) | | | | 275286983 | 252741034 | 532153561 | 1271977973 |

Como puede observarse en la Tabla III.5, la composición de los extractos era diferente en función del disolvente utilizado así como de la temperatura seleccionada. Mientras que los extractos producidos con etanol poseían una cantidad total de volátiles similar, la cantidad que se determinó en los extractos de hexano se incrementaba conforme aumentaba la temperatura de extracción. En cualquier caso, comparando

extractos producidos con la misma temperatura de extracción, el hexano era el disolvente que producía una mayor cantidad de compuestos volátiles.

Si comparamos la composición de compuestos volátiles en los extractos obtenidos con etanol a diferentes temperaturas se puede apreciar que ambos extractos difieren mucho entre sí. Mientras que el extracto que se obtuvo a 100°C estaba compuesto básicamente de alcanos, neofitadieno y derivados, y fitol y derivados. El extracto obtenido con etanol a 200°C presentaba mayor variedad de compuestos volátiles. En cuanto a la composición de volátiles que se pudieron encontrar en los extractos obtenidos con hexano a diferentes temperaturas fue muy variada. En los extractos que se obtuvieron a 200°C el compuesto predominante fue el pentadecano (46%), sin embargo, en los extractos obtenidos a 100°C fue el ciclododecano (30%).

III.4.5.2. Análisis de los ácidos grasos.

En cuanto al análisis de los ácidos grasos presentes en los extractos de etanol y hexano a 100 y 200°C, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.6. Por otra parte, en la Figura III.4 se muestra, a modo de ejemplo, un cromatograma obtenido tras el análisis de ácidos grasos metilados del extracto de *Synechocystis* obtenido con etanol a 200°C. Como se puede apreciar en dicha tabla, los principales compuestos detectados fueron los ácidos mirístico (C_{14}), palmitoleico ($C_{16:1}$) y palmítico (C_{16}), llegando a representar estos tres componentes, hasta más del 94% del área total de los cromatogramas. Otros ácidos grasos presentes en menor concentración, pero asimismo de importancia desde el punto de vista funcional fueron los ácidos oleico ($C_{18:1}$), 11-octadecenoico ($C_{18:1}$) o el ácido linoleico. Por tanto, *Synechocystis* sp. es una microalga rica en ácidos grasos libres saturados y monoinsaturados.

Como se puede observar en la Tabla III.6, los extractos obtenidos a 200°C, independientemente del disolvente empleado, presentaron mayores áreas totales (unidades de área) que los extractos obtenidos a 100°C, así como una mayor complejidad en cuanto al número de compuestos que fueron determinados. No obstante, comparando los diferentes disolventes de extracción, los extractos obtenidos con hexano presentaron mayores cantidades de ácidos grasos.

Tabla III.6. Identificación por GC-MS de los ácidos grasos (metil ésteres) encontrados en los extractos de *Synechocystis* obtenidos mediante PLE con hexano y etanol a 100 y 200°C. Contribución de cada pico al área total (% área normalizada). ID: Número de pico en la Figura III.4. T.R., tiempo de retención.

| ID | TR (min) | Ácidos grasos (metil ésteres) | Nombre común | Etanol | | Hexano | |
|---------------------------|----------|-------------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | | 100°C | 200°C | 100°C | 200°C |
| | | | | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) |
| 1 | 6.55 | Ácido tetradecanoico | Ácido mirístico | 54.92 | 36.73 | 19.22 | 34.68 |
| 2 | 7.2 | Ácido pentadecanoico | | | 2.08 | | 1.84 |
| 3 | 7.95 | Ácido hexadecanoico | Ácido palmítico | | 14.29 | 33.31 | 14.59 |
| 4 | 8.23 | Ácido 9-hexadecenoico | Ácido palmitoleico | 45.08 | 43.01 | 28.51 | 42.51 |
| 5 | 10.04 | Ácido octadecanoico | Ácido esteárico | | 1.37 | | 0.89 |
| 6 | 10.40 | Ácido 9-octadecenoico | Ácido oleico | | 0.89 | 18.96 | 1.34 |
| 7 | 10.50 | Ácido 11-octadecenoico | | | 1.64 | | 2.67 |
| 8 | 11.15 | Ácido 9,12-octadecadienoico | Ácido linoleico | | | | 1.47 |
| TOTAL AREAS (u.a.) | | | | 2975484 | 142126921 | 6689105 | 492495901 |

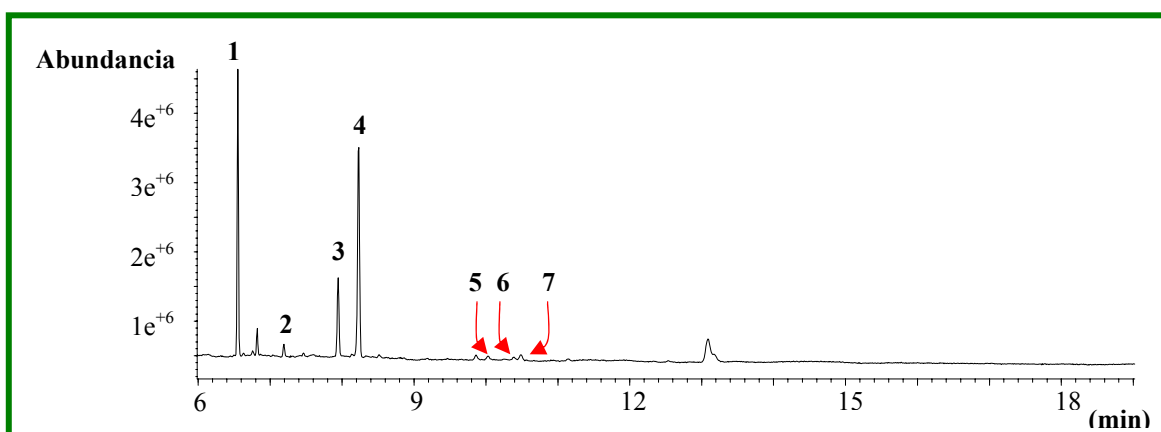


Figura III.4. Cromatograma de GC-MS correspondiente a los ácidos grasos detectados en el extracto de *Synechocystis* obtenido mediante PLE empleando etanol a 200°C. La numeración de los picos corresponde con la dada en la Tabla III.6.

En un intento de relacionar las actividades antimicrobianas con la presencia de compuestos volátiles y ácidos grasos, se estudiaron las posibles tendencias en los resultados presentados. Por ejemplo, si se realiza una comparación teniendo en cuenta las áreas totales presentadas, se puede apreciar que la cantidad de volátiles determinada en los extractos obtenidos a 200°C, independientemente del disolvente empleado, fue más elevada que la obtenidas a 100°C, pudiéndose relacionar esto con la actividad bactericida que presentan dichos extractos, ya que ésta fue mayor en los extractos obtenidos a altas temperaturas. Aun así, las diferencias en cuanto a cantidad de compuestos volátiles es muy grande si comparamos las distintas temperaturas de extracción, no existiendo unas diferencias tan grandes de actividad antimicrobiana si comparamos las distintas temperaturas de extracción. Asimismo, el hexano presentó la mayor cantidad de volátiles, con cantidades muy superiores a las encontradas en los

extractos de etanol. Esto no parece corroborar los resultados de las actividades antimicrobianas que presentó el hexano, dado que dicha actividad fue ligeramente menor a la de los extractos de etanol, como se puede ver en la Tabla III.3.

Por otro lado, se obtienen resultados equivalentes teniendo en cuenta la composición de ácidos grasos de las muestras analizadas. De nuevo, los extractos obtenidos con hexano presentaron una mayor cantidad total de ácidos grasos libres mientras que la actividad antimicrobiana de estos extractos era menor en comparación con la que presentaban los extractos obtenidos con etanol.

Por tanto, a la vista de estos resultados se puede concluir que, dado que la cantidad de compuestos volátiles y ácidos grasos en los extractos de etanol es claramente inferior a la obtenida con hexano, y que, sin embargo, la actividad antimicrobiana proporcionada por los extractos de etanol es ligeramente mayor (ver Tablas III.3, III.5 y III.6), la presencia de estos dos tipos de compuestos detectados por GC-MS no es suficiente para explicar dicha actividad. Sin embargo, los extractos producidos con agua presentaron una menor actividad antimicrobiana comparada con los anteriores obtenidos con disolventes orgánicos, no encontrándose en ellos cantidades apreciables de compuestos volátiles ni de ácidos grasos libres. Asimismo, cabe suponer que pudieran existir diferentes sinergias entre los compuestos presentes en los extractos más activos, que pudieran tener una influencia positiva en la actividad mostrada por los diferentes extractos.

III.5. CONCLUSIONES.

En este estudio se ha demostrado la capacidad de la PLE para obtener extractos con capacidad antioxidante y antimicrobiana de la microalga *Synechocystis* sp., obteniéndose elevados rendimientos de extracción empleando agua y etanol a altas temperaturas.

Las mejores capacidades antioxidantes de los extractos obtenidos mediante PLE se consiguieron empleando disolventes con polaridad media-alta, como fueron etanol a 100-150°C (0.407-0.466 mmol de Trolox/g de extracto, respectivamente) y agua a

200°C (0.330 mmol de Trolox/g de extracto).

Asimismo, los extractos de etanol y hexano proporcionaron actividades antimicrobianas razonablemente elevadas.

Se caracterizaron químicamente los extractos con una mayor capacidad antioxidante (obtenidos con etanol y agua a 100 y 200°C) mediante HPLC-DAD. De esta forma se pudieron identificar algunos de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante como fueron diferentes carotenoides (tales como mixoxantofila, zeaxantina, equinenona y β -caroteno). Aún así, la sola presencia de estos compuestos no fue suficiente para explicar la capacidad antioxidante de estos extractos. Asimismo, los extractos de etanol a 100°C poseían menor concentración de carotenoides y mayor capacidad antioxidante que los obtenidos a 200°C. Además, los extractos de agua que presentaron alta capacidad antioxidante no mostraron la presencia de estos compuestos.

Mediante GC-MS se determinaron los compuestos volátiles y los ácidos grasos que podían contribuir a la actividad antimicrobiana asociada a los extractos que presentaron mayor actividad (obtenidos con etanol y hexano a 100 y 200°C), aunque su sola presencia no pudo explicar la actividad asociada a los extractos obtenidos por etanol, ya que éstos presentaban valores ligeramente mayores de actividad antimicrobiana que los extractos de hexano. Sin embargo, estos últimos presentaron cantidades muy superiores de compuestos volátiles y de ácidos grasos.

Considerando los resultados de este capítulo, se puede concluir que el etanol es el disolvente más apropiado para la obtención de extractos con propiedades funcionales a partir de *Synechocystis* sp., debido, fundamentalmente, a sus elevados rendimientos, sus elevadas actividades biológicas y a que es un disolvente considerado seguro para la industria alimentaria.

CAPÍTULO IV:

“Obtención de extractos con actividad antioxidante y antimicrobiana de *Cystoseira abies-marina* mediante el empleo de extracción con líquidos presurizados. Caracterización química y funcional”

IV.1. INTRODUCCIÓN.

Cystoseira abies-marina es una macroalga marrón que se engloba dentro del orden Fucales, familia Cystoseiraceae, clase Phaeophyceae, género *Cystoseira*. Este organismo es muy común en las Islas Canarias. De ahí, que sea también denominada comúnmente como “*Cystoseira canariensis*”. Se trata de un alga arbustiva con tonos pardo-amarillentos, muy ramificada que puede alcanzar hasta 50 cm de altura (Figura IV.1). Esta macroalga puede ser buena fuente de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas, conteniendo bajos niveles de lípidos.



Figura IV.1. Fotografía de la macroalga *Cystoseira abies-marina*.

La información disponible en la bibliografía acerca de la composición de esta especie de algas no es muy numerosa, dado que no se ha estudiado extensamente. Por ello, *C. abies-marina* es una macroalga aún muy desconocida en cuanto a su composición química y sus propiedades funcionales. No obstante, se ha visto que esta alga posee un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados y en monogalactosildiacilgliceroles (Moreno y col., 1998). Además, se comprobó que los ácidos grasos presentes formando parte de triacilgliceroles y fosfolípidos estaban formados mayoritariamente por ácido araquidónico y por ácido eicosapentaenoico. Asimismo, el principal esteroles que se encontró en esta macroalga fue el fucosterol.

De igual manera, también se ha comprobado cómo esta especie de alga marrón puede contener polisacáridos sulfatados (Ramazanov y col., 2003). Estos polisacáridos sulfatados comprenden un complejo grupo de macromoléculas con un amplio intervalo de propiedades fisiológicas. Los autores demostraron que estas propiedades parecen estar unidas y regulan directamente la bioactividad de los factores de crecimiento y citoquinas, tales como el factor básico de crecimiento de los fibroblastos, interferón,

varias enzimas y la transformación del factor de crecimiento.

Asimismo, otros compuestos interesantes, como terpenos con demostrada actividad antimicrobiana, se han determinado en otras especies del género *Cystoseira* (Kukovinets y Kislitsyn, 2006). De hecho se ha constatado la actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos de extractos obtenidos a partir de diferentes especies de *Cystoseria* (Ozdemir y col., 2006; Zinedine y col., 2004).

El presente capítulo describe el estudio de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de *Cystoseira abies-marina* obtenidos mediante PLE.

IV.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El objetivo del presente trabajo fue el de encontrar las condiciones más adecuadas de extracción mediante PLE para obtener extractos con mayor capacidad antioxidante y antimicrobiana a partir de *Cystoseira abies-marina*, así como proceder a la caracterización exhaustiva de los compuestos presentes en estos extractos que pudieran asociarse con dichas actividades.

Para alcanzar este objetivo general, se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Obtención de los extractos de *Cystoseira abies-marina* a diferentes condiciones de extracción, incluyendo diferentes combinaciones disolvente-temperatura (como son agua, etanol y hexano a 50, 100, 150 y 200°C).
2. Evaluación funcional de los extractos obtenidos mediante el empleo de ensayos *in vitro*, para la determinación de su capacidad antioxidante y de su actividad antimicrobiana.
3. Caracterización química de los extractos activos mediante HPLC-DAD y GC-MS para la detección e identificación de los compuestos potencialmente responsables de la actividad observada, tales como carotenoides, clorofilas, compuestos volátiles ó ácidos grasos.

IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.3.1. Muestras y reactivos.

Las muestras de *Cystoseira abies-marina* (también llamada *Cystoseira canariensis*) (Figura IV.2) consistieron en macroalgas secadas al sol, procedentes de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Canarias, España). Las muestras se almacenaron en todo momento protegidas del oxígeno, la humedad y la luz.



Figura IV.2. Imagen de la macroalga *Cystoseira abies-marina* seca empleada en este trabajo.

Los disolventes, reactivos y patrones de compuestos puros que se emplearon en el presente trabajo fueron semejantes a los ya descritos en el Capítulo II de la presente Memoria.

IV.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE).

Para llevar a cabo las extracciones de la alga marrón *Cystoseira abies-marina* se utilizaron de nuevo tres diferentes disolventes (etanol, agua, y hexano) con el fin de obtener extractos con una diferente composición. Las extracciones se llevaron a cabo a cuatro temperaturas distintas de extracción (50, 100, 150, y 200°C) manteniendo un tiempo de extracción estático de 20 minutos.

Todas las extracciones se realizaron en una celda de 11 mL empleando 1.5 g de muestra. En el caso de las extracciones con agua, para evitar la obstrucción del sistema de extracción, la muestra se introdujo mezclada con arena de mar empleando una disposición de tipo sándwich (se colocaron 6 g de arena de mar, después la muestra y por último 2 g de arena de mar).

Tanto el equipamiento utilizado para la extracción presurizada con disolventes, como el modo de funcionamiento del mismo fueron equivalentes a los descritos en el Capítulo II.

IV.3.3. Caracterización funcional.

IV.3.3.1. Capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de los extractos de *Cystoseira abies-marina* obtenidos por PLE, se determinó empleando el método TEAC, cuyos fundamentos se han expuesto en el Capítulo I, siguiendo idéntico protocolo al descrito en el Capítulo II de la presente Memoria.

IV.3.3.2. Actividad antimicrobiana.

Los extractos de *Cystoseira abies-marina* obtenidos por PLE empleando diferentes disolventes se estudiaron individualmente frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Candida albicans* ATCC 60193 y *Aspergillus niger* ATCC 16404, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo II.

IV.3.4. Caracterización química.

IV.3.4.1. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC).

En este estudio, como método complementario para la caracterización de los extractos de *Cystoseira abies-marina* obtenidos mediante PLE se utilizó un método de cromatografía en capa fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*). Esta técnica permitió una primera identificación tentativa de los compuestos presentes en los distintos extractos. Para llevar a cabo la TLC, se emplea una plana y relativamente delgada de un material que a la vez es el soporte, o bien recubre una superficie de vidrio, de plástico o metálica. La fase móvil empleada se mueve a través de la fase estacionaria por capilaridad.

El protocolo de análisis utilizado fue el siguiente: se depositaron 9 μl de los diferentes extractos a analizar a una concentración de 30 mg/ml sobre la placa cromatográfica (Silicagel 60 F254, Merk, Darmstad, Alemania). La muestra se dejó secar, y una vez seca se introdujo en el interior de una cubeta de elución para TLC que contenía la fase móvil. La placa se mantuvo sumergida el tiempo necesario hasta que el frente de avance de la fase móvil alcanzó el final de la misma. El avance se produjo por capilaridad, y en todo momento, la cubeta y la placa se mantuvieron cerradas para evitar la modificación de la composición de la fase móvil por evaporación de alguno de sus componentes. Para llevar a cabo estos análisis se utilizaron dos tipos de fases móviles, de diferente polaridad, la Fase 1 compuesta por tolueno, acetato de etilo y ácido fórmico (5:4:1) y la Fase 2 compuesta por éter de petróleo y acetona (3:1).

IV.3.4.2. Análisis mediante cromatografía de líquidos (HPLC-DAD).

Para su correcto análisis por HPLC-DAD, los extractos secos se disolvieron de la siguiente manera antes de ser analizados: los extractos obtenidos con etanol y agua se disolvieron en etanol mientras que los obtenidos con hexano lo hicieron en acetona, todos a la misma concentración de 10 mg/ml.

Tanto el equipamiento utilizado para obtener la composición de pigmentos de los diferentes extractos, como el método de análisis empleado se han descrito en el Capítulo II.

Asimismo se obtuvieron las curvas de calibrado para la cuantificación de los diferentes carotenoides y clorofilas presentes en las muestras. Para ello se inyectaron cuatro cantidades diferentes (de 0.02 a 0.08 μg) de cada uno de los patrones de fucoxantina, zeaxantina, clorofila *a* y clorofila *b* y cuatro cantidades (de 0.15 a 18 μg) de all-trans- β -caroteno. Cada patrón se preparó empleando el solvente apropiado: fucoxantina y zeaxantina en etanol, clorofila *a* y *b* en acetona, y β -caroteno en diclorometano. La ecuación de la recta de regresión para cada calibrado externo se obtuvo representando la concentración de cada patrón inyectado frente al área del pico correspondiente a este compuesto. Las ecuaciones para los diferentes compuestos así como sus respectivos coeficientes de correlación se muestran en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Ecuaciones de las rectas de regresión de los patrones de carotenoides y clorofilas obtenidos por HPLC-DAD (450 nm).

| Compuesto | Ecuación de la recta de regresión ^a | Coefficiente de correlación (r^2) |
|----------------------|--|---------------------------------------|
| Fucoxantina | $Y = 2017775x + 122.7$ | 0.9871 |
| Zeaxantina | $Y = 12189189x + 5.6$ | 0.9993 |
| β -caroteno | $Y = 992031x - 109.4$ | 0.9999 |
| Clorofila <i>b</i> | $Y = 4042366x + 33.3$ | 0.9905 |
| Clorofila <i>a</i> * | $Y = 4004070x - 0.2$ | 0.9999 |

^a Y es el valor del área del pico. X es el valor de la cantidad de muestra inyectada (mg). *Detección a 660 nm.

IV.3.4.3. Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

IV.3.4.3.1. Análisis de la fracción volátil.

Con el objeto de caracterizar los compuestos volátiles presentes en los extractos, éstos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Tanto el equipamiento utilizado para estudiar la composición de la fracción volátil, como el método empleado están descritos en el Capítulo II de la presente Memoria.

IV.3.4.3.2. Análisis de ácidos grasos.

Para llevar a cabo el análisis por GC-MS de los ácidos grasos de los extractos de *Cystoseira abies-marina* obtenidos por PLE, se llevó a cabo la derivatización previa de las muestras para formar los metil-ésteres. Tanto el protocolo empleado para la metilación de los ácidos grasos, como el equipo y el método utilizados para el análisis de estos compuestos están descritos en el Capítulo II.

IV.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.4.1. Extracción por PLE.

Las condiciones de extracción empleadas, así como los resultados obtenidos en términos de rendimiento de extracción y capacidades antioxidantes se recogen en la Tabla IV.2. En general, como se puede apreciar, los rendimientos de extracción (expresado como % de extracto seco respecto a la cantidad inicial de macroalga) fueron

mayores al aumentar la temperatura de extracción. Este hecho se ha comentado previamente en capítulos anteriores de la presente Memoria. Este efecto, aunque notable en todos los disolventes empleados, ocurre en menor medida para el hexano que proporciona, en general, rendimientos 5 veces inferiores a los obtenidos con etanol y/o agua. De todas las condiciones ensayadas, los mejores rendimientos se obtuvieron trabajando con agua subcrítica a 200°C. En estas condiciones existen dos mecanismos importantes que pueden contribuir al aumento del rendimiento: por una parte, la ya comentada influencia de la temperatura en la solubilidad y transferencia de materia y, por otra, la disminución de la constante dieléctrica del agua con la temperatura, la cual desciende hasta valores próximos a 27 a 200°C. Asimismo, cabe destacar que, en este caso, las diferencias observadas en cuanto a los máximos rendimientos alcanzables utilizando etanol y agua fueron menores que las comentadas en los capítulos anteriores, correspondientes a muestras de microalgas.

Tabla IV.2. Condiciones de extracción (disolvente y temperatura de extracción), rendimientos obtenidos (% de peso seco) y capacidad antioxidante TEAC de los extractos obtenidos por PLE a partir de *Cystoseira abies-marina*.

| Disolvente (constante dieléctrica, ϵ) | Temperatura de extracción (°C) ¹ | Rendimiento (%) | Capacidad antioxidante ² |
|--|--|-----------------|-------------------------------------|
| Agua (78.5) | 50 | 8.7 | 0.339 ± 0.003 |
| | 100 | 10.8 | 0.242 ± 0.005 |
| | 150 | 20.4 | 0.370 ± 0.007 |
| | 200 | 24.3 | 1.073 ± 0.024 |
| Etanol (24.3) | 50 | 6.4 | 0.750 ± 0.044 |
| | 100 | 7.1 | 1.241 ± 0.020 |
| | 150 | 11.0 | 1.158 ± 0.036 |
| | 200 | 17.1 | 0.801 ± 0.021 |
| Hexano (1.9) | 50 | 0.7 | 0.752 ± 0.053 |
| | 100 | 1.4 | 1.015 ± 0.017 |
| | 150 | 3.3 | 1.013 ± 0.109 |
| | 200 | 4.7 | 0.555 ± 0.046 |

¹Tiempo de extracción 20 min. ²Capacidad antioxidante expresada como TEAC (mmol de Trolox/g de extracto).

IV.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos.

De igual manera, en la Tabla IV.2 se muestran los resultados del estudio de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante PLE a partir de *Cystoseira abies-marina*, determinados mediante el ensayo TEAC. Como se puede apreciar, la mayor capacidad antioxidante se obtuvo con extractos de etanol y hexano a temperaturas medias de extracción (1.241-1.158 mmol de Trolox/g de extracto, para los extractos de etanol y 1.015-1.013 mmol de Trolox/g de extracto, para los extractos de hexano, a 100 y 150 °C, respectivamente) y con el extracto acuoso obtenido a 200°C

(1.073 mmol de Trolox/g de extracto). En el caso del empleo de los disolventes orgánicos para la extracción, la capacidad antioxidante aumentaba hasta los 100°C, para mantenerse prácticamente estable a 150 °C. Un posterior aumento de la temperatura hasta 200°C producía una disminución en la capacidad antioxidante determinada en dichos extractos. Aunque las actividades mostradas por los extractos obtenidos con etanol y hexano fueron parecidas, los valores de los extractos de etanol a una temperatura determinada fueron siempre ligeramente superiores. Sin embargo, la tendencia cuando se utilizó agua como disolvente de extracción fue diferente. En este caso, a temperaturas medias se producía un incremento leve de la capacidad antioxidante de los extractos; sin embargo, cuando se utilizaban temperaturas de extracción más altas, la capacidad antioxidante de los extractos generados mejoraba notablemente. En resumen, estos resultados pueden sugerir la presencia en *Cystoseira abies-marina* de antioxidantes de polaridad media-baja.

IV.4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos.

Como se puede observar en la Tabla IV.3, los extractos de hexano, etanol y agua presentaron cierta actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, mientras que el crecimiento de *Aspergillus niger* prácticamente no se vio afectado.

Tabla IV.3. Valores medios de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos mediante PLE de *Cystoseira abies-marina*.

| Disolvente | T (°C) | <i>Escherichia coli</i> MBC ^a | <i>Staphylococcus aureus</i> MBC | <i>Candida albicans</i> MFC ^b | <i>Aspergillus niger</i> MFC |
|---------------------------|--------|---|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| Hexano | 50 | 6.00 | 8.50 | 10.25 | 18.00 |
| | 100 | 6.00 | 8.50 | 10.25 | 18.00 |
| | 150 | 6.50 | 9.00 | 9.00 | 18.00 |
| | 200 | 6.50 | 9.00 | 8.50 | 17.00 |
| Etanol | 50 | 6.50 | 8.50 | 10.00 | 18.00 |
| | 100 | 5.50 | 8.50 | 9.00 | 17.00 |
| | 150 | 2.25 | 4.50 | 8.00 | 17.00 |
| | 200 | 2.25 | 6.00 | 8.251 | 17.00 |
| Agua | 50 | 15.00 | 13.00 | 14.00 | 22.00 |
| | 100 | 15.00 | 12.00 | 14.00 | 20.00 |
| | 150 | 12.00 | 7.00 | 13.00 | 18.00 |
| | 200 | 12.50 | 6.00 | 13.00 | 18.00 |
| Antibiótico de referencia | | 10.00 | 10.00 | 100.00 | 150.00 |

^a: MBC: Concentración Mínima Bactericida. ^b: MFC: Concentración Mínima Fungicida. Los valores MBC y MFC son dados como mg/ml para las muestras y como µg/ml para el antibiótico.

En general, los extractos obtenidos con etanol presentaron una actividad

significativamente más alta contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que los extractos de hexano. Por otro lado, los extractos obtenidos con agua a altas temperaturas mostraron una relativamente buena actividad bactericida contra *Staphylococcus aureus*, comparable a los extractos de hexano y etanol, siendo menor la actividad bactericida contra los demás microorganismos si se compara con los otros dos disolventes (a la misma temperatura de extracción). En términos absolutos, la mejor actividad antimicrobiana fue la de los extractos obtenidos con etanol a 200°C frente a *E. coli*. Estos valores de actividad fueron asimismo mayores que los mostrados por los extractos de diferentes algas estudiados hasta el momento.

Estos datos parecen indicar que la extracción de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana de *C. abies-marina* está ligada a la polaridad del disolvente de extracción. De hecho, los disolventes orgánicos fueron más efectivos a la hora de extraer compuestos antimicrobianos de esta macroalga. Aún así, el etanol, cuya polaridad es más alta que la del hexano, mostró la mejor extracción de este tipo de compuestos.

Analizando la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos en función de la temperatura de extracción (Tabla IV.3) se puede observar que, en general, la actividad aumenta con el incremento de la temperatura de extracción desde 100 a 200°C para los disolventes de mayor polaridad (etanol y agua). Por tanto, del análisis de estos resultados se puede concluir que la temperatura más adecuada para la extracción de compuestos antimicrobianos procedentes de *Cystoseira abies-marina* es de 150-200°C.

En general, teniendo en cuenta los resultados frente a los cuatro microorganismos utilizados, se puede concluir que las condiciones más adecuadas de extracción mediante PLE para la obtención de compuestos con actividad antimicrobiana de *C. abies-marina* consisten en el empleo de etanol como disolvente de extracción a una temperatura de 150°C.

IV.4.4. Caracterización química de los extractos por TLC y HPLC-DAD.

La cromatografía en capa fina (TLC) se utilizó como método complementario de caracterización de los extractos de *Cystoseira abies-marina* obtenidos mediante PLE.

Esta técnica permitió una primera identificación tentativa de los diferentes carotenoides presentes en los distintos extractos. Como se ha comentado en el apartado correspondiente (IV.3.4.1), la TLC se llevó a cabo empleando dos eluyentes distintos, con diferente polaridad, para mejorar la separación de los compuestos de la muestra. Para ello se utilizó como eluyente 1: tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (5:4:1, v/v/v) y como eluyente 2: éter de petróleo/acetona (3:1, v/v).

En la Figura IV.3 se presenta la placa de TLC correspondiente al análisis de los diferentes extractos obtenidos empleando los eluyentes anteriormente mencionados. Como se puede observar, se detectó la presencia de varias bandas, que se identificaron tentativamente gracias a los datos encontrados en la bibliografía sobre los carotenoides presentes en las algas marrones y los Rf de dichos carotenoides (Haugan y Liaaen-Jensen, 1989; Schiedt, 1995). Considerando la separación de las bandas en la TLC de la Figura IV.3B, es posible afirmar que los carotenoides mayoritarios en los extractos de etanol y hexano son la fucoxantina y el β -caroteno. Asimismo, es posible detectar la presencia de otros carotenoides más polares y la ausencia total de pigmentos (carotenoides, clorofilas) en los extractos de agua.

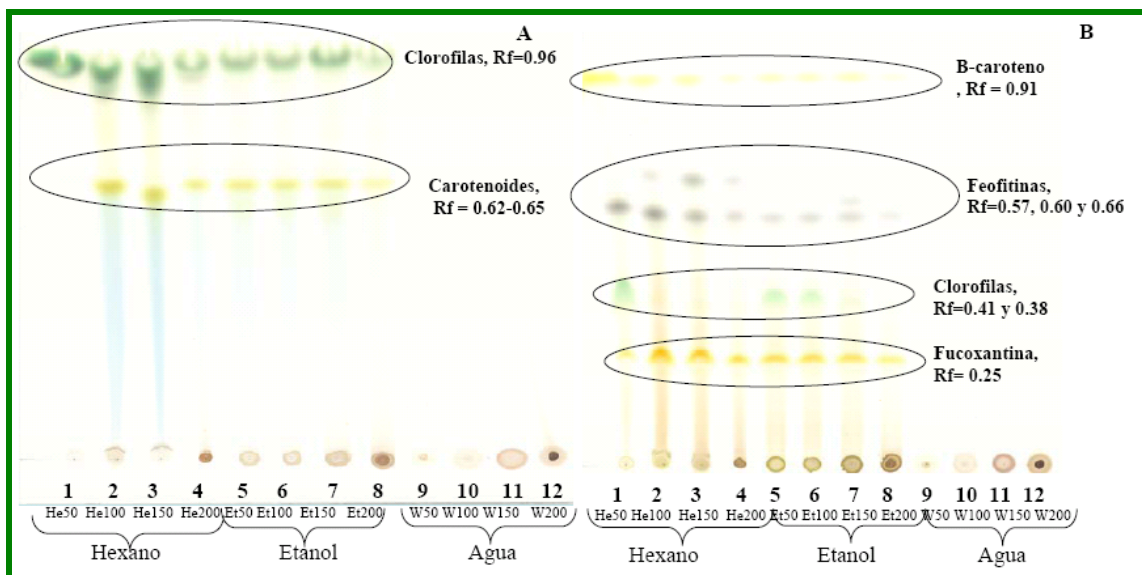


Figura IV.3. Análisis por TLC de los extractos obtenidos por PLE con los diferentes disolventes (hexano, etanol y agua) y a distintas temperaturas (50, 100, 150 y 200 °C) a partir de *Cystoseira abies-marina*. (A) Eluyente 1: tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico (50/40/10) y (B) eluyente 2: éter de petróleo/acetona (75/25).

Tras este análisis preliminar por TLC, se llevó a cabo el análisis mediante HPLC-DAD de los extractos que mejores actividades funcionales presentaban. A modo

de ejemplo se muestra en la Figura IV.4 el cromatograma obtenido del extracto de etanol a 100°C.

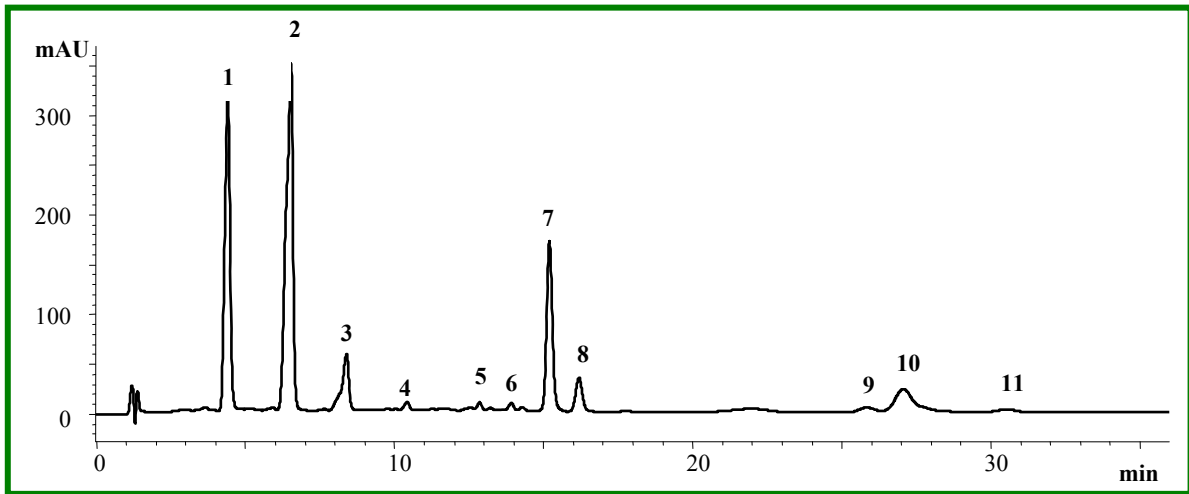


Figura IV.4. Cromatograma de HPLC-DAD (450 nm) del extracto de *C. abies-marina* obtenido mediante PLE utilizando etanol a 100°C. Identificación de picos: 2, fucoxantina; 4, zeaxantina; 5, clorofila *b*; 7, clorofila *a*; 9, α -caroteno; 10, β -caroteno; 3, carotenoide no identificado; y 1, 6, 8, 11, clorofila no identificada.

En ellos se puede apreciar un perfil complejo, con la presencia de un elevado número de compuestos. Concretamente, se constató la presencia de fucoxantina y β -caroteno, carotenoides ya identificados como mayoritarios mediante TLC (Figura IV.3).

Los compuestos identificados para los cuales se contaba con patrones comerciales se cuantificaron en los diferentes extractos. En la Tabla IV.4 se muestra la concentración de cada uno de los pigmentos (mg/g de muestra). La cuantificación se basó en las curvas de calibrado que se muestran en la Tabla IV.1. Como se puede observar no se presenta ninguna información relativa a los extractos de agua, ya que en estas muestras no se encontraron cantidades significativas de estos pigmentos.

Tabla IV.4. Contenido en carotenoides y clorofilas (mg compuesto/g muestra) de los extractos de *Cystoseira abies-marina* obtenidos mediante PLE a diferentes condiciones de extracción.

| Disolvente | T (°C) | Fucoxantina | Zeaxantina | β -Caroteno | Clorofila <i>a</i> | Clorofila <i>b</i> |
|------------|--------|-------------|------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Etanol | 100 | 7.160 | 0.047 | 5.508 | 5.433 | 0.080 |
| | 200 | 2.100 | 0.020 | 2.110 | 0.799 | 0.015 |
| Hexano | 100 | 12.455 | 0.019 | 16.823 | 0.124 | --- |
| | 200 | 9.350 | 0.132 | 13.500 | 0.141 | --- |

Los resultados muestran una disminución en la concentración de carotenoides conforme aumenta la temperatura de extracción mediante PLE. Esto puede deberse a

que a altas temperaturas los carotenoides pueden sufrir rupturas o variaciones en su estructura. Comparando los datos de los extractos de etanol y hexano, se puede observar como la concentración de carotenoides extraídos con hexano es mucho mayor que la extraída con etanol. Sin embargo, la capacidad antioxidante no sigue la misma tendencia por lo que es posible concluir que la presencia de otro tipo de compuestos (como por ejemplo, compuestos fenólicos, terpenos, etc.) en los extractos de etanol puede tener una influencia decisiva en la capacidad antioxidante total.

Considerando los antecedentes bibliográficos que relacionan la capacidad antioxidante con la presencia de pigmentos, como carotenoides, es de esperar que las mayores capacidades se encuentren en aquellos extractos con mayor contenido en carotenoides (Tablas IV.2 y IV.4). Si comparamos la concentración de carotenoides presentes en los extractos de etanol y hexano, se observa que la mayor capacidad antioxidante corresponde al extracto con mayor concentración de carotenoides, estos extractos son los que se obtienen a 100°C. También se observa que los extractos obtenidos con agua a 200°C presentan una elevada capacidad antioxidante, pero no poseen carotenoides, lo que parece indicar que en esas condiciones se extraen otros compuestos con importante capacidad antioxidante, como son los compuestos fenólicos, o bien que se puede favorecer la formación de nuevos antioxidantes derivados de reacciones no enzimáticas, como es la reacción de Maillard o la reacción de caramelización (Rodríguez-Meizoso y col., 2010).

IV.4.5. Caracterización química de los extractos por GC-MS.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se empleó para caracterizar los compuestos volátiles, así como los ácidos grasos presentes en los extractos de *Cystoseira abies-marina* que presentaron una mayor actividad antimicrobiana.

IV.4.5.1. Análisis de la fracción volátil.

A modo de ejemplo, en la Figura IV.5 se muestran los cromatogramas obtenidos por GC-MS correspondientes a la fracción volátil de los extractos producidos de hexano y etanol obtenidos a 200 y 100°C, respectivamente.

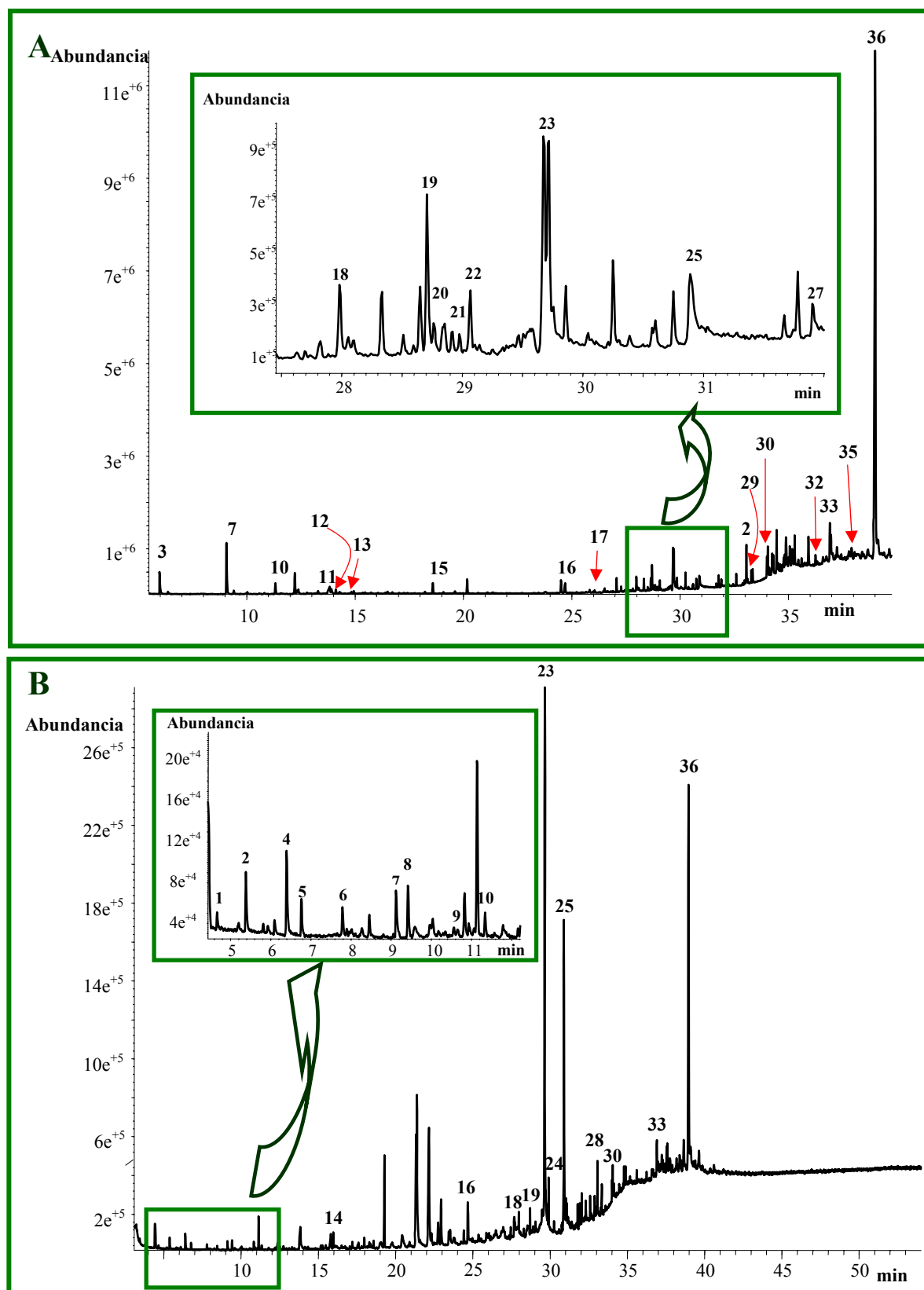


Figura IV.5. Cromatogramas obtenidos por GC-MS correspondientes a los compuestos volátiles identificados en los extractos de *Cystoseira* obtenidos por PLE empleando (A) hexano a 200°C y (B) etanol a 100°C. La numeración de los picos corresponde con la dada en la Tabla IV.5.

En la Tabla IV.5 se muestra la composición de volátiles que pudieron ser satisfactoriamente identificados por GC-MS en los extractos con mayor actividad

antimicrobiana. En dicha tabla se muestra la identificación tentativa de los compuestos separados, las áreas normalizadas (contribución relativa de cada compuesto) para cada extracto, así como sus índices de retención (RI). Los compuestos se identificaron comparando sus espectros de masas con aquellos almacenados en la biblioteca de MS, así como comparando sus RI experimentales con los RI teóricos, y con la información encontrada en la bibliografía para cada uno de los compuestos tentativamente identificados. La información relativa a los extractos de PLE producidos con agua no se muestra en esta tabla, ya que no se obtuvieron resultados satisfactorios empleando esta técnica analítica probablemente debido a que estos compuestos volátiles no fueron solubles en agua.

Tabla IV.5. Compuestos identificados mediante GC-MS, área total (u.a. unidades de área), % área normalizada (% A. Norm.) y sus índices de retención calculados (RI), encontrados en los extractos de *C. abies-marina* producidos por PLE.T.R., tiempo de retención; ID, números de picos.

| ID | T.R. (min) | RI | Compuesto | Etanol | | Hexano | |
|-----------------------------|---------------|--------|--|------------|------------|------------|------------|
| | | | | 100°C | 200°C | 100°C | 200°C |
| | | | | % A. Norm. | % A. Norm. | % A. Norm. | % A. Norm. |
| 1 | 4.45 | <900 | Propana-2,2-dietoxi- | | 4.55 | | |
| 2 | 5.40 | <900 | Ácido propanoico, 2-hidroxi-, etil ester | | 0.95 | | |
| 3 | 5.98 | <900 | 2-Pentanona, 4-hidroxi-4-metil- | | 1.29 | 1.92 | 2.22 |
| 4 | 6.41 | <900 | 2-Furanmetanol | | 0.66 | | |
| 5 | 6.78 | <900 | 2-Propanona, 1-(acetiloxi)- | | 0.42 | | |
| 6 | 7.80 | 901.2 | Ácido butanoico, 2-hidroxi-, etil ester | | 0.92 | | |
| 7 | 9.06 | 941.1 | 2(5H)-Furanona-5,5-dimetil | 2.00 | 0.95 | 4.48 | 3.65 |
| 8 | 9.43 | 952.5 | 2-Furancarboxaldehido,5-metil(5-metilfurfural) | | 0.92 | | |
| 9 | 10.82 | 996.5 | 1H-pirrol-2-carboxaldehido | | 0.81 | | |
| 10 | 11.32 | 1012.6 | 2-Ciclopenten-1-ona, 2-hidroxi-3-metil- | | 4.21 | 0.99 | |
| 11 | 13.82 | 1093.6 | 3-Piridinol | | | 1.23 | |
| 12 | 13.84 | 1094.2 | 4H-Pyran-4-ona,3-hidroxi-2-metil- | | | 0.26 | |
| 13 | 13.90 | 1096.3 | 2H-Pyran-2-ona,4-metoxi-6-metil- | | | 0.51 | |
| 14 | 15.97 | 1167.5 | Ácido butanodioico, dietil ester | | 1.40 | | |
| 15 | 18.59 | 1260.6 | Fenol-4-etil-2-metoxi- (etilguaicol) | | | 0.90 | |
| 16 | 24.70 | 1497.2 | 2-4-bis(1,1-dimetiletil) fenol | 3.06 | 6.13 | 1.15 | 0.59 |
| 17 | 26.06 | 1578.6 | Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, dietil ester | | | 0.17 | 0.26 |
| 18 | 27.99 | 1753.7 | Ácido tetradecanoico | 0.66 | 1.00 | 0.86 | |
| 19 | 28.71 | 1830.8 | Neofitadieno | 1.84 | 1.47 | 1.39 | 0.92 |
| 20 | 28.76 | 1837.5 | 2-Hexadeceno,3,7,11,15-tetrametil-, [R-(R*,R*-(E))] | 0.09 | | 0.17 | |
| 21 | 28.98 | 1864.2 | Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, dibutil ester | | | 0.14 | 0.15 |
| 22 | 29.07 | 1875.7 | 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil | 0.62 | | 0.53 | 0.33 |
| 23 | 29.68 | 1952.2 | Ácido hexadecanoico | 2.82 | 11.06 | 2.85 | 0.17 |
| 24 | 29.91 | 1981 | Ácido hexadecanoico, etil ester | | 2.83 | | |
| 25 | 30.90 | 2127.9 | Ácido 9-octadecanoico (Z)-, etil ester | | 1.09 | 1.51 | |
| 26 | 31.02 | 2147.3 | Ácido octadecanoico | 0.14 | | | |
| 27 | 31.91 | 2294.7 | Ácido tetradecanoico, 2-hidroxi 1-(hidroximetil) etil ester | | | 0.38 | |
| 28 | 33.07 | 2500.1 | Ácido hexadecanoico, 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etil ester | 1.72 | 1.90 | 1.84 | 0.44 |
| 29 | 33.29 | | Ácido 1,2-benzenodicarboxílico bis (2-etilhexil) ester | | | 0.55 | 0.40 |
| 30 | 34.01 | 2541.7 | Ácido octadecanoico (Z)-2-Hidroxi 1-(hidroximetil) etilester | | 1.00 | 2.26 | |
| 31 | 35.59 | 2949 | NI (no identificado) | | | | |
| 32 | 36.26 | 3137.3 | Beta-tocoferol | | | 2.34 | 0.41 |
| 33 | 36.92 | 3374 | Vitamina E | 2.97 | 3.68 | 4.66 | 0.55 |
| 34 | 36.96 | 3389 | Colest-5-en-3-ol (3 beta) (Colesterol) | | | | 0.10 |
| 35 | 37.92 | >3600 | Ergosta-5, 24-dien-3-ol (3 beta) | | | 3.04 | 1.16 |
| 36 | 39.01 | >3600 | Estigmata-5, 24(28)-dien-3-ol, (3, beta, 24 E) | 84.07 | 52.77 | 65.86 | 88.76 |
| ÁREAS TOTALES (u.a.) | | | | 126755886 | 120986704 | 574439564 | 384391542 |

Como se puede apreciar en la Tabla IV.5, se pudieron identificar 36 compuestos en los extractos obtenidos con etanol y hexano. De estos 36 compuestos, el que se encontró en mayor concentración, independientemente del disolvente empleado, fue el fucosterol (estigmata-5,24(28)-dien-3-ol) (compuesto 36), llegando a suponer en alguno extractos el 80% de la fracción volátil. Este compuesto se encuentra principalmente en algas marrones, pertenece al grupo de los fitosteroles, los cuales presentan la capacidad de reducir la absorción intestinal del colesterol biliar y del procedente de la dieta (Quilez y col., 2003; Berguer y col., 2004), además se ha descrito

que puede poseer actividad anticarcinogénica (Bradford y Awad, 2007) así como una fuerte actividad antibacteriana (Sharma, 1993) y antifúngica (Rahman y col., 1997). Por tanto, el fucosterol podría contribuir, en parte, a la actividad antimicrobiana total que presentaron estos extractos.

Entre los compuestos identificados se observó asimismo la presencia de ácido hexadecanoico así como de 2-hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil (fitol). El diterpeno fitol se ha encontrado en diversos aceites esenciales de plantas con actividad antimicrobiana (Couladis y col., 2002) y también en algunos extractos de microalgas (Herrero y col., 2006a; Mendiola y col., 2007b); de hecho, se ha descrito que algunos derivados del fitol presentan actividad antimicrobiana (Ragassa y col., 2005).

