



TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA

Optimización del método de extracción y
análisis de compuestos antioxidantes
presentes en la cianobacteria
Arthrospira platensis

Alumna: Uxue Muñoz Berruezo
Tutor: Carolina Padrón Sanz
Curso 2021-2022



Agradecimientos

Cuando haces el doble grado, dicen que el segundo TFG es más fácil. Nada más lejos de la realidad. La búsqueda bibliográfica es mucho más eficiente, porque ya sabes que los artículos que estás buscando para la introducción y para informarte sobre el tema antes de entrar al laboratorio te servirán para la discusión, y te los dejas subrayaditos. Pero te vuelves mucho más exigente. “Si ya has hecho uno, este será más fácil y puedes abarcar más”. Y no sabes dónde te estás metiendo. La parte buena es que se disfruta el doble de la parte experimental porque tienes mucha más confianza en ti misma.

Y cuando me faltó la confianza o pensaba que estaba haciendo todo al revés, tuve el maravilloso apoyo de Samanta. Compartió sus protocolos, me enseñó los trucos que llevaba años aprendiendo, y siempre estaba ahí cuando me surgían dudas, no me cuadraban los resultados o me exasperaba porque no es fácil pesar 0,00385g de un reactivo en polvo que se aglutina como quiere, o filtrar unos extractos cuya misión en la vida es destrozarte todos los huesos de la mano.

Además, me he reafirmado sobre que lo que más me gusta es la biotecnología azul, obtener compuestos activos de origen marino. Es bonito encontrar un área que te apasiona de verdad, y la he podido encontrar gracias a que mi tutora (Carolina) me ofreció la posibilidad de hacer este TFG. Se le ocurrió el tema, me dio alas para poder abarcar en el estudio todo lo que quería, y ha estado siempre pendiente. He intentado aplicar todos los consejos y correcciones que me ha dado para poder obtener un buen resultado. Del trabajo además ha salido un póster para un congreso, así que creo que hemos hecho un buen trabajo.

Por último y no menos importante, tengo que agradecer a mi familia todo lo que hacen por mí. Mi hermana es mi apoyo día a día. La que me hacía la cena cuando llegaba a las mil del laboratorio y me escuchaba hablar por millonésima vez del protocolo maldito que tenía que repetir porque había hecho algo mal. Y a mis padres: me mandaron a Valencia a perseguir mi sueño de “investigar cosas del mar” y siempre me dan el empujoncito que me falta para poder lanzarme a la piscina, y el apoyo para poder lograr todo lo que me propongo. Espero que estén orgullosos de mí, yo también lo estoy de ellos.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| OBJETIVOS | 13 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 15 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 23 |
| 1. Optimización del método de Extracción Asistida por Ultrasonidos | 23 |
| 1.1 Valoración del ultrasonidos como método óptimo de extracción | 23 |
| 1.2 Cantidad de alga..... | 25 |
| 1.3 Volumen de solvente o extractante | 26 |
| 1.4 Tipo de extractante | 27 |
| 1.5 Porcentaje de solvente | 29 |
| 1.6 Tiempo de extracción | 30 |
| 1.7 Potencia de extracción (W) | 31 |
| 1.8 Temperatura de extracción..... | 32 |
| 2. Estudio de correlación entre Contenido Total de Polifenoles (CTP) y Actividad Antioxidante (%) para cada una de las variables estudiadas | 34 |
| 3. Caracterización del extracto antioxidante | 46 |
| 3.1 Perfil de polifenoles | 46 |
| 3.2 Contenido de Polisacáridos..... | 51 |
| 3.3 Contenido de pigmentos fotosintéticos | 51 |
| CONCLUSIONES | 55 |
| BIBLIOGRAFÍA | 57 |

RESUMEN

El creciente interés en la obtención de antioxidantes de origen natural ha posicionado a las microalgas, y entre ellas a la cianobacteria *Arthrospira platensis*, como una potencial fuente de compuestos antioxidantes. Los procesos de extracción utilizados tradicionalmente son poco eficientes en términos de tiempo y requerimiento energético, ya que a menudo se necesita la aplicación de elevadas temperaturas durante varias horas. Por ello, se requiere del desarrollo y optimización de metodologías de extracción más respetuosas con el medio ambiente, que permitan a su vez reducir costes y el tiempo requerido en el proceso analítico. Siguiendo con este principio, en el estudio se han optimizado los parámetros del proceso de extracción asistida por ultrasonidos de diferentes compuestos antioxidantes presentes en *A. platensis*. (polifenoles, pigmentos y polisacáridos). Los parámetros estudiados fueron: Cantidad de alga, Volumen de solvente, Tipo de solvente, Porcentaje de solvente, Tiempo, Potencia y Temperatura de extracción. Para cada condición estudiada, se analizó el contenido de fenoles totales (mediante el método de Folin-Ciocalteu) y la actividad antioxidante (mediante el método DPPH). Posteriormente, se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) para determinar el perfil individual de polifenoles, y se caracterizaron los pigmentos y polisacáridos presentes en los extractos. El método optimizado proporcionó un extracto hidroalcohólico con alta actividad antioxidante (>85%) en condiciones experimentales muy convenientes.

Palabras clave: *Spirulina*, *Arthrospira platensis*, Antioxidantes, Extracción asistida por ultrasonidos, Polifenoles, Polisacáridos, Pigmentos, Optimización.

ABSTRACT

The growing interest in obtaining antioxidants from natural sources has positioned microalgae, including the cyanobacteria *Spirulina* (*Arthrospira platensis*), as a potential source of antioxidant compounds. Traditional methods used for the extraction of these compounds are inefficient in terms of time and energy requirements, since the application of high temperatures for several hours is often necessary. For this reason, the development and optimization of extraction methodologies that are more respectful for the environment are required, which also reduce the costs and the time required in the analytical processes. Therefore, the optimisation of an ultrasound-assisted extraction method is proposed to obtain a crude extract of *Arthrospira platensis* with the highest possible antioxidant activity. For this purpose, the following parameters were optimised: amount of algae, solvent volume, solvent type and concentration, ultrasound extraction time and power, as well as temperature. For each condition studied, the total phenolic content (using the Folin-Ciocalteu method) and the antioxidant activity (using the DPPH method) were analysed. Subsequently, the high-performance liquid chromatography technique (HPLC-DAD) was used to determine the individual profile of polyphenols. The pigments and polysaccharides present in the extracts were also characterized. The optimized method provided a hydroalcoholic extract with high antioxidant activity (>85%) under very convenient experimental conditions.

Key words: *Spirulina*, *Arthrospira platensis*, Antioxidants, Ultrasound Assisted Extraction, Polyphenols, Polyssacharides, Pigments, Optimization.

LISTA DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

AA: Actividad antioxidante

AFC: Alococianinas

APx: Ascorbato peroxidasa

CAT: Catalasa

COX-2: Ciclooxygenasa-2

CTP: Contenido Total de Polifenoles

EAU: Extracción Asistida por Ultrasonidos

FC: Ficocianinas

FCB: Ficocianobilina

FE: Ficoeritrina

FEB: Ficoeritrobilina

FEC: Ficoeritrocianinas

FUB: Ficourobilina

FXB: Ficobiliviolina

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GST: Glutación S-transferasa

HAT: *Hydrogen Atom Transfer*

HO: Hemo-oxigenasa

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

PX: Peroxidasa

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

SET: *Single Electron Transfer*

SOD: Superóxido dismutasa

TAS: *Total Alkali Silica*

UAE: Ultrasound Assisted Extraction

INTRODUCCIÓN

Estrés oxidativo

La oxidación es una reacción esencial del metabolismo. Durante este proceso, se forman especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres. Las especies reactivas del oxígeno son moléculas químicamente reactivas que contienen el oxígeno formado como subproducto de la fosforilación oxidativa (Machu et al., 2015).

Las ROS donan uno o más electrones desapareados a otras moléculas, produciendo radicales (Hernández Lepe et al., 2015; Yu et al., 2016). Los radicales libres son átomos, moléculas o iones con electrones desapareados o una configuración de capa abierta, como el anión superóxido y el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Yu et al., 2016).

Las ROS reaccionan con lípidos, proteínas, carbohidratos y DNA tanto en el interior celular como con componentes extracelulares, produciendo un daño en las macromoléculas orgánicas conocido como estrés oxidativo. Pueden dañar las funciones biológicas del endotelio, subendotelio, lipoproteínas y lípidos. En situaciones extremas, si la lesión es irreversible, puede llevar a la muerte celular (Hernández Lepe et al., 2015; Machu et al., 2015; Trillo, 2015; Wu et al., 2016; Yu et al., 2016).

Existen cerca de 200 patologías asociadas al estrés oxidativo causado por las ROS (Blagojević et al., 2018), como enfermedades cardiovasculares, cáncer, hipertensión, diabetes mellitus, isquemia, artritis reumatoide y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Hernández Lepe et al., 2015; Kurd y Samavati, 2015; Machu et al., 2015; Wu et al., 2016; Yu et al., 2016)

Frente al estrés oxidativo, el cuerpo humano dispone de barreras de defensa antioxidantes. Los antioxidantes mantienen la salud celular y sistémica y eliminan el exceso de radicales libres (Hernández Lepe et al., 2015; Kurd y Samavati, 2015). Las defensas antioxidantes pueden ser de tipo enzimático (a nivel intracelular) y no enzimático (a nivel extracelular). Algunas de las enzimas antioxidantes son superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST) y hemo-oxigenasa (HO). Los antioxidantes no enzimáticos se encuentran en el suero sanguíneo. Son moléculas de bajo peso molecular como las vitaminas C y E, y el ácido úrico, además de otras sustancias presentes en menor concentración como β -carotenos, bilirrubina, ubiquinona y glutatión. Estas sustancias son capaces de atrapar especies reactivas del oxígeno, consumiéndose en este proceso (Trillo, 2015). Los antioxidantes pueden retrasar o prevenir la oxidación de sustratos oxidativos celulares (Kurd y Samavati, 2015). Sin embargo, cuando los sistemas de

defensa antioxidante se debilitan (por ejemplo, por envejecimiento), se rompe el equilibrio entre generación y eliminación de radicales libres (Yu et al., 2016).

Los principales antioxidantes extracelulares son compuestos naturales que se ingieren en la dieta, como las vitaminas A, E y C y los polifenoles (Blagojević et al., 2018; Trillo, 2015), entre los cuales los fenoles muestran las actividades antioxidantes *in vitro* más altas (Blagojević et al., 2018). Precisamente, se ha propuesto introducir el consumo de antioxidantes en la dieta para disminuir la incidencia de enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Hernández Lepe et al., 2015).