Otro de los compuestos mayoritarios era el neofitadieno (compuesto 19); esta sustancia pertenece a la familia de los fitanos y, además, se ha encontrado en altas concentraciones en aceites esenciales con elevada actividad antimicrobiana procedentes de hojas de tabaco (Stajanovic y col., 1999) y su presencia se ha detectado en extractos antimicrobianos de algunas microalgas (Herrero y col., 2006a; Mendiola y col., 2007b). También se identificó la vitamina E (compuesto 33) que presenta una gran variedad de actividades funcionales, como actividad antioxidante (Maeda y col., 2005), efectos positivos en las enfermedades cardiovasculares (John y col., 2007) y actividad anticarcinogénica (Bradford y Awad., 2007).

Otra familia de compuestos de gran interés, que se encuentran en menor medida en los extractos analizados, son las furanonas y sus derivados. Entre ellas destacan la 2(5H)-furanona-5,5-dimetilo (compuesto 7) en alto porcentaje y la 4H-pyrano-4-ona,3-hidroxi-2-metilo y 2H-pyrano-2-ona,4-metoxi-6-metilo (compuestos 12 y 13). En general, las furanonas y sus derivados son compuestos capaces de inhibir sistemas bacterianos, este efecto se ha comprobado en furanonas aisladas a partir de macroalgas (Wu y col., 2004; Hentzer y col., 2002). Asimismo, las piranonas, compuestos aromáticos al igual que las furanonas, y sus derivados han demostrado una importante actividad antibacteriana (Chen y col., 2005).

Otros compuestos que poseen actividad antimicrobiana que se pueden encontrar en estos extractos son los fenoles (2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol-) (Rodríguez-Meizoso

y col., 2008; Mayer y Hamann, 2005) y ácidos grasos (estudiados más en detalle en el apartado siguiente).

Analizando la composición de los diferentes extractos, se observa que es muy parecida entre ellos (hexano y etanol) y que a 200°C se obtiene una mayor variedad de compuestos; no obstante, las áreas totales fueron mayores en los extractos obtenidos con hexano.

IV.4.5.2. Análisis de los ácidos grasos.

En la Tabla IV.6 y Figura IV.6 se muestran los resultados obtenidos para los experimentos que presentaron mayor cantidad de ácidos grasos, los extractos de hexano a 100 y 200°C. Como se puede observar, los principales compuestos detectados fueron los ácidos palmítico (C₁₆), oleico (C_{18:1}) y áraquidónico (C_{20:4}); llegando a representar aproximadamente hasta el 65% del área total de los cromatogramas. El perfil de ácidos grasos obtenidos coincide con los datos reflejados previamente en la bibliografía para esta macroalga (Moreno y col., 1998).

Tabla IV.6. Identificación mediante GC-MS de los ácidos grasos (metil ésteres) encontrados en los extractos de *C. abies-marina* obtenidos por PLE. Contribución de cada pico al área total (% área normalizada). ID: Número de pico en la Figura IV.6. T.R., tiempo de retención.

| I.D. | T.R. | Familia de ácido graso | Nombre común | Ácidos grasos metil ésteres | Hexano | |
|-----------------------------|-------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------|--------------|
| | | | | | 100°C | 200°C |
| | | | | | A. Norm. (%) | A. Norm. (%) |
| 1 | 7.41 | | Ácido mirístico | Ácido tetradecanoico | 7.91 | 8.36 |
| 2 | 9.01 | | Ácido palmítico | Ácido hexadecanoico | 26.51 | 31.63 |
| 3 | 9.31 | n-7 | Ácido palmitoleico | Ácido 9-hexadecanoico | 2.56 | 2.27 |
| 4 | 11.44 | | Ácido esteárico | Ácido octadecanoico | 1.09 | 1.21 |
| 5 | 11.81 | n-9 | Ácido oleico | Ácido 9-octadecanoico | 12.98 | 15.62 |
| 6 | 12.62 | n-6 | Ácido linoleico | Ácido 9,12-octadecadienoico | 7.02 | 5.89 |
| 7 | 13.92 | n-3 | Ácido α-linolénico | Ácido 9,12,15-octadecatrienoico | 4.36 | 4.89 |
| 8 | 14.66 | | | N.I. | 2.29 | 2.11 |
| 9 | 14.83 | | Fitol | 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil | 8.97 | 4.02 |
| 10 | 18.39 | n-9 | | Ácido 5,8,11- Eicosatrienoico | 1.91 | 2.10 |
| 11 | 19.22 | n-6 | Ácido araquidónico | Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico | 22.76 | 20.27 |
| 12 | 21.80 | | | N.I. | 1.64 | 1.64 |
| ÁREAS TOTALES (u.a.) | | | | | 42697565 | 64642539 |

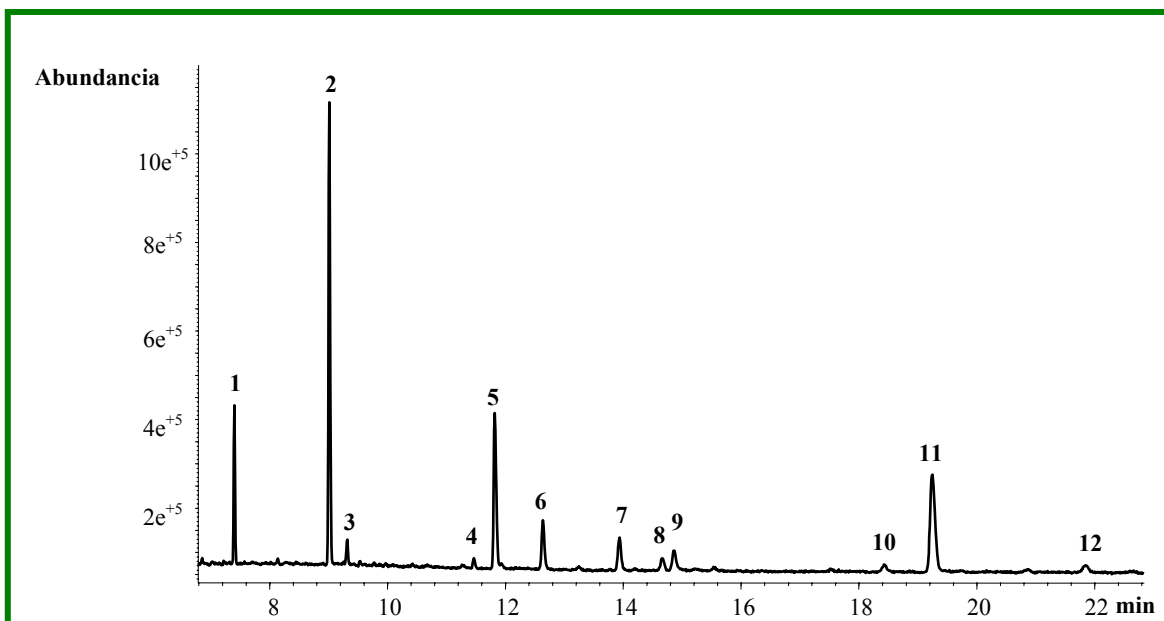


Figura IV.6. Cromatograma obtenido por GC-MS correspondiente al perfil de ácidos grasos presentes en el extracto producido con hexano mediante PLE a 200°C. La numeración de los picos se corresponde con la dada en la Tabla IV.6.

Como se puede apreciar en la Tabla IV.6, otros compuestos que contribuyen de forma notable en la composición en ácidos grasos de los extractos son los ácidos mirístico ($C_{14:0}$), linoleico ($C_{18:2}$) y α -linolénico ($C_{18:3}$). Aunque las proporciones de ácidos grasos fueron parecidas en los extractos obtenidos a 100 y 200°C, las áreas totales de los extractos de hexano a 200°C fueron significativamente mayores a las obtenidas a 100°C.

En un intento de relacionar las actividades antimicrobianas con la presencia de compuestos volátiles y ácidos grasos, se estudiaron las posibles tendencias en los resultados presentados. Por ejemplo, los extractos de etanol y hexano presentaron actividades antimicrobianas similares. Este hecho no se correlacionaba de manera directa con la concentración de compuestos volátiles presentes en estos extractos, ya que ésta fue mayor en los extractos obtenidos con hexano.

A la vista de estos resultados se puede concluir que, dado que la cantidad de volátiles y ácidos grasos en los extractos de etanol es claramente inferior a la obtenida con hexano, y que la actividad antimicrobiana de los dos extractos es muy parecida (ver Tablas IV.3, IV.5 y IV.6), deben existir otros compuestos en los extractos de etanol no detectados con esta metodología que contribuyen a la actividad antimicrobiana de los mismos, como podrían ser sesquiterpenos, cuya presencia se ha descrito previamente en

algas del mismo género (Kukovinets y Kislitsyn, 2006).. Asimismo, cabe suponer que pudieran existir distintas sinergias entre los compuestos presentes, que pudieran tener una influencia positiva en las actividades mostradas por los diferentes extractos (Kukovinets y col., 2006).

IV.5. CONCLUSIONES.

En este estudio se ha demostrado la capacidad de la PLE como una técnica medioambientalmente limpia de extracción para la obtención de compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana de la macroalga marrón *Cystoseira abies-marina*, obteniéndose altos rendimientos de extracción tanto con agua como con etanol a altas temperaturas.

Las mejores actividades antioxidantes de los extractos de PLE se consiguieron empleando disolventes orgánicos, etanol y hexano, a temperaturas medias, de 100-150°C, y empleando agua a la mayor temperatura estudiada (200°C).

Por su parte, los extractos de etanol a altas temperaturas (150-200°C) proporcionaron actividades antimicrobianas elevadas.

Se identificaron como carotenoides mayoritarios, parcialmente responsables de la capacidad antioxidante, fucoxantina, zeaxantina, α -caroteno y β -caroteno. Los resultados demuestran que otros compuestos, además de los carotenoides, podrían tener una influencia positiva en la capacidad antioxidante de los extractos, sobre todo para el extracto obtenido con agua mediante PLE a 200°C, ya que éste presentó elevada capacidad antioxidante y no se detectó la presencia de carotenoides.

Mediante GC-MS se determinó la presencia de compuestos volátiles y ácidos grasos que podían contribuir a la actividad antimicrobiana asociada a los extractos, aunque su sola presencia no podía explicar completamente la actividad asociada a los extractos procedentes de esta macroalga.

Considerando los resultados del presente capítulo, se puede concluir que el etanol es el disolvente más apropiado para la obtención de extractos con propiedades funcionales a partir de *Cystoseira abies-marina*, debido fundamentalmente a los elevados rendimientos que proporciona, las elevadas actividades biológicas mostradas por los extractos generados con este disolvente y a que es un disolvente considerado seguro para la industria alimentaria.

CAPÍTULO V:

“Obtención de extractos de *Himanthalia elongata* con actividad antioxidante y antimicrobiana mediante el empleo de extracción con líquidos presurizados. Caracterización química y funcional”

V.1. INTRODUCCIÓN.

Himanthalia elongata es una macroalga marrón que se engloba dentro del orden Fucales, familia Himanthaliaceae, clase Phaeophyceae, género *Himanthalia*. Es un alga formada por un pedúnculo basal de fijación, primero con forma de vesícula y luego de seta (parte vegetativa) hundida en el centro, de hasta 4 cm de diámetro y 3 cm de altura, de cuyo centro salen entre 1 y 4 receptáculos con forma de correas (parte fértil) que se dividen dicotómicamente hasta los 3 m (Figura V.1). Comúnmente es conocida como “espagueti de mar”, “correa” o “judía de mar”. Recientemente se ha empezado a usar como alga alimentaria debido a sus notables características organolépticas y nutricionales, atrayendo el interés de los consumidores y de la industria alimentaria por su bajo contenido en calorías y su alto contenido en vitaminas, minerales y fibra dietética.



Figura V.1. Fotografías de la macroalga *Himanthalia elongata*.

La composición química de *H. elongata* se ha estudiado en función de su procesamiento, deshidratada o en conserva (Sánchez-Machado y col., 2004a). Esta macroalga mostró un alto contenido en cenizas (en conserva, 22.98 g/100 g de alga seca, y deshidratada, 26.78 g/100 g de alga seca), un apreciable contenido en proteínas (en conserva, 19.95 g/100 g de alga seca, y deshidratada, 5.46 g/100 g de alga seca) y un bajo contenido en lípidos (en conserva, 0.93 g/100 g de alga seca, y deshidratada, 0.97 g/100 g de alga seca). Aun siendo su contenido lipídico bastante bajo, esta alga poseía un elevado nivel de ácidos grasos poliinsaturados, siendo una buena fuente de ácido eicosapentaenoico (EPA) (en conserva 2.77 % del total de ácidos grasos, y deshidratada 5.50 % del total de ácidos grasos). Aunque es una buena fuente de EPA, los ácidos grasos predominantes en la fracción lipídica de esta alga son los ácidos oleico, palmítico, araquidónico, α -linolénico y mirístico (Sánchez-Machado y col., 2004a). Además, dentro de su fracción lipídica se pueden encontrar otros compuestos de interés,

como tocoferoles y esteroides. El principal tocoferol descrito es el α -tocoferol, pudiendo llegar a niveles de 0.052 mg/g (Sánchez-Machado y col., 2002). Por su parte, entre los esteroides presentes predomina el fucosterol, pudiendo llegar a suponer hasta el 97% del contenido total de esteroides (Sánchez-Machado y col., 2004b).

H. elongata presenta un alto contenido en fibra, pudiendo alcanzar hasta 53.3 g de fibra dietética total por cada 100 g de peso seco (Sánchez y col., 2004c). Como en otras algas marrones, la fracción soluble de la fibra está compuesta principalmente de alginatos, fucanos y laminarina, mientras que la fracción insoluble contiene básicamente celulosa (Sánchez y col., 2004c).

Asimismo se han estudiado los compuestos antioxidantes presentes en *H. elongata* (Rodríguez-Bernaldo de Quiros y col., 2010a). Para ello, se ha examinado el contenido total de polifenoles, observándose que esta macroalga posee 10.0 g de floroglucinol/kg de peso húmedo de la muestra. Otros compuestos antioxidantes que se evaluaron en el trabajo fueron carotenoides y clorofilas (responsables del color), siendo la fucoxantina el compuesto mayoritario y el responsable del color en esta alga (5.1 mg de fucoxantina/100 g de muestra). Además de este carotenoide, se ha podido encontrar en menor concentración β -caroteno, clorofila *a* y feofitina *a*. También se han identificado compuestos fenólicos, como epigallocatequina (715.6 μ g/g peso seco) o ácido gálico (55.6 μ g/g peso seco) (Rodríguez-Bernaldo de Quiros y col., 2010b).

De igual manera, también se ha estudiado la posibilidad de obtener compuestos con actividad antiviral a partir de esta macroalga (Plaza y col., 2010). En este trabajo se evaluó la actividad antiviral de los extractos obtenidos a partir de *Himanthalia elongata* por PLE (etanol, agua y hexano) contra el virus del herpes simple de tipo 1 (HSV-1) en diferentes estados del proceso de la infección viral. Se observó que el pretratamiento de las células vero con 75 μ g/ml del extracto de etanol inhibió la infección del virus aproximadamente en un 90%, además, la misma concentración de los extractos de agua y de hexano redujeron la infección del virus en un 78 y 70 %, respectivamente. Esta actividad antiviral se relacionó con la presencia en los extractos de agua de polisacáridos, mientras que en los extractos de hexano y etanol se relacionó principalmente con la presencia de fucosterol.

A pesar de los diferentes trabajos que se han descrito, en la bibliografía no existen referencias sobre la utilización de la extracción con líquidos presurizados (PLE) para la obtención de compuestos con actividad antimicrobiana y antioxidante a partir de *H. elongata*. Como ya se ha mencionado en esta memoria, esta técnica de extracción, comparada con otros procesos de extracción tradicionales, puede proporcionar tiempos de extracción menores, con un menor uso de disolventes, así como mayores rendimientos, además de estar automatizada y mantener la muestra en condiciones de ausencia de luz y oxígeno (Luque de Castro y col., 1999). A estas ventajas se le suma la posibilidad de emplear disolventes considerados GRAS (*Generally Recognized As Safe*), como son etanol y agua. Asimismo, tampoco se han descrito con detalle las posibles funciones ó efectos fisiológicos beneficiosos relacionados con esta macroalga. Por lo tanto, en el presente trabajo se propone la extracción de compuestos bioactivos mediante PLE, estudiando la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos obtenidos. Los extractos que presentaron mayores actividades se caracterizaron mediante GC-MS y HPLC-DAD, siempre manteniendo el objetivo de intentar relacionar las actividades mostradas con la composición química de dichos extractos.

V.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El objetivo primordial del presente trabajo fue obtener extractos de *Himanthalia elongata* con diferente composición mediante PLE, así como evaluar su potencial capacidad antioxidante y antimicrobiana y caracterizar los compuestos responsables de dichas actividades.

Para ello se siguió el siguiente plan de trabajo:

1. Obtención mediante PLE de extractos de *H. elongata* con agua, etanol y hexano a diferentes temperaturas (50, 100, 150 y 200°C).
2. Caracterización funcional de los extractos obtenidos mediante el empleo de ensayos *in vitro*, que permitan la determinación de su capacidad antioxidante y antimicrobiana.

3. Caracterización química de los extractos considerados más activos mediante el empleo de HPLC-DAD y GC-MS para la detección e identificación de los compuestos que pudieran ser responsables de las actividades observadas.

V.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

V.3.1. Muestras y reactivos.

Las muestras de *Himanthalia elongata* empleadas consistieron en macroalgas liofilizadas (Figura V.2), procedentes de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Canarias, España). Las muestras se almacenaron en todo momento protegidas del oxígeno, la humedad y la luz.



Figura V.2. Imagen de la macroalga *Himanthalia elongata* liofilizada empleada en este trabajo.

Los disolventes, reactivos y patrones comerciales que se emplearon en el presente trabajo fueron semejantes a los ya descritos en el Capítulo II.

V.3.2. Extracción con líquidos presurizados (PLE).

Para llevar a cabo las extracciones de la alga marrón *Himanthalia elongata* se utilizaron etanol, agua, y hexano; las extracciones se llevaron a cabo a cuatro temperaturas distintas de extracción (50, 100, 150, y 200°C), cubriendo todo el rango instrumental de temperaturas que permitía el equipo utilizado, manteniendo un tiempo

de extracción estático de 20 minutos.

Todas las extracciones se realizaron en una celda de 11 mL de capacidad empleando 1 g de muestra. En el caso de las extracciones llevadas a cabo con agua, para evitar la obstrucción del sistema de extracción, la muestra se introdujo mezclada con arena de mar empleando una disposición de tipo sándwich (situando 6 g de arena de mar, posteriormente la muestra, y por último otros 2 g de arena de mar).

Tanto el equipamiento utilizado para la extracción presurizada con disolventes, como el modo de funcionamiento del mismo fueron iguales a los ya descritos en el Capítulo II.

V.3.3. Caracterización funcional.

V.3.3.1. Capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de los extractos de *H. elongata* obtenidos por PLE, se determinó empleando el método TEAC, cuyos fundamentos se han expuesto en el Capítulo I, siguiendo idéntico protocolo al descrito en el Capítulo II de la presente Memoria.

V.3.3.2. Actividad antimicrobiana.

Los extractos de *H. elongata* obtenidos por PLE empleando diferentes disolventes se estudiaron individualmente frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Candida albicans* ATCC 60193 y *Aspergillus niger* ATCC 16404, siguiendo el protocolo descrito en el capítulo II.

V.3.4. Caracterización química.

V.3.4.1. Análisis mediante cromatografía de líquidos (HPLC-DAD).

Para su correcto análisis por HPLC-DAD, los extractos secos se disolvieron

antes de ser analizados. Así pues, los extractos obtenidos con etanol y agua se disolvieron en etanol mientras que los obtenidos con hexano se disolvieron en acetona, todos a la misma concentración (10 mg/ml).

Tanto el equipamiento utilizado para estudiar la composición de pigmentos, como el método de análisis empleado se han descrito en el Capítulo II.

Para la cuantificación de los compuestos identificados en los extractos para los cuales se disponía de patrones comerciales, se llevaron a cabo las diferentes curvas de calibrado. Para ello se inyectaron cuatro cantidades diferentes (de 0.01 a 0.08 μg) de los patrones de violaxantina, fucoxantina, y zeaxantina. Todos los patrones empleados se disolvieron en etanol. La ecuación de la recta de regresión para cada curva patrón se obtuvo representando la concentración de cada patrón inyectado frente al área del pico correspondiente a ese compuesto. Los datos obtenidos para esta calibración externa se muestran en la Tabla V.1.

Tabla V.1. Ecuaciones de la recta de regresión de los patrones de carotenoides obtenidos por HPLC-DAD (450 nm).

| Compuesto | Ecuación de la recta de regresión ^a | Coefficiente de correlación (r^2) |
|---------------------|--|---------------------------------------|
| Violaxantina | $Y = 1816187x + 82.9$ | 1 |
| Fucoxantina | $Y = 2017775x + 122.7$ | 0.9871 |
| Zeaxantina | $Y = 12189189x + 5.6$ | 0.9993 |

^a Y es el valor del área del pico. X es el valor de la cantidad de muestra inyectada (mg).

V.3.4.2. Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

V.3.4.2.1. Análisis de la fracción volátil.

Con el objeto de caracterizar los compuestos volátiles presentes en los extractos, éstos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Tanto el equipamiento utilizado para estudiar la composición de la fracción volátil, como el método empleado están descritos en el Capítulo II.

V.3.4.2.2. Análisis de ácidos grasos.

Para llevar a cabo el análisis por GC-MS de los ácidos grasos de los extractos de *H. elongata* obtenidos por PLE, se llevó a cabo la derivatización previa de las muestras. Tanto el protocolo empleado para la metilación de los ácidos grasos, como el equipo y el método utilizados para el análisis de estos compuestos están descritos en el Capítulo II.

V.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

V.4.1. Extracción por PLE.

Las condiciones de extracción empleadas, así como los resultados obtenidos en términos de rendimiento de extracción y capacidad antioxidante, se recogen en la Tabla V.2. Como se puede observar, el rendimiento de extracción (expresado como % de extracto seco respecto a la cantidad inicial de macroalga) fue máximo cuando se empleó agua como disolvente a temperaturas elevadas de 150 y 200°C (46.4 y 51.6%, respectivamente). Por otra parte, se puede apreciar cómo los extractos obtenidos con hexano proporcionaron los rendimientos más bajos (entre 3.4 y 7.6%), mientras que con etanol se obtuvieron valores intermedios a 150 y 200°C (19.2 y 36.9%, respectivamente). De nuevo en este caso, independientemente del disolvente empleado, se observaron mayores rendimientos de extracción a temperaturas elevadas. Como se ha expuesto en la introducción del presente Capítulo, *H. elongata* es un alga que presenta apreciables cantidades de hidratos de carbono así como de proteínas, mientras que su composición en cuanto a su fracción lipídica es cuantitativamente mucho menor (Sánchez-Machado y col., 2004). Por ello cabe pensar que mediante el empleo de agua se extraen en mayor medida este tipo de compuestos, mientras que utilizando disolventes orgánicos como el hexano, de muy baja polaridad, esta extracción disminuye.

Tabla V.2. Condiciones de extracción por PLE (disolvente y temperatura de extracción), rendimientos (% de peso seco) y capacidad antioxidante TEAC de los extractos obtenidos a partir de *Himanthalia elongata*.

| Disolvente (Constante dieléctrica, ϵ) | Temperatura de extracción (°C) ¹ | Rendimiento (%) | Capacidad antioxidante ² |
|--|--|--------------------|--|
| Hexano (1.9) | 50 | 3.4 | 0.060 ± 0.001 |
| | 100 | 3.5 | 0.118 ± 0.004 |
| | 150 | 4.7 | 0.143 ± 0.003 |
| | 200 | 7.6 | 0.140 ± 0.001 |
| Etanol (24.3) | 50 | 8.3 | 1.036 ± 0.010 |
| | 100 | 10.6 | 1.067 ± 0.003 |
| | 150 | 19.2 | 0.480 ± 0.007 |
| | 200 | 36.9 | 0.286 ± 0.006 |
| Agua (78.5) | 50 | 9.5 | 0.246 ± 0.002 |
| | 100 | 15.1 | 0.273 ± 0.002 |
| | 150 | 46.4 | 0.350 ± 0.006 |
| | 200 | 51.6 | 0.565 ± 0.001 |

¹Tiempo de extracción 20 min. ²Capacidad antioxidante expresada como TEAC (mmol de Trolox/g de extracto).

V.4.2. Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos.

En la Tabla V.2 se muestran los resultados obtenidos del ensayo TEAC para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de *Himanthalia elongata* obtenidos mediante PLE. Como se puede observar, el aumento de la temperatura provoca un comportamiento diferente en la capacidad antioxidante en función del disolvente empleado. Por ejemplo, en los extractos obtenidos con etanol, al aumentar la temperatura de extracción por encima de 100 °C, disminuye la capacidad antioxidante, siendo ésta máxima a dicha temperatura (1.067 mmol de Trolox/g de extracto). Además, en estas condiciones se obtienen los valores globalmente más altos de actividad antioxidante. Sin embargo, en los extractos acuosos, al aumentar la temperatura aumenta asimismo la capacidad antioxidante, siendo el valor TEAC más elevado, el proporcionado por el extracto obtenido a 200°C (0.565 mmol de Trolox/g de extracto). De igual manera, el valor de TEAC máximo en los extractos de hexano se encontró a 150 °C, si bien, un posterior aumento de la temperatura de extracción a 200 °C no produjo una variación significativa de dicho valor. No obstante, se puede observar como el hexano fue el disolvente que proporcionó los peores resultados en términos de capacidad antioxidante.

Estos resultados pueden sugerir la presencia en *H. elongata* de antioxidantes de polaridad media, dado que el etanol fue el disolvente que permitió la obtención de los extractos con mayor capacidad antioxidante entre todas las condiciones estudiadas.

III.4.3. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos.

La concentración mínima bactericida (MBC) y fungicida (MFC) de los extractos de *H. elongata* frente a los microorganismos seleccionados se muestran en la Tabla V.3. En todos los casos, los microorganismos más sensibles a los diferentes extractos fueron las bacterias, si bien es cierto que los extractos producidos con agua presentaron una actividad significativamente menor que los obtenidos empleando los disolventes orgánicos. Los extractos que presentaron una actividad antimicrobiana mayor fueron los de etanol. Además, se podía observar un aumento del poder antimicrobiano a medida que se aumentaba la temperatura de extracción. Esta tendencia fue similar a la observada para los extractos de hexano, aunque en este último caso, de menor magnitud. No obstante, se puede afirmar que la temperatura no tuvo un efecto crucial sobre la actividad antimicrobiana mostrada por los diferentes extractos. Puede observarse, asimismo, que la actividad fungicida de todos los extractos no fue muy elevada, y que sólo los extractos producidos con etanol tenían una actividad más fuerte frente a la levadura *C. albicans*.

Tabla V.3. Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de *Himanthalia elongata* obtenidos por PLE.

| Disolvente | Temperatura (°C) | <i>Escherichia coli</i> MBC ^a | <i>Staphylococcus aureus</i> MBC | <i>Candida albicans</i> MFC ^b | <i>Aspergillus niger</i> MFC |
|---------------------------|------------------|---|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| Hexano | 50 | 7.50 | 8.25 | 12.00 | 14.00 |
| | 100 | 7.50 | 8.25 | 12.00 | 14.00 |
| | 150 | 7.00 | 8.25 | 10.00 | 12.25 |
| | 200 | 7.25 | 8.25 | 10.00 | 12.25 |
| Etanol | 50 | 7.00 | 7.00 | 8.50 | 13.00 |
| | 100 | 6.50 | 7.00 | 8.25 | 13.00 |
| | 150 | 6.00 | 6.25 | 8.00 | 12.25 |
| | 200 | 6.00 | 6.25 | 8.00 | 12.00 |
| Agua | 50 | 13.50 | 13.00 | 12.50 | 14.25 |
| | 100 | 13.00 | 13.00 | 12.50 | 14.00 |
| | 150 | 12.50 | 12.50 | 12.25 | 13.00 |
| | 200 | 13.00 | 12.50 | 12.25 | 13.00 |
| Antibiótico de referencia | | 10.00 | 10.00 | 100.00 | 150.00 |

^a: MBC: Concentración Mínima Bactericida. ^b: MFC: Concentración Mínima Fungicida. Los valores MBC y MFC son dados como mg/ml para las muestras y como µg/ml para el antibiótico.

V.4.4. Caracterización química de los extractos por HPLC-DAD.

Como se ha mencionado en la introducción, en *H. elongata* se han identificado previamente diferentes carotenoides, entre ellos fucoxantina (Rodríguez-Bernaldo de Quirós, 2010a). Por lo tanto, cabía esperar que en los diferentes extractos de PLE producidos a partir de esta alga pudieran encontrarse este y otros compuestos de

naturaleza carotenoide. Para llevar a cabo el análisis de los pigmentos antioxidantes, se seleccionaron los extractos obtenidos a 100 y 200°C con etanol, agua y hexano. Dicha selección se tomó considerando que a estas dos temperaturas se incluían los extractos más activos para cada disolvente empleado en términos de actividad antioxidante (ver Tabla V.2). Dado que en los extractos acuosos no se encontraron cantidades apreciables de los pigmentos objeto de este análisis, los resultados de dicho análisis no se incluyen en la Tabla V.4.

En la Tabla V.4 se muestran los compuestos detectados, la información proporcionada por el detector DAD y la identificación tentativa de algunos de los compuestos separados. Con la información ofrecida por el detector DAD, así como gracias a los datos cromatográficos (tiempos de retención, órdenes de elución) y al uso de patrones comerciales, y de acuerdo con los datos reflejados en la bibliografía, se pudieron identificar tentativamente en estos extractos: fucoxantina (pico 3), violaxantina (pico 4) y zeaxantina (pico 7) (ver Figura V.3). Como se puede apreciar en la Tabla V.4, el carotenoide mayoritario fue fucoxantina, seguido de zeaxantina. La violaxantina, como ocurría con la microalga *Chlorella vulgaris*, solo se encuentra en los extractos obtenidos con etanol a baja temperatura, debido a que es un carotenoide muy termolábil. Independientemente del disolvente empleado, los extractos obtenidos a 100°C presentaron mayores concentraciones de carotenoides. El hexano fue el disolvente que proporcionó una mayor capacidad para la extracción de estos pigmentos, debido a que los carotenoides son compuestos generalmente apolares.

Tabla IV.4. Identificación por HPLC-DAD, contribución de cada pico al área total (% área normalizada) y áreas totales (u.a., unidades arbitrarias), y concentración de carotenoides (mg/g) presentes en el los extractos obtenidos etanol y hexano (100 y 200°C) a partir de *Himantalia elongata*. TR: tiempo de retención, NI: no identificado.

| ID | TR (min) | Datos espectroscópicos λ max. | Pigmentos | Etanol | | | | Hexano | | | |
|--------------------------|----------|--|----------------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|
| | | | | 100°C | | 200°C | | 100°C | | 200°C | |
| | | | | Área norm. (%) | Concentración (mg/g) | Área norm. (%) | Concentración (mg/g) | Área norm. (%) | Concentración (mg/g) | Área norm. (%) | Concentración (mg/g) |
| 1 | 4.40 | 278, 336, 444, 580, 632, 666 | Clorofila N.I. | 5.06 | | | | | | | |
| 2 | 5.35 | 268, 338, 392, 446, 582, 634 | Clorofila N.I.. | 24.49 | | | | | | | |
| 3 | 7.46 | 448, 468 | Fucoxantina ^{ab} | 39.76 | 0.82 | 64.75 | 0.32 | 62.75 | 3.25 | 43.62 | 1.77 |
| 4 | 8.59 | 372, 412, 506, 536, 608, 668 | Violaxantina ^{ab} | 2.82 | 0.05 | | -- | | -- | | -- |
| 5 | 9.24 | 442, 462 | Carotenoide N.I. | 4.29 | | | | 3.87 | | 3.03 | |
| 6 | 9.56 | 270, 320, 334, 438, 462 | Carotenoide N.I. | 6.41 | | 9.28 | | 10.05 | | 7.40 | |
| 7 | 11.14 | 422, 450, 476 | Zeaxantina ^{ab} | 9.97 | 0.13 | 12.81 | 0.04 | 13.72 | 0.30 | 10.23 | 0.24 |
| 8 | 12.41 | 412, 444, 472, 662 | Clorofila N.I. | | | 7.58 | | 3.23 | | 4.00 | |
| 9 | 16.07 | 326, 372, 396, 408, 506, 536, 608, 666 | Clorofila N.I. | | | | | | | 19.49 | |
| 10 | 17.67 | 338, 404, 432, 614, 666 | Clorofila N.I. | 3.59 | | 5.58 | | | | 1.10 | |
| 11 | 21.47 | 326, 372, 396, 406, 506, 538, 608, 666 | Clorofila N.I. | | | | | | | 6.31 | |
| 12 | 29.85 | 324, 370, 408, 502, 534, 606, 666 | Clorofila N.I. | 2.27 | | | | 3.98 | | 2.97 | |
| 13 | 31.69 | 324, 370, 408, 502, 534, 606, 666 | Clorofila N.I. | 1.34 | | | | 2.41 | | 1.87 | |
| AREA TOTAL (u.a.) | | | | 2603.00 | | 370.80 SOLO? | | 4547.90 | | 3974.00 | |

^a Espectro similar al patrón. ^b Tiempo de retención igual al patrón.

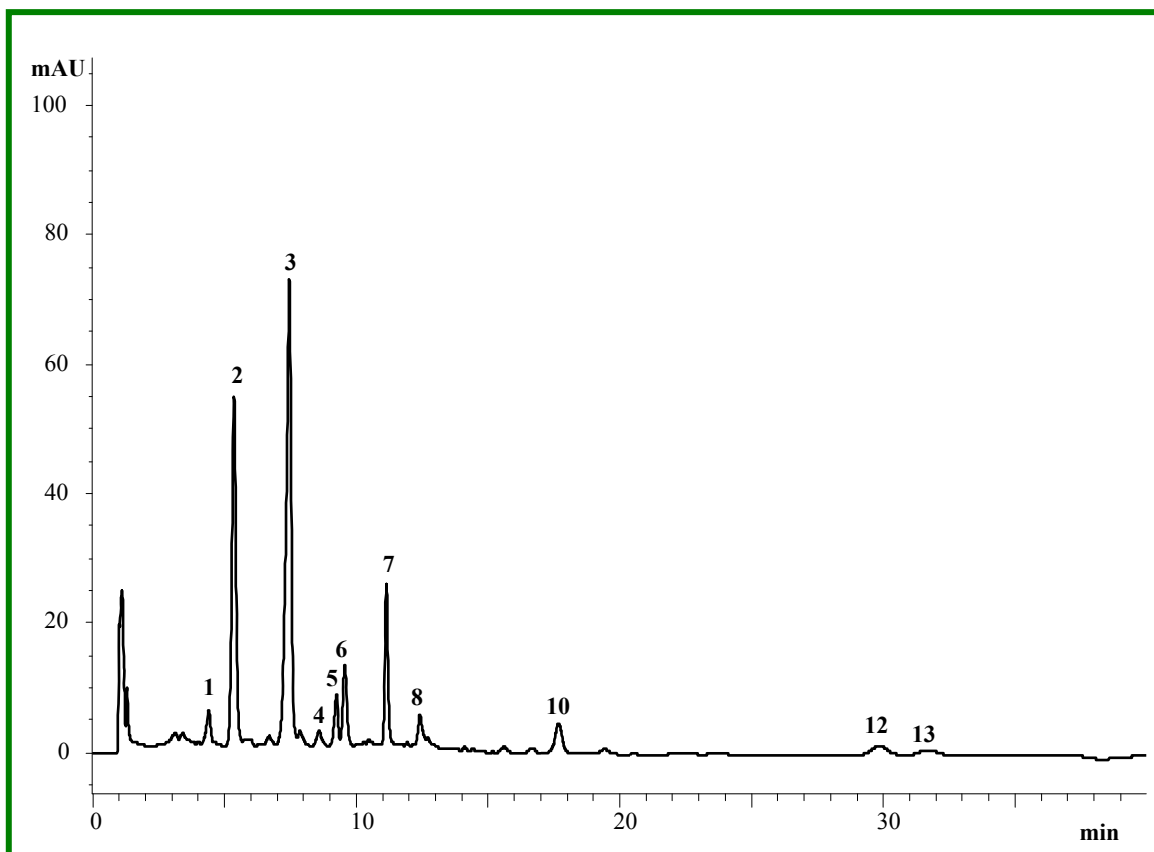


Figura V.3. Cromatograma de HPLC (450 nm) del extracto obtenido mediante PLE a 100 °C con etanol. La numeración de los picos se corresponde con la dada en la Tabla V.4 .

Considerando los antecedentes bibliográficos que relacionan la capacidad antioxidante con la presencia de pigmentos, como carotenoides, era de esperar que las mayores capacidades antioxidantes se encontraran en aquellos extractos con mayor contenido en carotenoides (Tablas V.2 Y V.4). En este sentido, si comparamos la concentración de carotenoides presentes en los extractos de etanol a 100 y 200°C (1.037 y 0.286 mmol Trolox/g de extracto, respectivamente), se observa que los extractos obtenidos a 100°C presentaron una capacidad antioxidante considerablemente mayor que los extractos obtenidos a 200°C, de acuerdo con la disminución en la concentración de carotenoides con el aumento en la temperatura de extracción. Sin embargo, en cuanto a la capacidad antioxidante de los extractos de hexano, ésta fue ligeramente mayor a 200°C mientras que la cantidad de carotenoides obtenida a dicha temperatura fue menor que la obtenida a una temperatura de 100°C. Por lo tanto, no existía una relación directa entre la capacidad antioxidante de los diferentes extractos y su composición en carotenoides. Además, los extractos de hexano poseían una mayor concentración de carotenoides que los de etanol, mientras que estos últimos mostraban una capacidad

antioxidante significativamente mayor, confirmando la no relación directa entre ambos parámetros.

Estos resultados hacen suponer que los carotenoides contribuirían a la capacidad antioxidante de los extractos pero que, asimismo, existirían otros compuestos que podrían tener una influencia positiva en la capacidad antioxidante total de los extractos de *H. elongata*, como podrían ser tocoferoles o compuestos fenólicos, que ya han sido descritos previamente en esta macroalga (Sánchez-Machado y col., 2002; Rodríguez-Bernaldo de Quiros, 2010a; Rodríguez-Bernaldo de Quiros, 2010b), así como a la posible acción sinérgica de las clorofilas y sus derivados y de los carotenoides y tocoferoles (Le Tutour y col., 1998; Sánchez-Machado y col., 2002). Además, en los extractos obtenidos con agua a altas temperaturas es previsible que se puedan formar nuevos antioxidantes derivados de reacciones no enzimáticas, como es la reacción de Maillard o de caramelización (Rodríguez-Meizoso y col., 2010).

V.4.5. Caracterización química de los extractos por GC-MS.

Los extractos de *H. elongata* obtenidos a 100 y 200°C con etanol, hexano y agua, se analizaron para estudiar su composición en compuestos volátiles y ácidos grasos.

V.4.5.1. Análisis de la fracción volátil.

En la Tabla V.5 se muestra los compuestos volátiles identificados por GC-MS en los diferentes extractos obtenidos mediante PLE que presentaron actividad antimicrobiana. En esta tabla se muestran la identificación tentativa de los compuestos separados, así como las áreas absolutas totales para cada extracto, sus áreas normalizadas (contribución relativa de cada compuesto), así como sus índices de retención (RI). Los compuestos se identificaron comparando sus espectros de masas con los de una biblioteca comercial de espectros de masas, así como sus RI experimentales con los RI teóricos, y con la información encontrada en la bibliografía para cada uno de los compuestos tentativamente identificados. Como se puede apreciar en la Tabla V.5, se pudieron identificar 12 compuestos en los extractos de etanol y hexano a 100 y 200°C. En los extractos obtenidos con agua no se obtuvieron resultados satisfactorios

empleando esta técnica analítica probablemente debido a que estos compuestos volátiles no fueron solubles en agua.

El compuesto que se encontró en mayor concentración en todos los extractos, independientemente del disolvente empleado, fue el fucosterol (estigmasta-5,24(28)dien-3-ol) (compuesto 12). El fucosterol es el esteroles mayoritario en las algas marrones, y ha sido descrito en esta alga anteriormente (Sanchez-Machado y col., 2004b). Este compuesto forma parte del grupo de los fitosteroles, los cuales presentan diferentes actividades funcionales (Quilez y col., 2003; Berger y col., 2004; Bradford y Awad, 2007). Por tanto, el fucosterol podría ser, en parte, responsable de la actividad antifúngica y antibacteriana que presentan estos extractos, como se ha descrito en trabajos anteriores (Rahman y col., 1997; Sharma, 1993).

Otros compuestos que poseen actividad antimicrobiana que se pueden encontrar en estos extractos analizados son el neofitadieno y el derivado del fitol (2-hexadecen-1-ol, 3, 7, 11, 15-tetrametil) (Herrero y col., 2006a; Couladis y col., 2002), así como fenoles (2,4-bis (1,1-dimetiletil)-fenol; y su derivado) (Rodríguez-Meizoso y col., 2008; Mayer y Hamann, 2005), ácidos grasos (ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico, ácido 9-octadecanoico, metilester, y ácido hexadecanoico, 2-3-dihidroxiopropil ester) (estudiados más detalladamente en el apartado siguiente de la presente memoria), compuestos furánicos (2-furancarboxaldehido-5-metil) (Mihailovic y col., 2009) y alcanos (ciclododecano) (Ozdemir y col., 2004).

Además se pudo comprobar cómo a medida que aumentaba la temperatura de extracción para los dos disolventes empleados se reducía la cantidad total de compuestos volátiles encontrados, así como su variedad. Además, como se puede observar en la Tabla V.5, los extractos de hexano poseían una mayor cantidad de compuestos volátiles que los de etanol.

Tabla V.5. Identificación de los compuestos separados por GC-MS así como sus áreas totales (u.a. unidades de área), % área normalizada e índices de retención (RI), encontrados en los extractos de *Himanthalia elongata* obtenidos mediante PLE. T.R., tiempo de retención; ID, Número de picos.

| ID | TR (min) | RI | Identificación | Etanol | | Hexano | |
|------------------------------------|----------|---------|---|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | | | | 100°C | 200°C | 100°C | 200°C |
| | | | | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) |
| 1 | 10.31 | 980.4 | 2-Furancarboxaldehído-5-metil- | | | | 24.85 |
| 2 | 25.56 | 1548.4 | 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol | 2.52 | 6.50 | 0.27 | 2.23 |
| 3 | 25.61 | 1551.5 | 2,4-bis (1,1-dimetiletil) fenol (derivado) | 0.84 | 3.29 | 0.90 | 3.27 |
| 4 | 27.90 | 1745.1 | Ciclododecano | | 8.33 | 1.05 | 3.39 |
| 5 | 28.56 | 1768.9 | Ácido tetradecanoico | 1.42 | 3.75 | 1.18 | 2.47 |
| 6 | 29.27 | 1900.8 | Neofitadieno | | | 3.37 | 6.61 |
| 7 | 29.62 | 1944.6 | 2-Ciclohexen-1-ona, 4,4-dimetil- | | | 0.89 | 1.74 |
| 8 | 30.20 | 2021.1 | Ácido hexadecanoico | 29.12 | 35.57 | 4.74 | 7.25 |
| 9 | 31.27 | 2185.5 | 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil (derivado) | | | 0.51 | |
| 10 | 31.42 | 2209.7 | Ácido 9-octadecenoico, metil ester | 8.15 | | 4.09 | |
| 11 | 33.58 | 2593.8 | Ácido hexadecanoico, 2,3-dihidroxi propil ester | 2.95 | | 1.16 | |
| 12 | 40.64 | >3600.0 | Stigmasta-5,24(28)dien-3-ol,(3 beta, 24,Z) | 55.01 | 42.57 | 81.84 | 48.19 |
| ÁREAS TOTALES (area counts) | | | | 176332648 | 73159806 | 816916002 | 114051659 |

V.4.5.2. Análisis de los ácidos grasos mediante GC-MS.

Los ácidos grasos presentes en los extractos de etanol y hexano a 100 y 200°C se muestran en la Tabla V.6. Además, a modo de ejemplo, se muestra en la Figura V.4 el cromatograma de GC-MS correspondiente al perfil de ácidos grasos presentes en el extracto de *H. elongata* obtenido con etanol a 200 °C. Como se puede observar, los compuestos mayoritarios detectados fueron los ácidos palmítico (C_{16}), oleico ($C_{18:1}$), araquidónico ($C_{20:4}$), linoleico ($C_{18:2}$), α -linolénico ($C_{18:3}$) y mirístico (C_{14}), llegando a representar aproximadamente hasta el 88% del área total de los cromatogramas. El perfil de ácidos grasos obtenido coincide con los datos reflejados previamente en la bibliografía para la macroalga *H. elongata* (Sánchez-Machado y col., 2004a).

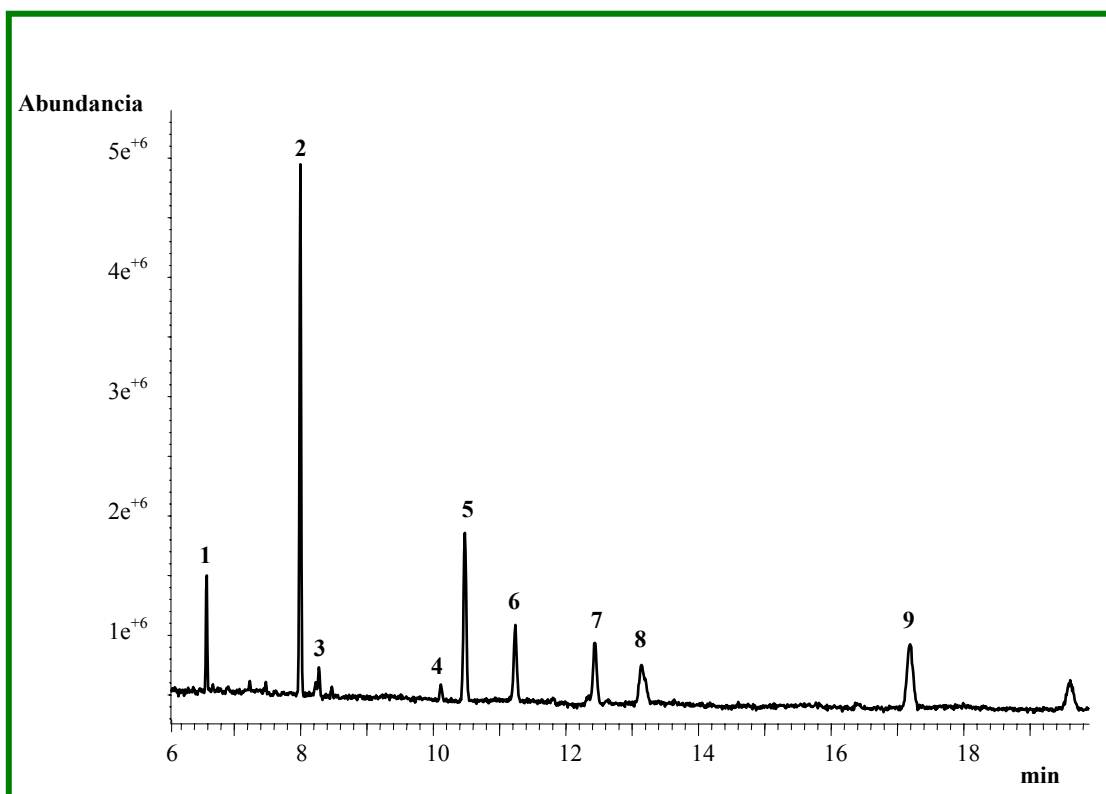


Figura V.4. Cromatograma de GC-MS correspondiente a los ácidos grasos (metil ésteres) detectados en el extracto de *H. elongata* producido por PLE con etanol a 200°C. La numeración de los picos se corresponde con la dada en la Tabla V.6.

Tabla V.6. Identificación mediante GC-MS de los ácidos grasos (metil ésteres) encontrados en los extractos de PLE de *H. elongata*. Contribución de cada pico al área total (% área normalizada). ID: Números de picos en la Figura V.4. T.R., tiempo de retención.

| ID | TR (min) | Nombre común | Ácidos grasos (metil ésteres) | Etanol | | Hexano | |
|-----------------------------|-------------|----------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | 100°C | 200°C | 100°C | 200°C |
| | | | | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) | Área norm. (%) |
| 1 | 6.6 | Ácido mirístico | Ácido tetradecanoico | | 8.75 | 10.40 | 6.88 |
| 2 | 8.0 | Ácido palmítico | Ácido hexadecanoico | 64.00 | 31.83 | 25.90 | 26.96 |
| 3 | 8.3 | Ácido palmitoleico | Ácido 9-hexadecenoico | | 2.32 | 4.60 | 2.02 |
| 4 | 10.1 | Ácido esteárico | Ácido octadecanoico | | 1.32 | 2.02 | 1.09 |
| 5 | 10.5 | Ácido oleico | Ácido 9-octadecenoico | 36.00 | 16.47 | 13.17 | 16.64 |
| 6 | 11.3 | Ácido linoleico | Ácido 9,12-octadecadienoico | | 9.11 | 9.86 | 9.58 |
| 7 | 12.5 | Ácido α -linolénico | Ácido 9,12,15-octadecatrienoico | | 8.43 | 6.81 | 9.11 |
| 8 | 13.2 | Fitol | 2-Hexadecen-1-ol,3,7,11,15-tetrametil- | | 7.89 | 10.19 | 10.85 |
| 9 | 17.2 | Ácido araquidónico | Ácido 5,8,11,14-eicotetraenoico | | 13.88 | 17.04 | 16.89 |
| AREAS TOTALES (u.a.) | | | | 8367116 | 259768991 | 687323920 | 577423605 |

En un intento de relacionar las actividades antimicrobianas con la presencia de compuestos volátiles y ácidos grasos, se estudiaron comparativamente los datos facilitados por los ensayos *in-vitro* y los datos correspondientes a la caracterización química por GC-MS de los extractos producidos por PLE. En este sentido, los extractos que presentaron mayor actividad antimicrobiana fueron los obtenidos con etanol, seguidos por los extractos de hexano. Sin embargo, en términos de compuestos volátiles se puede apreciar que las cantidades de compuestos volátiles en los extractos de hexano fueron más elevadas que las encontradas en los extractos de etanol. Por otro lado, tampoco se correlaciona la actividad antimicrobiana con la cantidad de volátiles obtenidos a altas temperaturas, ya que la actividad antimicrobiana fue generalmente mejor en los extractos obtenidos a altas temperaturas, mientras que la cantidad de compuestos volátiles obtenidos a 200°C fue menor, independientemente del disolvente empleado. En cuanto a la posible correlación entre la actividad antimicrobiana y la cantidad de ácidos grasos extraída, los extractos que mayores unidades de área presentaron fueron los obtenidos con hexano a 100°C; estos extractos presentaron peor actividad antimicrobiana que los extractos obtenidos con etanol.

Por tanto, a la vista de estas observaciones se puede concluir que, si bien estos compuestos podrían tener un efecto positivo en la actividad antimicrobiana total mostrada por los diferentes extractos, deberían existir otros compuestos que contribuirían a la actividad antimicrobiana de los mismos. Asimismo, cabe suponer que pudieran existir distintas sinergias entre los compuestos presentes, y que, por tanto,

tuvieran una influencia positiva en la actividad mostrada por los diferentes extractos (Kukuvinets y col., 2006).

V.5. CONCLUSIONES.

En este trabajo se ha demostrado la capacidad de la PLE para la extracción de compuestos con capacidad antioxidante y antimicrobiana de la macroalga marrón *Himanthalia elongata*, obteniéndose altos rendimientos de extracción con agua y etanol a altas temperaturas.

Las mejores capacidades antioxidantes de los extractos de PLE se consiguieron empleando disolventes con polaridad media alta, como el etanol a temperaturas bajas (50 y 100°C), así como empleando agua a altas temperaturas (200°C).

Asimismo, los extractos de etanol y hexano proporcionaron actividades antimicrobianas razonablemente elevadas.

Se identificaron como carotenoides mayoritarios, parcialmente responsables de la capacidad antioxidante, fucoxantina, zeaxantina y violaxantina. Los resultados demostraron la necesidad de determinar la presencia de otros compuestos que influyeran positivamente en la capacidad antioxidante, sobretodo en el extracto obtenido con agua a 200°C, ya que presentó la mayor capacidad antioxidante y no se detectó la presencia de estos compuestos.

Mediante GC-MS se determinaron los compuestos volátiles y los ácidos grasos que podían contribuir a la actividad antimicrobiana asociada a los extractos, aunque su sola presencia no podía explicar completamente la actividad asociada a los extractos procedentes de esta macroalga.

Debido a que la capacidad antimicrobiana y antioxidante fueron más altas con etanol a 100°C y los rendimientos en estas condiciones fueron aceptables, se puede concluir que éstas serían las condiciones óptimas seleccionadas para la extracción mediante PLE de compuestos funcionales de *Himanthalia elongata*.

Discusión General a la Primera Parte

En esta Parte I de la presente Memoria se han demostrado las grandes posibilidades del uso combinado de la extracción presurizada con disolventes junto con técnicas avanzadas de análisis químico y funcional para la realización de un primer *screening* de los compuestos bioactivos de macro- y microalgas.

En general, como se ha podido apreciar a lo largo de los cuatro capítulos incuados en esta primera parte, el disolvente que generalmente permitía la extracción de compuestos con mayores actividades funcionales fue el etanol, independientemente del alga estudiada. Además, este disolvente presentó siempre altos rendimientos de extracción, lo que podría aprovecharse, junto con su consideración de seguro para la industria alimentaria, para obtener extractos mediante PLE a partir de macro- y microalgas potencialmente útiles para ser utilizados en la industria alimentaria. Por el contrario, los extractos generados con hexano proporcionaban actividades antimicrobianas aceptables, si bien su actividad antioxidante era generalmente menor, como también su rendimiento. En este sentido, cabe destacar que los rendimientos obtenidos utilizando hexano mediante PLE fueron siempre significativamente menores que los obtenidos utilizando etanol o agua como disolventes de extracción.

En cuanto al empleo de agua como disolvente para la extracción de compuestos funcionales, ésta podría ser viable si se tienen en cuenta diferentes aspectos tales como las ventajas *per se* del agua como disolvente, los elevados rendimientos de extracción y las buenas capacidades antioxidantes obtenidas a altas temperaturas (200°C). En relación a la actividad antimicrobiana mostrada por los extractos acuosos, ésta fue siempre menor que la proporcionada por los extractos obtenidos con disolventes orgánicos. Por otro lado, no se consiguieron identificar los compuestos responsables de la actividad antioxidante que presentaron los extractos acuosos a 200°C en ninguna de las macro- y microalgas estudiadas. Es importante destacar que, en todos los resultados de capacidades antioxidantes de extractos acuosos (independientemente del tipo de alga), se observó la clara tendencia de un aumento muy significativo de la actividad antioxidante de los extractos producidos con agua a 200°C, en comparación con los obtenidos a temperaturas menores. Esta observación motivó los estudios ulteriores que se describen en la Parte III de la presente Memoria, y que están encaminados a la observación de la variación de la composición química de extractos obtenidos mediante

PLE con agua a muy altas temperaturas a partir de matrices naturales, en concreto hacia la posibilidad de formación de neoantioxidantes durante estos procesos de extracción.

Por tanto, en conclusión, como se ha comentado anteriormente, el etanol sería el disolvente más equilibrado para la extracción de compuestos funcionales a partir de algas.

En cuanto a las cuatro algas estudiadas, *Cystoseira abies-marina* fue la especie que permitió la obtención de extractos más activos desde el punto de vista de su capacidad antioxidante. De hecho, los extractos obtenidos con PLE a partir de esta macroalga presentaron una elevada capacidad antioxidante cuando se empleó cualquier disolvente en la extracción, pero sobretodo con etanol a temperaturas medias (100-150 °C). Además, se pudo correlacionar que parte de la capacidad antioxidante que poseían estos extractos, estaba directamente relacionada con los carotenoides identificados. Asimismo, el rendimiento de extracción en estas condiciones fue relativamente alto (hasta el 11%).

Por su parte, los extractos (PLE) obtenidos a partir de *Chlorella vulgaris* presentaron una elevada capacidad antioxidante cuando se empleó agua como disolvente de extracción a 200°C. No obstante, la composición precisa de este extracto no pudo conocerse, dado que no presentó pigmentos antioxidantes. Por tanto, sería necesaria una caracterización química en mayor detalle de forma que se pudiera constatar la composición química de este tipo de extracto para su posterior aprovechamiento por parte de la industria alimentaria. De igual manera, los extractos obtenidos con etanol a bajas temperaturas a partir de *Himantalia elongata* mostraron una alta capacidad antioxidante, si bien dicha actividad no podía correlacionarse directamente con su composición en pigmentos. Por último, los resultados menos satisfactorios se obtuvieron con la microalga *Synechocystis* sp.

En conjunto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en términos de actividad antimicrobiana y actividad antioxidante, *Cystoseira abies-marina* puede considerarse como el organismo con un mayor potencial entre los estudiados en este trabajo. En este sentido, combinando los resultados ofrecidos por el *screening* de condiciones de extracción, las condiciones más adecuadas para la obtención de

compuestos funcionales, antioxidantes y antimicrobianos, a partir de esta macroalga mediante PLE incluiría la utilización de etanol como disolvente a una temperatura de 150°C.

Como conclusión general a esta primera Parte, se puede decir, que se pusieron a punto satisfactoriamente las metodologías adecuadas que permitieron llevar a cabo un *screening* rápido de diferentes especies de miro- y macroalgas. Con esta metodología fue posible determinar, en muestras naturales, compuestos con actividades funcionales de interés, así como las condiciones óptimas de extracción para la obtención de extractos complejos con actividad antimicrobiana y/o antioxidante.

No obstante, cabe mencionar que los métodos empleados para la caracterización química de los extractos no han permitido explicar completamente la relaciones entre las actividades funcionales observadas en los extractos, aunque sí han sido capaces de proporcionar una valiosa información acerca de la composición de los mismos. En consecuencia, en la Parte II de la presente memoria, se profundizó en el estudio de otros compuestos funcionales que podrían formar parte de los extractos obtenidos, y que serían asimismo responsables de dichas actividades. En concreto, se llevó a cabo un *screening* de los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos e isoflavonas) que podrían contener estas algas y que pudieran explicar las actividades funcionales proporcionadas por sus extractos complejos.

Bibliografía

Abe, K., Hattori, H., Hirano, M. (2007). Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *Mueltistriata*. *Food Chem.* 100: 656-661.

Adhikari, U., Mateu, C.G., Chattopadhyay, K., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Ray, B. (2006). Structure and antiviral activity of sulphated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry* 67: 2474-2482.

Ahmed, D., Arshad, M.A., Asghar, M.N., Aujla, M.I. (2010). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Otostegia limbata*. *Asian J Chem.* 22: 4524-4532.

Basile, A., Jiménez-Carmona, M.M., Clifford, A.A. (1998). Extraction of Rosemary by superheated water. *J. Agric. Food Chem.* 46: 5205-5209.

Benkendorff, K., Davis, A.R., Rogers, C.N., Bremmer, J.B. (2005). Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 316: 29-44.

Berger, A., Jones, P.J.H. Abumweis, S.S. (2004). Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.* 3: 5-23.

Bertoldi, F.C., Sant'Anna, E., Da Costa Braga, M.V., Oliveira, J.L.B. (2006). Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Grasas Aceites* 57: 270-274.

Boehm, M., Nield, J., Zhang, P., Aro, E.M., Komenda, J., Nixon, P.J. (2009). Structural and mutational analysis of band 7 proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. starin PCC 6803. *J. Bacteriol.* 191: 6425-6435.

Borowitzka, M.A. (1999). Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae, En: Chemicals from microalga. Cohen, Z (Ed.), Taylor & Francis, Londres, Reino Unido, p.351.

Bradford, P.G., Awad, A.B. (2007). Phytosterols as anticancer compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 161-170.

Cha, K.H., Koo, S.Y., Lee D.U. (2008). Antiproliferative effects of carotenoids extracts from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10521-10526.

Cha, K.H., Lee, H.J., Koo, S.Y., Song, D.G., Lee, D.U, Pan, C.H. (2010a). Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 58: 793-797.

Cha, K.H., Kang, S.W., Kim, C.Y., Um, B.H., Na, Y.R., Pan, C.H. (2010b). Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* 58: 4756-4761.

Chen, Y.L., Huang, H.Y., Chen, Y.W., Huang, Z.Y., Tzeng, C.C., Liu, C.L., Yao, C.W. (2005). Synthesis and antimycobacterial evaluation of pyranone and pyridinone metal-chelator bearing fluoroquinolones. *Chin. Pharmaceut. J.* 57: 57-70

Couladis, M., Chinou, I.B., Tzakou, O., Loukis, A. (2002). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ballota pseudodictamnus* L. Benth. *Phytother. Res.* 16: 723-726.

Cunningham, J.F.R., Tice, A.B., Pham, C., Gantt, E. (2010). Inactivation of genes encoding plastoglobulin-like proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 leads to a light-sensitive phenotype. *J. Bacteriol.* 192: 1700-1709.

De Philippis, R., Vincenzini, M. (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 151-175.

Desbois, A.P., Smith, V.J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1629-1642.

Eikani, M.H., Golmohammad, F., Rowshanzamir, S. (2007). Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum*, L.). *J. Food. Eng.* 80: 735-740.

El Semary, N.A., Abb El Naby, M. (2010). Characterization of a *Synechocystis* sp. from Egyp with the potential of bioactive compounds production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1125-1133.

Flickinger, B.D., Huth, P.J. (2004). Dietary fats and oils: Technologies for improving cardiovascular health. *Curr. Atheroscler. Rep.* 6: 468-476.

Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., Empis, J. (1996). Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 57: 157-163.

Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A.P., Sousa, I., Empis, J. (2006). *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *Eur. Food Res. Technol.* 222: 362-367.

Haugan, J.A., Liaaen-Jensen, S. (1989). Improved isolation procedure for fucoxanthin. *Phytochemistry* 28: 2797-2798.

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S.A., Ebert, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* 148: 87-102.

Herrero, M., Martín-Álvarez, P. J., Señorans, F. J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2005). Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidant from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chem.* 93: 417-423.

Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., Reglero, G., Santoyo, S. (2006a). *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials. *J. Food Prot.* 69: 2471-247.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006b). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae-A review. *Food Chem.* 98: 136-148.

Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010a). Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J. Chromatogr. A* 1217: 2512-2520.

Huang, C.B., Ebersole, J.L. (2010a). A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. *Mol. Oral Microbiol.* 25: 75-80.

Huang, C.B., George, B., Ebersole, J.L. (2010b). Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their ester for oral microorganisms. *Arch. Oral Biol.* 55: 555-560.

Husain, A., Alam, M.M., Shaharyar, M., Lal, S. (2010). Antimicrobial activities of some synthetic butenolides and their pyrrolone derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25: 54-61.

L Ibáñez, E., Kubátová, A., Señorans, F.J., Cavero, S., Reglero, G., Hawthorne, S.B. (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 375-382.

J John, S., Sorokin, A.V., Thompson, P.D. (2007). Phytosterols and vascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 18: 35-40.

Johns, L., Belt, S., Lewis, C.A., Rowland, S., Massé, G., Robert, J.M., Köniq, W.A. (2000). Configurations of polyunsaturated sesterterpenoids from the diatom, *Haslea ostrearia*. *Phytochemistry* 53:607-611.

Kamat, S.Y., Wahidulla, S. Dsouza, L., Naik, C.G., Ambiye, V., Bhakuni, D.S., Goel, H.S., Garg, H.S., Srimal, R.C. (1992). Bioactivity of marine organisms, VI. Antivital evaluation of marine algal extracts from the Indian coast. *Bot. Marina* 35: 161-164.

Kapetanovic, R., Sladic, D., Popov, S., Zlatovic, M., Kljajic, Z., Gasic, M.J. (2005). Sterol composition of the Adriatic sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomium*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. *J. Serb. Chem. Soc.* 70: 1395-1400.

Kavitha, A., Prabhakar, P., Narasimhulu, M., Vijayalakshmi, M., Venkateswarlu, Y., Venkateswara Rao, K., Balaraju Subba Raju, V. (2010). Isolation, characterization and biological evaluation of bioactive metabolites from *Nocardia levis* MK-VL_133. *Microbiol. Res.* 165: 199-210.

Klejdus, B., Kopecký, J., Benešová, L., Vacek, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *J. Chromatogr. A* 1216: 763-771.

Kiss, E., Kós, P.B., Vass, L. (2009). Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J. Biotechnol.* 142: 31-37.

Korelusova, J., Kastovsky, J., Komerak, J. (2009). Heterogeneity of the cyanobacterial genus *synechocystis* and description of a new genus, *geminocystis*. *J. Phycol.* 45: 928-937.

Koşar, M., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem.* 91: 525-533.

Kukovinets, O.S., Zainullin, R.A., Kislitsyn, M.I. (2006). Natural Arylterpenes and their Biological activity. *Chem. Nat. Compd.* 42: 1-15

Kulkarni, A., Suzuki, S., Etoh, H. (2008). Antioxidant compounds from *Eucalyptus grandis* biomass by subcritical liquid water extraction. *J. Wood Sci.* 54: 153-157.

Lagarde, D., Beuf, L., Vermaas, W. (2000). Increased Production of Zeaxanthin and Other Pigments by Application of Genetic Engineering Techniques to *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 64-72.

Le Tutour, B., Benslimane, F., Gouleau, M.P., Gouygou, J.P., Saldan, B., Quemeneur, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongate*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.* 19 :121-129.

Luque De Castro, M.D., Jiménez-Carmona, M.M., Fernández-Pérez, V. (1999). Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends Anal. Chem.* 18: 708-716.

Ma, Y., Ye, X., Xu, G., Xu, G., Liu, D. (2008) Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. *Ultrason. Sonochem.* 15: 227-232.

Maeda, H., Sakuragi, Y., Bryant, D. A., DellaPenna, D. (2005). Tocopherols Protect *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 from Lipid Peroxidation. *Plant Physiol.* 138: 1422-1435.

Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about in Vitro evaluation of antioxidante properties. *Anal. Chim. Acta* 613: 1-19.

Maksimova, I.V., Bratkovskaya, L.B., Plekhanov, S.E. (2004). Extracellular carbohydrates and polysaccharides of the alga *Chlorella pyrenoidosa* Chick S-39. *Biol. Bull.* 31: 175-181.

Mao, W., Li, H., Li, Y., Zhang, H., Qi, X., Sun, H., Chen, Y., Guo, S. (2009). Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysachharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). *Int. J. Biol. Macromol.* 44: 70-74.

Marxen, K., Vanselow, K.H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., Hansen, U.P. (2007). Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors* 7: 2080-2095.

Mayer, A.M.S., Hamann, M.T. (2005). Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanism of action. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Pharmacol.* 140: 265-286.

Mendes, R.L., Fernandes, H.L., Coelho, J.P., Reis, E.C., Cabral, J.M.S., Novais, J.M., Palabra, A.F. (1995a). Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chem.* 53: 99-103.

Mendes, R. L., Coelho, J. P., Fernandes, H. L., Marruchp, I. J., Cabral, J. M. S., Novais, J. M., Palavra, A. F. (1995b). Applications of supercritical CO₂ extraction to microalgae and plants. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 62: 53-59.

Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., Palabra, A.F. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorg. Chim. Acta* 356: 328-334.

Mendiola, J.A., Marín, F.R., Hernández, S.F., Arredondo, B.O., Señoráns, F.J., Ibáñez, E., Reglero, G. (2005). Characterization via LC-DAD and LC-MS/MS of supercritical fluid antioxidant extracts of *Spirulina platensis* microalga. *J. Sep. Sci.* 28: 1031-1038.

Mendiola, J.A., Torres, C.F., Toré, A., Martín-Álvarez, P.J., Santoyo, S., Arredondo, B.O., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2007b). Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content. *Eur. Food Res. Technol.* 224: 505-510.

Mendiola, J.A., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2007c). Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *J. Chromatogr. A* 1152: 234-246.

Mendoza, H., Martel, A., Jiménez del Río, M., García Reina, G. (1999). Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.*

11: 15-19.

Mihailovic, V., Vukovic, N., Niciforovic, N., Solujic, S., Sukdolak, S. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Gentiana asclepiadea* L. *J. Serb. Chem. Soc. DOI:10.2298/JSC091204041M*.

Moreno, P., Petkov, G., Ramazanov, Z., Garcia, G. (1998). Lipids, fatty acids and sterols of *Cystoseira abies-marina*. *Bot. Mar.* 41: 375-378.

Morris, H.J., Carrillo, O., Almarales, A., Bermudez, R.C., Lebeque, Y., Fontaine, R., Llauro, G., Beltran, Enzime, Y. (2007). Immunostimulant activity of an enzymatic protein hydrolysate from green microalga *Chlorella vulgaris* on undernourished mice. *Enzime Microb. Technol.* 40: 456-460.

Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Sci. Technol.* 43:992-999.

Mulo, P., Sicoraa, C., Aro, E.M. (2009). Cyanobacterial psbA gene family: Optimization of oxygenic photosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 3697-3710.

Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., Okonogi, S. (2010). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT-Food Sci. Technol.* 43: 1095-1103.

NCCLS. (1999). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, USA, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M100-S9.

Nichols, H.W., Bold, H.C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. *J. Phycol.* 1: 34-38.

Nishino, H., Murakoshi, M., Li, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M., Mou, X.Y., Wada, S., Masuda, M., Ohsaka, Y., Yogosawa, S., Satomi, Y., Jinno, K. (2002). Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* 21: 257-264.

Nowak, J.Z. (2006). Age-related macular degeneration (AMD): Pathogenesis and therapy. *Pharmacol. Rep.* 58: 353-363.

Onofrejevová, L., Vašíčková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S., Kopecký, J., Vacek, J. (2009). Bioactive phenols in algae: The applications of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 464-470.

Ozdemir, G., Karabay, N.U., Dalay, M.C., Pazarbasi, B. (2004). Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Res.* 18: 754-757.

Park, J.S., Chew, B.P., Wong, T.S. (1998). Dietary lutein from marigold extract inhibits mammary tumor development in BALB/c mice. *J. Nutr.* 128: 1650-1656.

Pengzhan, Y., Quanbin, Z., Ning, L., Zuhong, X., Yanmei, W., Zhien, L. (2003). Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. *J. Appl. Phycol.* 15: 21-27.

Petkov, G., Garcia, G. (2007). Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*?. *Biochem. Syst. Ecol.* 35: 281-285.

Plaza, M., Jaime, L., Ibáñez, E., Reglero, G., Señorans, F.J., Santoyo, S. (2010). Pressurized liquid extraction as an alternative process to obtain antiviral agents from the edible seaweed *Himantalia*

elongata.

Prakash, J.S.S., Sinetova, M., Zorina, A., Kupriyanova, E., Suzuki, I., Murata, N., Los, D.A. (2009). DNA supercoiling regulates the stress-inducible expression of genes in the cyanobacterium *Synechocystis*. *Mol. Biosyst.* 5:1904-1912.

Quillez, J., Garcia-Lorda, P., Salas-Salvado, J. (2003). Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clin. Nutr.* 22: 343–351.

Ragassa, C.Y., de Luna, R.D., Holifena, J.G. (2005). Antimicrobial terpenoids from *Pterocarpus indicus*. *Nat. Prod. Res.* 19: 305-309.

Rahman, A.U., Choudhary, M.I., Majjed, A., Shabbir, M., Ghani, U., Shameel, M. (1997). A succinylanthranilic acid ester and other bioactive constituents of *Julyna laminarioides*. *Phytochemistry* 46: 1215-1218.

Ramazanov, Z., Jimenez del Rio, M., Ziegenfuss, T. (2003). Sulfated polysaccharides of brown seaweed *Cystoseira canariensis* bind to serum myostatin protein. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* 27: 101-106.

Rangsriwong, P., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Goto, M., Shotipruk, A. (2009). Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. *Fruits. Sep. Purif. Technol.* 66: 51-56.

Rao, K., Ch, B., Narasu, L.M., Giri, A. (2010). Antibacterial activity of *Alpina galanga* (L.) wild crude extracts. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162: 871-884.

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 Radical Biol. Med.* 26: 1231-1237.

Ribaya-Mercado, J.D., Blumberg, J.B. (2004). Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 23: 567S-587S.

Rodriguez-Bernaldo de Quiros, A., Castro de Ron, C., Lopez-Hernandez, J., Lage-Yusty, M.A. (2004). Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr. A* 1032: 135-139.

Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Frecha-Ferreiro, S., Vidal-Pérez, A.M., López-Hernández, J. (2010a). Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *Eur Food Res. Technol.* 231: 495-498.

Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Lage-Yusty, M.A., López-Hernández, J. (2010b). Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chem.* 121: 634-638.

Rodriguez-García, I., Guil-Guerrero, J.L. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of the three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chem.* 108: 1023-1026.

Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 1560-1565.

Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señorans, F.J., Cifuentes A., Ibáñez, E. (2010). Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 456-463.

Rudkowska, I., Jones, P.J.H. (2007). Functional foods for the prevention and treatment of cardiovascular

diseases: Cholesterol and beyond. *Expet. Rev. Cardiovasc. Ther.* 5: 477-490.

Rzama, A., Dufourc, E.J., Arreguy, B. (1994). Sterols from green and blue-green algae grown on reused waste water. *Phytochemistry*, 37: 1625-1628.

Sánchez-Machado, D.I., López-Hernandez, J., Paseiro-Losada, P. (2002). High performance liquid chromatographic determination of alfa-tocopherol in macroalgae. *J. Cromatogr. A* 976: 277-284.

Sanchez-Machado, D.I., Lopez-Cervantes, J., Lopez-Hernandez, J., Paseiro-Losada, P. (2004a). Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* 85: 439-444.

Sanchez-Machado, D.I., Lopez-Hernandez, J., Paseiro-Losada, P., Lopez-Cervantes, J. (2004b). An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed. Chromatogr.* 18: 183-190.

Sanchez-Machado, D.I., Lopez-Cervantes, J., Lopez-Hernandez, J., Paseiro-Losada, P., Simal-Lozano, J. (2004c). Determination of the uronic acid composition of seaweed dietary fibre by HPLC. *Biomed. Chromatogr.* 18: 90-97.

Santoyo, S., Herrero, M., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Jaime, L. (2006). Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platenses*. *Phytother. Res.* 18: 754-757.

Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Señorans, F.J., Ibáñez, E. (2009). Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT- Food Sci. Technol.* 42:1213-1218.

Santoyo, S., Plaza, M., Jaime, L., Ibáñez, E., Reglero, G., Señorans, F.J. (2010). Pressurized liquid extracts from the microalgae *Chlorella vulgaris* as a source of potential antiviral agents. *J. Agric. Food Chem.* DOI: 10.1021/jf100369h.

Schiedt, K. (1995). Chromatography: Part III. Thin-Layer Chromatography, En: Carotenoids, Volume 1A: Isolation and analysis. Britton, G., Liaen-Jensen, S., & Pfander, H. (Ed.), Birkhäuser, Basel, Suiza, p. 131.

Sharma, R.K. (1993). Phytosterols: Wide-spectrum antibacterial agents. *Bioor. Chem.* 21: 49-60.

Sheng, J., Yu, F., Zhihong, X., Zhao, L., Zhu, X., Hu, Q. (2007). Preparation, identification and their antitumor activities *in vitro* of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chem.* 105: 533-539.

Shi, Y., Sheng, J., Yang, F., Hu, Q. (2007). Purification and identification of polysaccharide derived from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chem.* 103: 101-105.

Shibata, S., Hayakawa, K., Egashira, Y., Sanada, H. (2007). Hypocholesterolemic Mechanism of *Chlorella*: *Chlorella* and its indigestible fraction enhance hepatic cholesterol catabolism through up-regulation of cholesterol 7 α -Hydroxylase in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 916-925.

Simopoulos, A.P. (2004). Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Rev. Int.* 20: 77-90.

Singh, A., Singh, S.P., Bamezai, R. (1998). Perinatal influence of *Chlorella vulgaris* (E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation. *Anticancer Res.* 18: 1509-1514.

Stojanovic, G., Palic, R., Alagic, S., Zekovic, Z. (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of semi-oriental tobacco, Otlja. *Flavour Frag. J.* 15: 335-338.

Sun, C.Q., O'Connor, C.J., Roberton, A.M. (2003). Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *Immunol. Med. Microbiol.* 36: 9-17.

Tabart, J., Keversa, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommessa, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113: 1226-1233.

Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzmán, J., Cailiau, C. & Marty, J.C. (1996). A rapid HPLC method for the determination of phytoplankton pigments in natural waters including the separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *J. Plankton Res.*, 18: 2377-2382.

Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Molin, S., Givskov, M., Høiby, N. (2004). Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 1054-1061.

Wu, Z., Wu, S., Shi, X. (2007). Supercritical fluid extraction and determination of lutein in heterotrophically cultivated *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Food Process Eng.* 30: 174-185.

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.

Ye, H., Wang, K., Zhou, C., Liu, J., Zeng, X. (2008). Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chem.* 111: 428-432.

Young, A.J. (1993). Carotenoids in pigment-protein complexes. In: A.J. Young and G. Britton, Editors, Carotenoids in Photosynthesis, Chapman & Hall, London, pp. 72-95.

Zhang, S., Spann, K.W., Frankel, L.K., Morony, J.V., Bricker, T.M. (2008). Identification of two genes, sl10804 and slr1306, as putative components of the CO₂-concentrating mechanism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 190: 8234-8237.

Zhao, L., Sweet, B.V. (2008). Lutein and zeaxanthin for macular degeneration. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 65:1232-1238

Zheng, C.J., Yoo, J.S., Lee, T.G., Cho, H.Y., Kim, Y.H., Kim, W.G. (2005). Fatty acids synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 579: 5157-5162.

Zinedine, A., Elakhdari, S., Faid, M., Benlemlih, M. (2004). Antifungal and anti-aflatoxinogenic activity of the brown algae *Cystoseira tamariscifolia*. *J. Mycol. Med.* 14: 201-205.

Zulueta, A., Esteve, M.J., Frigola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* 114:310-316.

SEGUNDA PARTE

Introducción General a la Segunda Parte

Las investigaciones incluidas en esta Segunda Parte se llevaron a cabo en la Universidad de Mendel de Agricultura y Ciencias Forestales en Brno (República Checa), durante una estancia de investigación, de tres meses de duración, en el Departamento de Química y Bioquímica de dicha Universidad, bajo la dirección del Prof. Borivoj Klejdus.

Como se ha comentado en la Introducción de la presente Memoria, las algas pueden suponer una importante fuente de diferentes compuestos bioactivos. Uno de estos tipos de compuestos son los compuestos fenólicos (Onofrejová y col., 2010; Klejdus y col., 2009; Kazłowska y col., 2010; Parys y col., 2007), algunos de los cuales pueden ejercer un efecto fisiológico beneficioso sobre la salud humana. Muchos de los compuestos bioactivos en algas marinas se producen bajo condiciones de estrés (cambios de salinidad, temperatura, variación en la irradiación, etc.), y pueden poseer actividad antioxidante (Wang y col., 2010; Zhang y col., 2010; Cox y col., 2010; Hajimahmoodi y col., 2010; Rodríguez-Meizoso y col., 2010; Herrero y col., 2006c; Herrero y col., 2004; Onofrejová y col., 2009), antimicrobiana (Cox y col., 2010; Alang y col., 2009; Santoyo y col., 2006; Santoyo y col., 2009; Komenarska y col., 2009; Shanmughapriya y col., 2008), y antiviral (Yasuhara-Bell y Lu, 2010; Santoyo y col., 2010; Plaza y col., 2010; Harden y col., 2009; Montanha y col., 2009; Adhikari y col., 2006).

Por tanto, de acuerdo con los resultados expuestos hasta el momento en la presente Memoria, cabe suponer que la presencia de compuestos fenólicos en los extractos obtenidos mediante PLE de diferentes tipos de algas, podría jugar un papel importante en la capacidad antioxidante total mostrada por dichos extractos. Por ello, y teniendo en cuenta que la presencia de compuestos fenólicos no se ha estudiado en profundidad en algas, en esta Segunda Parte se propone la búsqueda de diferentes grupos de compuestos fenólicos que podrían aportar cierta actividad antioxidante a los extractos complejos obtenidos y descritos en la primer parte de la Memoria. Estos estudios se recogen en los Capítulos VI y VII, y están enfocados a confirmar la presencia de ácidos fenólicos e isoflavonas, respectivamente, en diferentes tipos de algas. Para ello se ha estudiado la composición química de diversas especies de macro- y microalgas cubriendo los principales tipos de algas distribuidas en la naturaleza, como

son cianobacterias (Cyanophyta), algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y algas marrones (Phaeophyta).

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, y ya se han descrito más de 8000 estructuras conocidas de diferentes compuestos incluidos en este amplio grupo (Harborne, 1993). Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas (u otras matrices naturales) y ejercen diversas funciones; desde la coloración de flores hasta la impregnación de lignina de las paredes pecto-celulósicas, siendo, asimismo, encargados de los mecanismos de defensa frente agresiones externas (radiación UVA, predadores, ataques fúngicos y víricos) (Dixon y col., 1996). Sin embargo, dado que los animales no son capaces de sintetizar este tipo de compuestos, tienen que incorporarlos directamente a través de la dieta.

El esqueleto común a todos los compuestos fenólicos consta de un anillo bencénico que contiene, al menos, un grupo hidroxilo. Así pues, las distintas familias de compuestos fenólicos se clasifican principalmente por el número de átomos de carbono que presentan en su estructura (Tabla 2.1). En la Tabla 2.1 se describen las principales familias de compuestos fenólicos, destacándose, en negrita, las estudiadas en el presente trabajo.

Tabla 2.1. Principales familias de compuestos fenólicos (los compuestos fenólicos estudiados en el presente capítulo están escritos en negrita).

| Estructura | Familia |
|-------------------|-------------------------------------|
| C_6 | Fenoles simples |
| C_6-C_1 | Ácidos fenólicos |
| C_6-C_2 | Ácidos fenólicos y acetofenonas |
| C_6-C_3 | Cumarinas y ácidos hidroxicinámicos |
| $C_6-C_1-C_6$ | Xantonas y benzofenonas |
| $C_6-C_2-C_6$ | Estilbenos |
| $C_6-C_3-C_6$ | Chalconas |
| $C_6-C_3-C_6$ | Flavonoides |
| $(C_6-C_3-C_6)_n$ | Taninos condensados |
| $(C_6-C_1)_n$ | Taninos hidrolizables |

Por tanto, la obtención de este tipo de compuestos a partir de matrices naturales, como son las algas, podría ser de gran interés para su posterior utilización por parte de

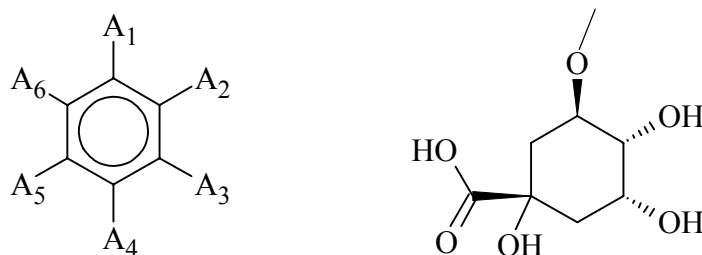
la industria alimentaria. Además, el desarrollo de nuevos procesos de extracción así como de potentes métodos analíticos avanzados es, asimismo, de gran importancia para el estudio y obtención de estos metabolitos a partir de algas. Así pues, en los dos siguientes capítulos se exponen los resultados obtenidos del estudio realizado para confirmar la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos, ácidos fenólicos e isoflavonas, en diversas clases de algas.

CAPÍTULO VI:

“Determinación de ácidos fenólicos en extractos obtenidos mediante PLE a partir de diferentes tipos de algas”

VI.1. INTRODUCCIÓN.

Los ácidos fenólicos son los metabolitos secundarios procedentes de plantas más ampliamente distribuidos en la naturaleza. El término *ácidos fenólicos*, en general, se emplea para designar fenoles que poseen un ácido carboxílico funcional. Sin embargo, cuando se habla de los metabolitos de plantas, se suele referir a los distintos grupos de ácidos orgánicos. Así, se pueden diferenciar dos grupos principales de ácidos fenólicos, los ácidos hidroxicinámicos y los ácidos hidroxibenzoicos (ver Figura VI.1). Aunque la estructura básica es la misma en todos ellos, el número y la posición de los grupos hidroxilo en los anillos aromáticos establecen los diferentes tipos de ácidos fenólicos que se pueden encontrar en matrices naturales.



| | A ₁ | A ₂ | A ₃ | A ₄ | A ₅ | A ₆ |
|---|----------------|----------------|------------------|----------------|------------------|----------------|
| Derivados del ácido benzoico^a | | | | | | |
| Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico | COOH | | | OH | | |
| Ácido protocatéquico | COOH | | OH | OH | | |
| Ácido gálico | COOH | | OH | OH | OH | |
| Ácido vanílico | COOH | | OCH ₃ | OH | | |
| Ácido siringico | COOH | | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | |
| Hidroxibenzaldehidos^a | | | | | | |
| 4-hidroxibenzaldehido | COH | | | OH | | |
| 3,4-dihidroxibenzaldehido | COH | | OH | OH | | |
| Derivados del ácido cinámico^b | | | | | | |
| Ácido <i>o</i> -cumárico | CH=CH-COOH | OH | | | | |
| Ácido <i>p</i> -cumárico | CH=CH-COOH | | | OH | | |
| Ácido cafeico | CH=CH-COOH | | OH | OH | | |
| Ácido ferúlico | CH=CH-COOH | | OCH ₃ | OH | | |
| Ácido sinápico | CH=CH-COOH | | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | |
| Ácido clorogénico | CH=CH-CO-X | | OH | OH | | |

^a Estructura de la izquierda; ^b Estructura de la derecha.

Figura VI.1. Estructura de los ácidos fenólicos.

Los ácidos fenólicos que con más frecuencia se pueden encontrar en fuentes naturales son el ácido cafeico y, en menor medida, el ácido ferúlico, que se encuentra

asociado a la fibra dietética mediante la formación de enlaces éster con la hemicelulosa. El ácido cafeico también se encuentra esterificado principalmente con el ácido quínico, dando lugar al ácido clorogénico, que está presente en el café, y en muchas frutas y verduras (Scalbert y Williamson, 2000). Los ácidos benzoicos o derivados del ácido hidroxibenzoico, tienen una estructura básica C₆-C₁. Los principales son los ácidos gálico, salicílico, *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, vanílico y siríngico. Estos cuatro ácidos se consideran universales ya que forman parte de las ligninas. Generalmente se presentan de forma conjugada en los vegetales, aunque pueden detectarse en forma libre en algunas frutas o tras su liberación como consecuencia del procesado. El ácido gálico se puede encontrar conjugado como tal o como sus dímeros (ácidos elágico), trímeros (ácido tergálico) o tetrameros (ácido galágico), los dos últimos menos frecuentes. Los ácidos gálico y elágico son componentes esenciales de los taninos hidrolizables, como por ejemplo los elagitaninos de fresas, frambuesas y zarzamoras. Generalmente los contenidos en estos ácidos son bajos a excepción de las frutas rojas (Manach y col., 2004).

Por su parte, los ácidos cinámicos o derivados del ácido hidroxicinámico, están ampliamente distribuidos como conjugados en matrices vegetales, incluyendo muchos alimentos y bebidas. Entre ellas, las frutas rojas constituyen una fuente significativa de estos compuestos. Salvo en el caso de alimentos procesados, raramente se encuentran como ácidos libres y de forma predominante aparecen esterificados con ácido quínico, tartárico o glucosa.

Los ácidos fenólicos, como se ha descrito anteriormente, poseen importantes funciones biológicas, entre la que destaca su elevada actividad antioxidante (Kumar, 2008; Duan y col., 2006; Ibrahim y col., 2010). Por tanto, de estar presentes estos compuestos en algas, podrían ser parcialmente responsables de la capacidad antioxidante encontrada en algunos de los extractos descritos en capítulos anteriores, obtenidos a partir de este tipo de organismos. Así pues, en el presente capítulo, se pretende realizar una búsqueda, en diferentes especies de algas rojas y marrones, de ácidos fenólicos, que ya han sido descritos previamente en algunas algas (Kazłowska y col., 2010, Onofrejová y col., 2010; Klejdus y col., 2009). Para la obtención de ácidos fenólicos a partir de algas, se utilizó la extracción con líquidos presurizados (PLE). Por otra parte, para detectar e identificar estos compuestos en los diferentes extractos se

empleó una técnica de análisis avanzada como es la cromatografía de líquidos de resolución rápida (RRLC, *Rapid Resolution Liquid Chromatography*) acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (MS/MS). En este estudio se emplearon macroalgas marinas marrones (*Sargassum muticum*, *Sargassum vulgare*, *Cystoseira abies-mariba* y *Undaria pinnatifida*) y rojas (*Hypnea spinella*, *Porphyra* spp., *Chondrus crispus* y *Halopitys incurvus*).

VI.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

Dado que la presencia de ácidos fenólicos en algas no se ha estudiado con gran detalle, el objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de este tipo de compuestos en algas, para lo cual se emplearon ocho especies diferentes de macroalgas marinas y la técnica de extracción con líquidos presurizados (PLE).

Para alcanzar este objetivo general, se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

6. Obtención de los extractos de las diferentes algas mediante PLE empleando una mezcla de metanol/agua (8:2, v/v) como disolvente de extracción, realizando dos ciclos de extracción de 130°C y 130 bar durante 10 minutos cada ciclo, y posterior purificación de los extractos por SPE.
7. Puesta a punto de un método de RRLC-MS/MS para la detección y cuantificación de ácidos fenólicos.
8. Identificación y cuantificación de los diferentes ácidos fenólicos, presentes en los extractos de algas obtenidos por PLE, mediante el empleo del método desarrollado (RRLC-MS/MS).

VI.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

VI.3.1. Muestras y reactivos.

Las muestras de las algas marinas (*Sargassum muticum*, *Sargassum vulgare*, *Cystoseira abies-marina*, *Hypnea spinella*, *Porphyra* spp., *Undaria pinnatifida*, *Chondrus crispus* y *Halopitys incurvus*) empleadas consistieron en macroalgas liofilizadas, procedentes de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Canarias, España). En la Figura VI.2 se muestran las imágenes correspondientes a las especies estudiadas. Todas las muestras se almacenaron protegidas del oxígeno, humedad y luz en todo momento.

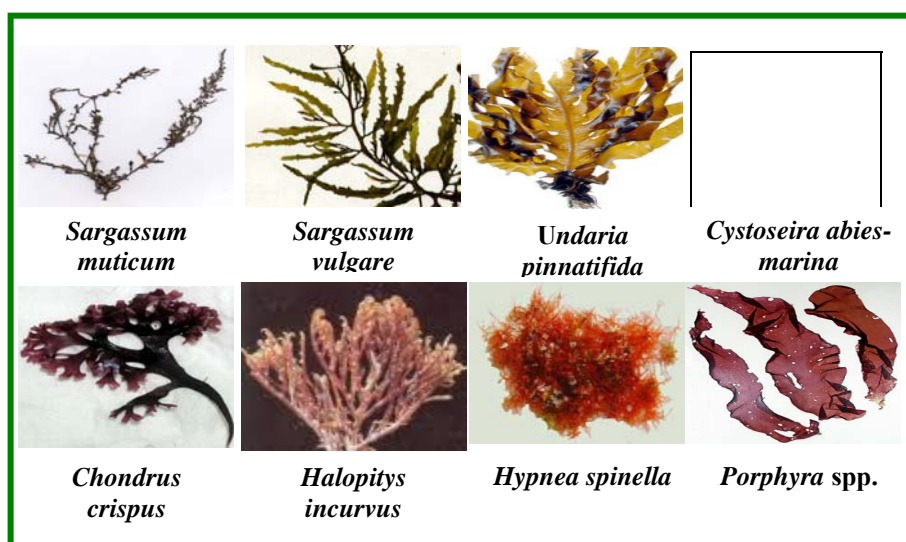


Figura VI.2. Fotografías de las diferentes especies de macroalgas empleadas en este trabajo.

Todos los disolventes orgánicos utilizados fueron de calidad HPLC. Acetonitrilo, metanol, ácido acético e hidróxido de amonio fueron suministrados por Fluka (Deisenhofen, Alemania). Los patrones de los compuestos fenólicos empleados fueron proporcionados por Sigma Aldrich (St. Louis, EEUU). Las soluciones madre de los diferentes patrones (10 µg/ml) se prepararon en metanol acuoso (1:1, v/v) y se almacenaron protegidas de la luz a 4°C. Las disoluciones de los patrones se prepararon con metanol/2% de ácido acético (9/1, v/v), en un rango de concentraciones desde 5 ng/ml hasta 5 µg/ml. Las soluciones se almacenaron a 4°C y protegidas de la luz. Todas las soluciones se filtraron a través de filtros de nylon (13 mm x 0.45 µm) (MetaChem, Torrance, CA, EEUU) antes de la separación por HPLC. El agua ultrapura usada se

obtuvo utilizando un equipo Milli-Q Water (Millipore, Bedford,EEUU).

VI.3.2. Procedimiento de extracción (PLE-SPE).

VI.3.2.1. Extracción con líquidos presurizados (PLE).

Para llevar a cabo las extracciones de algas mediante PLE, se empleó un equipo PSE-one de Applied Separations (EEUU) (Figura VI.3). Todas las extracciones se realizaron por duplicado, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.3.2 de la presente Memoria, con ligeras modificaciones. En concreto, las extracciones se realizaron en una celda de 10 ml de capacidad empleando 50 mg de la muestra de alga, que se envolvieron en papel de filtro para evitar el taponamiento del sistema de extracción. Asimismo la celda de extracción se llenó de esferas de vidrio como soporte sólido, quedando el paquete de papel con la muestra situado en la parte central de la celda de extracción. Las extracciones se llevaron a cabo a una temperatura de 130°C, una presión de 1850 psi y empleando como disolvente de extracción metanol acuoso (80%, v/v). Además, las extracciones se realizaron en dos ciclos de extracción de 10 minutos cada uno, con un periodo de precalentamiento de 5 min.



Figura VI.3. Imagen del equipo de extracción con líquidos presurizados (PSE-one, Applied Separations) utilizado en este trabajo.

VI.3.2.2. Hidrólisis ácida.

Una vez obtenidos los extractos mediante PLE, se evaporó el disolvente de extracción en un rotavapor (IKA RV 02-ST). Las muestras se redisolviéron en 2.5 ml de HCl 2M y se hidrolizaron en un termobloque (Thermomixer, Eppendorf) a 25°C y 1500 rpm durante 30 minutos. A continuación, los hidrolizados se purificaron usando extracción en fase sólida (SPE).

VI.3.2.3. Extracción en fase sólida (SPE).

Los extractos de las algas obtenidos mediante PLE y posteriormente hidrolizados se purificaron por extracción en fase sólida (SPE) empleando cartuchos Oasis MCX 3 cc (60 mg, tamaño de partícula 38 µm). Los cartuchos se acondicionaron haciendo pasar 2 ml de metanol seguidos por 2 ml de agua milli-Q. A continuación se pasó la muestra (2.5 ml) a través del cartucho y se lavó éste con una solución acuosa con un 5% de metanol y un 2% de ácido acético. Los analitos retenidos en el cartucho se eluyeron a continuación mediante el empleo de 2 ml de diferentes soluciones de metanol acuoso (fracciones: 5%, 10%, 15% y 20% de metanol) con 2% de NH₄OH. Todas las fracciones se mezclaron y se secaron mediante un rotavapor. Finalmente, las muestras se disolvieron en 500 µl de la fase móvil empleada para el análisis de RRLC-MS/MS (acetonitrilo/0.2% ácido acético, 8/92, v/v). Como paso previo a su inyección en el RRLC-MS/MS, las muestras se filtraron con un filtro de disco de nylon de 45 µm.

VI.3.3. Cromatografía de líquidos de resolución rápida y espectrometría de masas en tándem.

Instrumentación. El equipo empleado consistió en un cromatógrafo Agilent 1200 *Series Rapid Resolution LC system* (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un desgasificador *on-line*, una bomba binaria, un inyector automático, un compartimento termostatizador para la columna, y un detector de haz de diodos (DAD). El sistema se acopló *on-line* a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (Agilent 6460 LC/MS con Agilent Jet Stream). El equipo utilizado se muestra en la Figura VI.4.



Figura VI.4. Imagen del equipo de cromatografía de líquidos de resolución rápida (Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC system, Agilent Technologies) acoplado a un detector de espectrometría de masas con analizador por triple cuadrupolo (Agilent 6460 Triple Cuadrupolo LC/MS con Agilent Jet Stream, Agilent Technologies) utilizado en este trabajo.

Cromatografía de líquidos de resolución rápida (RRLC). Para llevar a cabo las separaciones de los ácidos fenólicos se utilizó una columna analítica Zorbax SB-C₁₈ (50 x 2.1 mm, 1.8 μ m diámetro de partícula, Agilent Technologies, EEUU). El volumen de inyección fue de 0.5-10 μ l para las soluciones de patrones y de 25 μ l para los extractos de muestras reales. Para la separación de los distintos ácidos fenólicos, se utilizaron dos fases móviles, 0.2% (v/v) de ácido acético en agua (fase móvil A) y acetonitrilo (fase móvil B), siguiendo el gradiente que se puede observar en la Tabla VI.1, empleando un flujo constante de 0.8 mL/min. La columna analítica se equilibró mediante el paso de fase móvil (8% de fase móvil B) durante 3 minutos antes de la inyección de la siguiente muestra. La temperatura del horno de la columna se fijó en 26°C. Las longitudes de onda empleadas para la detección de los ácidos fenólicos por el detector DAD fueron 254, 210 y 280 nm.

Tabla VI.1. Gradiente empleado para el análisis de ácidos fenólicos por RRLC. A) agua con 0.2% ácido acético y B) acetonitrilo.

| Tiempo (min) | A (%) | B (%) |
|--------------|-------|-------|
| 0 | 92 | 8 |
| 0.79 | 92 | 8 |
| 1.19 | 80 | 20 |
| 1.99 | 80 | 20 |
| 3 | 75 | 25 |
| 3.5 | 92 | 8 |
| 4.5 | 92 | 8 |

Para cada uno de los compuestos se obtuvo su tiempo de retención y sus características individuales (simetría del pico y resolución, entre otros), así como las correspondientes ecuaciones de las rectas de regresión para el cálculo de la concentración.

Espectrometría de masas de triple cuadrupolo (MS/MS). Como herramienta para la detección de ácidos fenólicos se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con interfase de electrospray (ESI), operada en modo de ionización negativo. Como gas de secado, de nebulización y de colisión se empleó nitrógeno. Las condiciones optimizadas del ESI para realizar la detección de ácidos fenólicos se indican en la Tabla VI.2.