En los últimos años se ha disparado la búsqueda de fuentes naturales de compuestos antioxidantes debido a que los compuestos sintéticos han mostrado efectos tóxicos, carcinógenos o mutagénicos, y también preocupan sus efectos a largo plazo (Agregán et al., 2018; Arciniegas, 2020; Blagojević et al., 2018; Valdés-Hernández et al., 2015; Yu et al., 2016). La mayoría de antioxidantes naturales disponibles comercialmente derivan de plantas terrestres. Sin embargo, los antioxidantes de origen acuático tienen un alto potencial (Agregán et al., 2018; Machu et al., 2015; Martínez-Galero et al., 2016). Blagojević et al. (2018) refieren múltiples estudios que destacan el papel de las microalgas y las cianobacterias como fuentes ricas en antioxidantes naturales.

En su estudio, Blagojević et al. (2018) comprobaron además que las cepas de *Arthrospira* exhibían una mayor actividad antioxidante en comparación con otras diez cepas de cianobacterias de los géneros *Nostoc* y *Anabaena*.

Las cianobacterias del género *Arthrospira* (*Sitzenberger ex Gomont, 1892*), (comúnmente conocida como espirulina) son microalgas azul-verdosas del orden *Oscillatoriales* (Guiry y Guiry, 2022). Las especies más conocidas comercialmente son *Arthrospira platensis*, *Arthrospira fusiformis* y *Arthrospira máxima* (Martínez-Galero et al., 2016; Wu et al., 2016).

La microalga espirulina ha sido utilizada tradicionalmente como alimento y como fuente natural de proteínas, carotenoides, ácidos grasos, vitaminas y minerales (Blagojević et al., 2018; Hernández Lepe et al., 2015; Kurd y Samavati, 2015; Martínez-Galero et al., 2016). Espirulina contiene un 60-70% de proteínas, un 30% de carbohidratos (6-12% de polisacáridos) y una variedad de vitaminas, ácidos grasos, minerales y fitoquímicos (Al-Dhabi y Valan Arasu, 2016; Martínez-Galero et al., 2016; Scaglioni et al., 2018; Wang et al., 2018). Además, se ha descubierto que produce metabolitos secundarios biológicamente activos con múltiples propiedades terapéuticas como propiedades antiproliferativas, antiinflamatorias, antiinfecciosas, y antioxidantes (Blagojević et al., 2018; Kurd y Samavati, 2015; Martínez-Galero et al., 2016; Shukla et al., 2009; Wang et al., 2018; Wu et al., 2016; Yu et al., 2016). Martínez-Galero et al. (2016) y Wu et al.

(2016) enumeran múltiples estudios y casos clínicos en los que el uso de espirulina y su potencial antioxidante aportaba beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades.

La actividad antioxidante de los componentes de esta cianobacteria ha sido objeto de varias investigaciones. El amplio espectro de actividades farmacológicas que se atribuyen a espirulina son resultado principalmente de su efecto antioxidante (Martínez-Galero et al., 2016). Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que el tratamiento con espirulina reduce significativamente el estrés oxidativo (Wu et al., 2016). Por ejemplo, la actividad antioxidante de la espirulina protege frente a la toxicidad inducida por tetracloruro de carbono, por metales, por insecticidas o por algunos fármacos. También se ha asociado la actividad antioxidante con efectos antiinflamatorios en modelos murinos (Finamore et al., 2017; Martínez-Galero et al., 2016). Además del efecto modulador sobre el metabolismo, la espirulina aumenta la actividad de enzimas antioxidantes clave como SOD, CAT, GR, GPx y GST (Asghari et al., 2016; Martínez-Galero et al., 2016). También inhibe la peroxidación lipídica y el daño al ADN, y protege frente a la neurotoxicidad y hepatonefrotoxicidad al reducir el estrés oxidativo (Wu et al., 2016). Por otra parte, no hay estudios que refieran efectos nocivos de su ingesta (Hernández Lepe et al., 2015; Martínez-Galero et al., 2016; Wu et al., 2016). La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha categorizado los productos derivados de *Arthrospira sp.* como seguros para el consumo humano, y el Comité de Expertos en Información sobre Suplementos Dietéticos (DSI-EC) concluyó que no existe un riesgo grave para la salud con el consumo de espirulina (Finamore et al., 2017; Martínez-Galero et al., 2016). Además, se consideran “de alto valor biológico” según los valores de referencia de la OMS/FAO y la legislación de algunos países (Martínez-Galero et al., 2016).

Mientras que los compuestos fenólicos como los flavonoides, los ácidos fenólicos y los taninos son los principales contribuyentes a las propiedades antioxidantes de las plantas (Abd El-Aty et al., 2014; Machu et al., 2015), algunos autores han comprobado que los compuestos fenólicos no contribuyen de manera significativa en el potencial antioxidante de las cianobacterias, ya que no hay una correlación directa entre la cantidad de fenoles detectados y la actividad antioxidante (Al-Dhabi y Valan Arasu, 2016; Blagojević et al., 2018; Santiago-Díaz et al., 2022; Shukla et al., 2009). Estos estudios demuestran que los polifenoles no son los únicos responsables de las propiedades antioxidantes.

En el caso de espirulina, la actividad antioxidante se asocia al pigmento C-ficocianina, los carotenoides y los ácidos grasos poliinsaturados (Blagojević et al., 2018; Finamore et al., 2017), aunque los ácidos fenólicos también forman parte de la producción de

antioxidantes (Agregán et al., 2018; Blagojević et al., 2018; Finamore et al., 2017; Santiago-Díaz et al., 2022). Si bien los mecanismos moleculares por los cuales la espirulina induce estas actividades no están claros, se ha determinado que la ficocianina y el β -caroteno son las moléculas más importantes (Wu et al., 2016). Espirulina contiene vitamina E (Finamore et al., 2017), y en menor proporción, vitamina C, llegando a no ser detectada en algunos estudios (Shukla et al., 2009). Respecto a los ácidos grasos, contiene ácido linoleico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido araquidónico y ácido estearidónico. Además, espirulina contiene los pigmentos clorofila A, zeaxantina, diatoxantina, 3-hidroxiéquinenona, equinenona, β -caroteno, xantofila, cantaxantina, c-ficocianina, β -criptoxantina, mixoxantofila, oscilaxantina, ficobiliproteínas y aloficocianina. También contiene tiamina, nicotinamida, piridoxina, riboflavina y ácido fólico (Al-Dhabi y Valan Arasu, 2016).

Extractos acuosos de espirulina han mostrado actividad citoprotectora significativa e inhibición de la generación de ROS inducida por t-BOOH (Shukla et al., 2009). En las últimas décadas se han utilizado compuestos nutracéuticos como terapias antioxidantes para controlar el daño oxidativo (Shyam et al., 2007).

Pese a que la actividad antioxidante de la microalga espirulina puede deberse tanto a los compuestos fenólicos como a las ficocianinas, la C-ficocianina se encuentra en mayores cantidades y se ha estudiado más *in vitro* y en modelos animales. Estudios en modelos celulares y animales demostraron que la C-ficocianina además regula la actividad de las enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GPx e inhibe la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la expresión génica de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). En estudios con humanos, el consumo de espirulina mejora marcadores de estado redox (disminución de los marcadores de peroxidación y/o aumento de las enzimas antioxidantes, TAS, GSH o vitamina C) (Finamore et al., 2017)

Algunos estudios demuestran que las algas pardas tienen mayor actividad antioxidante que las microalgas como espirulina. Por ejemplo, Agregán *et al.* (2018) evaluaron el potencial antioxidante de extractos etanólicos de tres algas pardas (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* y *Bifurcaria bifurcata*) y dos microalgas (*Chlorella vulgaris* y *Arthrospira platensis*) comparando el rendimiento de la extracción, el contenido fenólico total y la actividad antioxidante. En comparación con las macroalgas, las microalgas tienen un rendimiento menor en términos de potencial antioxidante de polifenoles. Machu et al. (2015) obtienen los mismos resultados comparando algas pardas, rojas y microalgas (incluyendo *A. platensis*). Sin embargo, la obtención de biomasa de espirulina a nivel industrial es más fácil y accesible gracias a los biorreactores, en los que además se pueden modular las condiciones de cultivo para inducir el potencial antioxidante (Agregán et al., 2018).

Los metabolitos y el contenido nutricional dependen de las condiciones de cultivo y los métodos de procesamiento (Al-Dhabi y Valan Arasu, 2016). Las condiciones ambientales fuerzan a los microorganismos a adaptarse y a acumular metabolitos de interés biotecnológico (Santiago-Díaz et al., 2022; Scaglioni et al., 2018). Por ejemplo, Liu et al. (2016) investigaron la influencia de salinidad sobre cepas de espirulina tolerantes. La producción en masa de espirulina normalmente se lleva a cabo en medio Zarrouk utilizando agua dulce. Sin embargo, comprobaron que utilizando medio modificado (con 600Nm de NaCl), las cepas producían más caroteno, ficocianina, polisacáridos y otros antioxidantes por efecto del estrés salino. Además de la acumulación de sustancias bioactivas, aumentaba la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y peroxidasa. Las cepas sometidas a estrés mostraron mayor capacidad antioxidante total que el control. Además, la utilización de agua de mar esterilizada evita los riesgos que supone utilizar aguas superficiales (contaminación con pesticidas, metales pesados y otros contaminantes). Otro ejemplo es el estímulo de producción de compuestos bioactivos mediante el cultivo de *Arthrospira platensis* en un medio suplementado con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), descrito en Wu et al. (2016). Se ha establecido una correlación positiva entre el aumento de las concentraciones de H_2O_2 y la cantidad de antioxidantes lipofílicos celulares (carotenoides totales y α -tocoferol) y antioxidantes hidrofílicos (glutati3n y ácido asc3rbico). Además, tambi3n se ha determinado un aumento lineal significativo en las actividades de las enzimas antioxidantes de espirulina: CAT, peroxidasa (PX), SOD y ascorbato peroxidasa (APx).

Los productos derivados de las microalgas tienen aplicaciones en muchos sectores industriales, incluyendo alimentaci3n, producci3n de piensos, industria cosm3tica, farmac3utica y producci3n de biocombustibles. Teniendo en cuenta todo el potencial de aplicaciones y a pesar de la rica biodiversidad de microalgas, cabe destacar que se explotan muy pocas especies desde el punto de vista biotecnol3gico (Santiago-Díaz et al., 2022). Esto ha llevado a que se fije la atenci3n en la exploraci3n de compuestos bioactivos que podrían contribuir al crecimiento de la economía azul (Agregán et al., 2018; Ćagalj et al., 2022).