Tabla VI.2. Parámetros optimizados de ESI con la fase móvil seleccionada.

| Parámetros ESI | Valor óptimo |
|---|---------------------|
| Voltaje del capilar (V) | 4000 |
| Flujo (l/min) de gas de secado (N ₂) | 12 |
| Temperatura (°C) de gas de secado (N ₂) | 350 |
| Presión (psi) del gas nebulizador (N ₂) | 50 |

El voltaje del fragmentador (80, 100 y 120 V) y la energía de colisión (10 y 20 eV) se seleccionaron individualmente para cada compuesto (ver Tabla VI.3). Las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos de resolución rápida-MS/MS en el modo de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), de manera que se maximizara la sensibilidad de los mismos. Las diferentes transiciones utilizadas para la detección de cada compuesto cuantificado se muestran en la Tabla VI.3.

Tabla VI.3. Parámetros de transición MRM (modo ESI negativo).

| Compuesto fenólico | Transición (m/z) | Ión precursor→Ión producto | Fragmentación [V] | Energía de Colisión [eV] |
|---------------------------------|------------------|---|-------------------|--------------------------|
| Ácido clorogénico | 353→191 | [M-H] ⁻ →[M-H-caf] ⁻ | 100 | 10 |
| Ácido siríngico | 197→182 | [M-H] ⁻ →[M-H-CH ₃] ⁻ | 100 | 10 |
| Ácido ferúlico | 193→134 | [M-H] ⁻ →[M-H-CO ² -CH ₃] ⁻ | 100 | 10 |
| Ácido cafeico | 179→135 | [M-H] ⁻ →[M-H-CO ₂] ⁻ | 100 | 10 |
| Ácido gálico | 169→125 | [M-H] ⁻ →[M-H-CO ₂] ⁻ | 100 | 10 |
| Ácido vanílico | 167→152 | [M-H] ⁻ →[M-H-CH ₃] ⁻ | 80 | 10 |
| Ácido <i>p</i> -cumárico | 163→119 | [M-H] ⁻ →[M-H-CO ₂] ⁻ | 100 | 10 |
| Ácido protocatéquico | 153→109 | [M-H] ⁻ →[M-H-CO ₂] ⁻ | 100 | 10 |
| Vanilina | 151→136 | [M-H] ⁻ →[M-H-CH ₃] ⁻ | 100 | 10 |
| 3,4-dihidroxibenzaldehído | 137→108 | [M-H] ⁻ →[M-H-COH] ⁻ | 120 | 20 |
| Ácido salicílico | 137→93 | [M-H] ⁻ →[M-H-CO ₂] ⁻ | 100 | 10 |
| Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico | 137→93 | [M-H] ⁻ →[M-H-CO ₂] ⁻ | 100 | 10 |
| <i>p</i> - Hidroxibenzaldehído | 121→92 | [M-H] ⁻ →[M-H-COH] ⁻ | 120 | 20 |

VI.3.4. Validación del método de análisis.

La reproducibilidad de los análisis realizados en el mismo día por HPLC/MS-MS se midió mediante el empleo de soluciones de patrones a concentraciones parecidas a las esperadas para muestras reales. Una serie de análisis (n=6) se inició a las 7:00, 9:00 y 11:00 AM y a las 1:00, 3:00 y 5:00 PM. Del mismo modo, para determinar la reproducibilidad de los análisis en días diferentes se realizó una serie de 6 análisis que se midieron en 6 días laborales consecutivos a las 9:00.

VI.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VI.4.1. Optimización y validación del método de análisis por RRLC-MS/MS.

Tal y como se ha comentado, para el análisis de los ácidos fenólicos procedentes de algas se utilizó un método de cromatografía de líquidos de resolución rápida acoplada a un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo con un sistema de ionización por electrospray (ESI-MS/MS). El procedimiento (ver sección VI.3.3) se optimizó para la separación simultánea de los 13 compuestos fenólicos estudiados; el orden de elución y el tiempo de retención de los distintos compuestos se pueden apreciar en la Tabla VI.4.

Una vez separados los compuestos fenólicos en el cromatógrafo de líquidos, el efluente de la columna se introdujo en un detector ESI-MS/MS que operó en modo de ionización negativo. Los compuestos se identificaron gracias a la detección de su ión molecular $[M-H]^-$ así como de sus productos específicos de fragmentación, siendo por lo general $[M-CO_2]^-$ (ver Tabla VI.3). El método de análisis optimizado se podía utilizar para la detección de cantidades por debajo de ng/ml de ácidos fenólicos en las muestras analizadas. Los límites de detección (LOD, S/N = 3) así como los límites de cuantificación (LOQ, S/N = 10) obtenidos se situaron entre 0.01-2.10 ng/ml y 0.03-7.01 ng/ml, respectivamente. Los mejores valores de LOD (0.01 ng/ml) y de LOQ (0.03 ng/ml) se encontraron para el ácido protocatéquico. Las curvas de calibrado obtenidas de todos los compuestos estudiados fueron lineales en el rango de concentraciones desde 0.3 hasta 30 $\mu\text{g/ml}$ con coeficientes de correlación comprendidos entre 0.996.-0.999. Las ecuaciones de calibrado, así como otros parámetros cuantitativos y cualitativos se pueden observar en la Tabla VI.4.

Tabla VI.4. Datos obtenidos por RRLC – MS/MS; MRM de los ácidos fenólicos estudiados.

| I.D. | TR (min) | Compuesto | Ión precursor [M-H] ⁻ (m/z) | Iones producto | LOD ^a (ng/ml) | LOQ ^b (ng/ml) | R ^{2c} | Ecuación de la recta de regresión ^d |
|------|----------|---------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|--|
| 1 | 0.34 | Ácido gálico | 169 | 125(100) | 2.10 | 7.01 | 0.997 | Y = 14196x + 51 |
| 2 | 0.62 | Ácido protocatéquico | 153 | 109(100) | 0.01 | 0.03 | 0.997 | Y = 5778x + 28 |
| 3 | 1.03 | 3.4-dihidroxibenzaldehído | 137 | 108(100); 91(24) | 0.04 | 0.14 | 0.996 | Y = 11703x + 14 |
| 4 | 1.09 | Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico | 137 | 93(100) | 0.10 | 0.33 | 0.999 | Y = 15655x + 17 |
| 5 | 1.42 | Ácido clorogénico | 353 | 191(100) | 0.03 | 0.08 | 0.999 | Y = 39935x + 11 |
| 6 | 1.63 | Ácido vanílico | 167 | 152(100); 108(96); 123(45) | 0.05 | 0.15 | 0.999 | Y = 15428x + 53 |
| 7 | 1.79 | <i>p</i> - Hidroxibenzaldehído | 121 | 92(100) | 0.05 | 0.16 | 0.998 | Y = 13485x + 41 |
| 8 | 1.85 | Ácido caféico | 179 | 135(100) | 0.24 | 0.80 | 0.998 | Y = 11807x + 11 |
| 9 | 2.19 | Ácido siríngico | 197 | 180(100); 121(47) | 0.03 | 0.10 | 0.999 | Y = 20719x + 203 |
| 10 | 2.50 | Vanilina | 151 | 136(100); 92(16) | 0.12 | 0.41 | 0.997 | Y = 12894x + 94 |
| 11 | 2.66 | Ácido <i>p</i> -cumárico | 163 | 119(100) | 0.09 | 0.30 | 0.999 | Y = 7469x + 8 |
| 12 | 2.81 | Ácido salicílico | 137 | 93(100) | 0.06 | 0.19 | 0.998 | Y = 9133x + 28 |
| 13 | 2.97 | Ácido ferúlico | 193 | 134(100); 178(30) | 0.11 | 0.35 | 0.999 | Y = 14234x + 41 |

^a Límite de detección (S/N = 3).

^b Límite de cuantificación (S/N = 10).

^c Coeficiente de regresión.

^d Rangos de concentración usados para la calibración: 0.3–30 ng/ml.

Finalmente, se estudió la reproducibilidad (n=6) del método empleado de RRLC-MS/MS para todos los compuestos. La desviación estándar relativa (RSD %) de la reproducibilidad para valores de áreas de los análisis llevados a cabo en el mismo día y en días diferentes varió entre 0.97-3.85% y 0.79-4.31%, respectivamente.

VI.4.2. Extracción de compuestos fenólicos por PLE-SPE.

La extracción de compuestos fenólicos procedentes de algas se llevó a cabo mediante el empleo de la extracción con líquidos presurizados (PLE) utilizando MeOH/H₂O (8:2, v/v) como disolvente en dos ciclos de 10 minutos cada uno, a una temperatura de 130°C y una presión de 1850 bar. Estas condiciones de extracción se seleccionaron a partir de resultados previos obtenidos en el grupo de investigación, que pusieron de manifiesto las elevadas recuperaciones de compuestos fenólicos obtenidas a partir de algas (Onofrejova y col., 2010). Los extractos de los compuestos fenólicos procedentes de algas se hidrolizaron con 2M HCl y, posteriormente se purificaron mediante el empleo de cartuchos de SPE con un sorbente basado en modo mixto de fase reversa e intercambio catiónico, con un copolímero que contiene grupos SO₃⁻. Los fenoles presentes en los hidrolizados ácidos se retuvieron en la superficie del sorbente y después se eluyeron mediante el empleo de 2% de NH₄OH.

Una vez preparados los extractos obtenidos por PLE-SPE se analizaron siguiendo el procedimiento de RRLC-MS/MS que se ha descrito en la sección anterior. De esta manera se determinó el contenido de compuestos fenólicos en los extractos procedentes de cuatro macroalgas marrones (*Sargassum muticum*, *Sargassum vulgare*, *Undaria pinnatifida* y *Cystoseira abies-marina*) y de cuatro macroalgas rojas (*Porphyra* spp., *Hypnea spinella*, *Chondrus crispus* y *Halopityis incurvus*). En la Tabla VI.5 se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación de este método analítico. Como se puede apreciar en dicha tabla, en todos los extractos obtenidos por PLE-SPE a partir de estas macroalgas se encontraron cantidades apreciables (en el orden de µg) de los diferentes ácidos fenólicos estudiados. A modo de ejemplo, en la Figura VI.5 se puede observar el cromatograma de MRM de la macroalga *Sargassum muticum*, que fue el organismo que presentó mayores concentraciones de compuestos fenólicos.

De los datos mostrados en la Tabla VI.5, se puede deducir que no existe una tendencia clara en relación a la composición en ácidos fenólicos de acuerdo al grupo de pertenencia de las diferentes algas (macroalgas marrones o macroalgas rojas). De hecho, se puede observar claramente como la presencia de compuestos fenólicos no viene determinada por el grupo al que pertenece el alga, sino por la especie en particular de que se trate. Así, por ejemplo, dentro del grupo de las algas marrones la composición total de ácidos fenólicos varía desde 3899 ng/g de alga seca para *U. pinnatifida* hasta 22694 ng/g de alga seca para *S. muticum*. Dentro de este grupo se encontraron las algas que presentaron tanto el mayor como el menor contenido de ácidos fenólicos de todos los organismos estudiados. De igual forma, dentro del grupo de algas rojas, las cantidades de compuestos fenólicos variaron de 5207 ng/g de alga seca para *Porphyra* spp. hasta 10572 ng/g de alga seca para *H. incurvus*. En general, *S. muticum* fue el alga que presentó el contenido más elevado en compuestos fenólicos de las estudiadas, seguido por *H. incurvus*.

En general los compuestos fenólicos mayoritarios en casi todas las algas fueron los ácidos *p*-hidroxibenzoico, *p*-hidroxibenzaldehído, gálico, vanílico, 3,4-dihidroxibenzaldehído, así como el ácido protocatéquico, mientras que los compuestos que se encontraron en menor cantidad fueron los ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cafeico, siríngico y clorogénico. El perfil de ácidos fenólicos encontrados en las algas estudiadas en este trabajo coincide con los encontrados en otras micro y macroalgas que fueron extraídas mediante PLE empleando una metodología muy parecida (Onofrejová y col., 2010).

En definitiva, se puede concluir que la PLE es una técnica de extracción eficaz para la obtención de compuestos fenólicos procedentes ya que se obtuvieron elevadas concentraciones de compuestos fenólicos, evitando su oxidación durante la extracción. Por tanto, teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes de estos compuestos (Kumar, 2008; Duan y col., 2006; Ibrahim y col., 2010), así como los datos obtenidos en los capítulos anteriores, se puede deducir que la presencia de ácidos fenólicos en diferentes tipos de algas podría contribuir a la capacidad antioxidante total de extractos complejos, como los obtenidos en la primer parte de esta Memoria.

Tabla VI.5. Contenido en ácidos fenólicos (ng/g de alga liofilizada) de los extractos obtenidos por PLE-SPE.

| Muestras | Macroalgas marrones | | | | | | Macroalgas rojas | | | | | | | | | |
|---------------------------------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|----------------------------|---------|--------------------------------|---------|----------------------|---------|------------------------|---------|-------------------------|---------|---------------------------|---------|
| | <i>Sargassum vulgare</i> | | <i>Sargassum muticum</i> | | <i>Undaria pinnatifida</i> | | <i>Cystoseira abies-marina</i> | | <i>Porphyra spp.</i> | | <i>Hypnea spinella</i> | | <i>Chondrus crispus</i> | | <i>Halopitys incurvus</i> | |
| | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) |
| Ácido gálico | 2796.13 | 5.31 | 1128.80 | 5.15 | 164.08 | 6.44 | 547.46 | 6.50 | 161.90 | 6.20 | 136.58 | 7.37 | 142.80 | 5.44 | 127.41 | 4.69 |
| Ácido protocatéquico | 692.80 | 4.50 | 898.00 | 4.85 | 310.41 | 4.81 | 355.90 | 5.62 | 305.08 | 5.14 | 329.82 | 5.00 | 321.32 | 6.57 | 697.20 | 6.53 |
| 3,4-dihidroxibenzaldehído | 284.23 | 7.79 | 119.88 | 6.83 | 146.23 | 4.88 | 125.73 | 5.05 | 1037.93 | 4.36 | 723.89 | 6.17 | 202.75 | 5.58 | 7732.78 | 7.33 |
| Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico | 406.65 | 5.08 | 18518.54 | 7.54 | 819.24 | 7.49 | 2535.13 | 4.96 | 484.67 | 5.48 | 2245.04 | 4.52 | 1530.50 | 5.40 | 583.78 | 3.09 |
| Ácido clorogénico | 46.97 | 5.23 | 25.30 | 5.05 | 43.39 | 5.02 | 165.76 | 6.24 | 40.56 | 7.81 | 33.30 | 4.15 | 79.05 | 7.26 | 64.79 | 3.65 |
| Ácido vanílico | 319.38 | 4.80 | 309.65 | 4.32 | 154.06 | 7.98 | 199.30 | 7.62 | 221.32 | 6.02 | 148.35 | 5.00 | 222.52 | 6.62 | 200.54 | 6.39 |
| <i>p</i> -Hidroxibenzaldehído | 601.11 | 5.59 | 1025.95 | 5.69 | 1531.43 | 4.56 | 331.67 | 4.16 | 1745.63 | 5.44 | 3604.58 | 7.28 | 1970.26 | 6.06 | 411.58 | 6.02 |
| Ácido cafeico | 46.89 | 7.75 | 13.12 | 5.88 | N.D. | 5.07 | 31.30 | 4.99 | 24.67 | 4.62 | 11.75 | 7.08 | 26.57 | 4.21 | 26.03 | 7.51 |
| Ácido siríngico | 101.17 | 5.75 | 7.93 | 7.82 | 8.27 | 5.90 | 41.27 | 7.59 | 186.74 | 4.90 | 36.21 | 4.44 | 125.51 | 7.63 | 37.15 | 7.41 |
| Ácido vanílico | 464.06 | 7.88 | 455.26 | 6.24 | 457.39 | 6.10 | 95.30 | 7.85 | 844.33 | 7.53 | 825.47 | 3.81 | 710.84 | 6.07 | 579.73 | 4.06 |
| Ácido <i>p</i> -cumárico | 4.54 | 5.79 | 16.36 | 4.67 | 5.84 | 3.83 | 9.79 | 6.77 | 5.51 | 5.23 | 56.99 | 5.39 | 16.43 | 5.40 | 19.07 | 7.21 |
| Ácido salicílico | 152.07 | 7.96 | 171.22 | 7.29 | 200.27 | 4.48 | 227.30 | 4.64 | 121.28 | 5.29 | 201.29 | 5.00 | 369.97 | 5.93 | 69.49 | 5.15 |
| Ácido ferúlico | 9.68 | 4.55 | 4.39 | 6.79 | 58.41 | 8.00 | 10.12 | 5.75 | 27.59 | 6.79 | 12.26 | 5.33 | 10.68 | 4.70 | 23.15 | 4.66 |
| TOTAL | 5925.68 | | 22694.40 | | 3899.01 | | 4676.04 | | 5207.22 | | 8365.52 | | 5729.19 | | 10572.69 | |

N.D: no detectado

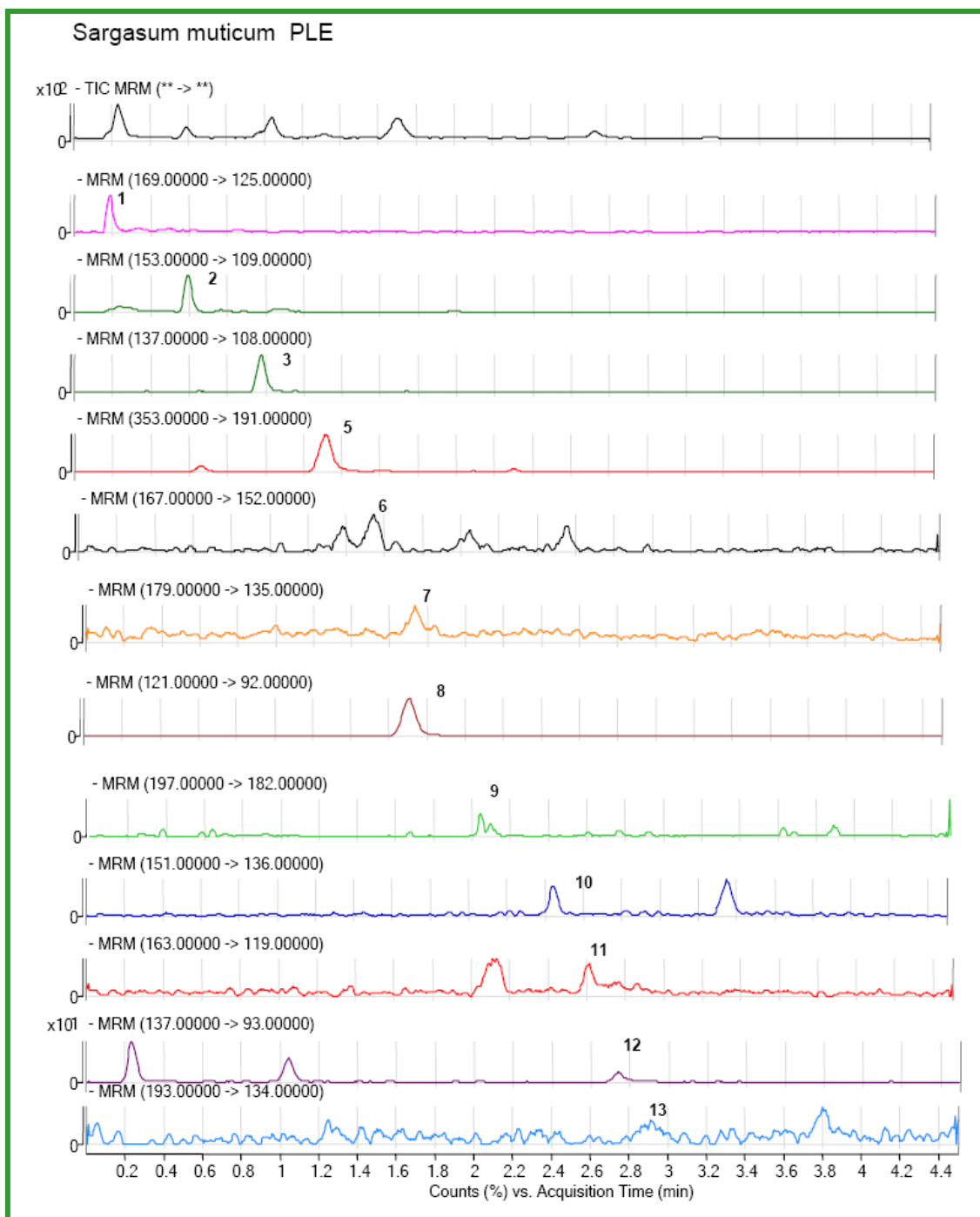


Figura VI.5. Cromatograma MRM del extracto obtenido por PLE de la macroalga *Sargassum muticum* obtenido mediante RRLC-MS/MS. Identificación de picos: 1. ácido gálico; 2. ácido protocatéquico; 3. 3,4-dihidroxibenzaldehído; 4. ácido p-hidroxibenzoico; 5. ácido clorogénico; 6. ácido vanílico; 7. ácido cafeico; 8. p-hidroxibenzaldehído; 9. ácido siríngico; 10. Vanilina; 11. ácido p-cumárico; 12. ácidos salicílico; 13: ácido ferúlico.

VI.5. CONCLUSIONES.

En este trabajo se ha demostrado que todas las macroalgas marinas estudiadas presentaron concentraciones apreciables de los trece ácidos fenólicos seleccionados. Mediante el empleo de RRLC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo, se pudieron separar y detectar los diferentes ácidos fenólicos en menos de 5 minutos, llevando a cabo al mismo tiempo, la correcta cuantificación de los mismos.

Asimismo, si se comparan las distintas especies de algas estudiadas, se puede observar que la concentración de cada compuesto fenólico difiere mucho de un alga a otra, no existiendo una relación directa entre el tipo de alga (alga marrón o alga roja) y la cantidad de compuestos fenólicos encontrados. Por lo tanto, la cantidad de compuestos fenólicos presentes en las diferentes algas depende de la especie de la macroalga y no del grupo al que pueda pertenecer. En conjunto, se pudo apreciar que *Sargassum muticum* fue la macroalga que presentó mayor concentración de ácidos fenólicos, mientras que en *Undaria pinnatifida* se detectó la menor concentración de fenólicos.

Mediante el empleo de la extracción con líquidos presurizados (PLE) junto con un protocolo de purificación por SPE, se pudieron obtener concentraciones apreciables de compuestos fenólicos a partir de las diferentes macroalgas estudiadas.

En general se puede decir que el uso combinado de la extracción con PLE y la purificación de los extractos con SPE, junto con la aplicación de potentes técnicas analíticas como es la RRLC-MS/MS, permitió la detección y cuantificación de compuestos fenólicos presentes en muestras de diferentes tipos de algas, incluyendo algas rojas y marrones. Esta metodología demostró que era apropiada para determinar compuestos fenólicos a bajas concentraciones presentes en extractos naturales complejos.

CAPÍTULO VII:

“Búsqueda de isoflavonas presentes en diferentes especies de algas”

VII.1. INTRODUCCIÓN.

En el capítulo anterior se detectó la presencia de ácidos fenólicos en distintos tipos de macroalgas; algunos de estos ácidos fenólicos (ácido cinámico y *p*-cumárico) se han descrito como precursores en la ruta metabólica de síntesis de flavonoides (Figura VII.1) y, podrían ser indicativos de la presencia, en las algas, de estructuras más complejas. Otros autores han descrito también recientemente la presencia de ácidos fenólicos y algunos de sus metabolitos en algas y cianobacterias de agua dulce (Klejdus y col., 2009; Onofrejová y col., 2009). Asimismo, se han podido identificar en algas otros precursores presentes en la ruta metabólica de síntesis de isoflavonas como son isoliquiritigenina y naringenina (Klejdus y col., 2010).

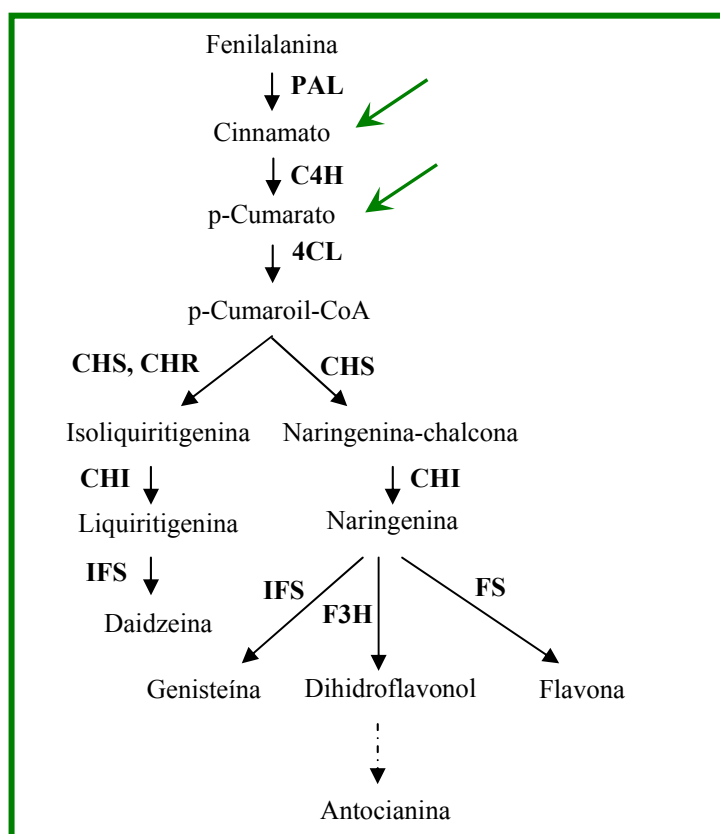


Figura VII.1. Esquema simplificado de la ruta de los fenilpropanoides. Las flechas discontinuas representan varios pasos enzimáticos. Las enzimas se indican en negrita: PAL, fenilalanina amonio-licasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato:CoA ligasa; CHS, chalcona sintetasa; CHR, chalcona reductasa; CHI, chalcona isomerasa; IFS, isoflavona sintasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; FS, flavona sintasa (Liu y col., 2007).

Los flavonoides presentan una estructura básica de fenil-benzo-pirona $C_6-C_3-C_6$, (Figura VII.2) caracterizada por un esqueleto de dos anillos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono ciclada en un heterociclo oxigenado.

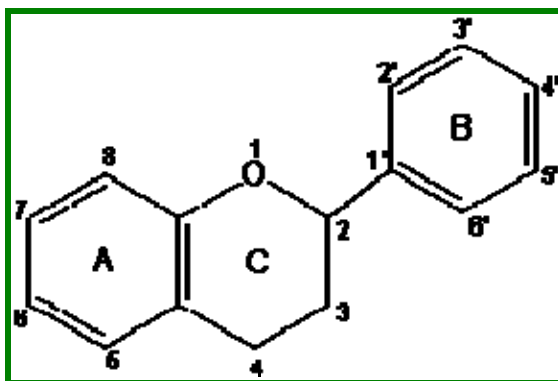
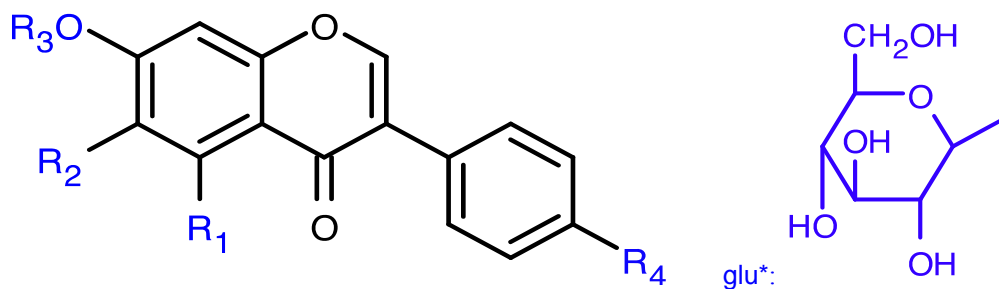


Figura VII.2. Estructura química básica de los flavonoides.

Las variaciones estructurales en el anillo C, subdividen a los flavonoides en seis importantes subclases, entre los que se encuentran las flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianidinas y flavan-3-oles (también llamados flavanoles). Los compuestos individuales dentro de cada grupo se distinguen por la sustitución diferencial en los anillos A y B. De esta forma se han identificado hasta 5000 estructuras diferentes.

Además, los flavonoides se pueden encontrar en estado libre (agliconas), o en forma de heterósidos, conjugados con un azúcar, también denominados glucósidos. La presencia de un azúcar en su estructura les confiere mayor solubilidad en agua, permitiendo su acumulación en las vacuolas, por lo que, generalmente se encuentran en esta forma. En este sentido, los azúcares preferentemente incorporados en su estructura son hexosas (glucosa, galactosa, ramnosa) y pentosas (xilosa y arabinosa). No obstante, también se han encontrado flavonoides unidos a lípidos, aminas o ácidos carboxílicos (Duthle y col., 2003). Los azúcares están generalmente unidos mediante enlace β -glucosídico en la posición C-3 y C-7 (ver Figura VII.2), aunque también pueden encontrarse en otras posiciones que contengan un grupo hidroxilo.

Dentro de los posibles flavonoides que podrían ser sintetizados por las algas, las isoflavonas presentan un elevado interés. En concreto, las isoflavonas comprenden un importante grupo de flavonoides. De hecho, se han identificado más de 700 isoflavonas diferentes en las plantas. Su estructura se basa en un grupo 3-fenil-benzopirona (3-fenil-cromona). Las diferentes estructuras de las isoflavonas difieren en el grado de metilación, hidroxilación y glicosilación (ver Figura VII.3).



| Isoflavonas | | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|---------------|--------------------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| Daidzina | daidzeina-7-O-β-D-glucopiranosido | H | H | Glu* | OH |
| Glicitina | glicitein-7-O-β-D-glucopiranosido | H | OCH ₃ | Glu* | OH |
| Genistina | genistein-7-O-β-D-glucopiranosido | OH | H | Glu* | OH |
| Daidzeína | 4,7-dihidroxiisoflavona | H | H | H | OH |
| Ononina | formononetin-7-O-β-D-glucopiranosido | H | H | Glu* | OCH ₃ |
| Gliciteína | 4,7-dihidroxi-6-metoxiisoflavona | H | OCH ₃ | H | OH |
| Genisteína | 4,5,7-trihidroxiisoflavona | OH | H | H | OH |
| Sissotrina | biochanina A-7-O-β-D-glucopiranosido | OH | H | Glu* | OCH ₃ |
| Formononetina | 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona | H | H | H | OCH ₃ |
| Biochanina A | 5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona | OH | H | H | OCH ₃ |

*glu: glucopiranosil

Figura VII.3. Estructura química básica de las isoflavonas y sustituyentes de algunas de las más comunes.

Este tipo de compuestos se puede englobar dentro de los conocidos como fitoestrógenos, debido a que se unen a los receptores de los estrógenos y a que, aunque no son esteroideos, poseen una estrecha similitud en la composición química con dichos estrógenos. Concretamente, presentan una configuración análoga a la de la molécula de estradiol, con grupos hidroxilo en la posición 7 y 4' (ver Figura VII.4). Debido a que se consideran fitoestrógenos, las isoflavonas se utilizan habitualmente en el tratamiento de los síntomas de menopausia, osteoporosis en la post-menopausia y otros desordenes relacionados con los estrógenos (Azadbakht, 2007). Por tanto, estos compuestos son muy utilizados como ingredientes de alimentos funcionales, y también en la industria farmacéutica. Las isoflavonas, en forma de agliconas, se absorben en el intestino más rápidamente que los glucósidos (Izumi y col., 2000). La concentración de agliconas en los suplementos alimenticios y en los extractos puede variar en el rango de 2 a 15% del total de isoflavonas, pero se pueden llegar a encontrar muestras que contienen incluso más del 85% de las isoflavonas totales en forma de agliconas (Setchell y col., 2001).

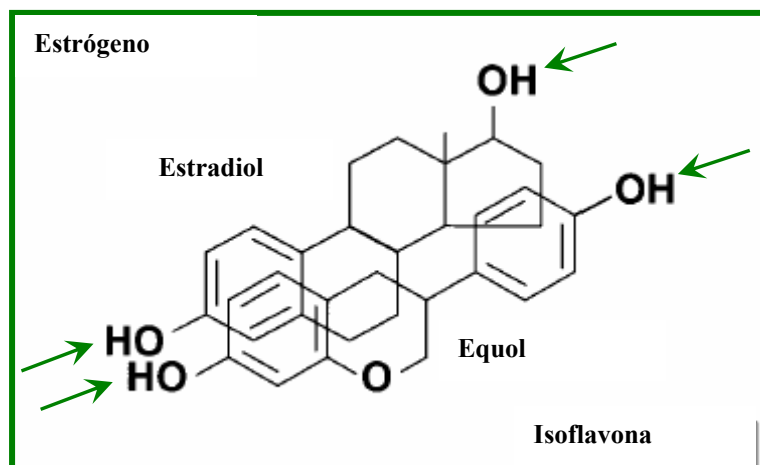


Figura VII.4. Comparación entre la estructura de las isoflavonas (equol) y los estrógenos (estradiol) donde se muestran las similitudes entre las dos moléculas.

Por otra parte, estas fitohormonas presentan propiedades antioxidantes y se consideran beneficiosas para la salud humana en concentraciones apropiadas. Asimismo, las isoflavonas juegan un importante papel en la prevención de cáncer (Duffy y Cyr, 2003; Wietrzyk y col., 2005), inhibición de la formación de tumores (Ishibashi y Ohtsuki, 2008), daño oxidativo (Spadafranca y col., 2008), y poseen actividad antiviral (Andres y col., 2009), actividad antimicrobiana (Sato y col., 2006;), actividad antifúngica (Meragelman y col., 2005), pueden estimular el sistema inmune (Oldreive y col., 1998), participar en la quelación de metales (Rice-Evans y col., 1996), así como poseer un efecto antialérgico (Middelton y Kandaswami, 1994).

Las isoflavonas se encuentran de forma natural casi exclusivamente en las legumbres. La soja es la fuente más abundante de estos compuestos, y todos los alimentos derivados de la misma podrían proporcionar, *a priori*, una fuente dietética considerable de estos constituyentes bioactivos. No obstante, dado su gran interés, se ha potenciado la búsqueda de este tipo de compuestos en otras matrices, encontrándose estos compuestos no sólo en leguminosas, sino también, en otras familias como Convolvulaceae, Cyperaceae, y Brassicaceae, entre otras (Vacek y col., 2008; Mackova y col., 2006).

Así pues, en el presente capítulo se pretende realizar una búsqueda, en diferentes tipos de algas (algas verde-azuladas, algas verdes, algas rojas y algas marrones), de algunas de las isoflavonas más comunes. Para ello se ha optimizado el procedimiento de extracción, empleando un pretratamiento con ultrasonidos y una posterior extracción

con fluidos supercríticos (SFE). En este trabajo se empleó la SFE debido a que se había utilizado con anterioridad para la extracción de compuestos fenólicos procedentes de matrices muy similares (microalgas) (Klejduš y col., 2009), así como para la extracción de isoflavonas a partir de matrices muy ricas en estos compuestos (Klejduš y col., 2005). Por su parte, para detectar e identificar estos compuestos en los diferentes extractos se empleó una técnica de análisis avanzada como es la cromatografía de líquidos de resolución rápida (RRLC, *Rapid Resolution Liquid Chromatography*) acoplada a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (MS/MS). En este estudio se emplearon macroalgas marinas marrones (*Sargassum muticum*, *Sargassum vulgare* y *Undaria pinnatifida*) y rojas (*Hypnea spinella*, *Porphyra* spp., *Chondrus crispus* y *Halopitys incurvus*), así como diferentes microalgas de agua dulce verdes (*Spongiochloris spongiosa* y *Scenedesmus*) y verde-azuladas (*Nostoc* 17).

VII.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de isoflavonas en macroalgas y cianobacterias, compuestos funcionales que nunca antes se habían descrito en estas matrices, para lo cual se estudiaron siete macroalgas marinas y tres cianobacterias de agua dulce. Para ello se llevó a cabo la optimización del proceso de obtención de isoflavonas procedentes de algas, mediante el pretratamiento de la muestra por ultrasonidos y la posterior extracción de isoflavonas por SFE.

Para alcanzar este objetivo general, se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Optimización de las condiciones de extracción de isoflavonas por SFE a partir de matrices de algas. Estudio del efecto de la presión, la temperatura, el tiempo, y la cantidad y composición del modificador.
2. Puesta a punto de un método de RRLC-MS/MS para la detección y cuantificación de las isoflavonas.
3. Identificación y cuantificación de las diferentes isoflavonas presentes en algas, mediante el empleo del método de análisis por RRLC-MS/MS.

VII.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

VII.3.1. Muestras y reactivos.

Las muestras de las algas marinas (*Sargassum muticum*, *Sargassum vulgare*, *Hypnea spinella*, *Porphyra* spp., *Undaria pinnatifida*, *Chondrus crispus* y *Halopitys incurvus*) empleadas consistieron en macroalgas liofilizadas, procedentes de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Canarias, España). Las microalgas de agua dulce (*Spongiochloris spongiosa*, *Scenedesmus* y *Nostoc* 17) empleadas consistieron en muestras liofilizadas, procedentes del Departamento de Microorganismos Autotróficos, Instituto de Microbiología (Třeboň, República Checa). En la Figura VII.5 se muestran las imágenes correspondientes a las especies estudiadas. Todas las muestras se almacenaron protegidas del oxígeno, humedad y luz hasta su utilización.

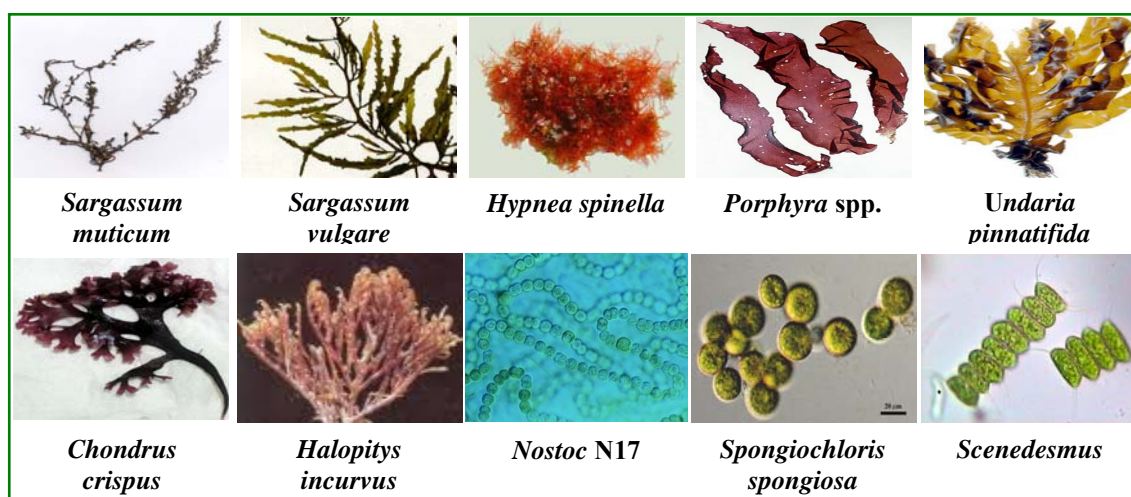


Figura VII.5. Fotografías de las diferentes especies de macro- y microalgas empleadas en este trabajo.

Todos los disolventes orgánicos utilizados fueron de calidad HPLC, suministrados por Merck (Praga, República Checa). Las isoflavonas empleadas y otros reactivos de pureza analítica fueron proporcionados por Sigma Aldrich (Praga, República Checa). Las soluciones madre de los diferentes patrones (10 $\mu\text{g/ml}$) se prepararon en metanol acuoso (1:1, v/v) y se almacenaron protegidas de la luz a 4°C. Las soluciones de los patrones de trabajo se prepararon diariamente con metanol acuoso a partir de las soluciones madre. Antes de su separación por HPLC, todas las soluciones, excepto los extractos utilizados para realizar los test de pureza, se filtraron a través de filtros de nylon (13 mm x 0.45 μm) (Cronus Filter, Gloucester, Reino Unido). El CO_2 y

el N₂ empleados fueron proporcionados por Siad (Braňany u Mustu, República Checa).

VII. 3.2. Pretratamiento de la muestra con ultrasonidos.

La cantidad de muestra empleada para la extracción fue de 0.1 g. Esta cantidad de muestra de cada alga o cianobacteria se colocó dentro de un vial eppendorf con 300 µl de la mezcla de disolventes que se empleó como modificador en la extracción por SFE (MeOH:H₂O 9:1 v/v), durante aproximadamente 16 h. Las algas marinas no requirieron este paso puesto que el líquido penetró en las partículas de la matriz inmediatamente. Sin embargo, en las muestras de microalgas procedentes de agua dulce, el proceso de la hidratación completa de la muestra era bastante lento y requería una ó dos horas. Por esta razón, cada tarde se preparaba la cantidad suficiente de alga fresca para ser empleada al día siguiente. Las muestras húmedas con el disolvente (modificador) se sometieron a ultrasonidos durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos (Kraintek, Podhájska, Eslovaquia), de acuerdo con resultados obtenidos en experimentos previos.

VII. 3.3. Extracción con fluidos supercríticos (SFE).

La solución de isoflavonas empleada para añadir a las muestras se preparó en el laboratorio, para ello se mezcló 1 mg de cada compuesto en metanol acuoso (1:1, v/v) y se añadió en una matriz de “alga limpia” preparada como se explica a continuación. Las matrices de algas limpias se prepararon a partir de muestras de algas reales (*Chondrus crispus* y *Spongiochloris spongiosa*): se llevó a cabo la extracción mediante SFE de la muestra con un 3% de modificador (MeOH/ H₂O 9:1 v/v), 40 MPa de presión, así como una temperatura de extracción de 60°C durante 60 min, y a un flujo elevado, empleando un restrictor muy corto y sin atrapar los analitos extraídos, hasta que la concentración de dichos analitos de interés en la matriz descendió por debajo de los límites de cuantificación del método analítico empleado (ver más adelante). A continuación, se añadió la solución de los patrones a esta “matriz limpia” y se almacenó durante al menos 14 días. El empleo de “algas limpias” se debe al interés de conocer el efecto matriz durante la optimización del proceso, a diferencia de la adición de los analitos de interés sobre lana de vidrio, que no aporta este tipo de información (Klejduš y col., 2007).

Para llevar a cabo la extracción de isoflavonas con SFE de las diferentes algas, se pesaron 0.1 g de la muestra (algas y cianobacterias) en polvo dentro de un vial de eppendorf, y se añadieron 300 μ l de la mezcla del modificador de SFE. A continuación, se llevó a cabo el pretratamiento de la muestra con ultrasonidos anteriormente mencionado. Una vez realizado el pretratamiento de la muestra, ésta se transfirió cuantitativamente a una celda de extracción (de acero inoxidable) de 0.7 ml de capacidad.

Asimismo, también se prepararon blancos mediante la extracción de las mismas cantidades de matriz limpia. En la matriz del blanco de la muestra no se encontraron los analitos en concentraciones por encima sus respectivos límites de cuantificación. Además, en el equipo de extracción no se encontraron residuos de isoflavonas después de cada extracción. Por el contrario, pequeños, pero apreciables residuos de isoflavonas se acumularon en la celda de extracción, por tanto ésta se limpió en el baño de ultrasonidos después de cada experimento, eliminando así los posibles residuos que pudieran afectar a los posteriores procesos de extracción.

Para llevar a cabo la extracción mediante SFE se utilizó un extractor SE-1 (SEKO-K, Ltd., Brno, República Checa) (ver Figura VII.6), mejorado con una válvula para la adición del modificador en continuo (Rheodyne, IDEX, Alemania, 300 μ l de tamaño del *loop*) (ver Figura VII.7). La extracción se realizó bajo las siguientes condiciones: las temperaturas probadas oscilaron entre 35 y 75°C, las presiones entre 10 y 40 MPa, mientras que el medio de extracción empleado fue CO₂ supercrítico (Siad, Braňany u Mostu, República Checa) con un 3% v/v de modificador (MeOH:H₂O 9:1 v/v) añadido por medio de la válvula de inyección entre la bomba de pistón y la celda de extracción.



Figura VII.6. Imagen del equipo de extracción con fluidos supercríticos (SE-1 instrument, SEKO-K) utilizado en este trabajo.

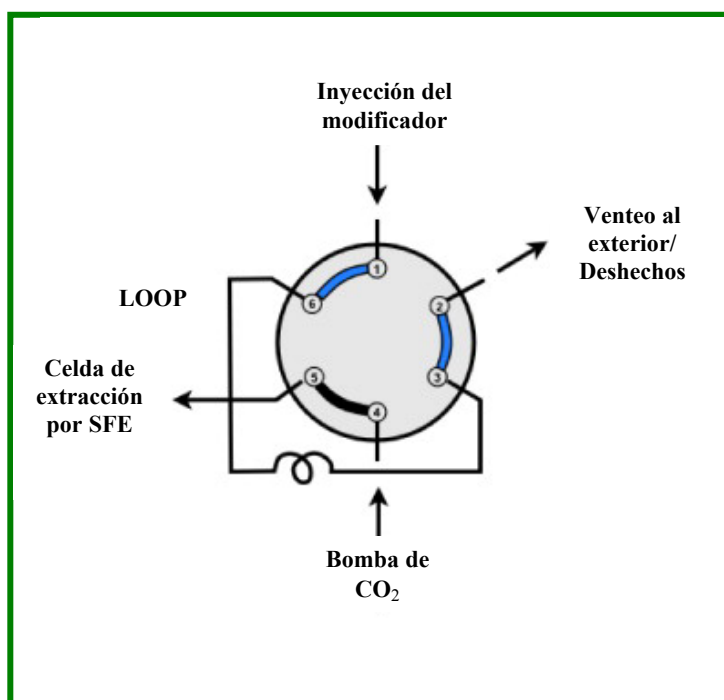


Figura VII.7. Esquema del sistema de válvula utilizado para la introducción de modificador al CO_2 supercrítico.

La extracción tuvo lugar durante 60 min (extracción dinámica) y se despresurizó mediante un restrictor de sílice fundida (12 cm x 50 μm diámetro interno, flujo de gas expandido igual a 750-850 mL/min, MicroQuarz, Munich, Alemania) dentro de un vial de cristal que contenía 25 ml de MeOH a temperatura ambiente. Aproximadamente se necesitaron 10 mL de MeOH para atrapar cuantitativamente las isoflavonas. Aún así, en

este caso, debido a que el flujo de gas expandido fue de aproximadamente 800 mL/min, se utilizaron 25 mL de MeOH en el vial de vidrio y se tapó con papel de aluminio para evitar que el disolvente salpicara fuera del vial. Dado que los analitos objeto de este estudio no eran volátiles, los extractos se pudieron preconcentrar fácilmente en un evaporador a 40°C. A continuación estos analitos se disolvieron en 0.5 ml de fase móvil antes del análisis por RRLC-MS/MS.

Antes de proceder a la inyección de los extractos en el equipo de RRLC, éstos se filtraron a través de filtros de discos de nylon (0.45 µm x 13 mm, LUT filtros de jeringa, Cronus, Gloucester, Reino Unido).

VII.3.4. Cromatografía de líquidos de resolución rápida y MS/MS.

Instrumentación. El equipo empleado se ha descrito en el apartado VI.3.3 Capitulo VI.

Cromatografía de líquidos de resolución rápida (RRLC). Para llevar a cabo las separaciones de las isoflavonas se utilizó una columna analítica Zorbax SB-CN (100 x 2.1 mm, 3.5 µm diámetro de partícula, Agilent Technologies, EEUU). El volumen de inyección fue de 0.2-5 µl para las soluciones de patrones y de 5 µl para los extractos de muestras reales. Para la separación de las distintas isoflavonas, se utilizaron dos fases móviles, 0.2% (v/v) de ácido acético en agua (fase móvil A) y acetonitrilo (fase móvil B), siguiendo el gradiente que se puede observar en la Tabla VII.1, empleando un flujo constante de 0.4 ml/min. La columna se equilibró mediante el paso de fase móvil (30% de fase móvil B) durante 2 minutos antes de la inyección de la siguiente muestra. La temperatura del horno de la columna se fijó en 35°C.

Tabla VII.1. Gradiente empleado para el análisis de isoflavonas por RRLC. A) agua con 0.2% ácido acético y B) acetonitrilo.

| Tiempo (min) | A (%) | B (%) |
|--------------|-------|-------|
| 0 | 70 | 30 |
| 3 | 50 | 50 |
| 6 | 20 | 80 |
| 10 | 70 | 30 |

Para cada uno de los compuestos se obtuvo su tiempo de retención y sus características individuales (simetría del pico y resolución, entre otros), así como las correspondientes ecuaciones de las rectas de regresión para el cálculo de la concentración.

Espectrometría de masas de triple cuadrupolo (MS/MS). Como herramienta para la detección de isoflavonas se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con interfase de electrospray (ESI), operada en modo de ionización negativo. Como gas de secado, de nebulización y de colisión se empleó nitrógeno. Las condiciones optimizadas del ESI para realizar la detección de isoflavonas se indican en la Tabla VII.2.

Tabla VII.2. Parámetros optimizados de ESI con la fase móvil seleccionada.

| Parámetros ESI | Valor óptimo |
|---|--------------|
| Voltaje del capilar (V) | 4000 |
| Flujo (l/min) de gas de secado (N ₂) | 13 |
| Temperatura (°C) de gas de secado (N ₂) | 350 |
| Presión (psi) del gas nebulizador (N ₂) | 50 |

El voltaje del fragmentador (100-150 V) y la energía de colisión (10-30 eV) se seleccionaron individualmente para cada compuesto (ver Tabla VII.3). Las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos de resolución rápida-MS/MS en el modo de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), de manera que se maximizara la sensibilidad en la detección de los compuestos cuantificados. Las diferentes transiciones utilizadas para la detección de cada compuesto se muestran Tabla VII.3.

Tabla VII.3. Transiciones empleadas para la cuantificación de las isoflavonas (MRM, modo ESI negativo).

| Compuesto | Transición | Ión precursor→Ión producto* | Fragmentación [V] | Energía de Colisión [eV] |
|---------------|------------|--|-------------------|--------------------------|
| Daidzina | 475→252 | [M-H+CH ₃ COOH] ⁻ →[M-glc] ⁻ | 100 | 30 |
| Genistina | 431→268 | [M-H] ⁻ →[M-glc] ⁻ | 150 | 30 |
| Daidzeína | 253→224 | [M-H] ⁻ →[M-H-CHO] ⁻ | 150 | 20 |
| Ononina | 489→267 | [M-H+CH ₃ COOH] ⁻ →[M-glc] ⁻ | 100 | 10 |
| Sissotrina | 505→283 | [M-H+CH ₃ COOH] ⁻ →[M-glc] ⁻ | 100 | 10 |
| Genisteína | 269→133 | [M-H] ⁻ →[^{0,3} B ⁻] (r.D.A.) | 135 | 30 |
| Formononetina | 267→252 | [M-H] ⁻ →[M-H-CH ₃] ⁻ | 135 | 10 |
| Biochanina A | 283→268 | [M-H] ⁻ →[M-H-CH ₃] ⁻ | 135 | 10 |

* La nomenclatura y algunos patrones de fragmentación se utilizaron de acuerdo con los datos que figuran en la bibliografía.

VII.3.5. Validación del método de análisis.

La exactitud, precisión y la recuperación para la determinación de las isoflavonas individuales (daidzina, glicitina, sissotrina, genistina, ononina, daidzeína, gliciteína, genisteína, formononetina y biochanina A) se evaluaron empleando las matrices de algas limpias, a las cuales se añadieron una cantidad conocida de patrones de isoflavonas. La adición de la solución de los analitos se realizó de la misma manera que para los estudios de optimización de los parámetros de extracción, pero en este caso, las soluciones recién preparadas se añadieron en el mismo día para evitar el efecto matriz.

VII.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VII.4.1. Estudio de las condiciones de optimización de la extracción por SFE.

El estudio de optimización se realizó en dos etapas. En primer lugar, se llevó a cabo una serie limitada de experimentos preliminares basados en las condiciones optimizadas en trabajos previos para la extracción de isoflavonas de trébol rojo (Klejdus y col., 2005). Aunque se debe tener en cuenta el efecto matriz en las extracciones por SFE, considerando que ambas matrices son materiales naturales liofilizados, los experimentos de extracción de isoflavonas a partir de trébol rojo se usaron como punto de partida para la optimización de las condiciones experimentales de extracción a partir de matrices de algas. Posteriormente se llevó a cabo un riguroso estudio de optimización (n=6) como verificación de las condiciones seleccionadas para la extracción.

Para los 10 analitos de interés, las presiones que se probaron fueron desde 10 MPa hasta 40 MPa en intervalos de 5 MPa (40 MPa es la presión máxima de trabajo del equipo de SFE). Para daidzina, glicitina, daidzeína y formononetina, la presión óptima fue de 35 MPa, mientras que para gliciteína y genisteína fue de 30 MPa. Sin embargo, genistina, ononina, sissotrina y biochanina A necesitaron 40 MPa para obtener los mejores porcentajes de recuperación. Por ello, la presión seleccionada como

compromiso para la extracción fue 35 MPa, ya que a esta presión las recuperaciones fueron muy elevadas para todas las isoflavonas (ver Tabla VII.4, los mejores valores de recuperación se muestran en negrita).

Fundamentalmente existen dos factores que pueden tener influencia en la eficacia de la extracción, como son la solubilidad del analito y el flujo del CO₂. Si se optimizan las condiciones de solubilidad, el proceso de la transferencia de masa ocurrirá tan rápido como sea posible y los analitos pasaran rápidamente desde la matriz al fluido de extracción. Bajo las presiones máximas y manteniendo la longitud del restrictor constante, el CO₂ pasa rápidamente por la celda de extracción. De esta manera, en la celda de extracción la concentración del analito en el fluido supercrítico es baja, fomentándose así la transferencia de masa del analito desde la matriz hasta el fluido de extracción. Debido a que la extracción se lleva a cabo en modo dinámico, el analito que se encuentra en la celda de extracción es diluido constantemente en el fluido supercrítico limpio que esta siendo bombeado de forma constante.

Rostagno y col. (2002) observaron un comportamiento similar de los analitos a los cambios de presión de extracción. Es bien conocido que la densidad del fluido supercrítico aumenta conforme aumenta la presión; con el aumento de densidad también se incrementa el poder disolvente del fluido supercrítico, y, por tanto, es de esperar que aumente el porcentaje de recuperación de los compuestos al aumentar la presión de extracción.

Dos factores que influyen significativamente en la recuperación de los analitos son la naturaleza y porcentaje de modificador y los analitos co-extraídos. Es importante tener en cuenta las condiciones de presión-temperatura-modificador para evitar trabajar en dos fases (líquido-vapor), puesto que en estas condiciones, la solubilidad disminuye notablemente. Asimismo, deben tenerse en cuenta aspectos tales como el efecto de la extracción de elevadas concentraciones de solutos junto con la disminución de poder de solvatación y enfriamiento del fluido supercrítico durante la despresurización que puede ocasionar obturaciones del mismo y, por tanto, afectar al proceso de extracción.

Tabla VII.4. Datos de recuperación de las isoflavonas estudiadas extraídas por SFE empleando diferentes presiones para su extracción.

| Compuesto | 10 MPa | | 15 MPa | | 20 MPa | | 25 MPa | | 30 MPa | | 35 MPa | | 40 MPa | |
|---------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|
| | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) |
| Daidzina | 72.20 | 1.99 | 86.11 | 3.83 | 94.07 | 3.29 | 95.60 | 2.75 | 96.41 | 3.32 | 97.17 | 4.68 | 97.09 | 3.71 |
| Glycitina | 58.90 | 3.35 | 86.43 | 2.91 | 95.33 | 4.71 | 96.66 | 4.54 | 99.45 | 3.98 | 100.30 | 2.84 | 99.37 | 4.34 |
| Genistina | 63.25 | 2.13 | 74.56 | 4.36 | 88.65 | 4.23 | 92.51 | 4.64 | 96.61 | 3.47 | 98.79 | 2.87 | 100.25 | 2.55 |
| Ononina | 55.11 | 2.88 | 80.19 | 5.44 | 90.45 | 4.03 | 94.00 | 5.05 | 94.73 | 1.16 | 95.55 | 4.08 | 97.08 | 2.83 |
| Daidzeína | 48.65 | 3.21 | 69.64 | 4.50 | 86.75 | 4.21 | 90.70 | 3.84 | 95.64 | 2.87 | 97.88 | 4.39 | 95.24 | 3.77 |
| Glyciteína | 55.31 | 3.03 | 70.96 | 3.34 | 93.31 | 3.88 | 98.51 | 4.33 | 98.93 | 4.40 | 98.57 | 3.82 | 96.20 | 5.24 |
| Sissotrina | 52.12 | 3.28 | 76.29 | 3.57 | 96.71 | 4.04 | 96.72 | 4.48 | 94.33 | 2.28 | 97.06 | 3.01 | 98.48 | 4.11 |
| Genisteína | 71.08 | 2.96 | 82.04 | 3.20 | 91.29 | 4.27 | 94.25 | 1.57 | 96.46 | 4.46 | 95.92 | 4.56 | 94.54 | 4.47 |
| Formononetina | 71.05 | 2.34 | 79.10 | 2.61 | 90.09 | 3.05 | 92.34 | 2.37 | 94.02 | 3.78 | 98.54 | 3.71 | 96.03 | 3.17 |
| Biochanina A | 51.36 | 3.26 | 67.31 | 1.30 | 84.37 | 3.11 | 89.61 | 2.48 | 90.57 | 4.12 | 96.55 | 3.24 | 97.85 | 2.00 |

La optimización de la temperatura de extracción es más sencilla. Todos los analitos de interés se extrajeron adecuadamente a 40°C, excepto daidzina y biochanina A (ver Tabla VII.5, los mejores valores de recuperación están escritos en negrita), cuya recuperación fue mayor a 45°C. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó 40°C como temperatura óptima de extracción para toda la familia de isoflavonas.

En este caso, la razón de que la extracción sea máxima a bajas temperaturas es lógica y común a muchos tipos de matrices naturales. Teóricamente, al incrementar la temperatura se reduce la densidad, disminuyendo el poder de solvatación del fluido supercrítico. Por tanto, la solubilidad de los analitos, en general, es mayor a bajas temperaturas aunque en muchas ocasiones se observa un comportamiento inverso a una determinada temperatura en la que el efecto de la presión de vapor de los analitos se convierte en el factor principal, por delante de la solubilidad. Por otro lado, en muestras reales se debe tener en cuenta la co-extracción de compuestos no deseados que puede provocar una disminución en la selectividad de la extracción y en la solubilidad de los compuestos de interés, e incluso problemas de obturación del restrictor.

Tabla VII.5. Datos de recuperación de las isoflavonas estudiadas extraídas por SFE empleando diferentes temperaturas para su extracción.

| Compuesto | 35 °C | | 40 °C | | 45 °C | | 50 °C | | 60 °C | | 75 °C | |
|---------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|
| | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) |
| Daidzina | 85.31 | 3.15 | 96.96 | 2.60 | 89.01 | 1.17 | 82.27 | 1.24 | 71.93 | 3.28 | 70.91 | 3.42 |
| Glycitina | 84.51 | 4.77 | 93.13 | 3.97 | 92.97 | 5.59 | 82.04 | 3.98 | 70.40 | 3.40 | 70.51 | 3.50 |
| Genistina | 94.28 | 2.63 | 97.99 | 4.43 | 95.53 | 3.50 | 87.35 | 3.73 | 75.82 | 2.61 | 75.16 | 2.27 |
| Ononina | 96.01 | 3.55 | 100.42 | 5.28 | 99.33 | 3.05 | 84.22 | 3.05 | 76.44 | 3.01 | 76.07 | 4.27 |
| Daidzeína | 87.54 | 3.93 | 91.09 | 2.58 | 97.52 | 4.31 | 91.66 | 3.45 | 74.56 | 4.06 | 73.73 | 3.90 |
| Glyciteína | 96.77 | 3.33 | 97.48 | 4.19 | 94.50 | 2.22 | 88.47 | 5.10 | 80.84 | 3.88 | 76.34 | 3.47 |
| Sissotrina | 83.14 | 2.23 | 94.39 | 3.29 | 88.79 | 2.15 | 85.28 | 2.61 | 76.42 | 4.59 | 71.34 | 2.33 |
| Genisteína | 86.05 | 2.05 | 96.36 | 3.76 | 94.97 | 2.20 | 86.61 | 3.41 | 74.29 | 4.84 | 73.05 | 3.14 |
| Formononetina | 92.24 | 3.15 | 99.45 | 2.77 | 97.97 | 4.01 | 82.95 | 4.60 | 86.94 | 4.07 | 76.59 | 3.73 |
| Biochanina A | 87.91 | 2.22 | 88.41 | 2.55 | 95.23 | 3.30 | 88.36 | 3.32 | 77.29 | 3.89 | 72.87 | 3.79 |

A continuación se llevó a cabo un estudio de la cinética de extracción, en el que se comprobó que un tiempo de extracción igual a 30 min era insuficiente para lograr elevados porcentajes de recuperación (3 de los 10 analitos presentaron porcentajes de recuperación menores al 90%, ver Tabla VII.6). A medida que se aumentaba el tiempo de extracción, la recuperación de los compuestos de interés mejoraba. Por tanto, se seleccionaron 60 min como tiempo de extracción óptimo para la obtención de las isoflavonas. Por tanto, considerando ambos tiempos (pretratamiento+extracción), la extracción efectiva de isoflavonas se puede realizar en 90 minutos. Considerando que el pretratamiento de la siguiente muestra se puede realizar simultáneamente a la extracción por SFE de la muestra anterior, sería posible procesar una muestra a la hora (ver Tabla VII.6).

Tabla VII.6. Estudio de la cinética de extracción de isoflavonas por SFE.

| Compuesto | 10 min | | 20 min | | 30 min | | 45 min | | 60 min | |
|---------------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|
| | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) | Recuperación (%) | RSD (%) |
| Daidzina | 82.22 | 4.42 | 89.49 | 3.73 | 93.92 | 2.78 | 96.02 | 3.54 | 98.37 | 3.08 |
| Glycitina | 81.10 | 3.82 | 88.00 | 3.91 | 94.21 | 3.04 | 98.24 | 3.97 | 101.87 | 3.57 |
| Genistina | 86.21 | 3.49 | 92.18 | 0.77 | 95.51 | 3.41 | 96.31 | 3.12 | 100.32 | 2.76 |
| Ononina | 77.32 | 3.70 | 84.71 | 2.80 | 87.70 | 2.78 | 91.15 | 3.03 | 96.21 | 2.46 |
| Daidzeína | 86.63 | 4.44 | 92.47 | 4.92 | 94.88 | 3.62 | 97.02 | 1.66 | 98.48 | 3.33 |
| Glyciteína | 86.53 | 3.06 | 95.15 | 3.62 | 96.73 | 3.63 | 98.26 | 4.83 | 98.65 | 3.66 |
| Sissotrina | 83.09 | 2.39 | 88.11 | 3.21 | 90.17 | 2.90 | 95.84 | 4.27 | 99.92 | 3.30 |
| Genisteína | 67.33 | 3.41 | 79.06 | 4.64 | 87.42 | 2.89 | 90.33 | 2.41 | 94.67 | 3.19 |
| Formononetina | 79.78 | 3.51 | 86.30 | 2.87 | 90.76 | 3.42 | 94.10 | 1.42 | 97.25 | 3.57 |
| Biochanina A | 74.43 | 5.24 | 81.98 | 3.62 | 88.05 | 3.29 | 92.01 | 4.56 | 98.38 | 4.48 |

Tanto la composición como el porcentaje de modificador se seleccionaron en función de los resultados previos obtenidos para la extracción de isoflavonas de trébol rojo (Klejduš y col., 2005) y fueron: porcentaje igual a 3 % y composición de modificador igual a una mezcla MeOH/H₂O 9:1 v/v. Teniendo en cuenta que los compuestos objetivo eran los mismos y las matrices similares, era de esperar un efecto equivalente de la composición y % de modificador en ambas matrices.

VII.4.2. Optimización y validación del método de análisis por RRLC-MS/MS.

Como paso previo a la determinación de las isoflavonas presentes en las diferentes muestras de algas, el método de análisis por RRLC-MS/MS se optimizó

adecuadamente. Para ello, se estudiaron diferentes composiciones de fases móviles, probándose diferentes proporciones y tipos de modificador ácido en la fase móvil A. De esta forma, se pudo comprobar como 0.2 % (v/v) de ácido acético producía mejores resultados desde el punto de vista cromatográfico, que el empleo de ácido fórmico. Empleando el gradiente y las condiciones que se señalan en la sección VII.3.4, se pudo obtener una adecuada separación de todos los compuestos. De hecho, se pudo observar que los picos de cada compuesto de interés presentaban una buena resolución, selectividad y simetría. La anchura media de los picos de los compuestos varió desde 0.11 min hasta 0.14 min, y la simetría de los picos varió en torno a 0.85-1.07. En la Tabla VII.7 se pueden observar los límites de detección (LOD, S/N = 3) y los límites de cuantificación (LOQ, S/N = 10) obtenidos para los diferentes compuestos. Asimismo se muestran los coeficientes de correlación obtenidos para las curvas de calibrado, los cuales fueron en todos los casos mayores a 0.9998. Como se puede apreciar en la tabla, los LODs y LOQs varían en los rangos de 0.06-1.81 ng/ml y 0.19-6.02 ng/ml, respectivamente. Estos resultados son comparables a los métodos descritos en la bibliografía (Klejduš y col., 2005). Los LODs y LOQs en fmol por inyección obtenidos son también comparables a los descritos previamente en la bibliografía (Klejduš y col., 2005). Los valores de LOD y LOQ más bajos se obtuvieron para biochanina A y formononetina. Ambos compuestos pudieron detectarse a concentraciones por debajo de 0.1 ng/ml.

Tabla VII.7. Datos cuantitativos obtenidos por RRLC – MS/MS (n=6); MRM

| R. T. (min) | Compuesto | Ecuación de la recta de regresión ^a | R ² ^b | LOD ^c (ng/ml) | LOQ ^d (ng/ml) | RSD ^e (%) | LOD ^f (fmol) |
|----------------|---------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 3.03 | Daidzina | Y = 6764.93x-61 | 0.9998 | 1.81 | 6.02 | 0.32 | 4.36 |
| 4.57 | Genistina | Y = 9553.44x-33 | 0.9998 | 1.17 | 3.88 | 0.25 | 2.71 |
| 5.06 | Ononina | Y = 44683.91x-163 | 0.9998 | 0.25 | 0.63 | 0.21 | 0.58 |
| 5.97 | Daidzeína | Y = 18701.90x-16 | 0.9998 | 0.62 | 2.05 | 0.27 | 2.45 |
| 6.17 | Sissotrin | Y = 15518.88x-10 | 0.9999 | 0.17 | 0.55 | 0.23 | 0.59 |
| 6.85 | Genisteína | Y = 14875.17x-39 | 0.9998 | 0.63 | 2.09 | 0.26 | 2.34 |
| 7.03 | Formononetina | Y = 120819.16x-12 | 0.9998 | 0.08 | 0.26 | 0.18 | 0.03 |
| 7.65 | Biochanina A | Y = 184366.68x-732 | 0.9998 | 0.06 | 0.19 | 0.16 | 0.02 |

^a Columna: Zorbax SB CN, 100x2.1mm (3.5µm diámetro de partícula). Rangos de concentración usados para la calibración: 0.2–5 ng/ml.

^b Coeficiente de regresión.

^c Límite de detección (3 S/N).

^d Límite de cuantificación (10 S/N).

^e Desviación estándar relativa (n=6).

^f Límite de detección por inyección en columna (1µl).

Posteriormente, una vez optimizadas las condiciones de separación, así como los parámetros asociados con la ionización y detección por MS de los compuestos de interés, se estudiaron los factores relativos a la correcta validación del método de análisis propuesto. De esta manera se confirmaron tanto la exactitud como la precisión en la determinación de cada una de las isoflavonas estudiadas. Para ello, se utilizaron muestras de “algas limpias” como se ha explicado anteriormente, a las cuales se les añadieron cantidades conocidas de los compuestos analizados. Por otra parte, en cuanto a la repetibilidad del método, las RSDs calculadas para las determinaciones en diferentes ensayos realizados en el mismo día y en días diferentes variaron entre 1.54-3.76 % y 0.98-3.68 %, respectivamente. Los valores de RSDs obtenidos combinando los experimentos de SFE y cromatografía de líquidos de resolución rápida-MS/MS fueron muy buenos, con desviaciones máximas de 2.27% y 2.26%, respectivamente.

VII.4.3. Análisis de isoflavonas en algas.

Una vez optimizados todos los parámetros para llevar a cabo la extracción de isoflavonas por SFE a partir de algas, se aplicó este método a 7 muestras de algas marinas y a 3 microalgas de agua dulce, de manera que se pudiera o no confirmar la presencia de estos compuestos en diferentes tipos de algas, incluyendo cianobacterias (Cyanophyta), algas verdes (Chlorophyta), algas marrones (Phaeophyta) y algas rojas (Rhodophyta). De las diez isoflavonas de interés, 8 isoflavonas se encontraron en la mayoría de las muestras (ver Tabla VII.8), aunque en concentraciones muy bajas o incluso a niveles traza.

Tabla VII.8. Contenido de isoflavonas en macroalgas marinas y microalgas de agua dulce.

| Muestras | Daidzina | | Genistina | | Ononina | | Daidzeína | | Sissotrina | | Genisteína | | Formononetina | | Biochanina A | |
|---------------------------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|------------|
| | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) | Cont. (ng/g) | RSD (%) |
| Macroalgas marrones | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Sargassum muticum</i> | 8.14 | 3.97 | 34.33 | 4.11 | 144.30 | 2.77 | 7.03 | 6.31 | 59.72 | 4.45 | 9.02 | 2.63 | 43.76 | 4.98 | 49.69 | 3.93 |
| <i>Sargassum vulgare</i> | 5.14 | 3.74 | 10.60 | 4.66 | 32.75 | 5.61 | 6.14 | 4.21 | 24.81 | 4.03 | 2.74 | 5.47 | 13.70 | 4.69 | 15.12 | 3.27 |
| <i>Undaria pinnatifida</i> | 6.05 | 1.78 | 8.25 | 4.95 | 26.54 | 3.29 | N.D. | - | 18.31 | 4.69 | N.D. | - | 9.86 | 3.26 | 10.49 | 0.75 |
| Macroalgas rojas | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Chondrus crispus</i> | 86.75 | 5.59 | 229.83 | 4.81 | 154.09 | 2.98 | 101.22 | 3.41 | 111.92 | 3.48 | 144.85 | 5.30 | 138.11 | 3.82 | 146.67 | 5.14 |
| <i>Halopitys incurvus</i> | 7.19 | 4.02 | 18.70 | 3.06 | 50.80 | 3.86 | 14.19 | 4.62 | 36.75 | 3.34 | 20.90 | 4.81 | 24.76 | 3.27 | 27.68 | 3.89 |
| <i>Porphyra</i> spp. | 7.69 | 3.29 | 12.62 | 4.38 | 22.22 | 2.71 | 2.36 | 1.45 | 17.51 | 3.47 | 1.02 | 3.87 | 10.57 | 3.68 | 11.05 | 3.69 |
| <i>Hypnea spinella</i> | 1.40 | 1.90 | 8.86 | 4.30 | 24.83 | 2.90 | 7.39 | 4.27 | 22.98 | 3.67 | 13.14 | 1.00 | 13.10 | 3.60 | 15.05 | 3.84 |
| Microalgas verdes | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Spongiochloris spongiosa</i> | 0.32 | 3.35 | 13.37 | 5.05 | 4.89 | 4.69 | N.D. | - | 2.89 | 3.54 | 4.27 | 4.79 | 4.29 | 4.92 | 4.95 | 4.40 |
| <i>Scenedesmus</i> | 0.96 | 4.67 | 4.91 | 3.27 | 9.14 | 4.97 | 10.59 | 3.45 | 3.82 | 4.49 | 6.11 | 3.31 | 5.92 | 4.27 | 6.75 | 4.76 |
| Microalga verde-azulada | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Nostoc N17</i> | 17.24 | 4.48 | 18.80 | 3.64 | 88.89 | 5.62 | 7.05 | 3.57 | 60.92 | 2.76 | 5.91 | 4.16 | 33.14 | 3.71 | 35.78 | 3.40 |

N.D., no detectado

A modo de ejemplo, en las Figuras VII.8 y VII.9 se pueden observar los cromatogramas de MRM de dos algas diferentes. En la Figura VII.8, se muestra el perfil en isoflavonas de *Chondrus crispus*, que fue el alga que presentó mayores concentraciones de isoflavonas, mientras que en la Figura VII.9, se muestra el perfil de isoflavonas de la cianobacteria *Nostoc* 17, como ejemplo de alga con niveles bajos. Como se puede apreciar en la Tabla VII.8, en general las algas marinas presentaron mayor contenido en isoflavonas que las microalgas de agua dulce. Si dividimos estas algas en grupos, algas marrones (*Sargassum muticum*, *Sargassum vulgare* y *Undaria pinnatifida*), algas rojas (*Hypnea spinella*, *Porphyra* spp., *Chondrus crispus* y *Halopitysis incurvus*), microalgas verdes (*Spongiochloris spongiosa* y *Scenedesmus*) y microalgas verde-azuladas (*Nostoc* 17), se puede apreciar que las microalgas verdes presentaron la concentración más baja de isoflavonas, mientras que en los otros grupos el contenido en isoflavonas depende de la especie. No obstante, es importante destacar que es la primera vez que se confirma la presencia de estos compuestos, aun en pequeña cantidad, en todos los tipos de algas estudiados. *Chondrus crispus* presentó un contenido en isoflavonas muy superior al resto de las algas analizadas, seguido por *Sargassum muticum*. La microalga *Nostoc* presentó valores de isoflavonas muy superiores al resto de microalgas, siendo también superior al de muchas macroalgas marinas. En general las isoflavonas mayoritarias en casi todas las algas (excepto en *C. crispus* y *S. spongiosa*) fueron ononina, sissotrina, biochanina A y formononetina, siendo las minoritarias daidzina, daidzeína y genisteína. Sin embargo, en *C. crispus* y *S. spongiosa* la isoflavona que se encontró en mayor concentración fue genistina.

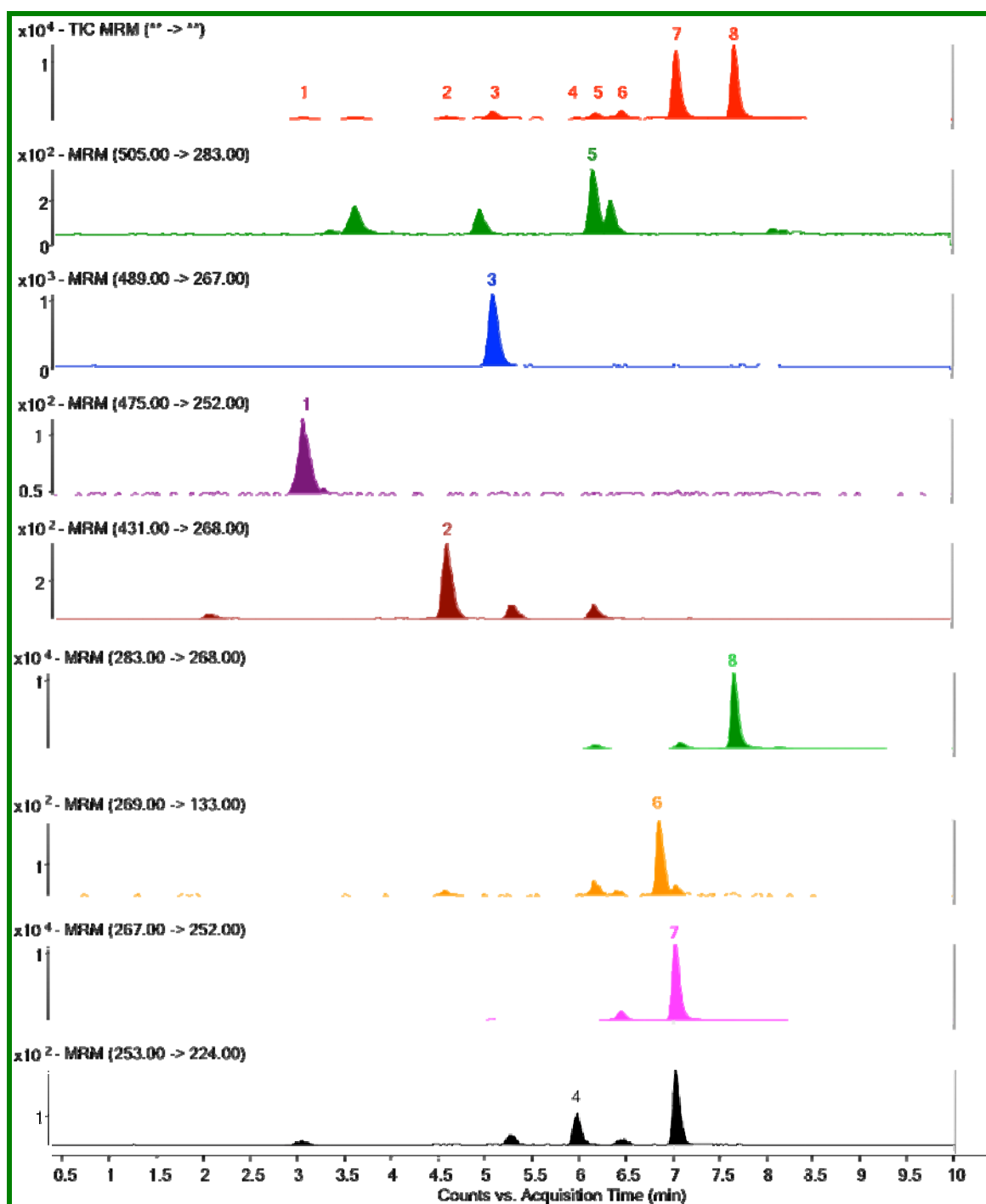


Figura VII.8. Cromatograma MRM de la macroalga marina *Chondrus crispus* obtenido mediante LC-MS/MS. Identificación de picos: 1. daidzina; 2. genistina; 3. ononina; 4. daidzeina; 5. sissotrina; 6. genisteína; 7. formononetina; 8. biochanina A.

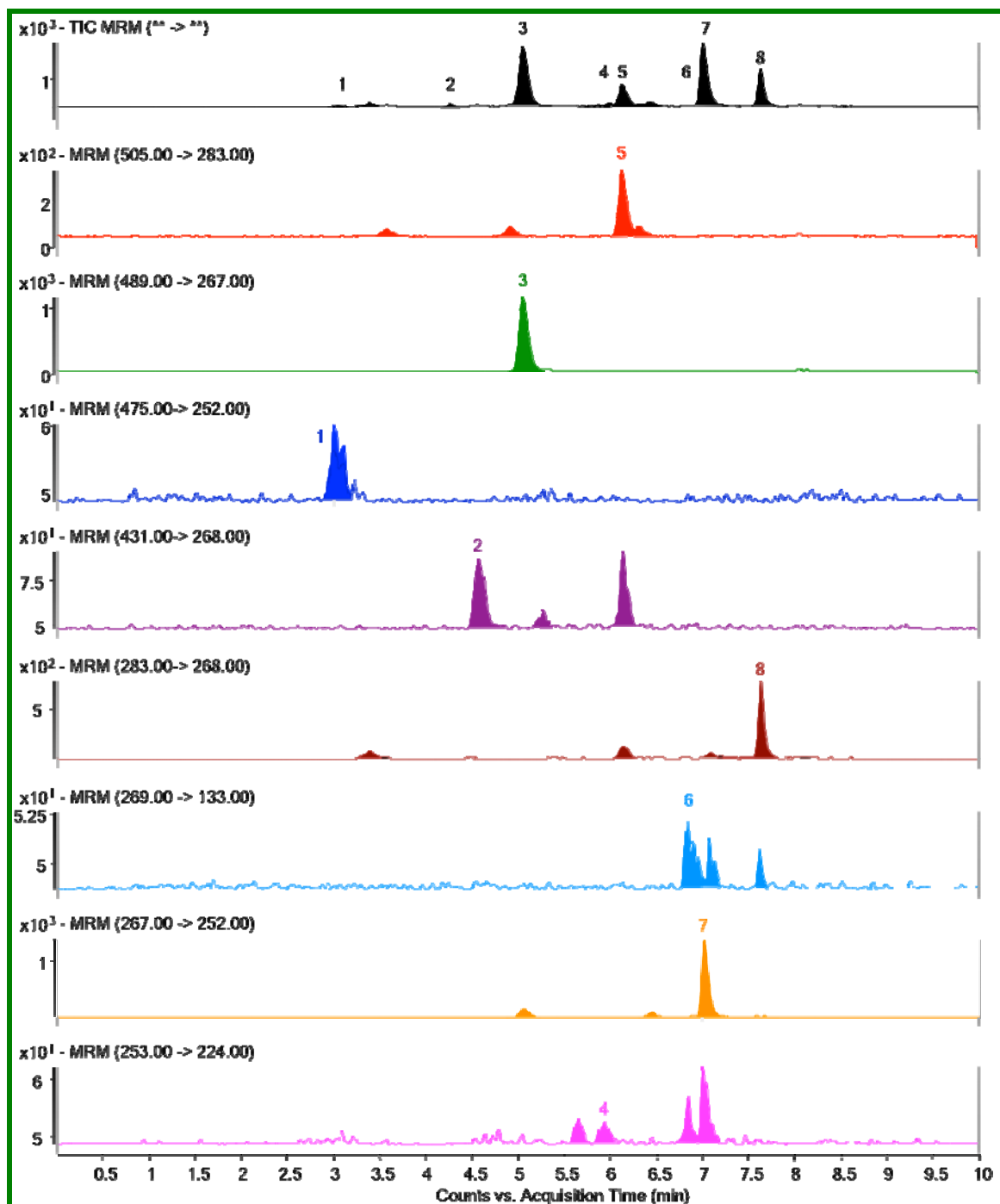


Figura VII.9. Cromatograma MRM de la microalga de agua dulce *Nostoc 17* obtenido mediante LC-MS/MS. Identificación de picos: 1. daidzina; 2. genistina; 3. ononina; 4. daidzeína; 5. sissotrina; 6. genisteína; 7. formononetina; 8. biochanina A.

Por tanto, teniendo en cuenta tanto las múltiples actividades funcionales atribuidas a estos compuestos (Duffy y Cyr, 2003; Wietrzyk y col., 2005; Ishibashi y Ohtsuki, 2008; Spadafranca y col., 2008; Andres y col., 2009; Sato y col., 2006; Meragelman y col., 2005; Oldreive y col., 1998), así como lo datos observados en capítulos anteriores, se puede sugerir que la presencia de isoflavonas en diferentes tipos

de algas podría contribuir de manera positiva a la actividad antioxidante total de algunos de los extractos estudiados.

VII.5.CONCLUSIONES.

En este estudio se ha demostrado, por primera vez, que todas las macroalgas marinas y microalgas de agua dulce estudiadas presentaron pequeñas concentraciones de ocho de las diez isoflavonas estudiadas. Gracias al empleo de una potente y muy sensible herramienta analítica, como es la RRLC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo, se pudieron no sólo detectar estos compuestos en los extractos estudiados, sino asimismo, proceder a su correcta cuantificación. Asimismo, si se comparan las distintas especies de algas estudiadas se puede observar que la concentración de cada una de las isoflavonas estudiadas difiere mucho de una alga a otra, y que no hay una relación directa entre el tipo de alga y la cantidad de isoflavonas encontradas.

Se comprobó cómo mediante el empleo de SFE utilizando dióxido de carbono supercrítico junto con una proporción de modificador del 3% (MeOH/H₂O 9:1 v/v), era posible obtener buenas recuperaciones de los compuestos estudiados. Las mejores condiciones de extracción incluyeron el empleo, además de dicho modificador, de una presión de 35 MPa y una temperatura de 40°C durante 60 min.

En conjunto, se puede decir que el uso combinado de métodos avanzados de extracción multi-etapa, junto con la aplicación de potentes técnicas analíticas permitió la detección y cuantificación, por primera vez, de isoflavonas presentes en muestras de diferentes tipos de algas, incluyendo algas verdes, rojas, marrones así como cianobacterias. Esta metodología demostró que era apropiada para determinar compuestos a bajas concentraciones presentes en extractos naturales complejos.

Discusión General a la Segunda Parte

En esta Segunda Parte de la presente Memoria se han podido identificar dos diferentes clases de compuestos fenólicos procedentes de algas, como son los ácidos fenólicos y las isoflavonas. Estos compuestos no habían sido casi estudiados en estas matrices; de hecho, las isoflavonas se han identificado por primera vez en algas en este trabajo. Además, la presencia de estos compuestos fenólicos se ha comprobado en un amplio grupo de algas, como son algas marrones, algas verdes, algas rojas y cianobacterias.

Los resultados mostrados en el Capítulo VI, han permitido confirmar la presencia de los 13 ácidos fenólicos estudiados en todas las diferentes especies de algas investigadas. Se demostró como el empleo de una técnica avanzada de extracción, como es la PLE, permitía la obtención de los compuestos bioactivos de interés a partir de estas fuentes naturales. En cuanto al estudio de las diferentes especies de algas, en relación a su contenido en ácidos fenólicos, se ha podido demostrar que la concentración de ácidos fenólicos depende de la especie de alga, ya que se observaron grandes variaciones en la concentración de los mismos de un alga a otra. Sin embargo, no se encontraron tendencias en función del grupo de algas del que se tratara. La macroalga marrón *Sargassum muticum* fue la macroalga cuyos extractos presentaron una mayor concentración en ácidos fenólicos, seguida por la macroalga roja *Halopitys incurvus*.

Se han descrito multitud de propiedades de los ácidos fenólicos, entre estas, como se ha comentado anteriormente, actividad antioxidante, pudiendo participar estos compuestos en la capacidad antioxidante total de los extractos de algas. En la bibliografía se ha relacionado la presencia de ácidos fenólicos en extractos de PLE, obtenidos mediante condiciones de extracción muy parecidas a las empleadas en este trabajo, con la capacidad antioxidante que presentaron dichos extractos (Onofrejova y col., 2010). Asimismo, estos ácidos fenólicos se podrían encontrar en los extractos obtenidos en la Primera Parte de la presente Memoria, por ejemplo, en los extractos obtenidos por PLE con agua a 200°C puesto que el agua a altas temperaturas, como se ha comentado anteriormente, disminuye su constante dieléctrica hasta valores próximos a los del metanol. El agua subcrítica, a temperaturas entre 150 y 200°C posee una constante dieléctrica entre 40 y 35, es decir, entre la del acetonitrilo (37.5) y la del metanol (32.6). El disolvente de extracción utilizado en esta segunda parte de la

Memoria consiste en metanol/agua (8:2, v/v) a 130°C cuya constante dieléctrica calculada a 130°C fue de aproximadamente 35. Por tanto, cabría esperar que los ácidos fenólicos que se han detectado en los extractos de algas empleando metanol/agua (8:2) se extrajeran asimismo utilizando agua en condiciones subcríticas a elevadas temperaturas. Este hecho podría explicar, en parte, el incremento de capacidad antioxidante total de los extractos producidos.

Por otro lado, se ha podido confirmar por primera vez la presencia de compuestos fenólicos con estructuras más complejas, como las isoflavonas, en diferentes especies de algas. Los resultados que se han expuesto en el Capítulo VII ponen de manifiesto la presencia de ocho diversas isoflavonas en diez diferentes especies de macro- y microalgas, incluyendo algas marrones, algas rojas, algas verdes y cianobacterias. En cuanto a los resultados en particular, se observó como las microalgas verdes *Scenedesmus* y *Spongiochloris spongiosa* presentaron un perfil muy similar de isoflavonas y a la vez fueron las algas con menores concentraciones de estos compuestos. Para otros grupos de algas no se encontraron tendencias similares. En general, los extractos producidos a partir de la macroalga roja *Chondrus crispus* fueron los que presentaron una mayor concentración de isoflavonas, seguidos por los obtenidos de la macroalga marrón *Sargassum muticum*.

En la extracción de isoflavonas procedentes de algas se empleó una técnica limpia de extracción como es la extracción con CO₂ supercrítico; considerando el carácter apolar de este disolvente, se utilizó un 3% de modificador MeOH/H₂O (9:1 v/v), siendo éste fundamental para la extracción de compuestos polares como son los compuestos fenólicos, ya que fácilmente dona enlaces de hidrógeno. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, no se puede descartar la presencia de isoflavonas en los extractos obtenidos en la Primera Parte de este trabajo, ante todo considerando su presencia en todos los tipos de algas estudiadas.

En conjunto el alga más completa, en cuanto a la presencia de los compuestos fenólicos estudiados (ácidos fenólicos e isoflavonas), es *Sargassum muticum*, debido a que presentó la mayor concentración de ácidos fenólicos y además, fue una de las algas en la que las isoflavonas se encontraron en mayor concentración.

La presencia de estos tipos de compuestos fenólicos en la composición química de las algas, podría ser de gran interés para la obtención de extractos complejos con actividades funcionales, fundamentalmente antioxidantes. De hecho, considerando que no pudieron relacionarse directamente las capacidades antioxidantes mostradas por los extractos de algas de la Primera Parte de esta Memoria con sus perfiles de carotenoides y otros pigmentos, sobre todo cuando se empleó agua como disolvente en PLE, la presencia en dichos extractos de compuestos fenólicos no debería descartarse. Dichos compuestos tendrían asimismo una influencia positiva en la capacidad antioxidante total de los extractos complejos obtenidos.

En general, se puede decir que el empleo de técnicas avanzadas y medioambientalmente respetuosas de extracción, como son las extracciones con líquidos presurizados y con fluidos supercríticos, junto con la aplicación de potentes técnicas analíticas, permitió la extracción e identificación de diferentes compuestos fenólicos en matrices tan complejas como son las algas. La presencia de estos compuestos añade un mayor valor a los extractos complejos procedente de algas, debido a las actividades funcionales que se les han atribuido, pudiéndose utilizar potencialmente dichos extractos de algas como ingredientes funcionales en la industria alimentaria.

Bibliografía

Adhikari, U., Mateu, C.G., Chattopadhyay, K., Pujol, C.A., Camonte, E.B., Ray, B. (2006). Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. *Phytochemistry* 67: 2474-2482.

Alang, G., Kaur, R., Singh, A., Budlakoti, P., Singh, A., Singla, P. (2009). Antimicrobial activity of *Ulva lactuca* extracts and its fractions. *Pharmacologyonline* 3: 107-117.

Azadbakht, M. (2007). Phytoprogestins. *J. Med. Plants* 6: 1-10.

Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcao, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 146: 60-78.

Cox, S., Abu-Ghannam, N., Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Int. Food Res. J.* 17: 205-220.

Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., Wang, B.G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem.* 95: 37-43.

Eriksen, N.T. (2008). Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 1-14.

Fahmy, T.M., Paulaitis, M.E., Johnson, D.M., McNally, M.E. (1993). Modifier effects in the supercritical-fluid extraction of solutes from clay, soil, and plant materials. *Anal. Chem.* 65: 1462-1469.

Ganesan, P., Kumar, C.S., Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour. Technol.* 99: 2717-2723.

Gantar, M., Svircev, Z. (2008). Microalgae and cyanobacteria: Food for thought. *J. Phycol.* 44: 260-268.

Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., Nafissi-Varcheh, N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J. Appl. Phycol.* 22: 43-50.

Harden, E.A., Falshaw, R., Carnachan, S.M., Kern, E.R., Prichard, M.N. (2009). Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 83: 282-289.

Herrero, M., Ibáñez, E., Señoráns, J., Cifuentes, A. (2004). Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga: Determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 1047: 195-203.

Herrero, M., Jaime, L., Martín-Álvarez, P.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006c). Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *J. Agric. Food. Chem.* 54: 5597-5603.

Ibrahim, T.A., El-Hefnawy, H.M., El-Hela, A.A. (2010). Antioxidant potential and phenolic acid content of certain cucurbitaceous plants cultivated in Egypt. *Nat. Prod. Res.* 24: 1537-1545.

Izumi, T., Piskula, M.K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., Kikuchi, M. (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than glucosides in humans. *J. Nutr.* 130: 1965-1699.

Jung, H.J., Choi, J., Nam, J.H., Park, H.J. (2007). Anti-ulcerogenic effects of the flavonoid-rich fraction from the extract of *Orostachys japonicus* in mice. *J. Med. Food.* 10: 702-706.

Kamenarska, Z., Serkedjieva, J., Najdenski, H., Stefanov, K., Tsvetkova, I., Dimitrova-Konaklieva, S., Popov, S. (2009). Antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities of some red and brown seaweeds from the Black Sea. *Bot. Mar.* 52: 80-86.

Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C.C., Yang, W.C., Tsai, G.J. (2010). Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentate*. *J. Ethnopharmacol.* 128: 123-130.

Klejdus, B., Lojková, L., Lapcik, O., Koblovská, R., Maravcová, J., Kubán, V. (2005). Supercritical fluid extraction of isoflavones from biological samples with ultra-fast high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 28: 1334-1346.

Klejdus, B., Lojková, L., Kosina, P., Ulrichová, J., Kubán, V. (2007). Liquid chromatographic/electrospray mass spectrometric determination (LC/ESI-MS) of chelerythrine and dihydrochelerythrine in near-critical CO₂ extracts from real and spiked plasma samples. *Talanta* 72: 1348-1356.

Klejdus, B., Kopecký, J., Benešová, L., Vacek, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *J. Chromatogr. A* 1216: 763-771.

Kumar, C.S., Ganesan, P., Suresh, P.V., Bhaskar, N. (2008). Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds - A review. *J. Food Sci. Technol.* 45: 1-13.

Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.* 102: 771-776.

Liu, R., Yuanlei, H., Li, J., Lin, Z. (2007). Production of soybean isoflavone genistein in non-legume plants via genetically modified secondary metabolism pathway. *Metab. Eng.* 9: 1-7.

MMcCue, P., Shetty, K. (2004). Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 361-367.

Mackova, Z., Koblovská, R., Lapcik, O. (2006). Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa – An update. *Phytochemistry*, 67:849-855.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 727-747.

Meragelman, T.L., Tucker, K.D., McCloud, T.G., Cardellina, J.H., Shoemaker, R.H. (2005). Antifungal flavonoids from *Hidegardia barteri*. *J. Nat. Prod.* 68: 1790-1792.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52: 673-751.

Montanha, J.A., Bourgougnon, N., Boustie, J., Amoros, M. (2009). Antiviral activity of carrageenans from marine red algae. *Lat. Am. J. Pharm.* 28: 443-448.

Onofrejšová, L., Vašíčková, J., Klejšus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S., Kopecký, J., Vacek, J. (2010). Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 464-470.

Parys, S., Rosenbaum, A., Kehraus, S., Reher, G., 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.

Riviere, C., Richard, T., Vitrac, X., Merillon, J.M. (2008). New polyphenols active on beta-amyloid aggregation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18: 828-831.

Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 456-463.

Santoyo, S., Herrero, M., Señorans, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Jaime, L. (2006). Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. *Eur. Food Res. Technol.*, 224: 75-81.

Santoyo, S., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Señorans, F.J., Ibáñez, E. (2009). Green processes base don the extraction with pressurized fluids to obtain potente antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT Food Sci. Technol.* 42:1213-1218.

Santoyo, S., Plaza, M., Jaime, L., Ibáñez, E., Reglero, G., Señorans, F.J. (2010). Pressurized liquid extracts from the microalgae *Chlorella vulgaris* as a source of potencial antiviral agents. *J. Agric. Food Chem.* DOI: 10.1021/jf100369h.

Sato, M., Tanaka, H., Tani, N., Nagayama, M., Yamaguchi, R. (2006). Different antibacterial actions of isoflavones isolated from *Erythrina poeppigiana* against methicillin.resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett. App. Microbiol.* 43:243-248.

Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073S-2085S.

Setchell, K.D.R., Brown, N.M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B.E., Brashear, W.T., Kirschner, A.S., Cassidy, A., Heubi, J.E. (2001). Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J. Nutr.* 131: 1362S-75S.

Shanmughapriya, S., Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G.S., Natarajaseenivasan, K. (2008). Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Ann. Microbiol.* 58: 535-541.

Singh, M., Govindarajan, R., Rawat, A.K.S, Khare, P.B. (2008). Antimicrobial flavonoid rutin from *Pteris vittata* L. against pathogenic gastrointestinal microflora. *Am. Fern J.* 98: 98-103.

Vacek, J., Klejdus, B., Lojková, L., Kubán, V. (2008). Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *J. Sep. Sci.* 31, 2054-2067.

Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Hreggvidsson, G.O., Jónsson, J.T., Thorkelsson, G., Ólafsdóttir, G. (2010). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*, *LWT-Food Sci. Technol.* 43: 1387-1393.

Willfor, S.M., Smeds, A.I., Holmbom, B.R. (2006). Chromatographic analysis of lignans. *J. Chromatogr. A* 1112: 64-77.

Yasuhara-Bell, J., Lu, Y. (2010). Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Res.* 86: 231-240.

Zhang, Z., Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., Zhang, Q. (2010). Extraction of the polysaccharides from Five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydr. Polym.* 82: 118-121.

TERCERA PARTE

Introducción General a la Tercera Parte

La extracción con agua subcrítica (SWE) se considera una técnica novedosa y ventajosa para la extracción de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales (Herrero y col., 2006b; Luque De Castro y col., 1999). Como se ha descrito en el Capítulo I de la presente Memoria, la SWE se basa en el empleo combinado de altas temperaturas (100-374°C) y presiones (10-60 bar) que permiten que el agua se encuentre en estado líquido durante todo el proceso de extracción. Entre las ventajas que se le atribuyen a esta metodología frente a los procesos de extracción convencionales cabe destacar la reducción del tiempo de extracción, uso nulo de disolventes orgánicos, elevados rendimientos de extracción, la no exposición a la luz y el oxígeno de las muestras y la automatización del proceso (Herrero y col., 2006). Estas ventajas son en parte responsables del gran aumento del empleo de esta técnica para la extracción de compuestos bioactivos y otros compuestos de interés procedentes de productos naturales y de alimentos (Herrero y col., 2010, Mendiola y col. 2007; Wiboonsirikul y Adachi, 2008; Rostagno y col., 2009). En este sentido, la SWE se ha utilizado para extraer compuestos nutraceuticos a partir de pulpa de cítricos (Kim y col., 2009), orégano (Rodríguez-Meizoso y col., 2006) o romero (Herrero y col., 2010), así como antioxidantes fenólicos procedentes de harina de colza (Hassas-Roudsari y col., 2009) y melón amargo (Budrat y Shotipruk, 2009), o incluso, proantocianidinas de subproductos de la industria vitivinícola (García-Marino y col., 2006), ente otros. El tratamiento térmico que implica la aplicación de esta metodología podría favorecer la liberación y la interacción entre los componentes de las muestras a procesar, formándose nuevas estructuras químicas con actividad biológica. Teniendo en cuenta las condiciones de trabajo de la SWE, algunos de los eventos químicos que podrían tener lugar durante la extracción de matrices vegetales son la reacción de Maillard, así como procesos de caramelización.