Efecto antioxidante de los polifenoles

Los polifenoles son compuestos bioactivos. Hay amplias evidencias epidemiol3gicas, estudios *in vitro*, en modelos animales e intervenciones en humanos que muestran su potencial (Ram3n y Gil-Garz3n, 2021).

Estructuralmente, los compuestos fen3licos se dividen en fenoles simples y polifenoles. Los polifenoles contienen uno o m3s grupos fenoles, y se dividen en xantonas,

estilbenos, antraquinonas, lignanos y flavonoides (Trillo, 2015). El contenido de polifenoles varía en función de la especie y de factores ambientales y de crecimiento (Blagojević et al., 2018).

Los compuestos fenólicos han mostrado potencial antioxidante (Coulombier et al., 2021; Ramón y Gil-Garzón, 2021; Santiago-Díaz et al., 2022), lo que hace interesante su extracción de manera selectiva (Luisetti et al., 2020; Machu et al., 2015). Permiten desde prolongar la vida útil de alimentos previniéndolos de la oxidación, hasta proteger frente al estrés oxidativo en sistemas biológicos (Luisetti et al., 2020; Sansone y Brunet, 2019).

La capacidad de los polifenoles para actuar como antioxidantes depende de la estructura de los compuestos, así como de la cantidad y ubicación de grupos hidroxilos (-OH) en ellos (Agregán et al., 2018). Al estar unidos a un anillo bencénico, los grupos hidroxilos confieren al polifenol la habilidad para actuar, ya sea como donante de un átomo de hidrógeno, *Hydrogen Atom Transfer* (HAT) o como donante de un electrón, *Single Electron Transfer* (SET) a un radical libre (u otras especies reactivas) (Machu et al., 2015; Trillo, 2015). Se ha comprobado que las células con compuestos fenólicos en su constitución son más resistentes al daño oxidativo ya que algunos compuestos actúan como inhibidores de la hidrolasa y la oxidoreductasa (Scaglioni et al., 2018).

Además, algunos polifenoles de tipo flavonoides pueden reaccionar con metales de transición como el cobre y el hierro, evitando la formación de radicales libres hidroxilo (a partir de peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton) y superóxido (a partir de oxígeno molecular) que, de otra manera, catalizarían ambos metales al estar en su estado libre y reducido (redox-activos). Por tanto, aportan un efecto antioxidante a través del mecanismo de quelación de metales (Trillo, 2015).

Los estudios que valoran el potencial antioxidante de las microalgas presentan resultados contradictorios (Agregán et al., 2018). Algunos estudios demuestran que la capacidad antioxidante de las algas se debe en gran parte a los polifenoles (Agregán et al., 2018; Finamore et al., 2017; Santiago-Díaz et al., 2022). Otros, por el contrario, no encuentran correlaciones entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de extractos etanólicos de varias microalgas (Al-Dhabi y Valan Arasu, 2016; Blagojević et al., 2018; Maadane et al., 2015; Santiago-Díaz et al., 2022; Shukla et al., 2009).

A pesar de que algunos autores han comprobado que los compuestos fenólicos no contribuyen de manera significativa en el potencial antioxidante de las cianobacterias, ya que no hay una correlación directa entre la cantidad de fenoles detectados y la actividad antioxidante, los flavonoides proporcionan otros muchos beneficios como propiedades antivirales, antiinflamatorias y antitumorales, además del potencial antioxidante (Blagojević et al., 2018).

Shukla et al. (2009) identificaron en un extracto metanólico de espirulina compuestos fenólicos como los ácidos salicílico, transcinámico, sináptico, clorogénico, y cafeico, y propusieron que podían ser responsables de su actividad antioxidante. Sin embargo, realizaron una correlación entre Contenido Total de Polifenoles y Actividad Antioxidante que demostró que las propiedades antioxidantes se debían a otros compuestos no identificados. Machu et al. (2015) detectaron mediante HPLC que los compuestos fenólicos más abundantes en extractos de espirulina fueron pirocatecol, hidrato de catequina y epicatequina.

Por ello, la determinación de compuestos fenólicos como moléculas individuales en los extractos en lugar del contenido total de polifenoles es clave para determinar la actividad antioxidante (Agregán et al., 2018).

Efecto antioxidante de pigmentos

Espirulina contiene varios pigmentos, entre los que se encuentran los carotenoides (entre ellos, el β -caroteno o la zeaxantina), la clorofila, o las ficocianinas (entre ellas la C-ficocianina) (Asghari et al., 2016).

Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son macromoléculas biológicas cuya estructura está formada por un complejo de proteína y un grupo cromóforo (ficobilinas). Las ficobiliproteínas se dividen en cuatro grandes grupos en función de sus propiedades espectroscópicas (Moreno, 2016):

- Ficoeritrinas (FE): presentan máximos de absorción entre 540-570 nm. Tienen un color rojo o naranja fluorescente. Las FE se clasifican en ficoeritrobilina (FEB) y ficourobilina (FUB). Tienen dos o tres ficobilinas en la subunidad α y tres en la subunidad β .
- Ficocianinas (FC): los máximos de absorción son 610-620 nm. Se caracterizan por su color azul debido a la ficocianobilina (FCB), su cromóforo. Tienen un cromóforo en la subunidad α y dos en la subunidad β . La R-Ficocianina es una ficocianina especial que además de FCB posee FEB.
- Aloficocianinas (AFC): sus máximos de absorción están entre 650-655 nm. Son de color púrpura y su cromóforo es la ficocianobilina (FCB). Tienen un FCB en la subunidad α y otro en la subunidad β .

- Ficoeritrocianinas (FEC): sus máximos de absorción se sitúan entre 570 y 595 nm. Solamente unas pocas cianobacterias presentan este grupo. Sus cromóforos son FCB y ficobiliviolina (FXB).

La cianobacteria espirulina es rica en ficocianina. La ficocianina es una mezcla compleja de monómeros, trímeros, hexámeros y otros oligómeros. Hay dos tipos de ficocianinas: la C-Ficocianina, cuyo cromóforo se denomina ficocianobilina (FCB), y R-Ficocianina, que además de ficocianobilina contiene ficoeritrobilina (Moreno, 2016). El color azul intenso de la ficocianina se debe al cromóforo ficocianobilina (Wu et al., 2016).

La C-Ficocianina es una de las principales biliproteínas de la espirulina, representando el 20% de su peso seco. Tiene una potente actividad antioxidante ya que es capaz de capturar los radicales libres hidroxilo, alcoxilo y peroxilo, involucrados en los procesos de lipoperoxidación y citotoxicidad. Además suprime la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y reduce la producción de nitritos (Asghari et al., 2016; Martínez-Galero et al., 2016). La C-ficocianina, como antioxidante, es 16 y 20 veces más eficaz que el trolox y el ácido ascórbico, respectivamente (Martínez-Galero et al., 2016). Las propiedades antioxidantes y de eliminación de radicales libres se atribuyen al cromóforo ficocianobilina (Asghari et al., 2016; Wu et al., 2016). De hecho, la hidrólisis por tripsina de la ficocianina reveló que la porción de apoproteína de la molécula es la que hace una contribución significativa a su actividad antioxidante (Zhou et al., 2005). Wu et al. (2016) refieren ensayos en los que se demuestra el potencial de la ficocianobilina aislada. La ficocianobilina tiene una estructura química similar a la bilirrubina, que es un inhibidor altamente específico de la NADPH oxidasa, y como ella, también reduce significativamente su actividad. La pureza de la C-ficocianina es el factor esencial que determina su actividad (Pez Jaeschke et al., 2021).

La ficocianina es soluble en agua y se puede extraer fácilmente como un complejo proteína-pigmento (Asghari et al., 2016; Moreno, 2016). La estabilidad de la ficocianina durante el proceso de extracción depende de parámetros como el pH y la fuerza iónica, y los procesos posteriores de separación y purificación son cruciales para evitar la degradación, que está influenciada por la luz, la temperatura, el pH y la concentración de proteínas (Moreno, 2016; Pez Jaeschke et al., 2021). A su vez, la actividad antioxidante de las ficocianinas varía en función de diferentes factores. Zhou et al. (2005) comprobaron que las ficocianinas generaban radicales hidroxilo en presencia de luz y que los eliminaban en oscuridad.

La aloficocianina también es una ficobiliproteína importante en espirulina, cuyo papel es la transferencia de energía a las moléculas de clorofila. También muestra una fuerte actividad antioxidante (Wu et al., 2016).

Carotenoides

Espirulina contiene carotenos y varios carotenoides, que tienen una gran actividad antioxidante, sobre todo en presencia de luz (Asghari et al., 2016).

El principal carotenoide en espirulina es el β -caroteno, que tiene efectos antioxidantes y protege frente a la peroxidación de lípidos mediada por oxígeno. Es considerado un eficaz antioxidante de membrana. Bloquea directamente la acumulación intracelular de ROS en las células e induce cambios en el estado redox intracelular, que a su vez regula la función inmunitaria de los macrófagos. Por tanto, además del potencial antioxidante, los pigmentos de la espirulina poseen actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora (Wu et al., 2016).

Otros carotenoides presentes en espirulina son la zeaxantina, la β -criptoxantina, la mixoxantofila y la equinenona. (Asghari et al., 2016).

Clorofila

La clorofila presente en espirulina también tiene propiedades antioxidantes. Derivados de la clorofila, como la feoforbida B y la feofitina B son potentes antioxidantes (Asghari et al., 2016).

Efecto antioxidante de polisacáridos

Los polisacáridos son estructuras poliméricas de carbohidratos. El porcentaje de carbohidratos varía ampliamente entre diferentes especies de microalgas. Además, los porcentajes pueden variar según el proceso de secado por el cual se obtiene la biomasa algal (Santiago-Díaz et al., 2022). La mayor parte de los carbohidratos presentes en espirulina son polisacáridos. En función de su estructura, los polisacáridos pueden tener propiedades diferentes (Chaiklahan et al., 2013).

Los polisacáridos tienen una alta actividad biológica (Kurd y Samavati, 2015). Los polisacáridos de las microalgas son una fuente de compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes, pero también antifúngicas, antivirales, antibacterianas, antitumorales, antiinflamatorias e inmunomoduladoras, entre otras (Amna Kashif et al., 2018; Santiago-Díaz et al., 2022; Wang et al., 2018). También se ha comprobado que los polisacáridos de espirulina mejoran la actividad enzimática del núcleo celular y la reparación de ADN (Kurd y Samavati, 2015).

Los polisacáridos de *Spirulina (Arthrospira) platensis* (SPP, *Spirulina platensis polysaccharides*) son un tipo de polisacáridos solubles en agua que tiene amplias aplicaciones, entre ellas actividad antioxidante. Wang et al. (2018) estudiaron cuatro métodos de extracción para determinar el método óptimo para obtener PSP y evaluaron su actividad antioxidante. Las actividades de los polisacáridos varían en función de la forma y la estructura. Por tanto, la estructura debe mantenerse intacta durante el proceso de extracción. Se requiere un método que rompa las paredes celulares (como la extracción mediada por ultrasonidos). Los métodos de extracción comunes incluyen extracción con agua, precipitación con alcohol, extracción con base ácida, extracción mediada por ultrasonidos, congelación-descongelación e hidrólisis enzimática (Wang et al., 2018).

En los métodos extracción por solventes, el tiempo y temperatura de extracción, el número de repeticiones y la proporción sólido-líquido se consideran los factores más importantes que afectan al rendimiento de los polisacáridos (Chaiklahan et al., 2013).

Wang et al. (2018) obtuvieron en torno a un 10% de polisacáridos en los extractos de espirulina. Los principales monosacáridos presentes son glucosa, ramnosa y xilosa.

Chaiklahan et al. (2013) propusieron que los compuestos fenólicos, que se sintetizan como metabolitos secundarios, son los verdaderos contribuyentes a la capacidad antioxidante, ya que pueden estar vinculados a varios polisacáridos componentes de las células.

Química verde y extracción de compuestos

Hay diversos métodos de extracción de compuestos antioxidantes. Algunos de los métodos utilizan solventes orgánicos como el etanol, metanol, cloroformo, diclorometano, éter y acetona (Arciniegas, 2020). Parte de estos compuestos son tóxicos y perjudiciales tanto para el medio ambiente como para la salud (Agregán et al., 2018; Arciniegas, 2020; Medina, 2017; Ramón y Gil-Garzón, 2021). Además, cuando los extractos van dirigidos a un uso médico o alimenticio, los solventes deben eliminarse (como recoge por ejemplo el Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, por el que se aprueba la lista positiva de los disolventes de extracción que se pueden utilizar en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes, y el contenido máximo en residuos de los productos alimenticios). En ocasiones los procesos de separación son difíciles, lentos y costosos económicamente (Medina, 2017; Munir et al., 2018). Asimismo, la eliminación de compuestos volátiles implica un aumento de temperatura, lo que supone un riesgo de degradación de los compuestos termosensibles (Ramón y Gil-Garzón, 2021).

Además, los métodos de extracción tradicionales (como la extracción Soxhlet o los métodos sólido-líquido) conllevan tiempos de extracción largos y con grandes requerimientos energéticos (en ocasiones de hasta 24h en agitación y a temperatura controlada, como en los protocolos de Shukla et al. (2009), Azmir et al. (2013), y Luisetti et al. (2019)). El alto consumo energético y el tiempo prolongado se traducen en gastos económicos elevados (Agregán et al., 2018; Ramón y Gil-Garzón, 2021).

Estos protocolos de extracción, además de ser poco eficientes energéticamente, pueden causar la degradación o pérdida de actividad de determinados biocompuestos (Agregán et al., 2018; Belwal et al., 2018; Ramón y Gil-Garzón, 2021). Arciniegas (2020) señala que hay una necesidad de nuevas técnicas de extracción, solventes menos dañinos, y procedimientos que permitan un rendimiento más eficiente y la obtención de compuestos bioactivos de mayor calidad.

En respuesta a esta demanda se establecen protocolos basados en los doce principios de la química verde, publicados en 1998 por Anastas y Warner, que proponen diseñar los procesos químicos de forma eficiente, con materias primas naturales, usando sustancias auxiliares (como solventes) inocuas o menos peligrosas o tóxicas para el medio ambiente, previniendo la generación de residuos, y mejorando la eficiencia energética (Anastas y Warner, 1998). Ajustándose a esos principios, se obtienen métodos de extracción eficientes en cuanto a rendimiento, capacidad antioxidante y costos de operación, además de sostenibles para el medio ambiente (Ramón y Gil-Garzón, 2021).

Se han realizado estudios evaluando el potencial antioxidante de vitaminas (C y E) y compuestos fenólicos totales obtenidos a partir de extractos acuosos y alcohólicos de espirulina (Shukla et al., 2009) que demuestran que se obtienen mejores rendimientos a partir de extractos alcohólicos. La extracción por solventes de compuestos bioactivos es una tecnología de bajo costo muy utilizada en la obtención de compuestos utilizados como aditivos o productos nutracéuticos de origen vegetal (Luisetti et al., 2020).

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) es una de las técnicas más económicas, rápidas, sencillas, versátiles, con menor tiempo de extracción, menor consumo de energía y de solvente y mayor eficiencia en comparación con la extracción convencional (Agregán et al., 2018; Kurd y Samavati, 2015; Medina, 2017), además de ser sostenible medioambientalmente (Ramón y Gil-Garzón, 2021). Esta técnica es fácilmente implementable a nivel industrial. Se ha utilizado ampliamente en la extracción de compuestos de interés de diferentes matrices debido a la transferencia facilitada de masas entre fases inmiscibles a través de agitación a baja frecuencia (Agregán et al.,

2018; Yan et al., 2011) y su capacidad para preservar la actividad biológica de los compuestos extraídos (Ramón y Gil-Garzón, 2021).

La eficacia de la extracción por ultrasonidos se debe al fenómeno de cavitación, que provoca la destrucción de las paredes celulares y la liberación de compuestos intracelulares, la reducción de tamaño de las partículas y la mejora de la transferencia de masas (Agregán et al., 2018; Kurd y Samavati, 2015; Medina, 2017; Wen et al., 2011).

Por ello, en este estudio se propone optimizar los parámetros de un protocolo de extracción mediada por ultrasonidos de compuestos bioactivos con el que obtener la máxima actividad antioxidante en tiempos cortos, con bajos requerimientos de biomasa, solventes y energía, de forma que el procedimiento sea limpio y altamente eficiente.

En el protocolo de extracción y cuantificación de metabolitos, se deben considerar varios factores, como el tratamiento previo de las microalgas, las condiciones de cultivo, obtención, secado y almacenamiento, las condiciones de hidrólisis (tiempo, temperatura, concentración de solvente) y los métodos de extracción mecánicos o químicos. (Agregán et al., 2018; Blagojević et al., 2018; Machu et al., 2015; Santiago-Díaz et al., 2022; Soto-Sierra et al., 2018).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el potencial de la microalga *Arthrospira platensis* como fuente de antioxidantes que podrían ser empleados frente al daño por estrés oxidativo.

Como objetivos secundarios:

- Optimizar del método de extracción de compuestos antioxidantes de la microalga *A. platensis* a fin de obtener el extracto con mayor actividad posible. Ensayo de las variables: Cantidad de alga (g), Volumen de solvente (ml), Tipo de solvente, Porcentaje de solvente (%), Tiempo (min), Potencia (W) y Temperatura (°C) de extracción en ultrasonidos, y su efecto en la actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales.
- Estudiar la correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante.
- Caracterizar las diferentes sustancias antioxidantes presentes en el extracto optimizado. Se determinan: el perfil individual de polifenoles, el contenido total en polisacáridos y la concentración de pigmentos fotosintéticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. REACTIVOS

El extractante se preparó a partir de etanol absoluto $\geq 99.5\%$, TechniSolv®, puro (Distribuido por VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Francia) y agua destilada desionizada, de Adesco S.A (Barcelona, España). Para los análisis colorimétricos se utilizaron metanol para HPLC, $\geq 99,9\%$ CHROMASOLV™, de Honeywell Riedel-de Haën™ (Seelze, Alemania); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) de Sigma-Aldrich® (Steinheim, Suiza); reactivo Folin-Ciocalteu para diagnóstico clínico, de PanReac AppliChem ITW Reagents (Castellar del Vallès, España) y sodio Carbonato anhidro (Na_2CO_3) (Reag. USP, Ph. Eur.) para análisis, ACS, de PanReac AppliChem ITW Reagents (Castellar del Vallès, España). Para el test de DuBois se utilizó fenol PA-ACS, de PanReac AppliChem ITW Reagents (Castellar del Vallès, España), ácido sulfúrico 95-98%AGR de Labkem (Labbox, Barcelona, España). Para la configuración del HPLC se utilizó metanol y ácido fórmico de Panreac (Barcelona, Spain).

2. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Los pesajes se realizaron con una balanza de precisión Entris®, de Sartorius (Goettingen, Alemania). Para los extractos se utilizaron un baño de ultrasonidos termostatzado, modelo ATM10L de OVAN® (Barcelona, España) y una centrífuga de la serie HERAEUS Megafuge™ 16R, de Thermo Scientific™. Los análisis se realizaron utilizando un vórtex modelo Vibramix-R de OVAN® (Barcelona, España), una plataforma magnética modelo MBG05E de OVAN® (Barcelona, España); y un espectrofotómetro NANOCOLOR UV/VIS II, de MACHEREY-NAGEL (Düren, Alemania). Para la cromatografía se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) LaChrom Elite® system de VWR-Hitachi, compuesto por: Column Oven L-2300 (LaChrom Ultra® system de VWR-Hitachi); Autosampler L-2200U (LaChrom Ultra® system de VWR-Hitachi); Bomba L-2130 (LaChrom Elite® system de VWR-Hitachi); Detector de Diodo Array L-2455 (LaChrom Elite® system de VWR-Hitachi). La columna utilizada fue una columna de fase reversa LiChrospher® 100 RP- 18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) (Darmstadt, Alemania). Para la preparación de los reactivos para el test de DuBois se utilizó una campana de gases OR-ST 1200 de Burdinola (Bizkaia, España) y un baño ultrasonidos de J.P Selecta S.A. (Barcelona, España).

3. PROCEDIMIENTOS

Extracción de sustancias antioxidantes Asistida por Ultrasonidos

Los extractos se obtuvieron a partir de espirulina en polvo (*Arthrospira platensis*) de la marca Sevenhills Wholefoods (Dublin, Irlanda). Se pesaron 7g de espirulina en una balanza de precisión con ayuda de un zapatito. Se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de cuello estrecho de 100ml (LBG, de Labbox Labware, S.L, Premià de Dalt, España). Con una pipeta graduada de plástico y una pera de goma, se añadieron al matraz 20ml de etanol 50% (V/V). Para facilitar la integración del solvente, se removió con ayuda de una espátula hasta observar que el alga quedaba totalmente empapada por la solución. Una vez mezclado, se selló el matraz con Parafilm M® de Bemis™ (USA). Este proceso se repitió por triplicado.