La reacción de Maillard, también conocida como de pardeamiento no enzimático, es una de las reacciones que se dan con más frecuencia durante el procesado de los alimentos, principalmente en el calentamiento pero también durante el almacenamiento a temperatura ambiente o incluso, aunque de forma mucho más moderada, a bajas temperaturas (Somoza, 2005; Mlotkiewicz, 1998). Esta reacción se origina con la condensación del grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína con un grupo carbonilo, que procede, normalmente, de un azúcar reductor, aunque también puede proceder de la degradación del ácido ascórbico o de productos formados

durante la oxidación lipídica (Chuyen, 1998). La IUPAC-IUB (*Joint Commission on Biochemical Nomenclature*, JCBN), recomienda el uso del término “*glycation*” (glicación), para referirse a la unión no-enzimática de azúcares y proteínas (Roth, 1983). Esta reacción engloba una serie de complejas transformaciones que dan lugar a una gran variedad de compuestos (volátiles y no volátiles), denominados productos de la reacción de Maillard (MRPs), que confieren nuevos colores, olores, sabores y texturas a los alimentos (Ledl y Schleiche, 1990; Martins y col., 2001). No obstante, también pueden originarse compuestos no deseados como acrilamida o aminas heterocíclicas (Friedman, 1996).

La reacción de Maillard puede dividirse en tres etapas (Mauron, 1981) (ver Figura 3.1):

- Etapa temprana o inicial: esta etapa corresponde a una serie de reacciones químicas, conocidas y caracterizadas, en las que aún no se produce pardeamiento. Los compuestos que se forman se caracterizan por ser compuestos no coloreados, sin absorción en la región ultravioleta. Comienza con la condensación entre el grupo carbonilo del azúcar reductor o de un lípido oxidado y el grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína, originando una base de Schiff, que sufre una reorganización llamada de Amadori. Esto origina ya una pérdida de valor nutritivo, porque el grupo amino queda bloqueado y no es disponible. El producto que se obtiene se llama compuesto de Amadori (N-sustituido-1-amino-1-deoxi-2-cetosa) (Yailayan, 1997), y se ha detectado en alimentos calentados, liofilizados y almacenados.
- Etapa avanzada: en condiciones de temperatura más extrema se forman gran cantidad de compuestos que son los responsables de los olores que desprenden los alimentos cocinados. En esta etapa se produce la fragmentación de azúcares y la degradación de los aminoácidos, formándose compuestos coloreados y fluorescentes. El pH influye decisivamente en el desarrollo de la reacción, de manera que pueden seguirse tres rutas diferentes a partir del compuesto de Amadori:

- *Pérdida de moléculas de carbono por escisión*, que da lugar a la formación de compuestos que pueden contener nitrógeno y reaccionar con otros productos intermedios de la reacción, responsables de los aromas característicos.

- *Deshidratación media dando lugar a la formación de reductonas y dihidrorreductonas*, que sufren la denominada degradación de Strecker dando lugar a pirazinas y aldehídos, componentes del olor y sabor de los alimentos cocinados (Cremer y Eichner, 2000). Además, el compuesto de Amadori puede degradarse mediante reacciones de enolización, dando compuestos como las 1- ó 3- deoxisonas (Namiki, 1988) y deoxihexosulosas como la 1-deoxi-2,3-hexosulosa y la 3-deoxi-2-hexosulosa (procedentes de una hexosa). Éstas estructuras pueden fragmentarse al sufrir reacciones de condensación vía retroaldol o β -eliminación, dando compuestos α -dicarbonílicos y α -hidroxicarbonílicos bastante reactivos como el gliceraldehído, metilglioxal o hidroxiacetona, considerados precursores de los MRPs (Weenen, 1998). En concreto la hidroxiacetona es un precursor de la pirazina mientras que el gliceraldehído y el metilglioxal participan fundamentalmente en los mecanismos de pardeamiento (Weenen y Tjan, 1994). Estos compuestos también pueden formarse a partir de carbohidratos sin participación alguna de los grupos amino, vía caramelización a elevadas temperaturas (Hollnagel y Kroh, 1998). La 2-hexosulosa, el glioxal y el metilglioxal son considerados precursores responsables de la formación de productos avanzados de la glicación (AGEs) (Biemel y Laderer, 2003). Parece ser que la formación de estos compuestos carbonílicos está modulada mediante ciclos redox (Yaylayan, 2003).

- *Deshidratación fuerte que produce furfural y derivados responsables del aroma*.

- Etapa final: incluye una serie de reacciones de condensación, polimerización y fenómenos de entrecruzamiento proteico, originándose oligómeros y polímeros insolubles, nitrogenados y coloreados de elevado peso molecular. Se trata de pigmentos pardos llamados melanoidinas

(Van Boekel, 1998), difíciles de aislar y cuya estructura y caracterización todavía son objeto de estudio. Estas macromoléculas pueden tener distinta estructura dependiendo de las condiciones en las que haya tenido lugar la reacción (Andriot y col., 2004; Tressl y Rewicki, 1999).

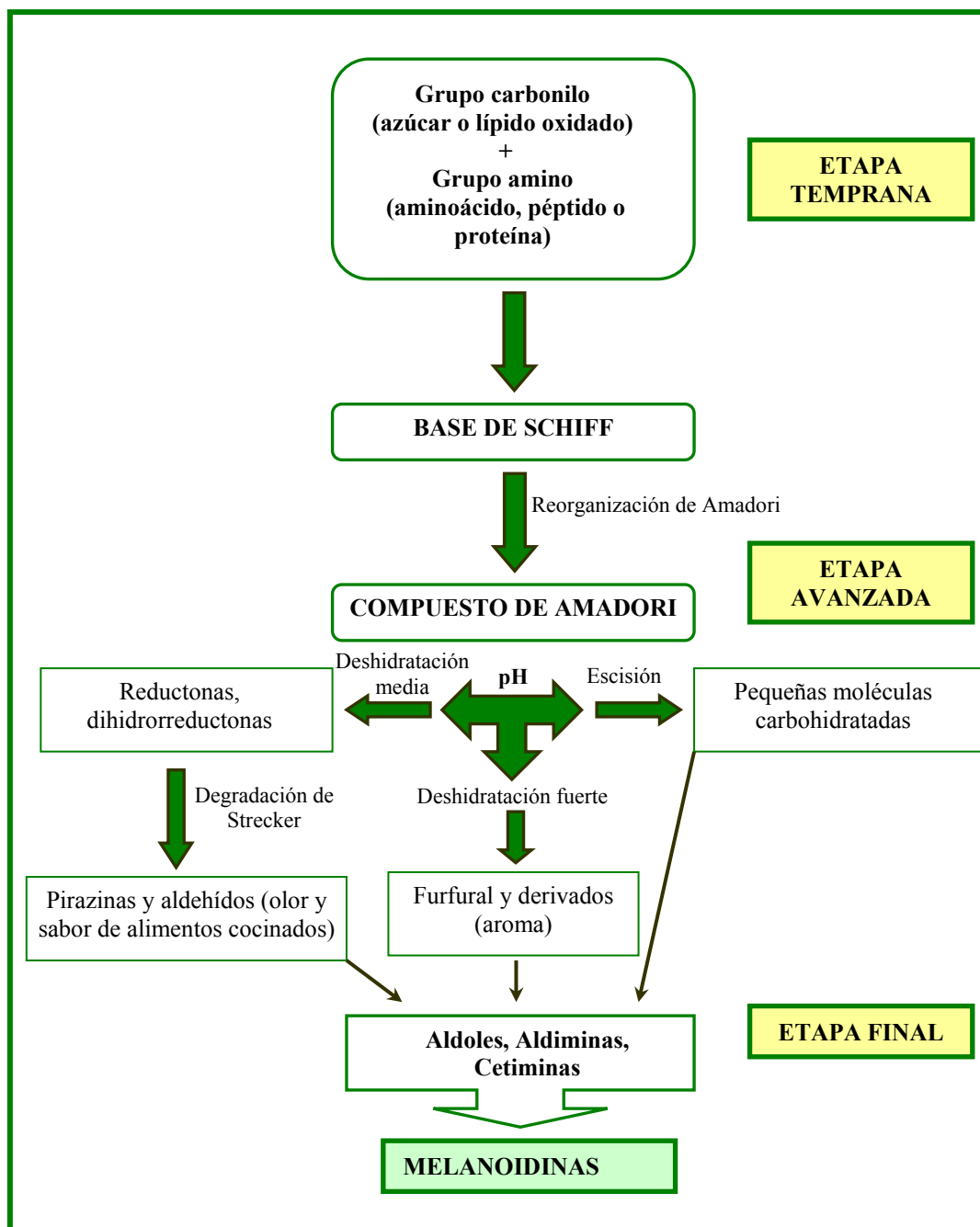


Figura 3.1. Esquema de la reacción de Maillard (Mauron, 1981).

Los azúcares sencillos, azúcares ácidos y otros compuestos polihidroxicarbonados producen reacciones de pardeamiento a altas temperaturas en

ausencia de grupos amino libres, originando productos similares a los resultantes de la reacción de Maillard. Esta reacción se llama caramelización y se ve favorecida a temperaturas superiores a 120°C, valores de pH inferiores a 3 o superiores a 9 y contenidos muy bajos de humedad (Olano y Martínez de Castro, 1996; Cardelle-Cobas y Villamiel, 2005).

Los productos resultantes de la reacción de Maillard se han estudiado en profundidad puesto que, además de los cambios organolépticos que producen en el alimento, algunos de ellos pueden modificar ciertas propiedades funcionales. Por ejemplo la glicación mejora las propiedades funcionales de diversas proteínas alimentarias (Aoki y col., 2001; Hattori y col., 2000), y genera compuestos con actividades antimicrobiana (Chevalier y col., 2001; Yang y col., 2005), anticarcinogénica y antimutagénica (Yen y Tsai, 1993). De igual forma, se ha demostrado que la alergenicidad de algunas proteínas alimentarias se puede enmascarar mediante la conjugación con azúcares reductores (Nakamura y col., 2008; Kato, 2002; Van de Lagemaat, 2007). Por otro lado, uno de los aspectos más interesantes y novedoso de los MRPs es la capacidad antioxidante que se les atribuye, actualmente objeto de muchas investigaciones (Gu y col., 2009; Silván y col., 2006; Del Castillo y col., 2005; Delgado-Andrade y col., 2005; Martín y col., 2009; Moreno y col., 2006a). Dicha actividad antioxidante se observó por primera vez en 1954 (Franzke e Iwainsky (1954)); estos autores descubrieron una relación directa entre el aumento de la actividad antioxidante y el tiempo de calentamiento. Debido a esta capacidad se ha propuesto el empleo de algunos de estos compuestos como aditivos alimentarios por incorporación directa al alimento, o bien mediante su formación durante la aplicación de tratamientos térmicos, contribuyendo así a la estabilidad oxidativa de algunos alimentos y a la mejora de sus propiedades (Bressa y col., 1996). Por ello algunos autores consideran que los MRPs podrían utilizarse como ingredientes funcionales en los alimentos, capaces de aportar los beneficios para la salud que se les atribuyen a los antioxidantes existentes en los alimentos de forma endógena (Chevalier y col., 2001). Ahora bien, tanto el mecanismo de acción de la actividad antioxidante de los MRPs, como sus posibles efectos en el organismo, están aun por dilucidar. Esta actividad se ha estudiado mayoritariamente mediante ensayos *in vitro* con sistemas modelo aminoácido-azúcar y en alimentos, siendo muy escasos los estudios *in vivo*.

Pese a esta, potencialmente interesante, propiedad antioxidante, la reacción de Maillard puede conducir de igual manera a una reducción del valor nutricional de los alimentos, provocada por la pérdida de aminoácidos esenciales, y a una modificación de la digestibilidad proteica y/o biodisponibilidad de los aminoácidos. Por tanto, es necesario controlar el desarrollo de la reacción, para evitar la posible formación de compuestos no deseados potencialmente tóxicos. Durante la reacción de Maillard, la formación de un tipo de producto u otro depende del grado de desarrollo de la reacción, el cual se ve influenciado por parámetros tales como la naturaleza de los compuestos implicados, temperatura, tiempo, pH y actividad de agua, principalmente (Ames y col., 1990; Wijewickreme y Kitts, 1997).

Como se ha podido observar en la primera parte de la presente Memoria, la capacidad antioxidante de los extractos de algas obtenidos por SWE a 200°C fue muy superior a la capacidad de los extractos obtenidos a temperaturas inferiores, llegando en muchas ocasiones a presentar una capacidad antioxidante superior al resto de extractos obtenidos por PLE con diferentes disolventes. Por otro lado, los métodos analíticos utilizados en la primera parte de esta Memoria no proporcionaron resultados satisfactorios para la caracterización de los posibles compuestos responsables de la elevada capacidad antioxidante presentada por los extractos acuosos a altas temperaturas. Ambos aspectos, unidos a las particularidades de la extracción con agua subcrítica a elevada temperatura y a la composición del material vegetal (mas o menos rico en azúcares reductores y aminoácidos, péptidos y proteínas), nos planteó la necesidad de buscar productos derivados de la reacción de Maillard y/o de procesos de caramelización en los extractos generados en condiciones extremas de temperatura mediante SWE. Estos nuevos compuestos podrían, de ser cierta la hipótesis planteada, tener una influencia determinante en la actividad antioxidante total del extracto producido.

Teniendo en cuenta el interés de conocer el grado de desarrollo de estas reacciones durante procesos de SWE y su contribución real a la capacidad antioxidante total de los extractos de matrices complejas, se abordó este estudio como objetivo principal de esta Tercera Parte de la Memoria.

Para poder corroborar si el aumento de la capacidad antioxidante de los extractos de algas obtenidos bajo condiciones de SWE se debía a los productos de la reacción de Maillard y/o caramelización, se realizó un amplio estudio dividido en dos partes diferenciadas, que se describen en los dos capítulos que forman la Tercera Parte de la presente Memoria. En primer lugar, en el Capítulo VIII, se llevó a cabo un estudio sobre la posible formación de nuevos antioxidantes derivados de la reacción de Maillard y de caramelización bajo las condiciones de extracción con SWE. Para realizar este estudio se simplificó la matriz y se trabajó con sistemas modelo basados en aminoácidos y glucosa. Por su parte, en el Capítulo IX se describen los resultados correspondientes a la comprobación experimental del desarrollo de dichas reacciones durante la extracción por SWE de muestras reales de diferentes macroalgas (*Sargassum vulgare*, *Sargassum muticum*, *Porphyra* spp., *Cystoseira abies-marina*, *Undaria pinnatifida* y *Halopitys incurvus*) y microalgas (*Chlorella vulgaris*). Estas especies de algas estudiadas se eligieron de manera que se cubrieran los grupos mayoritarios de algas, algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y algas marrones (Phaeophyta).

CAPÍTULO VIII:

“Formación de nuevos compuestos con capacidad antioxidante mediante la extracción con agua subcrítica de sistemas modelos de glicación”

VIII.1. INTRODUCCIÓN.

Como se ha mencionado en la introducción general de esta Tercera Parte, actualmente está aumentando el empleo de la extracción mediante SWE a partir de productos naturales y alimentos. Estas extracciones están dirigidas principalmente a la obtención de compuestos bioactivos y de interés que están presentes en dichas matrices. Sin embargo, poco se conoce acerca de los compuestos que se pueden formar durante el proceso de extracción, como resultado de las condiciones del mismo y de la composición química de las matrices extraídas. Estos productos formados pueden tener una influencia significativa en las propiedades funcionales de los extractos finales obtenidos.

En este trabajo, se estudia la posibilidad de encontrar evidencias de la formación de nuevos compuestos antioxidantes en las condiciones de extracción con agua subcrítica y empleando diferentes sistemas modelo simplificados formados por un aminoácido (Lys, Arg o Ala) y glucosa en una relación molar 1:4.

VIII.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El objetivo del presente trabajo fue corroborar la hipótesis anteriormente planteada, y demostrar que durante la extracción mediante SWE de sistemas modelo de glicación, podían tener lugar diferentes eventos químicos como son las reacciones de Maillard y/o caramelización. Asimismo, se pretendía verificar si estos nuevos compuestos formados durante la extracción presentaban capacidad antioxidante.

Para alcanzar este objetivo general, se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo (ver Figura VIII.1):

1. Obtención de extractos constituidos por mezclas de aminoácidos (lisina, arginina o alanina) y glucosa, mediante el empleo de SWE a temperatura ambiente, 100 y 200°C, manteniendo en todos los casos una presión y tiempos de extracción constantes (1500 psi durante 20 min). Como

controles se emplearon muestras constituidas únicamente por glucosa así como por cada uno de los aminoácidos empleados (Lys, Arg o Ala).

2. Verificación de la evolución de la reacción de Maillard y caramelización, mediante la realización de diferentes ensayos, incluyendo el análisis de la disminución de grupos aminos libres del aminoácido reactante y de la formación de productos iniciales, avanzados y finales de la reacción de Maillard.
3. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos obtenidos usando los métodos ABTS y ORAC_{FL}.

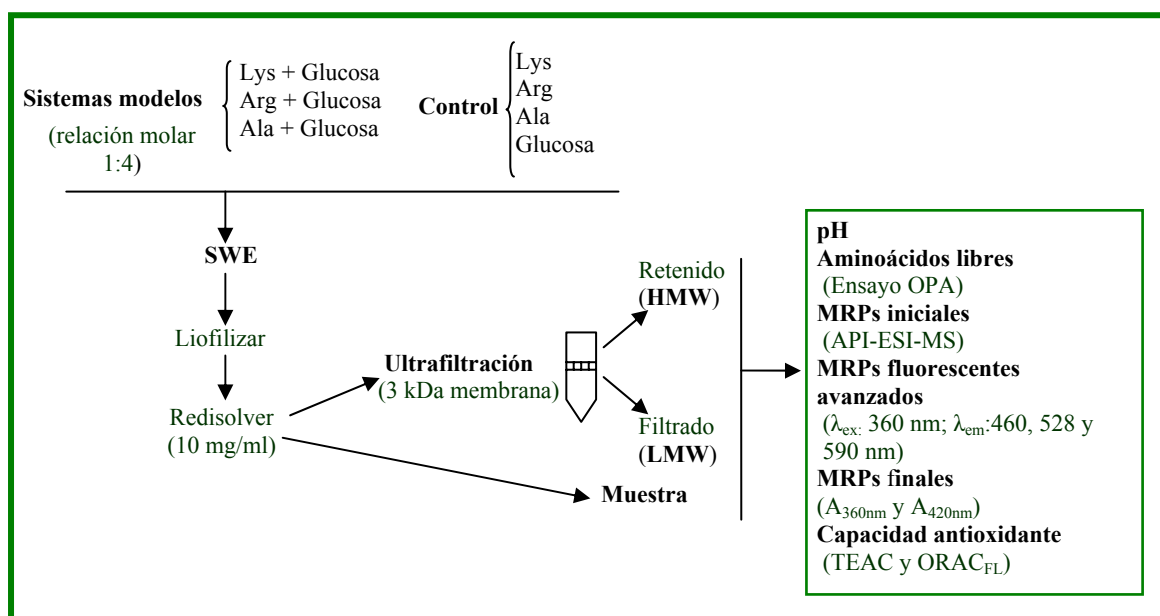


Figura VIII.1. Esquema de trabajo realizado para la búsqueda de nuevos compuestos antioxidantes, procedentes de la reacción de Maillard y/o caramelización, formados durante la SWE de sistemas modelo de glicación.

VIII.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

VIII.3.1. Productos químicos y reactivos.

Todos los disolventes utilizados fueron de grado analítico. o-Ftaldehído (OPA), 2,2'-azobis-2-metilaminopropano (AAPH), y 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (trolox), así como los aminoácidos (L-lisina (Lys), L-arginina (Arg) y L-alanina (Ala)), la glucosa y el persulfato potásico fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). La fluoresceína sódica y 2,2'-azinobis-(3-

etilbenzotiazolin)-6-sulfonato sal diamónica (ABTS) fueron proporcionados por Fluka (Buchs, Suiza). Fosfato monosódico dihidratado y ortofosfato disódico de hidrógeno anhidro fueron suministrados por Prolabo (Briare, Francia). El agua ultrapura usada se obtuvo utilizando un equipo Milli-Q Water (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). La arena de mar empleada para las extracciones se adquirió a Panreac Química (Barcelona, España).

VIII.3.2. Preparación de los sistemas modelos.

Los controles y los sistemas modelos en polvo se prepararon de la siguiente manera: para la obtención de los sistemas modelo de glicación, se mezclaron aminoácidos (Lys, Arg o Ala) y glucosa en una relación molar 1:4. Es decir, 35.0, 65.0 y 55.0 mg de Ala, Arg y Lys, respectivamente, se mezclaron con 260.0 mg de glucosa con el fin de preparar cada sistema modelo individualmente. Asimismo, se añadió arena de mar, como soporte sólido para las mezclas, hasta tener un peso final de 2 g. Para preparar los controles de aminoácidos se empleó la misma cantidad de cada aminoácido individualmente pesado y se mezcló con una cantidad de arena determinada con el fin de alcanzar un peso final de 2 g. De igual manera, para la elaboración del control de glucosa, 260.0 mg de glucosa se mezclaron con 1740 mg de arena de mar. Las muestras en polvo se homogeneizaron previamente a su utilización en un molino de bolas. Todas las muestras se prepararon por triplicado.

VIII.3.3. Extracción con agua subcrítica (SWE).

Las extracciones se llevaron a cabo en un sistema de Extracción Acelerada con Disolventes ASE200 de Dionex (Sunnyvale, CA, EEUU) equipado con una unidad controladora de disolventes (ver Figura II.3).

Todas las extracciones se llevaron a cabo por triplicado, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.3.2 del Capítulo II de la presente Memoria, incluyendo el protocolo de limpieza. Todas las extracciones se realizaron en una celda de 11 ml de capacidad empleando 2 g de la muestra en polvo. Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente, 100 y 200°C, manteniendo un tiempo de extracción estática de 20 minutos. Asimismo, la presión se mantuvo también constante a 1500 psi.

Los extractos obtenidos se congelaron y se eliminó el agua mediante liofilización con un liofilizador Freeze Dry System, Model 79480 (Labconco Corporation, Missouri, EEUU). Los extractos secos se mantuvieron a 4°C y protegidos de la luz hasta su análisis posterior.

VIII.3.4. Fraccionamiento de las muestras.

Las muestras se disolvieron con agua milli-Q a una concentración final de 1 mg/ml. 2 ml de las muestras se transfirieron a los cartuchos de ultrafiltración con filtros de centrífuga Microcon (Millipore, Billerica, MA, EEUU) con un tamaño de poro de 3000 Da y se centrifugaron a 9000 g durante 60 minutos. Las fracciones retenidas de alto peso molecular (HMW) así como las filtradas, de bajo peso molecular (LMW), se liofilizaron y se almacenaron a -20°C hasta que se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante.

VIII.3.5. Determinación de los productos iniciales de la reacción de Maillard (compuestos de Amadori).

La formación de los compuestos de Amadori se detectó mediante el empleo de un espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo simple (modelo HP 1100 MSD, Agilent, Santa Clara, CA) e ionización por eselectrospray (ESI). El detector de masas operó en modo de ionización positivo en las siguientes condiciones: temperatura del gas, 330°C; voltaje del capilar, 4 kV; flujo del gas secante, 10 l/min; y presión del gas nebulizador, 40 psi. Las muestras se inyectaron directamente después de que éstas fueran diluidas con agua milli-Q, y los compuestos de Amadori se detectaron mediante el escaneo de los compuestos existentes en el rango de masas m/z 50-500.

VIII.3.6. Determinación de grupos amino primarios libres (OPA).

El método espectrofluorimétrico del o-ftaldehído (OPA) se utilizó para determinar los grupos amino primarios libres. Este método se basa en la reacción específica del reactivo fluorogénico OPA en presencia de un agente reductor y en medio alcalino con los grupos amino primarios libres de los aminoácidos, péptidos o proteínas (α -amino terminales o ϵ -amino libres) dando lugar a isoindoles fluorescentes que son

medidos en un espectrofluorímetro. La detección de los grupos amino libres se utilizó como un marcador de la progresión o no de la reacción de Maillard.

O-ftaldehído (OPA) + Grupo amino libre → Fluoróforo ($\lambda_{ex}=340/\lambda_{em}=455$ nm)

La pérdida de grupos amino libres como consecuencia de la glicación se determinó siguiendo el protocolo descrito por Goodno y col. (1981), modificado por Arribas-Lorenzo y Morales (2009) para su aplicación en placas multipocillo. La solución madre de la reacción del OPA se preparó mezclando 100 mg del reactivo OPA disuelto en 1 ml de metanol, 0.5 ml de β -mercaptoetanol, y 8.5 ml de 0.1 M tampón borato (pH 10). La solución de trabajo de OPA se preparó disolviendo 100 veces la solución madre de OPA con tampón borato (0.1 M, pH 10). Las muestras se disolvieron a una concentración adecuada con tampón borato. 20 μ l de muestra, 180 μ l de 0.1 M de tampón borato (pH 10) y 50 μ l de la solución OPA, se transfirieron a una placa de multipocillo para medir fluorescencia (PS Black, Porvair, Leatherhead, Reino Unido). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, y la fluorescencia se determinó a $\lambda_{exc} = 340$ nm y $\lambda_{em} = 450$ nm usando un espectrofluorímetro Synergy HT model (Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Alemania) con la versión de software Gen 5.1.06. Los blancos de la muestra se realizaron transfiriendo 20 μ l de muestra, a la misma concentración que se empleó en la reacción OPA, y 230 μ l de tampón borato a una placa multipocillo. Los blancos de la muestra se analizaron para descartar cualquier interferencia posible debido a una fluorescencia natural.

Los análisis cuantitativos se llevaron a cabo por el método de patrones externos, empleando una curva de calibrado del correspondiente aminoácido (Lys, Arg o Ala) en un rango de concentraciones de 1.5-30 μ M. Los resultados se expresaron como μ mol de aminoácido/g de materia seca. Los resultados finales se calcularon como la media de seis repeticiones.

VIII.3.7. Determinación de productos avanzados de la reacción de Maillard (productos fluorescentes) (AGEs).

La presencia de compuestos fluorescentes característicos de las etapas avanzadas de la reacción de Maillard se estimó en todas las muestras de glicación y sus respectivos controles. La formación de AGEs fluorescentes se determinó por la medida de la fluorescencia a $\lambda_{\text{ex}} = 360 \pm 40 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 40 \text{ nm}$ en un espectrofluorímetro de microplacas Synergy HT model (Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Alemania). Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (FU). Todas las muestras se analizaron cuatro veces.

VIII.3.8. Determinación de los productos finales de la reacción de Maillard (melanoidinas).

La formación de productos coloreados (melanoidinas) característicos de las etapas finales de la reacción de Maillard, se determinó mediante la medida de la absorbancia a 360 nm y 420 nm, empleando para ello un espectrofotómetro con lector de microplacas PowerWave TM XS con un software KC junior (Bio-Tek, Winooski, VT). Algunas de las muestras se diluyeron para obtener valores de absorbancia menores a 1 unidad arbitraria.

Los cambios de la composición inducidos por el calentamiento se siguieron por el análisis de los espectros. Para ello, 250 μl de las muestras extraídas se transfirieron a un pocillo de la microplaca y se realizó el análisis del espectro visible (380-780 nm) en un espectrofotómetro de microplacas. Todas las medidas se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de absorbancia.

VIII.3.9. Evaluación de la capacidad antioxidante.

VIII.3.9.1. Ensayo TEAC.

La capacidad antioxidante de los extractos de los sistemas modelos obtenidos por SWE, se determinó empleando el método TEAC (capacidad antioxidante equivalente al trolox) (Re y col., 1999) con ligeras modificaciones. Este método, basado

en la generación de radicales de $ABTS^{•+}$, se correlaciona directamente con la capacidad antioxidante, es decir, un mayor valor TEAC supone una mayor capacidad antioxidante del extracto.

En el método TEAC, el catión radical $ABTS^{•+}$ se generó haciendo reaccionar en una disolución 7 mM de ABTS con 2.45 mM de persulfato potásico (concentraciones finales de reacción) durante 16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. La solución de radicales catiónicos $ABTS^{•+}$ se diluyó (1:88, v/v) con tampón fosfato sódico (5 mM, pH 7.4) hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0.70 (\pm 0.02) a 734 nm. En un vial de plástico se añadió 1 ml de la solución de $ABTS^{•+}$ y se adicionaron 10 μ l de la muestra a analizar. La mezcla se agitó en un vortex, y 300 μ l de la mezcla de reacción se transfirieron a un pocillo de la placa de poliestireno Microtest plate PS96 (Sarstedt, Alemania) donde se incubaron a 30°C y se monitorizó la absorbancia a 734 nm cada 5 min durante 30 minutos. Se empleó como control una muestra, preparada según se ha indicado anteriormente, compuesta por tampón fosfato sódico y radicales ABTS. El cálculo de la capacidad antioxidante de las muestras se realizó empleando una curva de calibrado con trolox disuelto en tampón fosfato sódico (5 mM, pH 7.4). La capacidad antioxidante de las muestras se calculó como μ moles de equivalentes de trolox/g de materia seca utilizando la curva de calibrado del trolox. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

VIII.3.9.2. Ensayo $ORAC_{FL}$.

La determinación de la capacidad antioxidante por el método $ORAC_{FL}$ (capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno empleando fluoresceína) se realizó siguiendo el método descrito por Ou y col. (2001) y modificado por Dávalos y col. (2004). Este método consiste en medir la disminución de fluorescencia debida a su oxidación por la presencia de radicales peroxílicos. La inhibición de esta oxidación en presencia de antioxidantes determina el potencial antioxidante de la sustancia objeto de estudio y es proporcional a la actividad antioxidante.

La reacción se llevó a cabo añadiendo 20 μ l de la muestra (50-100 μ g/ml) y 120 μ l de solución de fluoresceína sódica (1.16 nM en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.5) en una placa multipocillo para medir fluorescencia (PS Black, Porvair,

Leatherhead, Reino Unido). La placa se incubó a 37°C durante 10 minutos. La reacción de oxidación se inició añadiendo 60 µl de la solución de AAPH (48 mM en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.5). Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 104 minutos y se midió la fluorescencia empleando los filtros de $\lambda_{\text{ex}}=485$ nm y $\lambda_{\text{em}}=520$ nm en un espectrofluorímetro FLUOstar Optima (BMG Labtech, Alemania) en intervalos de 1 min. Se realizó un control de oxidación y un control de estabilidad de la fluoresceína en la misma placa. El control de la oxidación consistió en 20 µl de tampón fosfato sódico, 120 µl de la solución de fluoresceína y 60 µl de la solución de AAPH. El control de la estabilidad de la fluoresceína consistió en 80 µl de tampón fosfato sódico y 120 µl de la solución de fluoresceína. Para cada conjunto de muestras, se construyó una curva de calibrado de trolox (10-80µM).

Para los cálculos se empleó el programa Fluostar Galaxy así como el programa Microsoft Excel. Se construyó una curva de calibrado con trolox y se normalizó empleando el blanco y el control utilizados. Como resultado, se obtuvo la curva de la caída de fluorescencia en función del tiempo y se calculó el área bajo la curva (AUC). El valor AUC se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{AUC} = 1 + f_{104}/f_0 + f_{103}/f_0 + \dots + f_i/f_0 + \dots + f_0/f_0$$

donde f_0 es la lectura de fluorescencia a tiempo 0 min y f_i es la lectura de fluorescencia a tiempo i . Se representaron los valores AUC en función de la concentración de trolox para ver la linealidad. Además, se calcularon los valores de AUC de las muestras normalizándolas con los controles. El valor ORAC_{FL} se calculó mediante interpolación en la recta de calibrado de trolox. Los resultados se expresaron como µmoles equivalente de trolox/g de materia seca. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

VIII.3.10. Análisis de los resultados.

El programa Microsoft Excel 2000 se empleó para realizar el análisis estadístico de los resultados con el nivel de significación establecido en 95%. Se empleó el test de la t de Student para evaluar si las diferencias observadas entre los controles y los sistemas modelos eran estadísticamente significativas.

VIII.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este trabajo se llevaron a cabo extracciones por SWE a temperatura ambiente, 100 y 200°C de los sistemas modelos de glicación y de los controles. Los resultados preliminares mostraron que sólo los extractos obtenidos a 200°C poseían cierta capacidad antioxidante y, por tanto, estos extractos se consideraron para un estudio más en profundidad.

VIII. 4.1. Cambios de pH.

En primer lugar, se realizó una rápida determinación del pH en los extractos obtenidos a 200°C por SWE. Una variación en el pH de las muestras estudiadas puede indicar la pérdida de grupos amino libres en los aminoácidos, y por tanto, este hecho puede ser considerado como una primera indicación del consumo de los grupos amino debido a la reacción entre los aminoácidos y la glucosa (Liu y col., 2008). En la Figura VIII.2 se pueden observar los valores de pH obtenidos para los sistemas modelo de glicación, los controles de aminoácidos y el control de glucosa. Para todos los sistemas modelos, que contienen un aminoácido más glucosa, se observó una disminución significativa del pH ($p < 0.05$). De hecho, se observó una disminución de los valores de pH de 6.5%, 13.7% y 12.8%, para los sistemas modelos de Lys, Arg y Ala, respectivamente, comparados con sus respectivos controles. Sin embargo, el valor de pH más bajo se encontró en el sistema control de glucosa. Este fenómeno puede deberse a la producción de los ácidos fórmico y acético a partir de glucosa, que se degrada parcialmente formando estos compuestos cuando se calienta a un pH alto, ya sea en presencia o no de proteínas (Rufian-Henares y col., 2006).

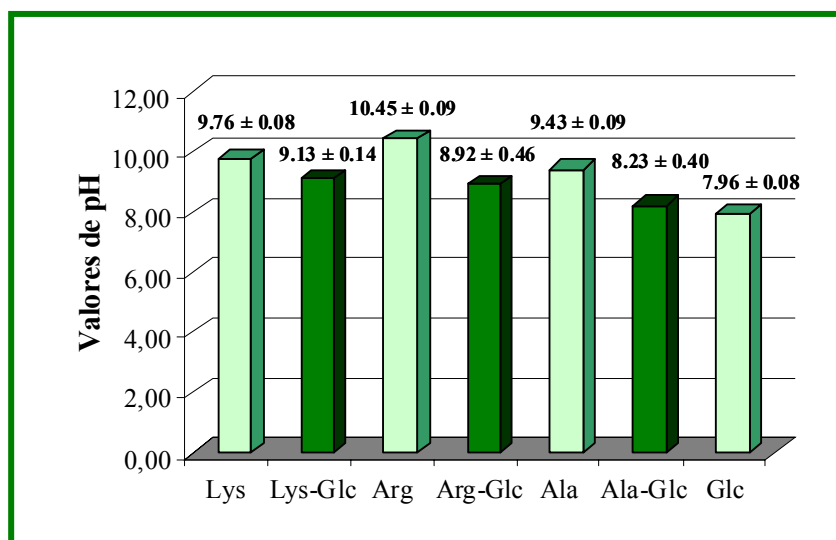


Figura VIII.2. Determinación de los valores de pH en los controles de aminoácidos, en los sistemas modelos de glicación y en el control de glucosa obtenidos tras las extracciones mediante SWE a 200°C. Los resultados se muestran como la media \pm sd (por triplicado). Todos los valores medios de cada sistema modelo y cada control de aminoácido fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Por tanto, estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de los valores de pH correspondientes a los extractos acuosos de los controles de aminoácidos y sistemas modelos de glicación, proporcionó un primer indicio de las posibles reacciones (descomposición de azúcares y aminoácidos, así como interacción azúcares-aminoácidos, es decir, reacción de Maillard) que podrían tener lugar durante los procesos de extracción por SWE.

VIII.4.2. Aminoácidos disponibles.

El análisis de los grupos amino primarios libres, determinados por el método OPA, se utilizó posteriormente como un indicador del avance de la reacción de Maillard durante la extracción de los sistemas modelos. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla VIII.1. Para cada aminoácido se calculó su correspondiente curva de calibrado. Como se puede apreciar en la Tabla VIII.1, se observó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.05$) del contenido de todos los aminoácidos estudiados después de la extracción de los sistemas modelo de glicación, comparado al contenido de los extractos acuosos de los controles. Específicamente, se observaron reducciones de disponibilidad del 52.9%, 83.4% y 82.3% para Lys, Arg y Ala, respectivamente (Tabla VIII.1). Este descenso en el contenido de aminoácidos podría deberse a la unión de los compuestos reductores a los grupos amino primarios de la estructura de los aminoácidos. Así pues, estos resultados obtenidos apoyan la hipótesis

de que la reacción de Maillard haya tenido lugar durante la extracción mediante SWE a 200°C. Por otro lado, anteriormente se había descrito en la bibliografía que los aminoácidos básicos, como lisina y arginina, favorecían la reacción de Maillard (Moreno y col., 2006). Además, a partir de valores de pH altos se podría inducir la reacción de condensación entre grupos amino libres y grupos carbonilos de la glucosa y sus productos de degradación (Brands y Van Boekel, 2003), por lo que sería de esperar una mayor tasa de formación de la reacción en los sistemas modelos basados en aminoácidos básicos. En este sentido, las soluciones acuosas de Lys y Arg dan lugar a pH básicos; además, ambos aminoácidos presentan dos grupos amino para reaccionar con la glucosa, mientras que la Ala sólo presenta uno. Por lo tanto, dado que la disminución de grupos amino disponibles en el sistema modelo de Ala fue similar al de Arg y mayor que la que se dió para el sistema modelo de Lys, se puede deducir que en el sistema modelo de Ala estarían ocurriendo otros eventos químicos, por ejemplo, termodoxidación de los compuestos, además de la reacción de Maillard.

Tabla VIII.1. Contenido en aminoácidos en los sistemas modelos de la reacción de Maillard obtenidos con SWE a 200°C durante 20 min. Todos los valores medios de cada aminoácido y su correspondiente sistema modelo fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

| Muestras | Contenido de aminoácidos ($\mu\text{mol/g}$ extracto seco) |
|------------------|---|
| Lisina | 300.65 \pm 25.31 |
| Arginina | 374.53 \pm 34.08 |
| Alanina | 430.51 \pm 35.87 |
| Lisina-glucosa | 141.71 \pm 28.66 |
| Arginina-glucosa | 62.65 \pm 7.23 |
| Alanina-glucosa | 76.16 \pm 4.44 |

VIII.4.3. Productos iniciales de la reacción de Maillard.

Los productos iniciales de la reacción de Maillard, también llamados compuestos de Amadori, se detectaron en los extractos acuosos obtenidos a partir de los sistemas modelos de glicación usando espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS). Mientras que después de la extracción de las muestras control sólo se encontraron los iones principales $[M+H]^+$ correspondientes al aminoácido estudiado, es decir m/z 147.2, 175.2 y 90.0 para Lys, Arg y Ala, respectivamente, en los sistemas modelo se encontraron otros iones adicionales. Como se puede apreciar en la Figura VIII.3, el análisis de los espectros de masas obtenidos a partir de los extractos de los modelos de glicación confirmó la clara presencia de los iones m/z 252.2, 309.2 y

337.2 detectados como $[M+H]^+$ característicos de los MRPs iniciales de cada aminoácido, respectivamente, fructosilalanina, fructosillisina, y fructosilarginina. Por otra parte, en los sistemas lisina-glucosa y alanina-glucosa se detectaron los iones correspondientes a los aminoácidos ($[M+H]^+$), el aducto de glucosa sódica (m/z 203.0) y los iones correspondientes a la condensación de dos glucosas (m/z 383.3 como $[2M+Na]^+$) (ver Figura VIII.3A y C). En el sistema modelo alanina-glucosa se encontró también un ión molecular con m/z 270.2, que podría corresponder a la base de Schiff (Figura VIII.3C).

La detección de los iones moleculares correspondientes a los respectivos compuestos de Amadori, indicó de forma inequívoca la progresión de la reacción de Maillard en las condiciones de extracción estudiadas.

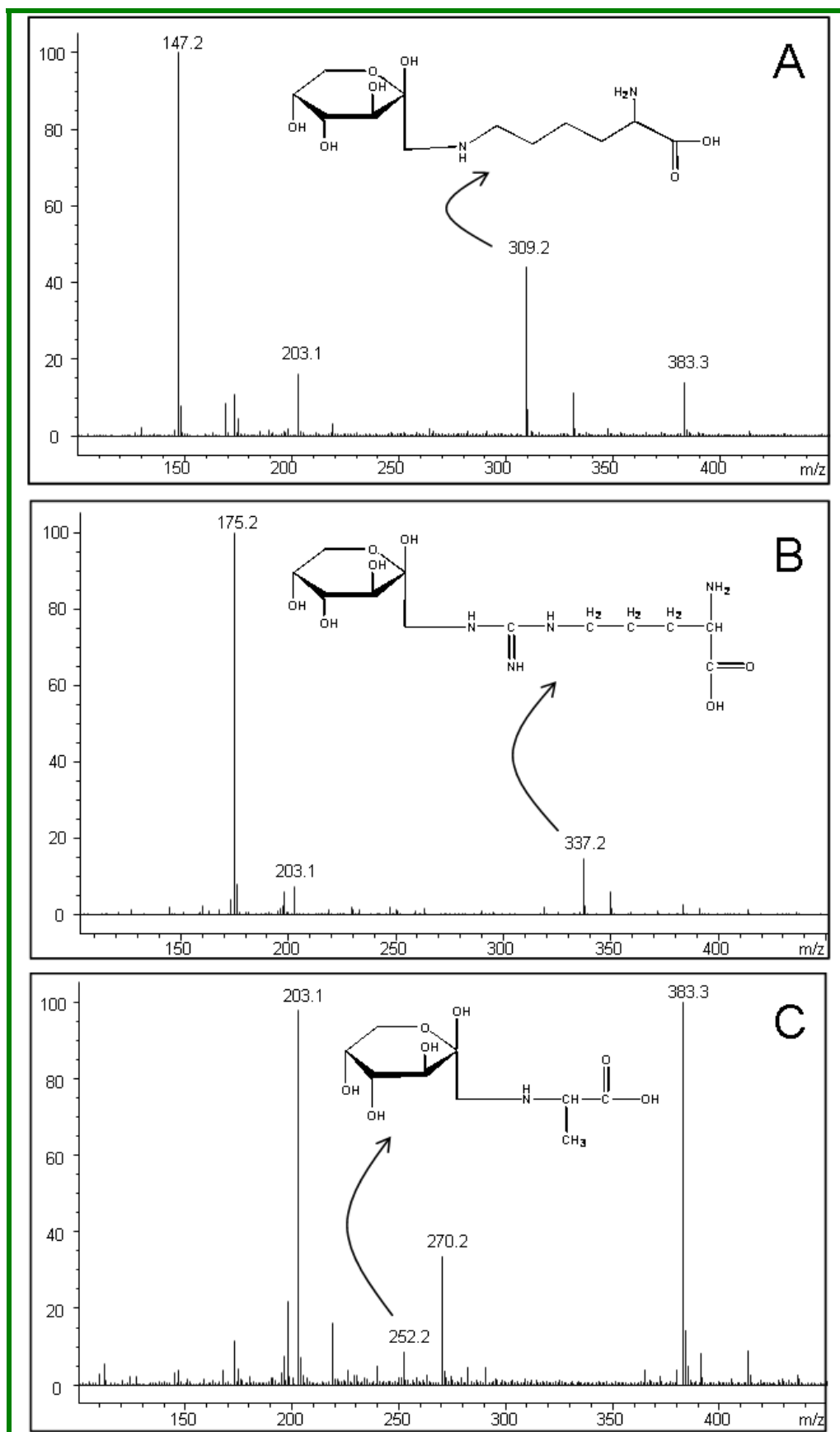


Figura VIII.3. Espectros de MS de lisina (A), arginina (B), y alanina (C) en los sistemas modelos de glicación con glucosa después de la extracción con SWE a 200°C, y la estructura química propuesta de los compuestos de Amadori encontrados.

VIII.4.4. Determinación de los productos avanzados de la reacción de Maillard (compuestos fluorescentes).

La presencia de compuestos de glicación avanzada (AGEs) se confirmó mediante la detección de compuestos fluorescentes en los diferentes extractos obtenidos a partir de los sistemas modelo estudiados. De hecho, los datos de fluorescencia (Tabla VIII.2) sugieren la formación de productos avanzados de la reacción de Maillard en los sistemas modelos de glicación. Como se puede observar en la tabla, los sistemas aminoácido-glucosa extraídos por SWE presentaron niveles significativamente ($p < 0.05$) más elevados de fluorescencia que sus correspondientes controles. Analizando los datos obtenidos se puede deducir que el sistema modelo de glicación de Lys producido después de la extracción con SWE presenta un mayor incremento de la fluorescencia comparado con su control, lo que implica una mayor proporción de AGEs fluorescentes de la reacción de Maillard. Sin embargo, el control de glucosa mostró los valores más bajos de fluorescencia. Varios estudios han mostrado que la reacción de azúcares y aldehídos con proteínas también puede conducir a la formación de un grupo de compuestos que presentan una fuerte emisión entre 400 y 500 nm, cuando se excitan a una longitud de onda de 370 nm (Dolhofer-Bliesener y Gerbitz, 1990; Fatima y col., 2008; Tsuji-Naito y col., 2009), también denominados AGEs fluorescentes.

Tabla VIII.2. Datos de fluorescencia y absorbancia de los MRPs avanzados determinados en las muestras de los controles de aminoácidos, del control de glucosa y de los sistemas modelos de glicación después de la extracción mediante SWE a 200°C. Las parejas de muestras que están marcadas con las letras en superíndice no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0.05$).

| Muestras | Fluorescencia | Pardeamiento | |
|------------------|---|--------------------------------|----------------------|
| | λ_{exc} 360/40; λ_{em} 460/40 | Absorbancia a 360 nm | Absorbancia a 420 nm |
| Lisina | 2157.77 \pm 141.81 | 0.505 \pm 0.003 ^a | 0.296 \pm 0.003 |
| Arginina | 2090.00 \pm 165.14 | 0.271 \pm 0.013 ^b | 0.154 \pm 0.008 |
| Alanina | 1721.88 \pm 135.00 | 0.334 \pm 0.024 | 0.229 \pm 0.022 |
| Glucosa | 767.67 \pm 42.59 | 0.262 \pm 0.059 | 0.124 \pm 0.023 |
| Lisina-glucosa | 5495.00 \pm 178.53 | 0.484 \pm 0.075 ^a | 0.436 \pm 0.016 |
| Arginina-glucosa | 5065.00 \pm 119.04 | 0.270 \pm 0.003 ^b | 0.112 \pm 0.003 |
| Alanina-glucosa | 3999.00 \pm 390.01 | 0.578 \pm 0.034 | 0.262 \pm 0.015 |

VIII.4.5. Productos de pardeamiento.

El color de los extractos, obtenidos a partir de los controles y los sistemas modelo, se estudió a 360 y 420 nm como un indicador del avance de la reacción de Maillard. El pardeamiento es la consecuencia más visible de la reacción de Maillard; su

intensidad se utiliza habitualmente como un indicador del desarrollo de la reacción de Maillard en alimentos, ya que la aparición de compuestos pardos indica un estado avanzado de la misma (Morales y Jimenez-Perez, 2001). Como se puede apreciar en la Tabla VIII.2, el sistema modelo de Ala fue el único que presentó un incremento significativo de absorbancia a ambas longitudes de onda, 360 y 420 nm.

Durante el desarrollo del pardeamiento causado por la reacción de Maillard, puede ocurrir simultáneamente el proceso de caramelización. Las reacciones de caramelización contribuyen sobre todo al pardeamiento no enzimático, especialmente a valores alcalinos de pH (Ajandouz y col., 2001; Benjakul y col., 2005). Sin embargo, en este caso, la caramelización no parece ser el evento químico mayoritario, aunque no se puede descartar la formación de productos de caramelización incoloros, que no absorberían a las longitudes de onda de trabajo. Estos compuestos incoloros, generados en etapas intermedias, contribuyen a la formación de pigmentos pardos en ambas reacciones, Maillard y caramelización (Benjakul y col., 2005). Otras reacciones que podrían tener lugar durante el proceso de SWE, son reacciones de pirólisis o de termoxidación de los aminoácidos, ya que éstas también pueden contribuir al desarrollo del color.

En conjunto, los resultados de fluorescencia y absorbancia a 360 nm y 420 nm, indicaron claramente el progreso de la reacción de Maillard, hacia etapas avanzadas, en los sistemas aminoácido-glucosa tras su extracción mediante SWE.

VIII.4.6. Capacidad antioxidante.

La capacidad antioxidante de los compuestos neoformados durante la SWE de los sistemas modelo se determinó mediante dos ensayos *in-vitro*, TEAC y ORAC_{FL}. Los resultados correspondientes a la aplicación de estos dos ensayos se pueden apreciar en la Tabla VIII.3. Dichos resultados demostraron que todos los sistemas modelos captaron los radicales peroxilo generados por termolisis de AAPH, mientras que los cambios observados en la actividad captadora de radicales ABTS se podrían correlacionar directamente con la formación de nuevos compuestos, derivados de la reacción de Maillard y de otros eventos químicos que tienen lugar simultáneamente.