Para la extracción con el baño de ultrasonidos, se configuró a 75W y 25°C. Se introdujeron los matraces y se sometieron a ultrasonidos durante 1 minuto. Tras el minuto, se sacaron del baño y se transfirió el contenido a tubos falcon de 50ml.

Se centrifugó a 2000 x g durante 20 minutos a 22°C. Tras el centrifugado, el sobrenadante se filtró con jeringas de 20ml (Injekt® Luer Solo, de B.BRAUN (Melsungen, Alemania)) y filtros de jeringa de nylon, con poro 0,45µm, ø25mm. (Branchia SFNY-245-100, de Labbox Labware, S.L. (Premià de Dalt, España). El extracto filtrado se recogió en tubos falcon de 15ml para conservarlo hasta la realización de los análisis.

Determinación de la Actividad Antioxidante (%) mediante DPPH

La actividad antioxidante de los extractos fue determinada mediante el método DPPH.

El ensayo DPPH (Blois, 1958) se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), que muestra una coloración violeta característica a 515 nm, en solución metanólica. La molécula de DPPH contiene un electrón desapareado que se conjuga aceptando un hidrógeno y reduciéndose, provocando un cambio de coloración característico de morado a amarillo. Por tanto, cuando la disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno (como un compuesto antioxidante), se produce la forma reducida de DPPH-H, con la consecuente pérdida de color y absorbancia (Figura 1) (Kurd y Samavati, 2015; Trillo, 2015).

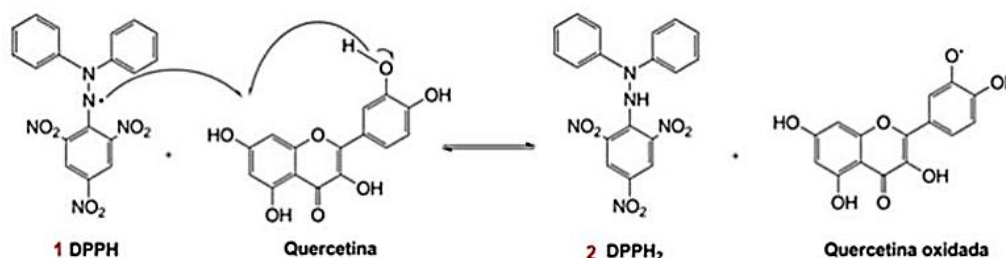


Figura 1: Mecanismo de la reacción de inhibición del radical DPPH por presencia de grupos –OH en compuestos polifenólicos, debido a su capacidad para actuar como donador de átomos de Hidrógeno (Hydrogen Atom Transfer, HAT). Fuente: Trillo (2015).

La cuantificación de la pérdida de absorbancia sirve para medir *in vitro* el porcentaje de inhibición de radicales libres, y por lo tanto, la actividad antioxidante, mediante la ecuación:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{(Abs_i - Abs_f)}{Abs_i} \times 100$$

Para la determinación de la actividad antioxidante de los extractos, en primer lugar se elaboró la disolución de DPPH 0,1 mM pesando 0,0039g de reactivo en una balanza de precisión y disolviéndolo en 100ml de metanol al 100% (calidad HPLC) en un matraz aforado. Puesto que el DPPH es fotosensible, se cubrió el matraz con papel de aluminio y se puso en agitación para disolverlo con ayuda de un pez sobre una plataforma magnética hasta su utilización.

Para el ensayo, se depositaron 0,5 ml de cada muestra en tubos de ensayo de vidrio, preparando además un control con 0,5ml de metanol 100%. A los tubos se adicionaron 5ml de la disolución de DPPH preparada. Se taparon los tubos con Parafilm® para evitar la evaporación del metanol, se agitaron en un vórtex para favorecer que la muestra entre en contacto con el reactivo, y se mantuvieron en oscuridad durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se filtraron de nuevo las muestras con jeringas de 10ml Ecoject® Luer, de Chirana T. Injecta, a.s. (Stará Tura, Eslovaquia) y filtros de jeringa de nylon de 0,45µm y se midió la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 515nm. El blanco se realizó con metanol al 100%.

Con los datos de absorbancia obtenidos, se realizó el cálculo de la actividad antioxidante (%).

Determinación del Contenido Total de Polifenoles (TPC/CTP)

El contenido total de polifenoles se determinó mediante una variante del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). El método se basa en la reducción en un medio alcalino de una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3W_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) por la acción de los polifenoles presentes en la muestra, produciéndose óxidos azules de Tungsteno (W_8O_{23}) y Molibdeno (Mo_8O_{23}) (Lamuela-Raventós, 2018; Luisetti et al., 2020; Trillo, 2015).

La concentración de fenoles totales se expresa como mg de Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por unidad de volumen. El ácido gálico es un fenol natural que se utiliza como estándar en las curvas patrón para los ensayos de Contenido Total de Polifenoles (TPC) debido a su alta solubilidad en agua, bajo costo y amplia disponibilidad comercial (Belda, 2017; Trillo, 2015).

La cuantificación del Contenido Total de Polifenoles se realizó siguiendo el método descrito por Julkunen-Tiitto (1985). En tubos de ensayo se vidrio, se adicionaron 100 μ l de la muestra extracto, 8,4 ml de agua destilada, y 500 μ l del reactivo Folin- Ciocalteu. La mezcla se mantuvo en oscuridad durante 5 minutos para que se llevase a cabo la reacción. Transcurrido el tiempo, se adicionó 1ml de una disolución de carbonato de sodio anhidro al 20% (p/v) para aportar las condiciones de alcalinidad. Los tubos se sellaron con Parafilm®. La mezcla se vorteoó y se mantuvo en reposo en oscuridad a temperatura ambiente durante una hora (Julkunen-Tiitto, 1985). El blanco se realizó de la misma manera, utilizando 100 μ l de agua destilada en lugar de extracto.

Tras el tiempo de reposo, se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765nm. Para expresar los resultados, se tomó como referencia una curva de calibrado de equivalencia de ácido gálico realizada por el grupo de investigación. La ecuación de regresión de la curva fue ($y = 0,0127x + 0,0118$). Los resultados obtenidos se expresaron como equivalentes de ácido gálico (EAG) por ml (mg EAG/ml).

Determinación del perfil de polifenoles individuales mediante HPLC-DAD

Para la determinación de polifenoles se realizó un análisis cromatográfico con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa acoplado a un detector de diodo array (DAD).

La separación de polifenoles se realizó con una columna de fase reversa C18. Para la fase móvil se empleó un sistema de gradiente con dos eluyentes: el eluyente A, agua

miliQ + 0.1% de ácido fórmico, y B, metanol (100%, calidad HPLC) con la siguiente configuración: 0-4 min, gradiente isocrático 90:10; 4-35 min, gradiente lineal 50:50, con un flujo de 1ml/min de caudal y medición a longitudes de onda 270nm, 324nm y 373nm. El volumen de inyección fue de 60 µl de extracto crudo. El sistema operó a una temperatura de 27°C. Asimismo, la identificación y cuantificación de los polifenoles presentes en las muestras se realizó por comparación de los cromatogramas a las diferentes longitudes de onda predeterminadas previamente, áreas y tiempos de retención de los picos respecto a los patrones de polifenoles elaborados previamente por el grupo de investigación (Belda, 2016; Sanchez-Bonet et al., 2021).

Determinación de pigmentos mediante espectrofotometría de absorción UV Visible

Se realizó la cuantificación de los pigmentos ficoeritrina (FE), C-ficocianina (C-FC) y aloficocianina (AFC). La FE absorbe luz a 495nm y en un rango de 540-570nm; la C-FC se localiza entre 610-620 nm y la APC absorbe en el rango de 650-655 nm. Por ello, se midió la absorbancia de los extractos por triplicado a las longitudes de onda 566nm, 620nm y 650nm, y a 280nm para cuantificar la pureza del extracto. Para la determinación de las concentraciones se emplearon las siguientes fórmulas (Bryant, 1982):

$$C - FC (mg \times ml^{-1}) = A_{620} - 0,72 A_{650} / 6,29$$

$$AFC (mg \times ml^{-1}) = A_{650} - 0,191 A_{620} / 5,79$$

$$C - FE (mg \times ml^{-1}) = A_{565} - 2,41 [FC] - 1,40 [AFC] / 13,02$$

Los criterios de pureza son determinados estudiando las siguientes relaciones:

- C-ficocianina: $A_{620}/A_{280} > 4,0$ indica la pureza de la preparación con respecto al resto de proteínas.
- Ficoeritrina: $A_{565}/A_{280} > 4,0$ indica la pureza de la preparación con respecto al resto de proteínas y $A_{620}/A_{565} < 0,005$ indica contaminación con R-ficocianina.
- Aloficocianina: $A_{650}/A_{280} > 4,0$ indica la pureza de la preparación con respecto al resto de proteínas y $A_{650}/A_{620} > 1,25$ indica la relación de la AFC con la C-ficocianina.

Para la cuantificación de clorofila, se midió la absorbancia del extracto a 645 y 663 nm (utilizados para el cálculo de la concentración de las clorofilas a y b; y 750nm para medir

la turbidez de la muestra. Las concentraciones de pigmento, expresadas en $\mu\text{g/ml}$, se calculan según las fórmulas de Hipkings y Baker, (1986):

$$Cl\ a\ (\mu\text{g}\ x\ \text{ml}^{-1}) = 12,7\ A_{663} - 2,69A_{645}$$

$$Cl\ b\ (\mu\text{g}\ x\ \text{ml}^{-1}) = 22,9\ A_{645} - 4,86A_{663}$$

$$\text{Clorofila total}\ (\mu\text{g}\ x\ \text{ml}^{-1}) = 20,2\ A_{645} + 8,02\ A_{663}$$

Hipkings y Baker (1986) también presentan la ecuación para la determinación de carotenos (Hipkins y Baker, 1986):

$$\text{Carotenos}\ (\mu\text{g}\ x\ \text{ml}^{-1}) = 10\ A_{480}$$

Determinación de polisacáridos mediante test de DuBois.

Para la determinación de azúcares, se realizó el método de DuBois et al. (1956). Se tomaron 2ml del extracto en un tubo de ensayo y se adicionó 1ml de una solución de fenol al 5% preparada previamente en una campana de gases. Posteriormente, se agregaron 5ml de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos de ensayo se dejaron en reposo durante 10 min, tras los cuales se vortearon 30s y se colocaron en un baño de agua con hielo durante 20 min para el desarrollo de la reacción. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 490nm para la determinación de hexosas. Los ensayos se hicieron por triplicado. El blanco y la solución patrón se prepararon asimismo siguiendo el protocolo y usando glucosa como estándar. Las concentraciones de polisacáridos se calcularon utilizando la ecuación de la recta patrón desarrollada previamente por el grupo de investigación.

Análisis estadístico

En la literatura consultada se encontraron múltiples propuestas para la extracción de polifenoles con actividad antioxidante. Las metodologías difieren en variables de operación como la temperatura y tiempo de extracción, el tipo de disolvente, la relación soluto-solvente, etc. La combinación apropiada de todos los parámetros es fundamental para lograr mejores resultados en cuanto al contenido de polifenoles y otras sustancias antioxidantes (Valdés-Hernández et al., 2015).

Por ello, se realizó la optimización de 7 variables del método. Para cada variable, se estudió el efecto de la variación de los parámetros de cada variable individualmente sobre la actividad antioxidante y se cuantificó el CTP.

Para determinar el parámetro óptimo en cada ensayo de variable, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey, con un nivel de significación de $\alpha=0,05$. Por otra parte, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el p-valor (p) para estudiar la correlación entre la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles. Se utilizaron los Softwares InfoStat® 2020 (Di Rienzo et al., 2020), IBM SPSS Statistics y el programa Excel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Optimización del método de Extracción Asistida por Ultrasonidos

1.1 Valoración del ultrasonidos como método óptimo de extracción

Espirulina es una cianobacteria eurioica, ya que es capaz de adaptarse a gran cantidad de ambientes y ecosistemas. Se han aislado especies de *Arthrospira* en una variedad de ambientes que incluyen suelo, arena, pantanos y aguas dulce, marina y salobre (Ciferri, 1983). Dentro del género hay especies que crecen en aguas con pH y/o salinidad elevados, especies marinas y especies dulceacuícolas (Nowicka-Krawczyk et al., 2019). Para adaptarse, los microorganismos generan y acumulan metabolitos de gran interés desde un enfoque biotecnológico (Malavasi et al., 2020).

Para que los metabolitos sean accesibles es necesario romper la membrana celular. La espirulina es una cianobacteria gram negativa, por lo que presenta una membrana celular interna, una delgada pared de peptidoglicano, y una segunda membrana celular externa (Vonshak, 2002 p.6-16). La eficacia y eficiencia de los métodos de disrupción celular dependen de la especie estudiada, el tipo de pared celular que posea y su estado fisiológico (Santiago-Díaz et al., 2022).

Para la obtención de compuestos bioactivos en materiales vegetales permeables, la extracción por solventes es una tecnología de bajo costo muy utilizada para obtener compuestos utilizados como aditivos o productos nutraceuticos (Luisetti et al., 2020).

En comparación con los métodos convencionales de extracción, la extracción asistida por ultrasonidos (EAU) es una de las técnicas más baratas, rápidas, simples y eficientes. Además, conlleva un menor requerimiento de solvente y de energía. Desde un punto de vista industrial, es más eficiente que los métodos tradicionales como el sólido-líquido que se mantiene hasta veinticuatro horas en agitación, o el método Soxhlet, que utiliza solventes orgánicos tóxicos y se alarga hasta veinte horas (Ramón y Gil-Garzón, 2021). Es una técnica ampliamente utilizada para la extracción de compuestos porque facilita la transferencia de masas. El efecto de cavitación provoca la ruptura de las paredes celulares y la reducción del tamaño de partícula (Agregán et al., 2018; Kurd y Samavati, 2015).

Kröger *et al.* (2019) estudiaron varios métodos de extracción sobre una microalga y establecieron que la liofilización era un procedimiento muy eficiente puesto que rompía la pared celular permitiendo altos rendimientos de extracción. Además, esta técnica no daña compuestos sensibles de con alta actividad antioxidante como las ficocianinas (Pez Jaeschke et al., 2021). Sin embargo, es una técnica compleja que requiere de equipamiento especializado como sistemas frigoríficos, sistemas de vacío, sistemas

hidráulicos, fluidos térmicos y sistemas de limpieza y esterilización (Kawasaki et al., 2019). Además de mantener un control estricto de las variables, se deben incluir excipientes lioprotectores (Rey y May, 2016). Por ello, el ultrasonidos se posiciona como una técnica más simple y con menos requerimientos en términos de tiempo y coste energético, lo que se traduce en un menor coste económico.

Arciniegas (2020) señala que la extracción líquida presurizada es una técnica escogida por muchos autores para extraer compuestos activos por su baja toxicidad y tiempos de extracción cortos. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante ultrasonidos muestran una mayor eficiencia de extracción.

Por último, existen tecnologías emergentes como la extracción con fluidos supercrítico o la extracción asistida con pulso, aunque no se pueden contemplar como alternativa porque implica altos costes de operación y no se implementa a nivel industrial (Ramón y Gil-Garzón, 2021).

Por todo lo expuesto anteriormente, la extracción asistida por ultrasonidos es una técnica muy adecuada para obtener compuestos activos de una forma sencilla, barata y eficiente. Pese a que Agregán et al. (2018) señalaran que los rendimientos y actividades antioxidantes que habían obtenido con su protocolo de extracción asistida por ultrasonidos no eran satisfactorios, el protocolo que se ha optimizado en este estudio logró obtener una gran actividad antioxidante bajo condiciones muy apropiadas.

En cuanto al procedimiento, otro paso destacable es el filtrado de los extractos tras la centrifugación. Agregán et al. (2018) y Farbin y Jacobsen (2013) comprobaron que el rendimiento de extracción de la espirulina era menor que el de otras algas y microalgas. Atribuyeron este hecho a la gran viscosidad que presentan estos extractos, que hace que el proceso de filtrado sea largo y difícil, lo cual también se ha observado en este estudio.

En relación al análisis de actividad antioxidante, se presentaron complicaciones durante los diferentes ensayos. En ocasiones, los resultados al preparar la disolución de DPPH eran diferentes a los esperados. Esto puede deberse tanto a una mala praxis en el pesaje del soluto, como a una variación del método de análisis. Según el protocolo de Trillo (2015), una vez preparada la disolución de DPPH se debe dejar en oscuridad durante mínimo una hora a temperatura ambiente para que se active el radical que daría lugar a la reacción. El protocolo seguido en este estudio no contempló la hora de espera, por lo que comúnmente se preparaba el reactivo justo en el momento del análisis. Por ello, puede que algunos de los resultados descartados pudieran deberse a una reacción incompleta del reactivo con la muestra, al no haber radicales disponibles.

Por otra parte, algunos autores recomiendan la combinación de diferentes métodos para evaluar la capacidad antioxidante a través de diferentes mecanismos de reacción. La combinación de los ensayos FRAP y DPPH permite reflejar con precisión la actividad de todos los antioxidantes de una muestra. Puesto que el ensayo FRAP se basa en la reducción de metales, no es capaz de detectar la actividad de tantos compuestos como el ensayo DPPH, y se detecta principalmente la actividad antioxidante de los polifenoles (Blagojević et al., 2018). Por su parte, el DPPH es un radical estable con bajas tasas de deterioro y sirve como indicador de la estabilidad de los compuestos antioxidantes. Solo los agentes reductores fuertes son capaces de reaccionar estequiométricamente con este tipo de radicales (Scaglioni et al., 2018)

1.2 Cantidad de alga

En primer lugar, se determinó la cantidad de alga en peso seco a partir de la cual se iban a realizar los extractos. Se ensayaron los pesos 0'5, 1, 3, 5, 7 y 9 g. La optimización de la cantidad de alga se realizó con las condiciones experimentales iniciales: 20ml de etanol al 50% (V:V), con una extracción asistida por ultrasonidos de 5 minutos a 25°C y 150W. Los extractos de 9g no pudieron llevarse a cabo, ya que, debido a las propiedades hidrófilas del alga, se absorbía el solvente por completo sin posibilidad de continuar con la extracción (Figura 2).



Figura 2: Fotografías tomadas durante el intento de extracción con 9g de alga. Se puede observar cómo la matriz absorbió todo el solvente.

El análisis estadístico (Figura 3) reflejó que a mayor cantidad de alga se obtuvo mayor actividad antioxidante. Del mismo modo, Abdullah y Valan Arasu (2015) observaron en sus extractos que la actividad antioxidante dependía de la concentración de alga utilizada. El extracto de 7g reflejó diferencias significativas frente a los demás extractos, por lo que se estableció este peso como el óptimo para el protocolo. Belda et al. (2016)

observaron un comportamiento similar, en el que la actividad antioxidante aumentaba gradualmente con el contenido de alga. Estos autores comprobaron que entre 5 y 10g la actividad antioxidante del extracto se estabilizaba y escogieron 6g como el peso óptimo. En este estudio no se pudo ensayar el último extracto, por lo que se desconoce si la actividad aumentaría o mostraría una tendencia estable.

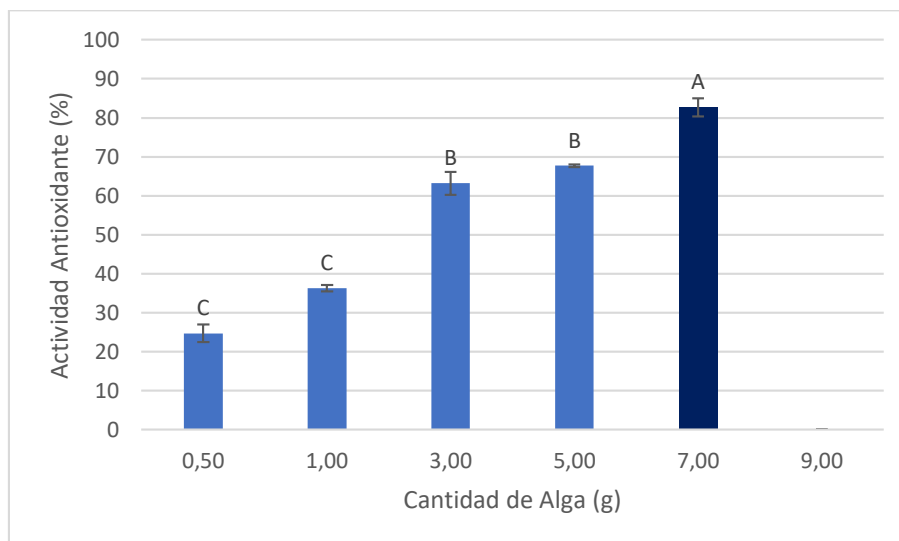


Figura 3: Efecto de la cantidad de alga sobre la Actividad Antioxidante (%) (n=3). Se refleja además la desviación estándar y el resultado de la comparación *post hoc* de las variables. Los valores con letras diferentes son significativamente ($p < 0.05$) diferentes. Destacado en azul más oscuro el valor escogido como óptimo.