Tabla VIII.3. Resultados de la capacidad antioxidante obtenida mediante los ensayos *in vitro* de ORAC_{FL} y TEAC en los sistemas modelo y control cuando se extrajeron por SWE a 200°C durante 20 minutos.

| Muestras | TEAC ($\mu\text{mol Trolox/g}$) | ORAC _{FL} ($\mu\text{mol/g}$) |
|------------------|-----------------------------------|--|
| Lisina | 94.34 \pm 4.74 | 81.88 \pm 8.11 |
| Arginina | 43.55 \pm 3.81 | 41.65 \pm 2.85 |
| Alanina | 23.85 \pm 1.90 | 26.50 \pm 1.64 |
| Glucosa | 68.63 \pm 7.60 | 105.22 \pm 6.73 |
| Lisina-glucosa | 125.55 \pm 7.10 | 147.61 \pm 18.48 |
| Arginina-glucosa | 180.39 \pm 5.61 | 205.96 \pm 28.21 |
| Alanina-glucosa | 165.51 \pm 20.13 | 141.09 \pm 35.85 |

Estos resultados indicaron que los productos nuevos, formados durante la extracción con SWE a 200°C, poseían capacidad antioxidante. El sistema arginina-glucosa presentó los valores más altos de capacidad antioxidante, seguido por los sistemas alanina- y lisina-glucosa.

Estos resultados son comparables a los encontrados en la bibliografía. Por ejemplo, Bekedam y col. (2008) describieron que el proceso de tostado del café tenía influencia sobre las propiedades antioxidantes de las infusiones de café, aumentando su actividad en función del grado de tueste. Asimismo, se observó una correlación lineal positiva entre el contenido de melanoidinas y las propiedades antioxidantes de la infusión del café inducidas por el tueste, atribuyéndose a los MRPs formados durante el proceso de tueste el incremento de la capacidad antioxidante de la infusión de café. Por otro lado, las propiedades antioxidantes de los MRPs formados durante el calentamiento de diferentes sistemas modelos (Chawla y col., 2007; Ehling y Shibamoto, 2005; Jing y Kitts, 2004; Kim y Lee, 2009a; Kim y Lee, 2009b) y alimentos (Atrooz, 2008; Cämmerer y Kroh, 2006; Mesa y col., 2008; Michalska y col., 2008; Sahin y col., 2009; Xu y col., 2007) se han estudiado ampliamente. En este sentido, la fructosilarginina se ha descrito como antioxidante (Silván y col., 2006). Además, también se ha observado que los productos derivados de arginina presentan, en la etapa inicial de la reacción de Maillard, una menor influencia sobre la capacidad antioxidante total de muestras complejas que los MRPs avanzados procedentes del mismo aminoácido (Moreno y col., 2006).

VIII.4.7. Fraccionamiento de los productos de la reacción de Maillard.

Los compuestos antioxidantes derivados de los tres sistemas modelo (lisina, arginina y/o alanina)-glucosa de la reacción de Maillard, así como sus respectivos

controles, se estudiaron en función del peso molecular de los productos de reacción y de sus propiedades antioxidantes. Las diferentes fracciones se obtuvieron por ultrafiltración, separándose una fracción de alto peso molecular (HMW, *High Molecular Weight*) (> 3kDa) y otra de bajo peso molecular (LMW, *Low Molecular Weight*) (< 3kDa). La capacidad antioxidante se midió, de igual manera, mediante el empleo de dos ensayos *in-vitro* diferentes, TEAC y ORAC_{FL}.

Como se puede observar en la Figura VIII.4, los resultados obtenidos demostraron que la fracción aislada de melanoidinas de alto peso molecular contribuía significativamente a la capacidad antioxidante total de todos los sistemas modelo. En ambos ensayos, los sistemas aminoácido-glucosa presentaron una mayor capacidad antioxidante. Asimismo, la fracción HMW presentó mayor capacidad antioxidante que la fracción LMW.

En trabajos previos se ha correlacionado la presencia de melanoidinas (formadas durante la última etapa de la reacción de Maillard) con la capacidad antioxidante frente a radicales catiónicos ABTS (Rufian-Henares y Morales, 2007). Los resultados obtenidos en el presente estudio (ver Figura VIII.4) indicaron que la fracción HMW procedente de los sistemas aminoácido-glucosa poseía mayor capacidad antioxidante que la fracción LMW. Además, la capacidad antioxidante total de los sistemas modelo fue mayor que la de los controles.

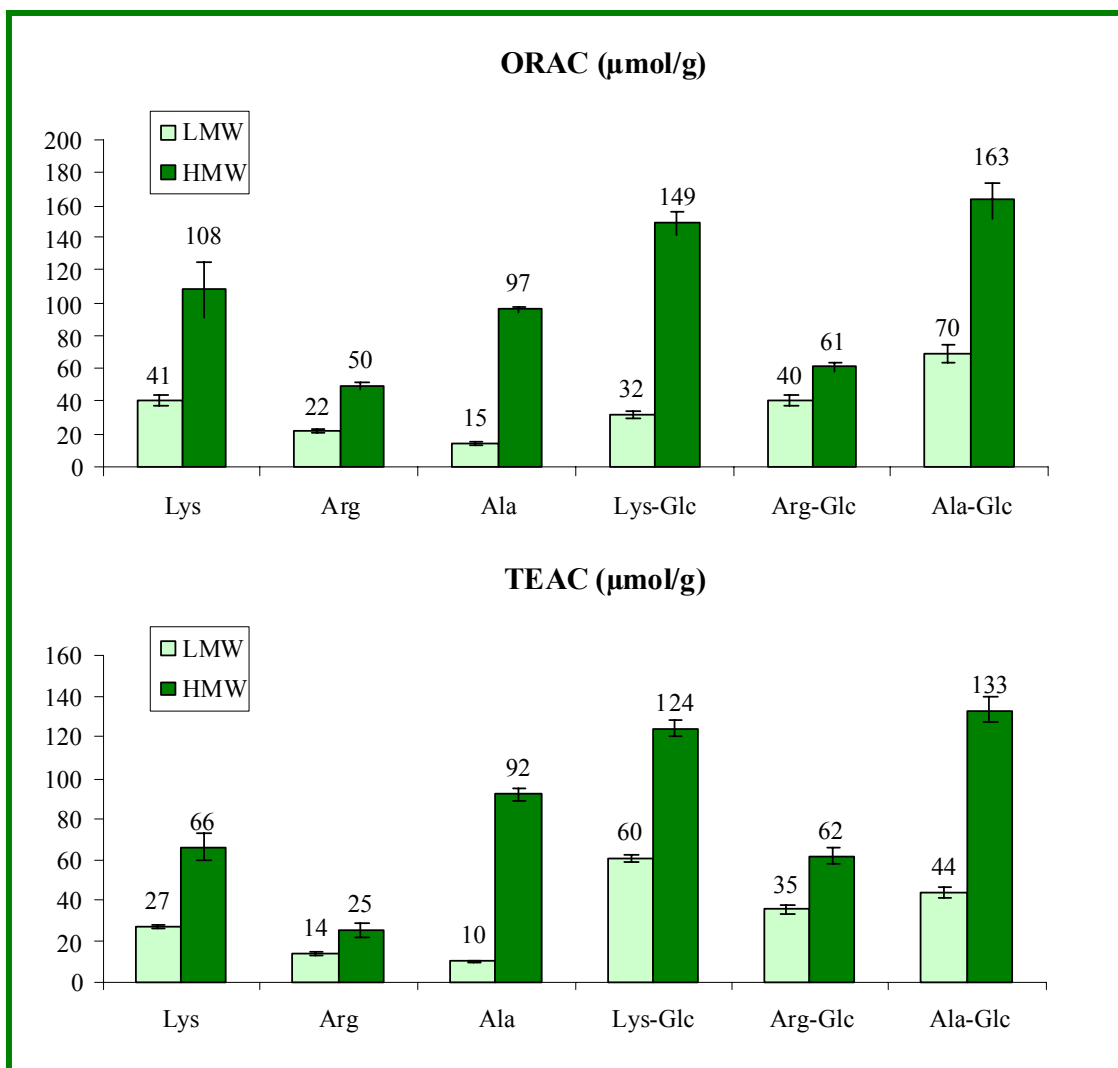


Figura VIII.4. Valores de capacidad antioxidante (TEAC y ORAC_{FL}) presentes en las fracciones de alto peso molecular (HMW, retenido) y en las fracciones de bajo peso molecular (LMW, filtrado) obtenidos a partir de los controles de aminoácidos y de los sistemas modelo de glicación después de la extracción por SWE a 200°C.

VIII.5. CONCLUSIONES.

En este trabajo se ha demostrado, por primera vez, la formación de antioxidantes a partir de sistemas modelo de aminoácidos-glucosa durante procesos de extracción mediante SWE a altas temperaturas (200°C).

Mediante el empleo de diferentes técnicas analíticas se llevó a cabo el estudio del avance de la reacción de Maillard y de caramelización en los controles de aminoácidos y glucosa, así como en los sistemas modelo de glicación durante la extracción con SWE a 200°C. Es este estudio se pudo comprobar que los extractos de

los sistemas de glicación presentaron pH más bajos, un descenso en el contenido de grupos amino libres, así como un incremento de productos avanzados de Maillard fluorescentes y pardos, en comparación con los extractos del correspondiente control. Además, en los extractos de los sistemas modelos de glicación se identificaron, mediante ESI-MS, compuestos iniciales de la reacción de Maillard (compuestos de Amadori) como fructosillisina, fructosilalanina y fructosilarginina, además de detectarse la base de Schiff en el sistema de glicación de alanina.

Globalmente estos resultados indicaron que bajo las condiciones de extracción con SWE a 200°C de todos los sistemas modelos, tuvo lugar la formación de compuestos de la reacción de Maillard y/o caramelización. Los sistemas modelo arginina- y lisina-glucosa fueron, como era de esperar de unos aminoácidos básicos, los que presentaron menor contenido en grupos amino libres y mayor contenido en AGEs fluorescentes y compuestos pardos, lo que indica que en estos sistemas modelo tuvo lugar un mayor desarrollo de las reacciones de Maillard y de glicación. Por su parte, el sistema modelo de alanina presentó el menor grado de desarrollo de la reacción de Maillard, pudiéndose identificar otros compuestos de las etapas iniciales de la misma.

El estudio de la capacidad antioxidante, mediante los métodos TEAC y ORAC_{FL}, de los extractos obtenidos con SWE a 200°C a partir de los controles de aminoácidos y glucosa y los sistemas modelos de glicación mostró un aumento de la actividad en los sistemas de glicación, frente a sus respectivos controles. Para poder correlacionar esta capacidad antioxidante con la formación de compuestos pardos de alto peso molecular (melanoidinas), se llevó a cabo un fraccionamiento de los extractos, obteniendo fracciones de alto (HMW, >3kDa) y bajo peso molecular (LMW<3kDa). Mediante este estudio se comprobó que las fracciones HMW contribuyeron significativamente a la capacidad antioxidante total de todos los sistemas. El sistema modelo arginina-glucosa presentó mayor capacidad antioxidante, seguido por los sistemas alanina- y lisina-glucosa.

Los resultados obtenidos indican que la reacción de Maillard tiene lugar bajo las condiciones de extracción con SWE a 200°C a partir de sistemas modelo de glicación. Asimismo, también se producen las reacciones de caramelización de azúcares y de descomposición de aminoácidos. Como era de esperar, el alcance del pardeamiento no

enzimático dependió de la intensidad del tratamiento térmico. Además, los compuestos formados derivados de estos eventos químicos presentaron capacidad antioxidante. Por tanto, se demuestra en este estudio que la SWE induce la formación de sustancias bioactivas en sistemas modelo aminoácido-glucosa.

CAPÍTULO IX:

“Búsqueda de nuevos compuestos con actividad antioxidante formados durante la extracción con agua subcrítica en micro- y macroalgas”

IX.1. INTRODUCCIÓN.

Como se ha mencionado anteriormente, la extracción mediante SWE es una alternativa medioambientalmente limpia para la extracción de ingredientes funcionales alimentarios procedentes de matrices naturales. Por lo general, los extractos complejos se caracterizan considerando sus componentes bioactivos, pero no se tienen en cuenta las posibles modificaciones y/o interacciones que pueden ocurrir entre sus componentes durante la extracción con agua subcrítica. Por ello, es necesario un conocimiento exhaustivo de la composición de dichos extractos para poder incrementar la relación beneficio/riesgo de los ingredientes funcionales obtenidos por SWE.

Por lo tanto, el presente capítulo se centra en la búsqueda de nuevos compuestos antioxidantes formados en los extractos obtenidos por SWE durante el proceso de extracción de diferentes muestras de algas. De acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo VIII, en el que se ha demostrado la formación de productos derivados de la reacción de Maillard (MRPs) y productos de caramelización con una influencia positiva en la capacidad antioxidante total de los extractos, en el presente estudio se espera confirmar la presencia de dichos eventos químicos cuando se realizan extracciones a partir de matrices naturales. En concreto, se estudiaron diferentes especies de algas (con diferente composición en términos de aminoácidos, azúcares y compuestos fenólicos, entre otros) de manera que se pudiera conocer cómo la composición química particular de cada muestra natural podía influir o modular el desarrollo y/o intensidad de dichas reacciones. Para ello se utilizaron diferentes macroalgas (*Sargassum vulgare*, *Sargassum muticum*, *Porphyra* spp., *Cystoseira abies-marina*, *Undaria pinnatifida* y *Halopitys incurvus*) y microalgas (*Chlorella vulgaris*), cubriendo la mayor parte de los grupos más importantes de algas (Chlorophyta, Rhodophyta y Phaeophyta).

IX.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El objetivo del presente trabajo fue corroborar la hipótesis anteriormente expuesta, y poder así demostrar que la elevada capacidad antioxidante de los extractos de algas obtenidos en condiciones de extracción mediante SWE a 200°C, era resultado

de la formación de nuevos compuestos antioxidantes generados durante la reacción de Maillard y de caramelización.

Para alcanzar este objetivo general, se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo (ver Figura IX.1):

1. Obtención de los extractos de macroalgas (*Sargassum vulgare*, *Sargassum muticum*, *Porphyra* spp., *Cystoseira abies-marina*, *Undaria pinnatifida* y *Halopitys incurvus*) y microalgas (*Chlorella vulgaris*) mediante SWE a temperaturas de 100 y 200°C, siempre manteniendo una presión y tiempo de extracción constantes, de 1500 psi y 20 min, respectivamente.
2. Caracterización química de los extractos (fenoles, proteínas, aminoácidos, azúcares, así como productos avanzados y finales de la reacción de Maillard) para poder verificar las diferentes reacciones químicas que tienen lugar durante la extracción.
3. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de las algas estudiadas usando diferentes métodos *in-vitro*, como son los ensayos TEAC, ORAC_{FL} y la capacidad de captación de radicales superóxido.
4. Estudio de la correlación de los cambios observados en la composición química que tienen lugar durante la extracción a diferentes temperaturas, con la capacidad antioxidante presente en dichos extractos.

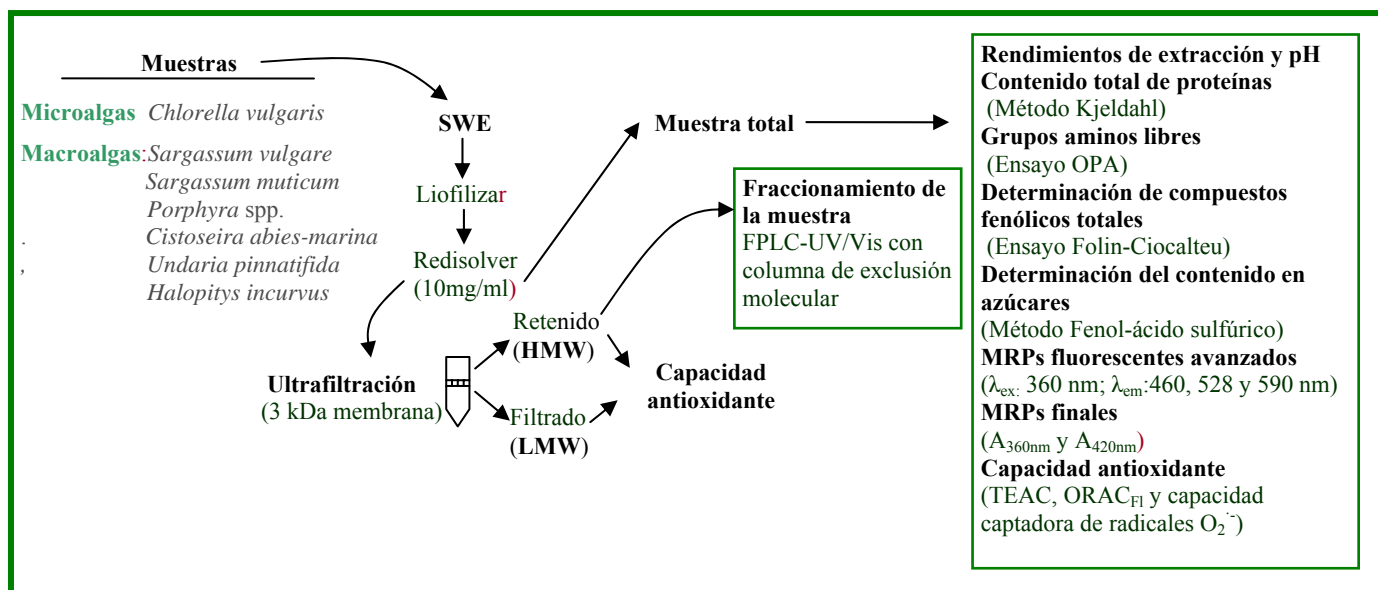


Figura IX.1. Esquema de trabajo realizado para la búsqueda de la formación de nuevos compuestos antioxidantes, procedentes de la reacción de Maillard o caramelización, en los extractos de macro- y microalgas obtenidos bajo las condiciones de SWE.

IX.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

IX.3.1. Productos químicos y reactivos.

Todos los disolventes utilizados fueron de grado analítico. o-Ftaldehído (OPA), 2,2'-azobis-2-metilaminopropano (AAPH), y 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (trolox), glucosa, L-leucina, xantina, xantina oxidasa procedente del suero de leche, nitroazul de tetrazolio (NBT), ácido etilendiamina tetra acético (EDTA), ácido gálico y persulfato potásico fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). La fluoresceína sódica y la sal diamónica del 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonato (ABTS) fueron proporcionados por Fluka (Buchs, Suiza). El reactivo de Folin Ciocalteu y el carbonato sódico se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El etanol, el fosfato monosódico dihidratado y el ortofosfato disódico de hidrógeno anhidro fueron suministrados por Prolabo (Briare, Francia). El agua ultrapura se obtuvo utilizando un equipo Milli-Q Water (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). La arena de mar empleada para las extracciones se adquirió a Panreac Química (Barcelona, España).

IX.3.2. Muestras.

Las muestras de macroalgas (*Sargassum muticum*, *Sargassum vulgare*, *Cystoseira abies-marina*, *Porphyra* spp., *Undaria pinnatifida* y *Halopitys incurvus*) y microalgas (*Chlorella vulgaris*) empleadas consistieron en muestras liofilizadas, procedentes de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Canarias, España). Todas las muestras se almacenaron a 4°C, protegidas de oxígeno, humedad y luz en todo momento.

IX.3.3. Extracción con agua subcrítica (SWE).

Las extracciones se llevaron a cabo en un sistema de Extracción Acelerada con Disolventes ASE200 de Dionex (Sunnyvale, CA, EEUU) equipado con una unidad controladora de disolventes.

Todas las extracciones se llevaron a cabo por duplicado, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.3.2 del Capítulo II de la presente Memoria, incluyendo el protocolo de limpieza. Las extracciones se realizaron en una celda de 11 ml de capacidad empleando 1g de la muestra. Para evitar la obstrucción del sistema de extracción, la muestra se introdujo mezclada con arena de mar, empleando una disposición de tipo sándwich (se colocaron 6 g de arena de mar, después la muestra, y por último 2 g de arena de mar). Las extracciones se realizaron a temperaturas de 100 y 200°C, manteniendo un tiempo de extracción estático de 20 minutos. Asimismo, la presión se mantuvo también constante a 1500 psi. Los extractos obtenidos se congelaron y el agua se eliminó mediante liofilización con un liofilizador Freeze Dry System, (Model 79480, Labconco Corporation, Missouri, EEUU). Los extractos secos se mantuvieron a 4°C y protegidos de la luz hasta su análisis posterior.

IX.3.4. Fraccionamiento de las muestras.

Para llevar a cabo el fraccionamiento de los extractos se empleó idéntico protocolo al descrito en el apartado VIII.3.4 de la presente Memoria. Las fracciones retenidas y filtradas, obtenidas después de la ultrafiltración, se liofilizaron y se almacenaron a -20°C hasta su análisis posterior.

El análisis de los compuestos presentes en la fracción de alto peso molecular (HMW) (melanoidinas) se llevó a cabo empleando un equipo de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) con detector UV/Vis (GE Amersham Pharmacia AKTA Explorer 100 Chromatograph GE, Uppsala, Suecia) (ver Figura IX.2), equipado con una columna Superdex 200 10/300 GL (Tricorn, Uppsala, Suecia). Se trabajó en modo isocrático empleando como fase móvil un tampón fosfato de sodio (50 mM), NaCl (0.15M) a pH 7. El flujo de la fase móvil se mantuvo constante a 0.5 ml/min. El volumen de inyección fue de 100 μ l. La detección se realizó a longitudes de onda de 214, 280 y 360 nm. Las muestras se inyectaron a una concentración de 1 mg/ml.



Figura IX.2. Imagen del equipo de FPLC (GE Amersham Pharmacia AKTA Explorer 100 Chromatograph GE, Uppsala, Suecia) utilizado en este trabajo.

Para la calibración de la columna se utilizó una mezcla de proteínas de peso molecular conocido. Esta mezcla se inyectó en la columna y posteriormente se representó el tiempo de retención frente al log del peso molecular.

La mezcla de proteínas que se utilizó para calibrar la columna (LMW Gel Filtration Kit Amersham, Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) constaba de ribonucleasa A (13.7 kDa), quimotripsinógeno A (25 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), albúmina (67 kDa) y azul dextrano (2000 kDa).

Una vez representado gráficamente el logaritmo de los pesos moleculares frente a los tiempos de retención para las proteínas de peso molecular conocido, se obtuvo la ecuación de la recta de calibrado que se empleó para obtener el peso molecular de los compuestos presentes en los extractos (ver Figura IX.3). Las muestras se analizaron por duplicado.

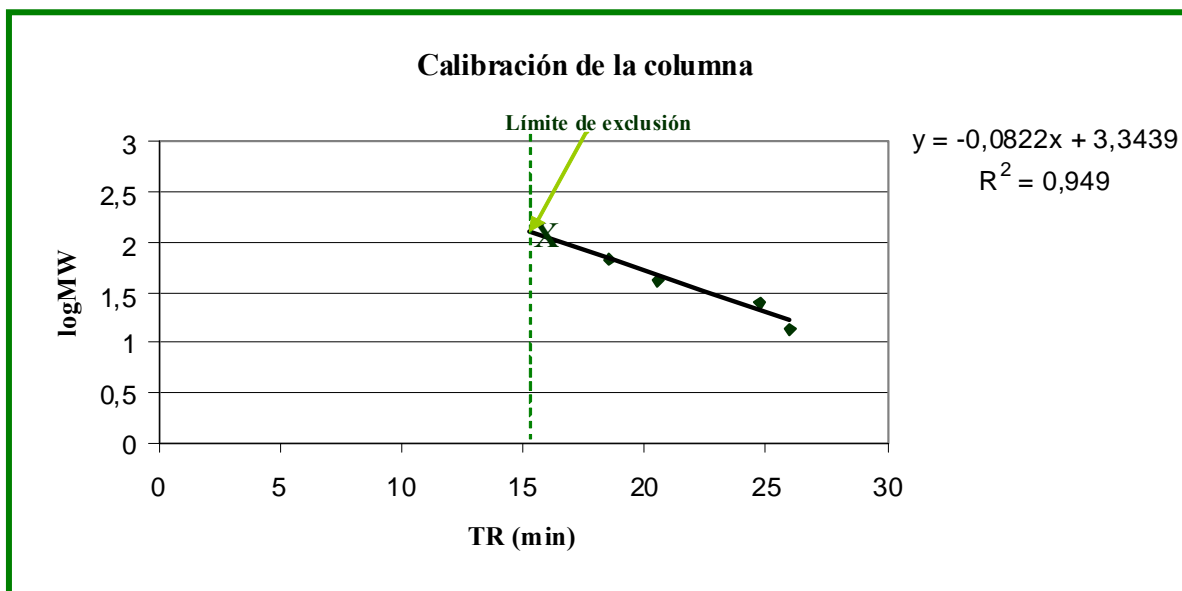


Figura IX.3. Recta de calibrado de la columna de exclusión molecular obtenida a partir del logaritmo del peso molecular de proteínas conocidas (albúmina, ovoalbúmina, quimotripsinógeno A y ribonucleasa A) frente al tiempo de retención de éstas en la columna, y ecuación y coeficiente de correlación de la recta obtenida.

IX.3.5. Contenido total en proteínas.

La concentración de proteínas totales de las muestras se determinó siguiendo el método Kjeldahl (Método Oficial AOAC, 2002). Las muestras se digirieron con ácido sulfúrico concentrado a ebullición en presencia de catalizadores (sulfato potásico y sulfato de cobre) en un digestor Modelo DK20 (Velp Scientifica, Italia). Posteriormente, con una unidad automática de destilación modelo UDK 142 (Velp Scientifica, Italia) se destiló por arrastre de vapor en medio alcalino sobre una solución de ácido bórico. El amoníaco recogido se valoró con HCl 0.1 M. Los datos se trataron con el software de la unidad de destilación-valoración Vesuv Datalogger y Metromada (Metrohm, Suiza) y se transformaron en porcentajes de proteína (g proteína/100 g de muestra) empleando el factor de conversión 6.25 (AOAC, 2002). Las muestras se analizaron por duplicado.

IX.3.6. Determinación de grupos amino primarios libres (OPA).

La pérdida de grupos amino libres como consecuencia de la glicación se determinó empleando el método espectrofluorimétrico del o-ftaldehído (OPA), siguiendo idéntico protocolo al descrito en el apartado VIII.3.6 del Capítulo anterior.

Los análisis cuantitativos se llevaron a cabo por el método de patrones externos, empleando una curva de calibrado de leucina en un rango de concentraciones de 1.5-24 μM . Los resultados se expresaron como μmol de leucina/g de materia seca y se calcularon mediante el valor medio de seis repeticiones.

IX.3.7. Determinación del contenido en azúcares (Método colorimétrico del fenol sulfúrico).

Para la determinación del contenido de azúcares presente en los extractos obtenidos, se empleó el método colorimétrico del fenol-sulfúrico. Este método permite estimar el contenido de azúcares totales presentes en una muestra. Los azúcares, en presencia de ácido sulfúrico y aplicando una fuente de calor, se degradan a hidroximetil-furfural (HMF) y furfural (F) dando un color anaranjado muy estable, el cual se mide espectrofotométricamente a 490 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de carbohidratos presentes en el medio. Este método es sencillo, rápido, reproducible, altamente sensible y específico para azúcares sin interferencias con las proteínas del medio. La reacción química implicada es la siguiente:



Para la estimación del contenido de azúcares en los extractos obtenidos por SWE, se utilizó el protocolo desarrollado por Dubois y col. (1956) y modificado por Masuko y col. (2005) para su aplicación en placas multipocillo. Para ello, 100 μl de las muestras en diluciones apropiadas se hicieron reaccionar con 300 μl de ácido sulfúrico concentrado (93-98%) y 90 μl de una solución de fenol 5% (p/v) en un vial de eppendorf (2 ml) en el cual se mezclaron enérgicamente con un agitador mecánico. La mezcla se incubó a 90°C durante 5 minutos y se dejó atemperar a temperatura ambiente durante otros 5 minutos. Para la lectura, 100 μl de las mezclas de reacción se

transfirieron a la placa multipocillo, midiéndose la absorbancia a 490 nm empleando un lector de placas BioTek PowerWave™ XS (BioTek Instruments, EEUU). Finalmente, la lectura se comparó con la curva de calibración de la glucosa (0.25-2.00 mg/ml, concentración final), elaborada de la misma manera. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

IX.3.8. Determinación del contenido total de fenoles (Método Folin-Ciocalteu).

Un procedimiento habitual para determinar la cantidad de fenoles totales en alimentos es el método colorimétrico Folin-Ciocalteu, ya que es un proceso rápido y simple. No se conoce la naturaleza exacta del reactivo de Folin-Ciocalteu, pero se sabe que contiene una mezcla de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotúngstico (Singleton y Rossi, 1965). El método consiste en la transferencia, en medio alcalino, de electrones desde los compuestos fenólicos y otras especies reductoras al molibdeno, formándose complejos azules que pueden ser detectados espectrofotométricamente a 750-765 nm (Singleton y col., 1999), de acuerdo con la siguiente reacción química:



Generalmente se usa el ácido gálico como compuesto patrón de referencia y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto, proporcionando una información cuantitativa global de la cantidad de fenoles. Los complejos azules que se forman son independientes de la estructura de los compuestos fenólicos (Singleton y col., 1999; Prior y col., 2005). Sin embargo, el reactivo de Folin no es específico para compuestos fenólicos, ya que puede ser reducido por muchos compuestos no fenólicos (por ejemplo, aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico, Cu (I), Fe (II), etc.). Por esta razón, recientemente, se ha propuesto este método para la medida de la capacidad reductora de las muestras (Huang y col., 2005) en lugar de para determinar la cantidad de fenoles totales. De hecho, se ha demostrado una correlación entre el método de Folin y otros métodos antioxidantes basados en la medida de la transferencia de electrones (TEAC y DPPH·) (Roginsky y Lissi, 2005).

El método de Folin-Ciocalteu se ha utilizado en diversas matrices alimentarias

tales como frutas (Müller y col., 2010; Huber y Rupasinghe, 2009; Wijngaard y col., 2009; Vasco y col., 2008), algas marinas (Ragubeer y col., 2010; de Quirós y col., 2010), plantas aromáticas (Almajano y col., 2008; Sengul y col., 2009; Li y col., 2007), y zumos (Gullücke y col., 2009).

En este trabajo, la cantidad de fenoles totales se determinó según el procedimiento descrito por Kosar y col. (2005). Los resultados se estimaron como equivalentes de ácido gálico (GAE), expresados como mg de ácido gálico/g de extracto. El volumen total de la mezcla de reacción se miniaturizó a 1 ml. Para ello, 600 μ l de agua Milli-Q y 10 μ l de la mezcla, se transfirieron a un vial eppendorf, al cual se le añadieron 50 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteau. Después de 1 minuto, se añadieron 150 μ l de 2% (w/v) de una solución acuosa de carbonato sódico, y finalmente, se enrasó con agua Milli-Q para tener un volumen final de 1 mL. Después de 2 horas de incubación a 25°C, se transfirieron 300 μ l de la mezcla a una placa multipocillo. La absorbancia se midió a 760 nm en un lector de placas BioTek PowerWave™ XS (BioTek Instruments, EEUU). La lectura obtenida se comparó con la curva de calibrado de ácido gálico (0.025 – 2 mg/ml) elaborada de la misma manera. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

IX.3.9. Determinación de los productos avanzados de Maillard fluorescentes.

Para llevar a cabo la determinación de los AGEs fluorescentes de las muestras se empleó el protocolo descrito en el apartado VIII.3.7 de la presente Memoria. Los resultados se expresaron como la media de los valores ($n = 4$) en unidades arbitrarias de fluorescencia (FU).

IX.3.10. Determinación de los MRPs finales (melanoidinas).

La formación de productos coloreados (melanoidinas) característicos de las etapas finales de la reacción de Maillard, se estimó mediante el protocolo descrito en el apartado VIII.3.8 de la presente Memoria. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de absorbancia.

IX.3.11. Evaluación de la capacidad antioxidante.

IX.3.11.1. Ensayo ABTS.

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por SWE, se determinó empleando el método TEAC (capacidad antioxidante equivalente al trolox) siguiendo el protocolo que se ha descrito en el apartado VIII.3.9.1 de la presente Memoria. Este método, basado en la generación de radicales $ABTS^{•+}$, se correlaciona directamente con la capacidad antioxidante, es decir, un mayor valor TEAC supone una mayor capacidad antioxidante del extracto.

Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (valor TEAC). Estos valores se determinaron para al menos cuatro concentraciones diferentes de cada uno de los extractos estudiados, proporcionando una respuesta lineal. Además, todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

IX.3.11.2. Ensayo ORAC_{FL}.

La determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC_{FL} (capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno empleando fluoresceína) de las muestras se realizó siguiendo idéntico protocolo al descrito en el apartado VIII.3.9.2 de la presente Memoria.

IX.3.11.3. Capacidad de captación de radicales superóxido ($O_2^{•-}$).

La determinación de la capacidad de captación de radicales superóxido ($O_2^{•-}$) de las muestras obtenidas por SWE se realizó por el método xantina/xantina oxidasa/nitroazul de tetrazolio (X/XO/NBT), siguiendo el método descrito por Sanz y col., 1994 y Fernandes y col. 2007, con ligeras modificaciones. Se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante del radical superóxido, el cual, al entrar en contacto con el NBT lo reduce y forma un producto llamado formazan, cuya formación se detecta espectrofotométricamente a 560 nm. Los compuestos captadores de radicales superóxido (antioxidantes) inhiben la reducción del NBT y la consiguiente formación de formazan.

En el método utilizado, el medio de reacción estuvo compuesto (volumen final: 250 μ l) por los siguientes reactivos en las concentraciones finales indicadas: 10 μ l de xantina (100 μ M), 25 μ l de NBT(100 μ M), 25 μ l de EDTA (1 mM) y 150 μ l de tampón fosfato (50 mM, pH 7.4). Se añadieron 10 μ l de diferentes diluciones de las muestras (1-10 mg/ml) o trolox. De igual manera, se realizó un blanco con cada lote de muestras como medida de control de la reacción, para ello se reemplazaron los 10 μ l de muestra por 10 μ l de tampón fosfato. La reacción se inició con la adición de 30 μ l de XO (0.5 U/ml). La lectura de la absorbancia a 560 nm se tomó cada 30 segundos durante 2 minutos. Cada experimento se realizó por triplicado y cada concentración generó una curva dependiente del tiempo. El porcentaje de inhibición para cada concentración se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ de inhibición} = [100 - (\text{pendiente/pendiente del control}) * 100].$$

El IC₅₀ de cada compuesto se definió como la concentración a la cual se inhibió el 50% de la reducción del NBT por el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) producido en el sistema X/XO.

IX.3.12. Análisis de los resultados.

Se empleó el programa Microsoft Excel 2000 para realizar el análisis estadístico de los resultados con el nivel de significación establecido en 95%. El análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para evaluar si las diferencias detectadas entre extractos eran estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

IX.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IX.4.1. Extracción con agua subcrítica (SWE).

Las siete micro- y macroalgas seleccionadas se extrajeron por SWE empleando agua como disolvente de extracción a dos temperaturas diferentes, 100 y 200°C. Como se puede observar en la Figura IX.4, la temperatura influyó directamente en el rendimiento de extracción de todas las muestras estudiadas. Este valor aumentó significativamente ($p < 0.05$) en todas las muestras, especialmente en la alga roja *Porphyra* spp., cuyo rendimiento aumentó desde 12.8% a 100°C hasta 68% a 200°C. La mayoría de las muestras mostraron incrementos del rendimiento, entre las dos temperaturas de extracción, superiores al 25%. Este efecto de la temperatura sobre los rendimientos de extracción se ha observado en los procesos de SWE (Herrero y col., 2010), como se ha expuesto anteriormente en la primera parte de la presente Memoria, y se explica básicamente por un incremento en la transferencia de materia de la muestra hacia el disolvente de extracción a medida que aumenta la temperatura de extracción, como resultado, entre otras posibles razones, de un aumento de la presión de vapor de los compuestos y una disminución de la viscosidad del disolvente con la temperatura.

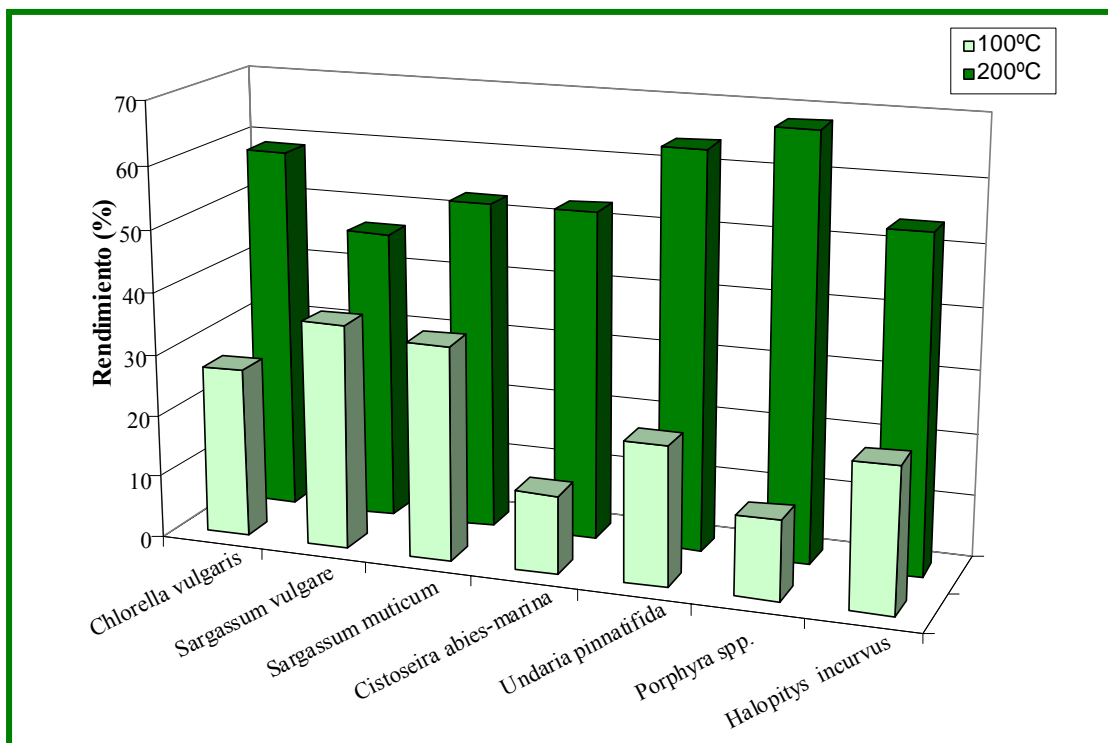


Figura IX.4. Rendimientos (% de peso seco) de los extractos obtenidos después de la extracción con SWE de las diferentes matrices de algas a 100 y 200°C. Los valores para cada muestra son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

IX. 4.2. Caracterización química de los extractos.

IX.4.2.1. Fenoles totales.

El contenido en fenoles totales se determinó en los extractos de las diferentes algas obtenidos a las dos temperaturas estudiadas. Este método ofrece información acerca de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los extractos. Este es un aspecto importante a considerar puesto que los compuestos fenólicos pueden tener una gran influencia en la capacidad antioxidante total de los extractos y, a su vez, modular la aparición y la intensidad de las reacciones de Maillard y caramelización (Gugliucci y col., 2009; Wang y col., 2009; Peng y col., 2008; Wu y Yen, 2005), lo cual influye en la bioactividad final de los extractos.

De los resultados obtenidos aplicando el método Folin, se puede observar que el contenido en fenoles totales también se incrementó con la temperatura de extracción en todas las muestras (Tabla IX.1). Las algas más ricas en compuestos fenólicos fueron *S. vulgare* y *U. pinnatifida* con concentraciones alrededor de 70 mg de ácido gálico/g de peso seco en los extractos obtenidos a 200°C. Para todas las muestras, el aumento de la temperatura de extracción produjo un aumento del contenido total de fenoles de al menos dos veces, alcanzando en algunas muestras un aumento de diez veces (*U. pinnatifida*). En los resultados expuestos en la Tabla IX.1, se puede apreciar que las macroalgas contienen una mayor cantidad de fenoles que la microalga estudiada (*Chlorella vulgaris*), que presentó el valor más bajo de compuestos fenólicos.

Tabla IX.1. Contenido en compuestos fenólicos, proteínas, aminoácidos y azúcares en los extractos de algas obtenidos bajo condiciones de SWE a 100 y 200°C. Las parejas de extractos (100 y 200°C) con valores no diferentes estadísticamente ($p > 0.05$) están marcados con superíndices. Todas las medidas se realizaron, al menos, por triplicado.

| Muestra | Fenoles totales (mg ácido gálico/g extracto) | | Proteínas (%) | Contenido en aminoácidos ($\mu\text{mol/g}$ d.m.) | | Contenido en glucosa (g/100g) | |
|--------------------------------|--|-------------------------------|----------------|--|------------------|-------------------------------|------------------|
| | 100°C | 200°C | | 100°C | 200°C | 100°C | 200°C |
| Microalgas | | | | | | | |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 16.94 \pm 7.26 | 32.91 \pm 4.47 | 38.9 \pm 0.1 | 19.97 \pm 1.27 | 10.44 \pm 1.11 | 34.90 \pm 3.87 | 17.64 \pm 1.24 |
| Macroalgas | | | | | | | |
| <i>Sargassum vulgare</i> | 26.43 \pm 2.46 | 70.86 \pm 4.40 | 3.7 \pm 0.1 | 2.20 \pm 0.07 | 0.91 \pm 0.09 | 2.95 \pm 0.22 | 4.93 \pm 0.05 |
| <i>Sargassum muticum</i> | 10.73 \pm 0.52 | 58.67 \pm 8.65 | 14.0 \pm 0.0 | 18.58 \pm 1.78 | 4.62 \pm 0.39 | 7.44 \pm 0.42 | 4.03 \pm 0.23 |
| <i>Porphyra</i> spp. | 12.86 \pm 1.09 | 35.30 \pm 5.12 | 31.9 \pm 0.0 | 25.51 \pm 1.42 | 8.67 \pm 1.03 | 25.70 \pm 3.25 | 39.16 \pm 1.49 |
| <i>Cystoseira abies-marina</i> | 6.81 \pm 3.07 | 48.09 \pm 4.51 | 7.5 \pm 0.0 | 5.73 \pm 0.55 | 1.83 \pm 0.05 | 9.06 \pm 0.92 | 14.18 \pm 1.41 |
| <i>Undaria pinnatifida</i> | 3.79 \pm 0.61 | 67.11 \pm 6.00 | 12.9 \pm 0.2 | 21.37 \pm 1.36 | 3.18 \pm 0.63 | 5.21 \pm 0.21 | 6.52 \pm 0.28 |
| <i>Halopitys incurvus</i> | 33.04 \pm 3.43 ^a | 41.78 \pm 8.15 ^a | 24.3 \pm 0.3 | 29.37 \pm 1.12 | 14.97 \pm 0.66 | 6.71 \pm 0.28 | 11.93 \pm 0.76 |

IX.4.2.2. Compuestos nitrogenados.

Se determinó el contenido de proteínas totales en las algas crudas, y los grupos amino libres en los extractos obtenidos de las algas (ver Tabla IX.1). Como se puede apreciar, el contenido de proteínas totales fue significativamente diferente ($p < 0.05$) entre las muestras, siendo *C. vulgaris* y *Porphyra* spp. aquellas que presentaron valores más altos de proteínas. Por otra parte, los extractos obtenidos con agua subcrítica a 100°C de las algas *S. vulgare* y *C. abies-marina* presentaron los niveles más bajos en grupos amino primarios libres; sin embargo, los extractos de *H. incurvus* y *Porphyra* spp. obtenidos a 100°C mostraron el contenido más alto en grupos amino libres. Comparando los resultados obtenidos a las dos temperaturas de extracción, se puede observar un descenso significativo en la disponibilidad de aminoácidos para todas las muestras ($p < 0.05$) (ver Tabla IX.1). Las muestras que presentaron una disminución más marcada en el contenido en aminoácidos fueron *U. pinnatifida* y *S. muticum*, con reducciones alrededor al 75% a 200°C, comparados con los extractos obtenidos a 100°C. Estas observaciones podrían ser una primera indicación de una menor disponibilidad de los amino ácidos libres a causa del avance de la reacción de Maillard.

IX.4.2.3. Azúcares disponibles.

Otro parámetro que se ha de tener en cuenta para conocer la progresión de la reacción de Maillard es la cantidad de azúcares que quedan en la muestra después de la extracción con SWE. En la Tabla IX.1 se presentan los valores obtenidos mediante el empleo del método del ácido fenol-sulfúrico para las diferentes muestras estudiadas. Como se puede observar en dicha tabla, el comportamiento de las diferentes algas no fue el mismo. Por ejemplo, la microalga (*C. vulgaris*) fue la muestra que presentó la mayor cantidad de azúcares después de la extracción a 100°C. Sin embargo, a excepción de *Porphyra*, las macroalgas presentaron cantidades relativamente bajas de azúcares en su composición química (ver datos en la Tabla IX.1). Las cantidades de azúcares determinadas en los extractos obtenidos a 200°C, en comparación con las obtenidas a 100°C, solamente disminuyeron en las algas *C. vulgaris* y *S. muticum*. Dado que el contenido de carbohidratos y de grupos amino libres se vieron afectados por la temperatura aplicada en la extracción de *C. vulgaris* y *S. muticum*, estos resultados

sugirieren que la reacción de Maillard tuvo lugar durante la extracción con agua subcrítica a 200°C.

Para el resto de las muestras de algas se pudo observar un incremento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de azúcares, lo cual no niega el desarrollo de la reacción de Maillard y caramelización durante la extracción SWE a altas temperaturas, sino que pone de manifiesto la posible hidrólisis de celulosa o de otros polisacáridos complejos bajo estas condiciones de extracción.

IX.4.2.4. Cambios de pH.

Si la reacción de Maillard progresa y se produce una disminución en la disponibilidad de los grupos amino como resultado de su interacción con los azúcares reductores, sería posible observar una disminución en el pH de las muestras (Liu y col., 2008). Por esta razón, la medida del pH de la muestra se considera una forma rápida de realizar el seguimiento de este tipo de reacciones. En la Figura IX.5, se pueden observar los valores de pH de los diferentes extractos obtenidos a 100 y 200°C por SWE. En todas las muestras se aprecia que el aumento de la temperatura de extracción produjo una disminución del pH en todas las algas. La disminución del pH va desde un descenso del valor del 26% en *Porphyra* hasta un 13% en *S. muticum*. Estas diferencias de pH, obtenidas a diferentes temperaturas de extracción para cada alga, podrían indicar una pérdida de los grupos amino como consecuencia de la reacción de Maillard. Este hecho también se observó en los sistemas modelo de glicación, como se ha expuesto en el capítulo VIII de la presente Memoria. Sin embargo, cabe destacar que, en este caso, el descenso del pH podría no sólo deberse a la progresión de la reacción de Maillard, con la consiguiente pérdida de grupos amino libres, sino también a la extracción de diferentes compuestos que ejercieran el mismo efecto sobre el pH en el extracto obtenido (por ejemplo, ácidos fenólicos). Por lo tanto, es necesario realizar experimentos adicionales con el fin de asegurar que este descenso del pH se puede relacionar directamente con la progresión de la reacción de Maillard.

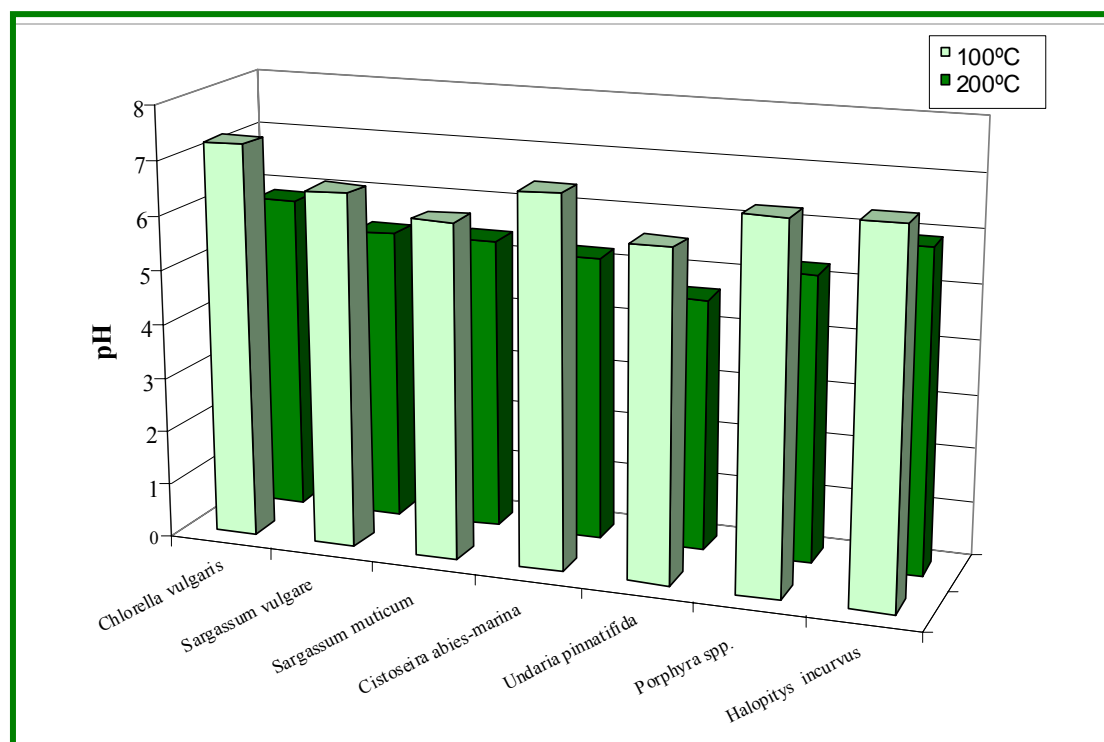


Figura IX.5. Determinación de los valores de pH para cada muestra después de la extracción con SWE a 100 y 200°C. Todos los extractos para cada muestra fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

IX.4.2.5. Productos avanzados de la reacción de Maillard (compuestos fluorescentes).