1.3 Volumen de solvente o extractante

Una vez determinado el peso óptimo de alga, se estudió el volumen de solvente necesario para hacer las extracciones. Se ensayaron los volúmenes de extractante 10, 20, 30 y 40 ml. Los extractos con 10 ml no se llevaron a cabo ya que no era suficiente volumen como para empapar la muestra (Figura 4).



Figura 4: Fotografías tomadas durante el intento de extracción con 10ml de solvente. Se puede observar que es un volumen insuficiente como para continuar con la extracción.

El análisis estadístico (Figura 5) mostró que no había diferencias significativas entre los tres volúmenes ensayados (p valor = 0,133). Los principios de la química verde establecen la necesidad de reducir el volumen de solvente utilizado en los procedimientos, además de buscar aquellos más inocuos (Anastas y Warner, 1998; Joshi y Adhikari, 2019). De acuerdo a estas premisas, se escogió el menor volumen (20 ml) por ser el más económico y sostenible medioambientalmente.

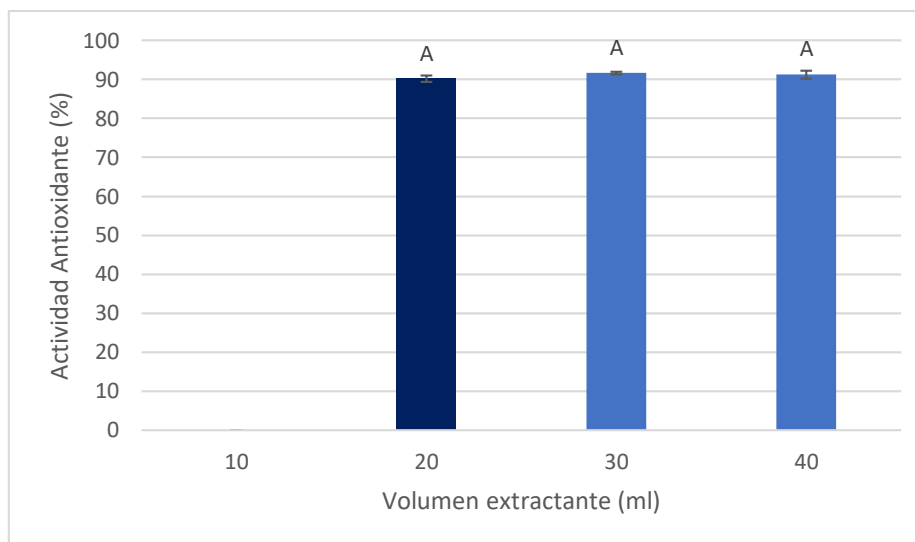


Figura 5: Efecto del volumen de solvente o extractante (ml) utilizado sobre la Actividad Antioxidante (%) de los extractos ($n=3$). Se refleja además la desviación estándar y el resultado de la comparación post hoc de las variables. Los valores con letras diferentes son significativamente ($p < 0.05$) diferentes. Destacado en azul más oscuro el valor escogido como óptimo.

1.4 Tipo de extractante

Aunque el agua es más eficiente para extraer una mayor variedad de sustancias, los solventes orgánicos son más eficientes para extraer compuestos con mayor actividad antioxidante (Jerez-Martel et al., 2017). Maadane et al. (2015) realizaron extractos de nueve microalgas con etanol, etanol acuoso y agua, concluyendo que el uso de etanol aumentaba la capacidad de eliminación del radical DPPH en todos los extractos. Asimismo, Shukla et al. (2009) observaron que se obtenía mayor actividad antioxidante en extractos alcohólicos de espirulina que en los extractos acuosos.

Son varios los solventes que se pueden utilizar para obtener compuestos activos. El factor más importante a la hora de elegir es la polaridad del compuesto objetivo. Otros factores a tener en cuenta son la afinidad molecular entre solvente y soluto, la transferencia de masa (que en este caso también está siendo facilitada por el baño en ultrasonidos), el uso de codisolventes, la seguridad ambiental, la toxicidad en humanos y la viabilidad financiera (Arciniegas, 2020).

En este estudio se ensayaron tres solventes: acetona, metanol y etanol, a una concentración de 50% (V:V). El análisis estadístico mostró que no hay diferencias significativas entre etanol y metanol (p valor $> 0,05$), mientras que ambos son mejores que la acetona (Figura 6).

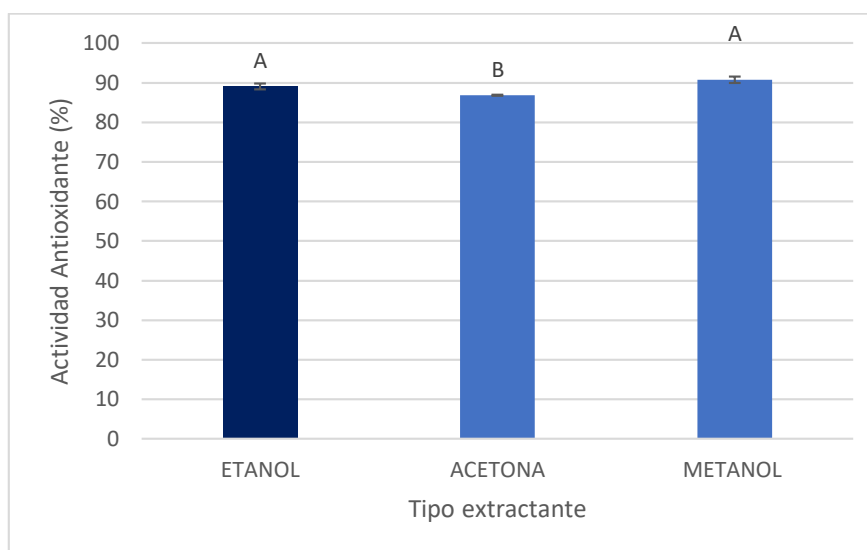


Figura 6: Efecto del tipo de solvente sobre la Actividad Antioxidante (%) de los extractos ($n=3$). Se refleja además la desviación estándar y el resultado de la comparación post hoc de las variables. Los valores con letras diferentes son significativamente ($p < 0.05$) diferentes. Destacado en azul más oscuro el valor escogido como óptimo.

Según el concepto de Química Verde establecido por Anastas y Warner (1998), una máxima en la optimización de procedimientos debe ser la reducción o eliminación de productos, materias primas, subproductos, reactivos y disolventes que puedan ser peligrosos para el ser humano o el medio ambiente. En los procedimientos de extracción se utilizan diferentes solventes. El nivel de impacto o síntomas derivados depende de la naturaleza del solvente y su concentración, y del tiempo, duración y frecuencia a la que estén expuestos los operarios o el medio ambiente (Joshi y Adhikari, 2019).

Para reducir los riesgos, se fomenta la utilización de aquellos solventes más inocuos, entre los que se encuentran tanto el etanol, como el metanol y la acetona. Además, la química verde también se enfoca en diseñar los productos con una toxicidad mínima, reduciendo el uso del volumen de solvente y tratando de evitar la necesidad de un tratamiento posterior para separar el solvente utilizado del producto final (Arciniegas, 2020; Joshi y Adhikari, 2019). Los métodos utilizados tradicionalmente como el sólido-líquido o el Soxhlet utilizan solventes orgánicos tóxicos y requieren un separar los compuestos volátiles aumentando la temperatura, lo que implica un riesgo de degradación de compuestos termosensibles (Ramón y Gil-Garzón, 2021). Además, Scaglioni et al. (2018) comentan que el postratamiento de sus extractos fenólicos

implicaría elevados costes. Por lo tanto, la selección del disolvente adecuado es un punto crucial del proceso (Arciniegas, 2020; Joshi y Adhikari, 2019).

Rahim et al. (2021) valoraron extractos de etanol, acetona y metanol (al 80 y 100%) y midieron su actividad antioxidante. A diferencia de en los extractos al 50% analizados en este estudio, obtuvieron que el metanol y la acetona obtenían la misma actividad antioxidante, mayor que en los extractos etanólicos.

Sin embargo en nuestro estudio, en términos de rendimiento, se ha obtenido una mayor actividad antioxidante en los extractos metanólicos y etanólicos que en aquellos obtenidos a partir de acetona. Por lo tanto, los alcoholes muestran mejores resultados. Sin embargo, la extracción con metanol fue notablemente más costosa en la etapa de filtrado, necesitando el uso de más filtros y un mayor tiempo y esfuerzo, lo que conlleva costes más elevados. Además, el metanol es un compuesto con mayor toxicidad que el etanol (Joshi y Adhikari, 2019). De hecho, Joshi y Adhikari (2019) comentan que se suele utilizar el término “alcohol tóxico” para referirse al metanol. Por ello, finalmente se decide escoger el etanol como extractante óptimo.

1.5 Porcentaje de solvente

Una vez escogido el etanol como extractante óptimo, se estudió qué porcentaje era el óptimo para la obtención de la máxima actividad antioxidante.

Do et al. (2014) obtuvieron mayores rendimientos de extracción utilizando como extractante soluciones hidroalcohólicas que utilizando solamente agua, o etanol, acetona y metanol puros. Arciniegas (2020) discutió que utilizar una mezcla de etanol y agua mejora la solubilidad de los analitos en el extractante, ya que el solvente orgánico hace que aumenten las interacciones de los analitos con el agua y mejore la tasa de recuperación de compuestos activos. El etanol permite extraer químicos polares y apolares de diferentes matrices orgánicas, y destaca por aumentar la solubilidad de compuestos bioactivos de baja polaridad, como los compuestos fenólicos. Por lo tanto, permite extraer grupos más amplios de componentes antioxidantes.

En este estudio, se ensayaron porcentajes de etanol al 40%, 50%, 60% y 70% (Figura 7). Los extractos de etanol al 40% no se lograron filtrar, puesto que un mayor porcentaje de agua hacía que el alga absorbiese el solvente y no precipitase adecuadamente con centrifugación a bajas revoluciones. El alga permaneció en suspensión haciendo el extracto muy difícil de filtrar, por lo que se descartó este valor por las elevadas necesidades de filtros, tiempo y esfuerzo.