La medida de la fluorescencia es otra herramienta analítica comúnmente empleada para la estimación del grado de desarrollo de la reacción de Maillard. La intensidad de la fluorescencia comprendida en un rango de $\lambda_{ex} = 340-370$ y $\lambda_{em} = 400-500$ nm, suelen emplearse con frecuencia como un parámetro para la estimación de AGEs fluorescentes (productos finales de glicación avanzada). (Dolhofer-Bliesener y Gerbitz, 1990; Tregoaat y col., 2009; Matiacevich y col., 2005). Con el fin de comprobar la formación de este tipo de compuestos en los extractos obtenidos por SWE, se midió la fluorescencia en dichos extractos a $\lambda_{exc} 360/40$ y $\lambda_{em} 460/40$. Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la Tabla IX.2. Como se observa, los valores de fluorescencia de todas las muestras aumentaron significativamente ($p < 0.05$) después de la extracción con agua subcrítica a 200°C.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la formación de los productos fluorescentes derivados de la reacción de Maillard se favoreció en las extracciones de SWE a 200°C, siendo *U. pinnatifida* la muestra que contiene mayor cantidad de este

tipo de productos. Además, se observó una correlación entre los datos de la fluorescencia y la disponibilidad de los aminoácidos, como se puede apreciar para *U. pinnatifida* (Tablas IX.2).

Tabla IX.2. Datos de fluorescencia y absorbancia de los extractos obtenidos por SWE a 100 y 200°C. Las parejas de extractos (100 y 200°C) para cada alga con valores no estadísticamente diferentes ($p > 0.05$) están marcados con superíndices. Todas las medidas se realizaron al menos por triplicado.

| Muestra | Fluorescencia | | Pardeamiento | | | |
|--------------------------------|---|--------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | λ_{exc} 360/40; λ_{em} 460/40 | | Absorbancia a 360 nm | | Absorbancia a 420 nm | |
| | 100°C | 200°C | 100°C | 200°C | 100°C | 200°C |
| Microalgas | | | | | | |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 326.667 ± 23.594 | 5867.833 ± 474.085 | 1.020 ± 0.038 ^a | 1.056 ± 0.026 ^a | 0.978 ± 0.036 | 0.602 ± 0.041 |
| Macroalgas | | | | | | |
| <i>Sargassum vulgare</i> | 227.167 ± 26.453 | 1662.333 ± 7.095 | 0.298 ± 0.024 | 1.056 ± 0.014 | 0.519 ± 0.098 ^b | 0.534 ± 0.007 ^b |
| <i>Sargassum muticum</i> | 433.333 ± 9.201 | 3544.333 ± 289.010 | 0.236 ± 0.016 | 1.169 ± 0.006 | 0.104 ± 0.007 | 0.608 ± 0.001 |
| <i>Porphyra</i> spp. | 671.167 ± 35.290 | 3964.500 ± 454.442 | 0.271 ± 0.006 | 1.006 ± 0.031 | 0.125 ± 0.004 | 0.630 ± 0.019 |
| <i>Cystoseira abies-marina</i> | 215.667 ± 24.695 | 2981.333 ± 130.849 | 0.120 ± 0.007 | 0.932 ± 0.009 | 0.056 ± 0.004 | 0.468 ± 0.004 |
| <i>Undaria pinnatifida</i> | 211.167 ± 6.969 | 6585.667 ± 526.935 | 0.211 ± 0.004 | 1.170 ± 0.114 | 0.028 ± 0.001 | 0.537 ± 0.039 |
| <i>Halopitys incurvus</i> | 1459.333 ± 55.985 | 4501.000 ± 130.565 | 0.138 ± 0.010 | 0.545 ± 0.009 | 0.138 ± 0.010 | 0.307 ± 0.011 |

IX.4.2.6. Productos de pardeamiento.

Otro de los indicadores comúnmente empleados para estimar el grado de desarrollo de reacciones no enzimáticas, como las reacciones de Maillard o caramelización, es la medida de la absorbancia a 360 nm y 420 nm, indicativas de la formación de pigmentos pardos también denominados melanoidinas (Purlis, 2010; Delgado-Andrade y col., 2010; Benjakul y col., 2005). Como se ha comentado anteriormente, ésta es la forma más sencilla de medir la existencia de productos de la reacción de Maillard y, por tanto, se ha empleado ampliamente como un indicador del grado de desarrollo de la misma en alimentos (Morales y Jimenez-Perez, 2001). En este trabajo se emplearon las medidas de absorbancia a 360 nm y 420 nm para obtener información acerca del grado de desarrollo de las reacciones de Maillard y caramelización en los extractos de algas. La Tabla IX.2 muestra los resultados obtenidos de pardeamiento. En la mayoría de las algas se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos a 100 y 200°C (a 360 nm y 420 nm). Los extractos de *S. vulgare* obtenidos a 200°C produjeron un aumento significativo de la absorbancia a 360 nm respecto a los extractos obtenidos a 100°C, pero no se observaron diferencias significativas en la medida de la absorbancia a 420 nm entre los dos extractos. Curiosamente, *U. pinnatifida* fue de nuevo el alga en la cual se observaron diferencias de absorbancia mayores entre las dos temperaturas de extracción. Los resultados obtenidos de los compuestos pardos apoyan la hipótesis de que la reacción de Maillard tiene lugar durante la extracción con SWE a 200°C de las muestras de algas, y estos resultados se correlacionan con los obtenidos de compuestos fluorescentes y aminoácidos. Sin embargo, en la muestra de la microalga no se observó la formación de MRPs pardos. De hecho, la absorbancia a 420 nm, en el extracto de *C. vulgaris* obtenido a 200°C fue menor que a 100°C.

En conjunto, teniendo en cuenta los datos conjuntos de aminoácidos, azúcares, fluorescencia y pardeamiento, se puede decir, que la velocidad de la reacción de Maillard y caramelización fue diferente entre las distintas algas estudiadas, dando lugar a la formación de estructuras químicas nuevas y diferentes durante el tratamiento de SWE. Como consecuencia, la contribución de cada uno de los diferentes compuestos formados a las propiedades antioxidantes totales de los extractos podría ser diferente.

IX.4.3. Capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por SWE.

La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por SWE se midió mediante el empleo de tres diferentes ensayos *in vitro*, TEAC, ORAC_{FL} y la captación de radicales superóxido. Este último método proporciona valores IC₅₀, que como se ha comentado anteriormente, son indicativos de la concentración a la cual se inhibió el 50% de la reducción del NBT por el anión superóxido producido en el sistema X/XO; por tanto, cuanto menor es el valor IC₅₀, mayor es la capacidad antioxidante. El uso de estos tres métodos, que permiten observar la capacidad antioxidante de cada extracto frente a tres radicales diferentes (ABTS^{•+}, peroxilo y superóxido), posibilita la obtención de una visión más general del mecanismo de acción de los antioxidantes presentes en los extractos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla IX.3 donde se puede observar que todos los extractos fueron capaces de actuar frente a los radicales ABTS^{•+}, peroxilo y superóxido. En todos los casos, los extractos obtenidos a 200°C mostraron una capacidad antioxidante significativamente más elevada que la de los extractos producidos a partir de la misma alga obtenidos a 100°C. Los aumentos de la capacidad antioxidante en las muestras variaron desde dos veces más en *S. vulgare* hasta treinta veces más en *U. pinnatifida* (ver Tabla IX.3). De hecho, el extracto obtenido a 100°C a partir de *U. pinnatifida* presentó los valores más bajos de capacidad antioxidante, mientras que el extracto obtenido a 200°C, a partir de esta misma macroalga, presentó elevadas capacidades antioxidantes. Por su parte, el alga que presentó la mayor capacidad antioxidante fue *Porphyra* spp., en el extracto obtenido a 200°C. Sin embargo, al igual que ocurría con *U. pinnatifida*, cabe destacar que el extracto obtenido a 100°C a partir de *Porphyra* spp. presentó capacidades antioxidantes mucho más bajas. Además de los datos mostrados en el capítulo anterior, que confirmaban la presencia de nuevos compuestos antioxidantes en sistemas modelo aminoácido-azúcar sometidos a extracción SWE a 200°C, otros autores también han propuesto la formación de antioxidantes durante la reacción de Maillard y caramelización (Bekedam y col., 2008; Atrooz, 2008; Cämmerer y Kroh, 2006; Mesa y col., 2008; Michalska y col., 2008; Sahin y col., 2009; Xu y col., 2007).

Por lo tanto, los resultados obtenidos tras la aplicación de los diferentes ensayos para determinar la capacidad antioxidante de los extractos generados por SWE parecen indicar la progresión de la reacción de Maillard en todas las muestras estudiadas.

Adicionalmente, esta conclusión se apoya en los resultados obtenidos de las determinaciones de grupos amino libres, presencia de azúcares, fluorescencia y pardeamiento (ver Tablas IX.1 y IX.2), expuestos anteriormente.

Tabla IX.3. Valores de capacidad antioxidante (ORAC_{FL}, TEAC y la capacidad de captación de radicales superóxido) obtenidos para el estudio de los extractos naturales de algas obtenidos mediante SWE a 100 y 200°C. Todos los valores medios de capacidad antioxidante de cada pareja de extractos (100 y 200°C) para cada alga fueron estadísticamente diferentes (p < 0.05). Todas las medidas se realizaron al menos por triplicado. TE₅₀, equivalentes de trolox.

| Muestra | TEAC (mmol TE/g d.m.) | | ORAC _{FL} (μmol TE/g) | | Capacidad de captación de radicales superóxido IC ₅₀ (mg/ml) | |
|--------------------------------|-----------------------|---------------|--------------------------------|--------------------|--|----------------|
| | 100 °C | 200 °C | 100 °C | 200 °C | 100 °C | 200 °C |
| Microalgas | | | | | | |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 0.146 ± 0.004 | 0.789 ± 0.068 | 242.652 ± 32.017 | 1007.663 ± 125.296 | 10.752 ± 0.773 | 8.260 ± 0.303 |
| Macroalgas | | | | | | |
| <i>Sargassum vulgare</i> | 0.852 ± 0.025 | 1.561 ± 0.077 | 439.534 ± 18.085 | 1742.670 ± 161.237 | 11.442 ± 1.054 | 4.391 ± 0.285 |
| <i>Sargassum muticum</i> | 0.302 ± 0.005 | 1.045 ± 0.099 | 284.172 ± 23.235 | 1449.344 ± 72.647 | > 50 | 3.564 ± 0.371 |
| <i>Porphyra spp.</i> | 0.193 ± 0.015 | 1.834 ± 0.164 | 329.191 ± 22.450 | 1349.683 ± 114.519 | > 50 | 13.565 ± 0.481 |
| <i>Cystoseira abies-marina</i> | 0.156 ± 0.014 | 1.006 ± 0.093 | 275.906 ± 34.658 | 1313.570 ± 139.662 | > 50 | 7.312 ± 0.296 |
| <i>Undaria pinnatifida</i> | 0.047 ± 0.006 | 1.512 ± 0.191 | 45.356 ± 4.829 | 1522.692 ± 150.928 | > 50 | 5.371 ± 0.284 |
| <i>Halopitys incurvus</i> | 0.355 ± 0.051 | 1.042 ± 0.017 | 629.802 ± 68.752 | 1498.756 ± 221.673 | 7.901 ± 0.164 | 5.851 ± 0.077 |

IX.4.4. Fraccionamiento de los extractos.

Con el fin de obtener una visión sobre la identidad de los antioxidantes presentes en los extractos de SWE, se realizó un fraccionamiento de los extractos obtenidos a 100 y 200°C. Para ello se utilizó un proceso de ultrafiltración mediante un filtro con un tamaño de poro de 3 kDa. Así se obtuvieron dos fracciones de cada extracto; una fracción de bajo peso molecular (LMW, < 3kDa) y una fracción de alto peso molecular (HMW, > 3kDa). El objetivo de este experimento fue estimar la contribución de los compuestos de bajo (fenoles, pequeños péptidos, y productos de caramelización y de la reacción de Maillard) y alto peso molecular (melanoidinas, proteínas) en la capacidad antioxidante total de los extractos obtenidos por SWE. Como se puede apreciar en la Figura IX.6, tanto los antioxidantes de bajo peso molecular como los de alto peso molecular, están presentes en todos los extractos. En general, las fracciones de alto peso molecular de los extractos obtenidos a 200°C contribuyen en mayor medida a la capacidad antioxidante total del extracto. En todos los casos se observa una relación entre la temperatura de extracción y el nivel de antioxidantes. Asimismo, de acuerdo con las evidencias antes mencionadas, el aumento de la capacidad antioxidante podría estar relacionado con la formación de nuevos compuestos con capacidad antioxidante derivados de las reacciones de Maillard y caramelización. Por otro lado, las fracciones de bajo peso molecular podrían estar formadas por compuestos fenólicos, además de por los nuevos compuestos generados durante el procesado de las muestras. Algunos compuestos de bajo peso molecular derivados de estas reacciones, como se ha descrito en el capítulo anterior, poseen cierta capacidad antioxidante.

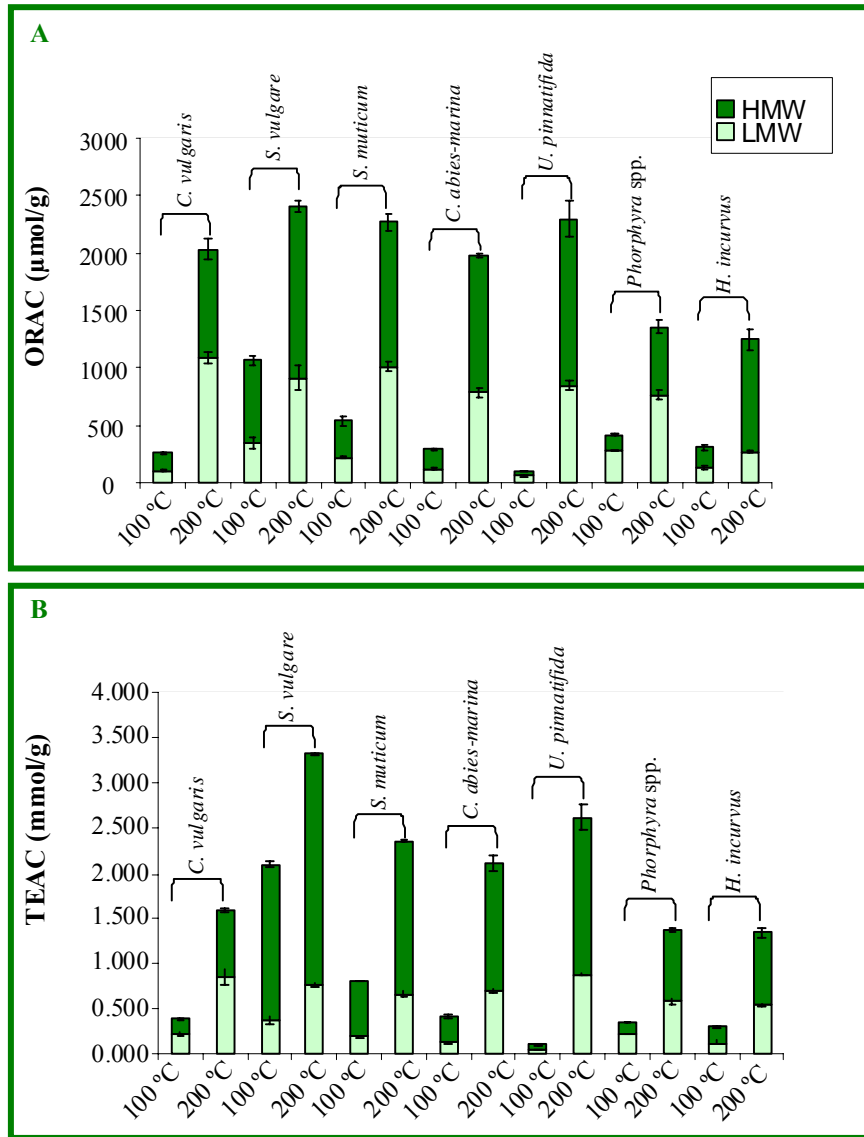


Figura IX.6. Valores de capacidad antioxidante (TEAC y ORAC_{FL}) presentes en las fracciones de alto peso molecular (retenido) (HMW) y en las fracciones de bajo peso molecular (filtrado) (LMW) obtenidos a partir de la extracción con SWE a 100 y 200°C de micro- y macroalgas.

Para poder conocer más acerca de los compuestos responsables de la capacidad antioxidante en las fracciones de alto peso molecular (melanoidinas), se llevó a cabo un fraccionamiento del retenido mediante cromatografía de exclusión molecular de alta eficacia empleando para ello un instrumento de FPLC equipado con un detector UV/Vis y con una columna de exclusión molecular. Los compuestos se detectaron a tres longitudes de onda diferentes, 214 nm (proteínas), 280 nm (compuestos fenólicos) y 360 nm (compuestos pardos, como melanoidinas), para poder observar diferentes tipos de compuestos. Se analizaron las fracciones HMW de los extractos obtenidos con SWE a 100 y 200°C. En todos los extractos obtenidos a 200°C se observó un pico a la longitud de onda de 360 nm, que no estaba presente en los extractos obtenidos a 100°C.

Este hecho parece indicar la presencia de melanoidinas en las fracciones de alto peso molecular de los extractos de algas obtenidos a 200°C. En la Figura IX.7, a modo de ejemplo, se muestran los cromatogramas obtenidos tras el análisis de las fracciones HMW de los extractos obtenidos a 100 y 200°C de *U. pinnatifida*. Como se puede apreciar en la Figura IX.7A, en el extracto a 100°C no se observó ningún pico a 360 nm, mientras que en el extracto a 200°C, se detectó un pico a 16 minutos (Figura IX.7B) que podría asignarse a melanoidinas.

Mediante la inyección de diferentes proteínas con distinto peso molecular, se pudo conocer que el peso molecular de los compuestos pardos (melanoidinas) que se forman en los extractos de algas era mayor de 67 kDa. No fue posible conocer el peso molecular exacto, debido a que las melanoidinas formadas presentaron un tiempo de retención muy próximo al límite de exclusión dado por el azul de dextrano (2000 kDa).

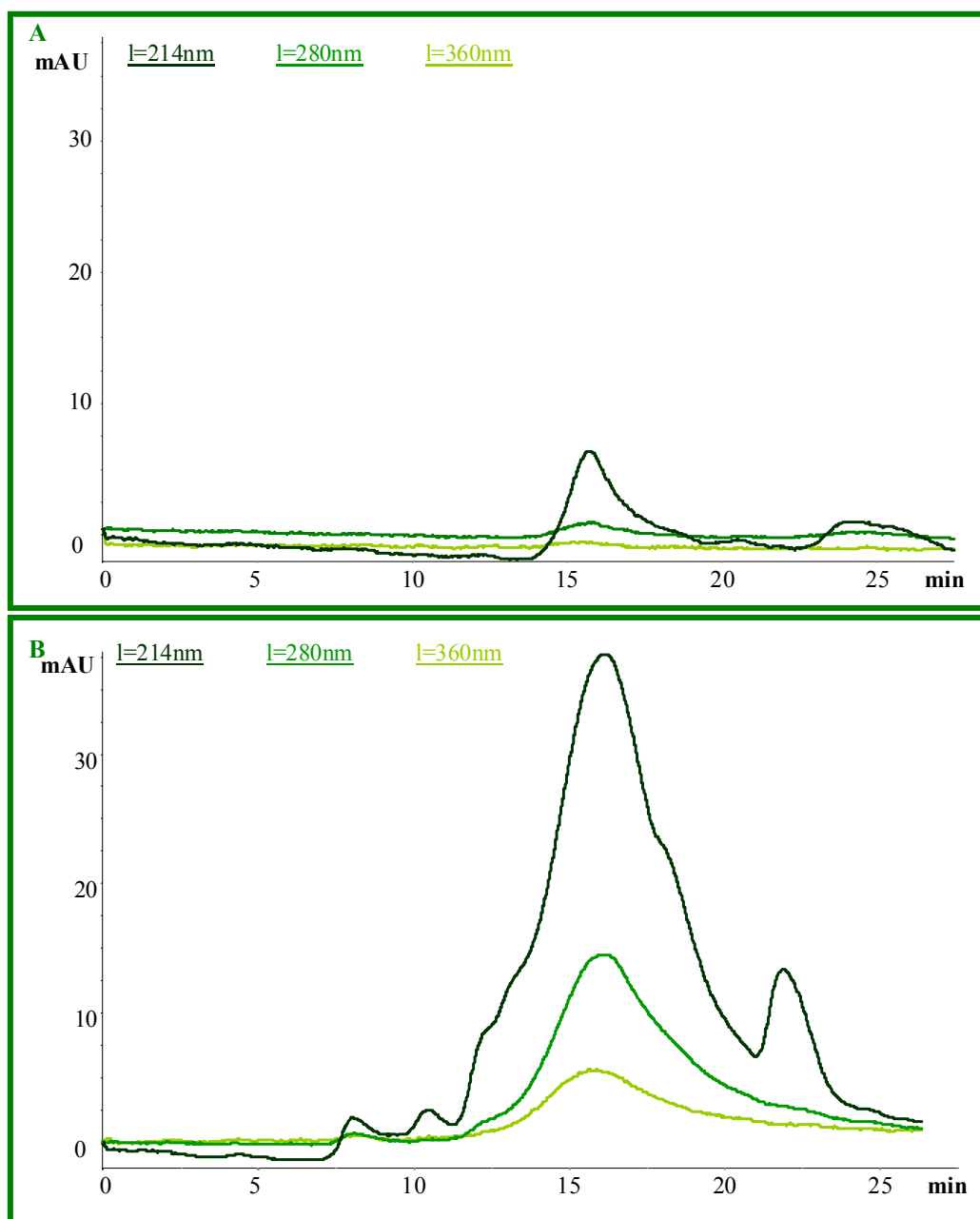


Figura IX.7. Cromatogramas obtenidos por FPLC-UV/Vis equipado con una columna de exclusión molecular correspondientes a los compuestos de alto peso molecular de *U. pinnatifida* obtenidos tras el fraccionamiento de las fracciones HMW de los extractos de 100°C (A) y 200°C (B) a diferentes longitudes de onda (214, 280 y 360 nm).

IX.5. CONCLUSIONES.

Del estudio de los diferentes extractos procedentes de algas obtenidos mediante SWE a diferentes temperaturas (100 y 200°C) se pudo apreciar, en términos de rendimiento, mejores resultados en los extractos obtenidos a 200°C. Las macroalgas *Porphyra* spp. y *Undaria pinnatifida* presentaron los rendimientos más elevados, llegando a suponer alrededor del 65% del peso seco.

Se llevó a cabo una caracterización química exhaustiva de los extractos obtenidos por SWE a 100 y 200°C procedentes de algas, empleando diferentes métodos que miden el contenido en fenoles, azúcares y aminoácidos, así como, fluorescencia, pH y color. Se pudo comprobar que los extractos obtenidos a 200°C presentaron mayor contenido en compuestos fenólicos, menor contenido de aminoácidos disponibles, pH más bajos, y una mayor formación de productos avanzados de Maillard fluorescentes y pardos, que sus correspondientes extractos a 100°C. Sin embargo, el contenido de azúcares, en contra de lo esperado, aumentó en la mayoría de las algas al pasar de 100 a 200°C, debido a una probable hidrólisis de celulosa y otros carbohidratos complejos a 200°C. Todos estos resultados hacen suponer que ha tenido lugar la reacción de Maillard durante la extracción con SWE a 200°C.

Según estos resultados, la macroalga que presentó mayores diferencias entre los extractos obtenidos a 100 y 200°C fue *U. pinnatifida*. Por su parte, la microalga *C. vulgaris* presentó las menores diferencias, indicando un menor desarrollo de la reacción de Maillard durante su extracción.

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante tres diferentes técnicas *in vitro* (TEAC, ORAC_{FL} y capacidad de captación de radicales superóxido) y se observó que los extractos obtenidos a 200°C en todas las algas presentaban una mayor capacidad antioxidante frente a los diferentes radicales (ABTS⁺, peroxilo y superóxido) empleados. *Porphyra* spp, *Sargassum vulgare* y *Undaria pinnatifida* fueron las algas que presentaron mayor capacidad antioxidante a 200°C. Asimismo, *U. pinnatifida* presentó mayores diferencias de capacidad antioxidante entre los extractos obtenidos a 100 y 200°C; mientras que la microalga *C. vulgaris* presentó los datos más bajos de capacidad antioxidante.

Del análisis conjunto de los resultados de caracterización química de los extractos y de capacidad antioxidante se puede concluir que *U. pinnatifida* es la muestra en la que las reacciones de Maillard y caramelización presentaron mayor grado de desarrollo. Por el contrario, en la microalga *C. vulgaris* se apreció menor desarrollo de estas reacciones.

Además, se llevó a cabo un fraccionamiento de los extractos, en fracciones de alto (HMW, >3 kDa) (melanoidinas) y bajo (LMW, <3 kDa) peso molecular, para estimar la contribución de los compuestos de ambas fracciones en la capacidad antioxidante total de los extractos. Los resultados obtenidos mostraron una mayor influencia de las fracciones de alto peso molecular (de los extractos obtenidos a 200°C) a la capacidad antioxidante total del extracto. Para poder correlacionar esta elevada capacidad antioxidante de las fracciones de alto peso molecular con la presencia de compuestos pardos (melanoidinas), se llevó a cabo un fraccionamiento de estas fracciones mediante FPLC con una columna de exclusión molecular. En las fracciones HMW de los extractos obtenidos a 200°C se identificó un pico de compuestos coloreados (melanoidinas) de alto peso molecular (67 kDa) que no se observó en la fracciones HMW de los extractos obtenidos a 100°C .

En este estudio se ha demostrado, por primera vez, que durante la extracción mediante SWE a elevadas temperaturas a partir de algas, pueden tener lugar la progresión de diferentes eventos químicos, como las reacciones de Maillard y/o de caramelización. Asimismo, se ha podido demostrar que mediante estas reacciones tiene lugar la formación de nuevos compuestos con elevada capacidad antioxidante que influyen en la capacidad antioxidante total del extracto.

Discusión General a la Tercera Parte

En esta tercera parte de la presente Memoria se ha demostrado, por primera vez, que durante la extracción con agua subcrítica a 200°C a partir de matrices complejas, como algas, puede tener lugar la formación de nuevos compuestos antioxidantes procedentes de diferentes eventos químicos, como es la reacción de Maillard y/o de caramelización. El grado de desarrollo de estas reacciones va a depender de la composición química de las matrices a extraer.

En primer lugar, en el Capítulo VIII de esta Tercera Parte, se ha podido observar cómo partiendo de sistemas modelos de glicación (aminoácido-glucosa) bajo las condiciones de extracción con agua presurizada a altas temperaturas (200°C) se forman nuevos compuestos que presentan capacidad antioxidante. Estos compuestos derivan de diferentes eventos químicos, como son las reacciones de Maillard y caramelización. Según el aminoácido empleado en la reacción, el grado de desarrollo de la misma es distinto, es decir se favorece la formación de compuestos diferentes. En este sentido, los sistemas de glicación arginina-glucosa y lisina-glucosa dieron lugar a la formación de compuestos finales de la reacción de Maillard como son los AGEs fluorescentes y los compuestos pardos. Sin embargo, alanina presentó diferentes compuestos de las etapas iniciales de la reacción de Maillard. Asimismo, el sistema arginina-glucosa presentó mayor capacidad antioxidante, seguido por alanina- y lisina-glucosa. En conjunto, el aminoácido que mostró un mayor desarrollo de sustancias bioactivas derivadas de la reacción de Maillard fue arginina.

En el Capítulo IX de esta Tercera Parte, se ha observado que al extraer matrices naturales (algas) utilizando SWE a altas temperaturas, para la obtención de extractos bioactivos, se pueden también formar nuevos compuestos con capacidad antioxidante. Mediante el estudio de la composición química de estos extractos se observó que bajo las condiciones de extracción de SWE a 200°C tuvieron lugar las reacciones de Maillard y caramelización. La capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a 200°C aumentó mucho con respecto a los de 100°C; siendo *U. pinnatifida*, el alga que sufrió mayores modificaciones en la composición química, así como en la capacidad antioxidante al ser extraída a 200°C. En cambio, *Chlorella vulgaris* fue el alga que presentó menor grado de desarrollo de la reacción de Maillard. En general todas las macroalgas extraídas a 200°C presentaron valores considerables de capacidad antioxidante, no encontrándose diferencias entre los distintos grupos de algas.

Por lo tanto, los resultados que se muestran en esta Tercera Parte confirman, por primera vez, la presencia inequívoca de este tipo de reacciones durante procesos de extracción mediante SWE a muy altas temperaturas, así como la influencia de los productos generados a partir de dichas reacciones sobre la capacidad antioxidante total de los extractos producidos. En general, los extractos de algas obtenidos a 200°C presentan una muy elevada capacidad antioxidante. Por lo tanto, estos extractos obtenidos con agua subcrítica a altas temperaturas podrían utilizarse, previo estudio de su toxicidad, como ingrediente funcional en alimentos. Además, este disolvente de extracción es considerado seguro para la industria alimentaria y presenta elevados rendimientos de extracción, lo que hace que estos extractos sean idóneos para ser empleados por la industria alimentaria. Sin embargo, aún queda mucho que estudiar sobre los efectos de estos compuestos en el organismo, ya que esta actividad generalmente sólo se ha estudiado en ensayos *in vitro*. Además debería llevarse a cabo un estudio en profundidad de los compuestos generados durante la reacción de Maillard, ya que también se pueden formar compuestos perjudiciales para la salud durante la reacción.

Bibliografía

- Ajandouz, E.H., Desseaux, V., Tazi, S., Puigserver, A. (2008). Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems. *Food Chem.* 107: 1244-1252.
- Ajandouz, E.H., Tchiakpe, L.S., Ore, F.D., Benajiba, A., Puigserver, A. (2001). Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *J. Food Sci.* 66: 926-931.
- Almajano, M.P., Carbó, R., Jiménez, J.A.L., Gordon, M.H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* 108: 55-63.
- Ames, J.M. (1990). Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends Food Sci. Technol.* 1: 150-154.
- Andriot, I., Quéré, J.L., Guichard, E. (2004). Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds : impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chem.* 85: 289-294.
- AOAC Official Method 979.09. (2002). Protein in grains In Official Methods of Analysis; Association of Analytical Communities: Washington, DC.
- Aoki, T., Hiidome, Y., Sugimoto, Y., Ibrahim, H.R., Kato, Y. (2001). Modification of ovoalbumin with oligogalacturonic acids through the Maillard reaction. *Food Res. Int.* 34: 127-132.
- Arribas-Lorenzo, G., Morales, F.J. (2009). Effect of pyridoxamine on acrylamide formation in a glucose/asparagine model system. *J. Agric. Food Chem.* 57: 901-909.
- Atrooz, O.M. (2008). The effects of Maillard reaction products on apple and potato polyphenoloxidase and their antioxidant activity. *Food Sci. Technol. Int.* 43: 490-494.
- B**ekedam, E.K., Schols, H.A., Cämmerer, B., Kroh, L.W., Van Boekel, M.A.J.S., Smit, G. (2008). Electron spin resonance (ESR) studies on the formation of roasting-induced antioxidative structures in coffee brews at different degrees of roast. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4597-4604.
- Benjakul, S., Lertittikul, W., Bauer, F. (2005). Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system. *Food Chem.* 93: 189-196.
- Biemel, K.M., Lederer, M.O. (2003). Site-specific quantitative evaluation of the protein glycation product N6-(2, 3-dihydroxy-5,6-dioxohexyl)-L-lisinate by LC-(ESI)-MS peptide mapping. Evidence for its key role in AGE formation. *Bioconjugate Chem.* 14: 619-628.
- Brands, C.M.J., Van Boekel, M.A. (2003). Kinetic modelling of reactions in heated monosaccharide-casein systems. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6725-6739.
- Bressa, F., tesson, N., Rosa, M.D., Sensidoni, A., Tubaro, F. (1996). Antioxidant effect of Maillard reaction products: application to a butter cookie of a competition kinetics analysis. *J. Agric. Food Chem.* 44: 692-695.
- Budrat, P., Shotipruk, A. (2009). Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction. *Sep Purif. Technol.* 66: 125-129.
- C**ämmerer, B., Kroh, L.W. (2006). Antioxidant activity of coffee brews. *Eur. Food Res. Technol.* 223: 469-474.

Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M. (2005). Evaluación del pardeamiento no enzimático en alimentos derivados de cereales. *Alim. Nutri. Salud* 12: 91-100.

Chawla, S.P., Chander, R., Sharma, A. (2007). Antioxidant formation by gamma-irradiation of glucose-amino acid model systems. *Food Chem.* 103: 1297-1304.

Chevalier, F., Chobert, J.M., Genot, C., Haertle, T. (2001). Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the Maillard reaction products of β -lactoglobulin glycosylated with several sugars. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5031-5038.

Chuyen, N.V. (1998). Maillard reaction and food processing. En *Process-induced chemical changes in food*. Shahidi y col., Eds. New York: Plenum Press. pp 213-235.

Cremer, D.R., Eichner, K., (2000). The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model Systems and plants powders. *Food Chem.* 71: 37-43.

Davalos, A., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.* 52: 48-54.

Del Castillo, M.D., Corzo, N., Olano, A. (1999). Early stages of Maillard reaction in dehydrated orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4388-4390.

Del Castillo, M.D., Gordon, M.H., Ames, J.M. (2005). Peroxyl radical-scavenging of coffee brews. *Eur. Food Res. Technol.* 221: 471-477.

Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J.A., Morales, F.J. (2005). Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7832-7836.

Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Haro, A., Castellano, R., Navarro, P. (2010). Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chem.* 122: 145-153.

De Quirós, A.R.B., Frech-Ferreiro, S., Vidal-Pérez, A.M., López-Hernández, J. (2010). Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 495-498.

Dolhofer-Bliesener, R., Gerbitz, K. D. (1990). Effect of nonenzymatic glycation on the structure of immunoglobulin G. *Biol. Chem. Hoppe-Seyle* 371: 693-697.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.

Drusch, S., Berg, S., Scampicchio, M., Serfert, Y., Somoza, V., Mannino, S., Schwarz, K. (2009). Role of glycosylated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients. *Food Hydrocolloids* 23: 942-948.

Ehling, S., Shibamoto, T. (2005). Correlation of acrylamide generation in thermally processed model systems of asparagine and glucose with color formation, amounts of pyrazines formed, and antioxidative properties of extracts. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4813-4819.

Fatima, S., Jairajpuri, D.S. Saleemuddin, M. (2008). A procedure for the rapid screening of Maillard reaction inhibitors. *J. Biochem. Bioph. Methods* 70: 958-965.

Fernandes, A.S., Gaspar, J., Cabral, M.F., Caneiras, C., Guedes, R., Rueff, J., Castro, M., Costa, J., Oliveira, N.G. (2007). Macrocyclic copper (II) complexes: Superoxide scavenging activity, structural Studies and cytotoxicity evaluation. *J. Inorg. Biochem.* 101: 849-858.

Franzke, C., Iwainsky, H. (1954). The antioxidant activity of melanoidins. *Dutch J. Food Chem.* 50:251-254.

Friedman, M. (1996). Food browning and its prevention: an overview. *J. Agric. Food Chem.* 44: 631-653.

Garcia-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Ibáñez, E., García-Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Anal. Chim. Acta* 563: 44-50.

Gollücke, A.P.B., Catharino, R.R., de Souza, J.C., Eberlin, M.N., de Queiroz Talavares, D. (2009). Evolution of major phenolic components and radical scavenging activity of grape juices through concentration process and storage. *Food Chem.* 112: 868-873.

Goodno, C.C., Swaisgood, H.E., Catignani, G.L. (1981). A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Anal. Biochem.* 115: 203-211.

Gu, F., Kim, J.M., Hayat, K., Xia, S., Feng, B., Zhang, X. (2009). Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system. *Food Chem.* 117: 48-54.

Gugliucci, A., Markowicz-Bastos, D.H., Schulze, J., Ferreira-Souza, M.F. (2009). Caffeic and chloreogenic acids in *Ilex paraguarensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia* 80: 339-344.

Hassas-Roudsari, M., Chang, P.R., Pegg, R.B., Tyler, R.T. (2009). Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chem.* 114: 717-726.

Hattori, M., Numamoto, K., Kobayashi, K., Takahashi, K. (2000). Functional changes in β -lactoglobulin by conjugation with cationic saccharides. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2050-2056.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae-A review. *Food Chem.* 98: 136-148.

Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J. Chromatogr. A* 1217: 2512-2520.

Hollnagel, A., Kroh, L.W. (1998). Formation of alpha-dicarbonyl fragments from mono- and disaccharides under caramelization and Maillard reaction conditions. *Food Res. Technol.* 207: 50-54.

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.

Huber, G.M., Rupasinghe, H.P.V. (2009). Phenolic profiles and antioxidant properties of apple skin extracts. *J. Food Sci.* 74:C693-C700.

Jing, H., Kitts, D.D. (2004). Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 15: 154-163.

Kato, A. (2002). Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. *Food Sci. Technol. Res.* 8: 193-199.

Kim, J.S., Lee, Y.S. (2009a). Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time. *Food Chem.* 116: 227-232.

Kim, J.S., Lee, Y.S. (2009b). Antioxidant activity of melanoidins from different sugar/amino acids model systems: Influence of the enantiomer type. *Food Sci. Technol. Int.* 15: 291-297.

Kim, J.W., Nagaoka, T., Ishida, Y., Hasegawa, T., Kitagawa, K., Lee, S.C. (2009). Subcritical water extraction of nutraceutical compounds from citrus pomaces. *Sep. Sci. Technol.* 44: 2598-2608.

Koşar, M., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristic of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem.* 91: 525-533.

Ledl, F., Schleicher, E. (1990). New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie International Edition* 29: 565-594.

Li, H.B., Jiang, Y., Wong, C.C. Cheng, K.W., Chen, F. (2007). Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 388: 483-488.

Liu, S.C., Yang, D.J., Jin, S.Y., Hsu, C.H., Chen, S.L. (2008). Kinetics of color development, pH decreasing, and anti-oxidative activity reduction of Maillard reaction in galactose/glycine model systems. *Food Chem.* 108: 533-541.

Luque De Castro, M.D., Jiménez-Carmona, M.M., Fernández-Pérez, V. (1999). Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends Anal. Chem.* 18: 708-716.

Martin, M.A., Ramos, S., Mateos, R., Rufian-Henares, J.A., Morales, F.J., Bravo, L., Goya, L. (2009). Biscuit melanoidins of different molecular masses protect human HepG2 cells against oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7250-7258.

Martins, S.I.F.S., Jongen, W.M.F., van Boekel, M.A.J.S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends in Food Science and Technology* 11: 364-373.

Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., Lee, Y.C. (2005). Carbohydrate analysis by phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.* 339: 69-72.

Matiacevich, S.B., Satagapita, P.R., Buera, M.P. (2005). Fluorescence from the Maillard reaction and its potential applications in food science. *Crit. Revs. Food Sci. Nutr.* 45: 483-495.

Mauron, J. (1981). The Maillard reaction in food – A critical-review from the nutritional standpoint. *Progress in Food and Nutrition Science* 5: 5-35.

Mendiola, J.A., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2007). Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *J. Chromatogr. A* 1152: 234-246.

Mesa, M.D., Silvan, J.M., Olza, J., Gil, A., del Castillo, M.D. (2008). Antioxidant properties of soy protein-fructooligosaccharide glycation systems and its hydrolyzates. *Food Res. Int.* 41: 606-615.

Michalska, A., Amigo-Benavent, M., Zielinski, H., del Castillo, M.D. (2008). Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *J. Cereal Sci.* 48: 123-132.

Mlotkiewicz, J.A. (1998). The role of the Maillard reaction in the food industry. In O'Brien, J., Nursten, H.E., Crabbe, M.J.C., Ames, J.M. (Eds). In: *The Maillard reaction in Food and Medicine*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 19-27.

Morales, F.J., Jimenez-Perez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem.* 72: 119-125.

Moreno, F.J., Corzo-Martínez, M., del Castillo, M.D., Villamiel, M. (2006). Changes in antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage. *Food Res. Int.* 39: 891-897.

Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Sci. Technol.* 43: 992-999.

Nakamura, S., Suzuki, Y., Ishikawa, E., Yakushi, T., Jing, H., Miyamoto, T., Hashizume, K. (2008). Reduction of *in vitro* allergenicity of buckwheat Fag e 1 through the Maillard-type glycosylation with polysaccharides. *Food Chem.* 109: 538-545.

Namiki, M. (1988). Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food Res.* 32: 115-184.

Olano, A., Martínez-Castro, I. (1996). Nonenzymatic Browning. In *Handbook of food analysis*. L.M.L. Nollet, Ed. New York: Marcel Decker., 1683-1721.

Ou, B.X., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4619-4626.

Peng, X., Cheng, K.W., Ma, J., Chen, B., Ho, C.T., Lo, C., Chen, F., Wang, M. (2008). Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavenger to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1907-1911.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.J. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.

Purlis, E. (2010). Browning development in bakery products-a review. *J. Food Eng.* 99: 239-249.

Ragubeer, N., Beukes, D.R., Limson, J.L. (2010). Critical assessment of voltammetry for rapid screening of antioxidants in marine algae. *Food Chem.* 121: 227-232.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannale, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 26: 1231-1237.

Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 1560-1565.

Roginsky, V., Lissi, E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92: 235-254.

Rostagno, M.A., Villares, A., Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., Martínez, J.A. (2009). Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J. Chromatogr. A*, 1216: 2-29.

Roth, M. (1983). Glycated haemoglobin not glycosylated or glucosylated. *Clinical Chem.* 29: 1991.

Rufián-Henares, J.A., Delgado-Andrade, C., Morales, F.J. (2006). Occurrence of acetic acid and formic acid in breakfast cereals. *J. Sci. Food Agric.* 86: 1321-1327.

Rufián-Henares, J.A., Morales, F. J. (2007). Functional properties of melanoidins: *In vitro* antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Res. Int.* 40: 995-1002.

Sahin, H., Topuz, A., Pischetsrieder, M., Ozdemir, F. (2009). Effect of roasting process on phenolic, antioxidant and browning properties of carob powder. *Eur. Food Res. Technol.* 230: 155-161.

Sanz, M.J., Ferrandiz, M.L., Cejudo, M., Terencio, M.C., Gil, B., Bustos, G., Ubeda, A., Gunasegaran, R., Alcaraz, M.J. (1994). Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica* 24: 689-699.

Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., Ercisli, S. (2009). Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22: 102-106

Silván, J.M., Van de Lagemaat, J., Olano, A., Del Castillo, M.D. (2006). Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 1543-1551.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth. Enzymol.* 299: 152-178.

Somoza, V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: an update. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 663-672.

Tregoat, V., Brohee, M., Cordeiro, F., van Hengel, A.J. (2009). Immunofluorescence detection of advanced glycation end products (AGEs) in cookies and its correlation with acrylamide content and antioxidant activity. *Food Agric. Immunol.* 20: 253-268.

Tressl, R., Rewicki, D. (1999). Heat generated flavours and precursors. In: Teranishi, R., Hornstein, I., Wick, E.L., Eds., Flavor chemistry. Thirty years of progress. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 305-325.

Tsuji-Naito, K., Saeki, H., Hamano, M. (2009). Inhibitory effects of *Chrysanthemum* species extracts on formation of advanced glycation end products. *Food Chem.* 116: 854-859.

Van Boekel, M.A.J.S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.* 62: 403-414.

Van de Lagemaat, J., Silván, J.M., Moreno, F.J., Olano, A., del Castillo, M.D. (2007). *In vitro* glycation and antigenicity of soy proteins. *Food Res. Int.* 40: 153-160.

Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidante capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 111: 816-823.

Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. (2009). Protein glycation inhibitory activity of wheat bran feruloyl oligosaccharides. *Food Chem.* 112: 350-353.

Weenen, H. (1998). Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.* 62, 393-401.

Weenen, H., Tjan, S.B. (1994). 3-Desoxyhexonose as flavour precursor. In: Maarse, H., Ven der Heij, D.G., Eds., Trends in Flavorur Research; Elsevier: New York. pp. 303-327.

Wiboonsirikul, J., Adachi, S. (2008). Extraction of functional substances from agricultural products or by-products by subcritical water treatment. *Food Sci. Technol. Res.* 14: 319-328.

Wijewickreme, A.N., Kitts, D.D. (1997). Influence of reactions on the oxidative behaviour of model Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4571-4576.

Wijngaard, H.H., Röble, C., Brunton, N. (2009). A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 116: 202-207.

Wu, C.H., Yen, G.C. (2005). Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3167-3173.

Xu, Q.P., Tao, W.Y., Ao, Z.H. (2007). Antioxidant activity in vinegar melanoidins. *Food Chem.* 102: 841-849.

Yang, W.H., Hattori, M., Ishii, Y., Takahaski, K. (2005). Improvement of potato starch by conjugation with ϵ -poly(L-lysine) through the Maillard reaction as an antibacterial emulsifier. *Japanese Society of Applied Glycoscience* 52: 253-259.

Yaylayan, V.A. (1997). Classification of the Maillard reaction: a conceptual approach. *Trends Food Sci. Tech.* 7:13-18.

Yaylayan, V.A. (2003). Recent advances in the chemistry of Strecker degradation and Amadori rearrangement: Implications to aroma and color formation. *Food Sci. Technol. Res.* 9:1-6.

Yen, G.C., Tsai, L.C. (1993). Antimutagenicity of a partially fractioned Maillard reaction product. *Food Chem.* 47: 11-15.

CAPÍTULO X:
“Conclusiones finales”

Las conclusiones parciales de cada trabajo se pueden encontrar al final de cada uno de sus correspondientes capítulos. A continuación se exponen las conclusiones finales a las que los trabajos contenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar:

1. En la búsqueda de potenciales ingredientes funcionales a partir de macro- y microalgas se ha podido comprobar cómo los extractos de PLE obtenidos con etanol y agua presentaron las capacidades antioxidantes más elevadas. Se ha determinado la composición en carotenoides de estos extractos, encontrándose estos compuestos en los extractos etanólicos procedentes de todas las algas estudiadas. No obstante, se ha confirmado que la totalidad de la actividad antioxidante mostrada por estos extractos no estaba directamente relacionada con su contenido en carotenoides.
2. Los extractos obtenidos con etanol mediante PLE procedentes de las diferentes especies de algas estudiadas presentaron las actividades antimicrobianas más elevadas. Esta actividad antimicrobiana se atribuyó, en parte, a la presencia de compuestos volátiles y ácidos grasos, identificados mediante el empleo de GC-MS. Por su parte, los extractos obtenidos con agua presentaron niveles más bajos de esta actividad.
3. Se ha podido confirmar satisfactoriamente la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos en un amplio grupo de algas estudiado, incluyendo micro- y macroalgas, pertenecientes a los principales grupos de algas existentes. En concreto, se ha podido confirmar la presencia de ácidos fenólicos en los extractos obtenidos por PLE a partir de dichas algas. La presencia de estos compuestos podría tener una importante influencia sobre la actividad antioxidante total mostrada por los extractos. Adicionalmente se ha podido confirmar, por primera vez, la presencia de compuestos fenólicos más complejos, como son las isoflavonas, en la composición química de todas las algas estudiadas. Si bien estos compuestos se encontraron en concentraciones relativamente bajas, su presencia podría ejercer un efecto positivo en la actividad antioxidante total de los extractos procedentes de estas fuentes naturales.
4. Se ha demostrado cómo, durante procesos de PLE empleando agua como disolvente a altas temperaturas (200°C) se pueden formar nuevos compuestos derivados de reacciones de Maillard y de caramelización que presentan carácter antioxidante pudiendo, por tanto, influir decisivamente en la actividad

antioxidante total mostrada por los extractos naturales generados en estas condiciones. Este hecho se ha podido comprobar tanto mediante el estudio de sistemas modelo como en la extracción de diferentes tipos de algas.

5. En resumen, en este trabajo se ha demostrado la posibilidad de obtener extractos complejos con diferentes actividades funcionales a partir de algas, gracias al uso combinado de técnicas de extracción medioambientalmente limpias junto con técnicas avanzadas de análisis químico y funcional. Este procedimiento podría ser útil y efectivo para la incorporación de nuevos ingredientes funcionales procedentes de estas interesantes matrices naturales para su utilización en la industria alimentaria.

ANEXO:

“Publicaciones relacionadas”

- Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2008). “In the search of new functional food ingredients from algae”. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 31-39. (CAPÍTULO I)
- Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2009). “Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (16), 7159-7170. (CAPÍTULO I)
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M.; Señoráns, F.J., Ibáñez, E. “Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*”. *LWT-Food Science and Technology* (enviado). (CAPÍTULO II)
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M.; Señoráns, F.J., Ibáñez, E. (2010). “Screening for bioactive compounds from algae”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 450-455. (CAPÍTULOS III Y V)
- Klejdus, B., Lojková, L., Plaza, M., Šnóblová, M., Štěrbová, D. (2010). “Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: ultrasound-assisted SFE followed by RRLC MS/MS. *Journal of Chromatography A*. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.07.020. (CAPÍTULO VII)
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., Del Castillo, M.D., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010). “Neoformation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions”. *Food Research International*, 43, 1123-1129. (CAPÍTULO VIII)
- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., Del Castillo, M.D., Ibáñez, E., Herrero, M. (2010). “Chemical events occurring during subcritical water extractin of natural samples”. *Food Research International*. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.07.036. (EN PRENSA) (CAPÍTULO IX)