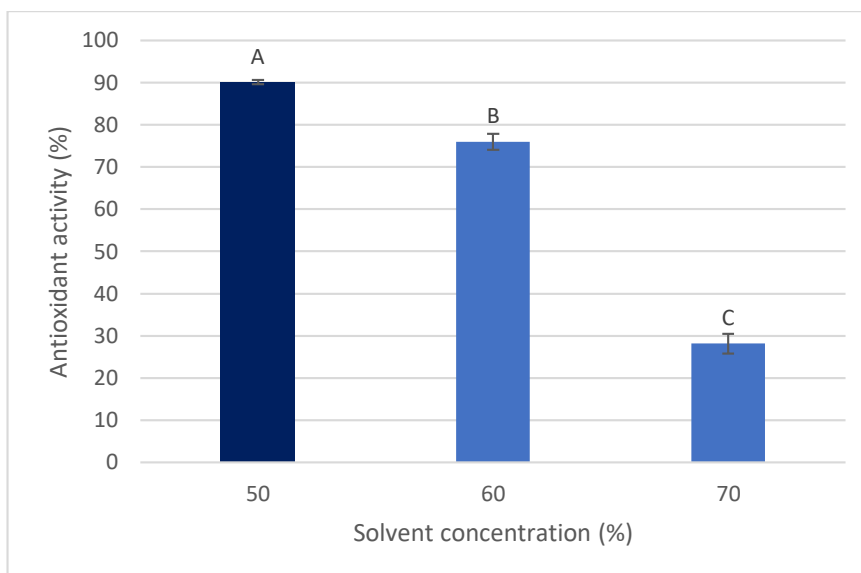


Figura 7: Efecto del porcentaje de solvente utilizado sobre la Actividad Antioxidante (%) de los extractos (n=3). Se refleja además la desviación estándar y el resultado de la comparación post hoc de las variables. Los valores con letras diferentes son significativamente ($p < 0.05$) diferentes. Destacado en azul más oscuro el valor escogido como óptimo.

El análisis estadístico mostró que hay diferencias significativas entre los tres porcentajes, siendo el óptimo 50%. Agregán et al. (2018) también utilizaron esa concentración para sus extracciones asistidas por ultrasonidos.

Un porcentaje elevado de etanol provoca un cambio de solubilidad de la mezcla hidroalcohólica que conlleva una extracción de compuestos más selectiva (Arciniegas, 2020). Además, Arciniegas comenta que el etanol puede afectar negativamente la capacidad de extracción de carbohidratos y polisacáridos, que son compuestos que también aportan actividad antioxidante al extracto (Wang et al., 2018).

1.6 Tiempo de extracción

Tras fijar los valores óptimos de matriz y extractante, se optimizaron los parámetros controlables durante la extracción con ultrasonidos: tiempo, potencia y temperatura. Ramón y Gil-Garzón (2021) señalan que las variables afectan directamente al rendimiento de la extracción, aunque hay una alta dependencia asimismo del compuesto bioactivo que se desee extraer y la matriz en la cual es evaluada.

En primer lugar se optimizó el tiempo de extracción (Figura 8). Se ensayaron los tiempos 1, 3, 5, 10 y 15 minutos. Las técnicas convencionales requieren tiempos muy prolongados, con extracciones que pueden durar hasta 24h en un tanque agitado y con solventes orgánicos en altas concentraciones (Arciniegas, 2020). Puesto que no había

diferencias significativas entre los valores estudiados, se estableció el tiempo de extracción en 1 minuto, ya que se pretende lograr el máximo rendimiento con el menor requerimiento de tiempo y energía posible. Además, las extracciones durante largos periodos de tiempo (y a altas temperaturas) pueden causar la descomposición de algunos compuestos y la pérdida de su bioactividad (Bewal et al., 2018). Estos resultados mejoran el procedimiento utilizado por Agregán et al. (2018), por ejemplo, que mantiene los extractos en el baño durante 30 minutos.

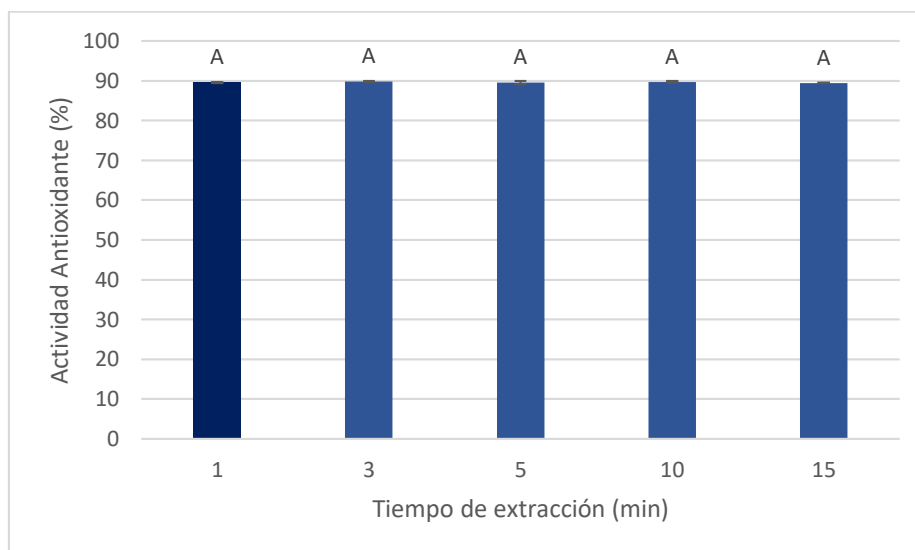


Figura 8: Efecto del tiempo de extracción (min) sobre la Actividad Antioxidante (%) de los extractos (n=3). Se refleja además la desviación estándar y el resultado de la comparación post hoc de las variables. Los valores con letras diferentes son significativamente ($p < 0.05$) diferentes. Destacado en azul más oscuro el valor escogido como óptimo.

1.7 Potencia de extracción (W)

La segunda variable a establecer en el ultrasonidos es la potencia. Se ensayaron extractos a 75, 150 y 300 W (Figura 9):

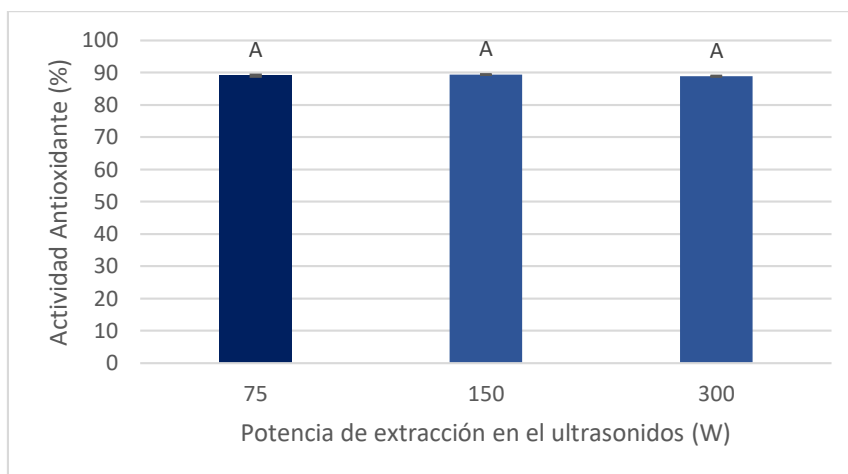


Figura 9: Efecto de la potencia (W) sobre la Actividad Antioxidante (%) de los extractos (n=3). Se refleja además la desviación estándar y el resultado de la comparación post hoc de las variables. Los valores con letras diferentes son significativamente ($p < 0.05$) diferentes. Destacado en azul más oscuro el valor escogido como óptimo.

De nuevo, no hay diferencias significativas entre las potencias ensayadas, por lo que se toma la menor (75W) como óptima.

1.8 Temperatura de extracción

Por último, se ensayaron las temperaturas a las que se lleva a cabo la extracción. Se ensayaron extracciones a 25, 35 y 45°C (Figura 10). Puesto que no hay diferencias significativas entre 25 y 35°C, se establece la mínima temperatura (25°C) como valor óptimo.

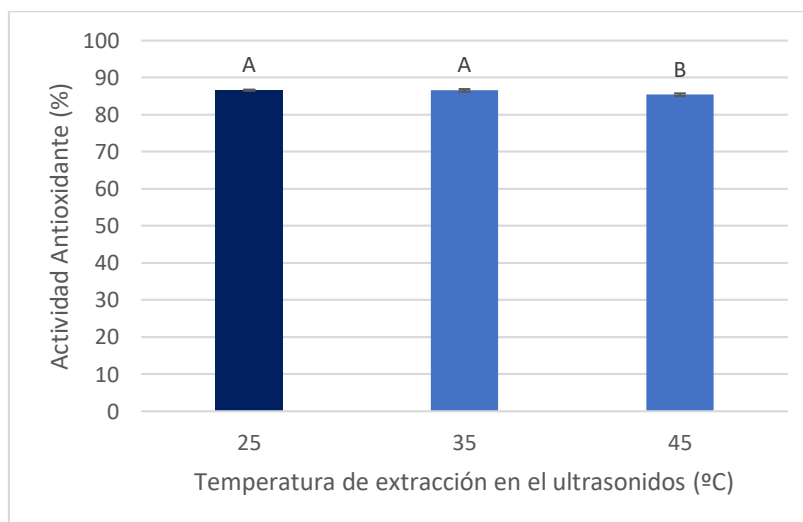


Figura 10: Efecto de la temperatura (°C) sobre la Actividad Antioxidante (%) de los extractos (n=3). Se refleja además la desviación estándar y el resultado de la comparación post hoc de las variables. Los valores con letras diferentes son significativamente ($p < 0.05$) diferentes. Destacado en azul más oscuro el valor escogido como óptimo.

La temperatura puede afectar a la actividad antioxidante, ya que facilita la extracción de compuestos como los flavonoides, que presentan mayor actividad antioxidante que otros polifenoles (Siddhuraju y Becker, 2003). Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en los valores estudiados. Valdés-Hernández et al. (2015) sí que observaron un aumento significativo de la actividad antioxidante valorando temperaturas entre 40°C y 70°C en un procedimiento de extracción SL en una matriz vegetal.

Como conclusión al apartado, se puede añadir además que, en su estudio, Santiago-Díaz et al. (2022) compararon la actividad de eliminación de radicales libres de DPPH de sus extractos en frente a los aditivos alimentarios BHA (hidroxianisol butilado) y BHT (hidroxitolueno butilado), conocidos por su actividad antioxidante. El BHT poseía una actividad de 17,37% y el BHA de 48,69%. Ambos aditivos poseen una actividad antioxidante menor que el extracto obtenido tras la optimización del método (<85%).

Los extractos de espirulina presentan una mayor actividad antioxidante que otros extractos realizados a partir de microalgas. Por ejemplo, Santiago-Díaz et al. (2022) estudiaron la actividad antioxidante de extractos metanólicos de algunas especies de la división clorófitas, que iban desde 19,33% hasta 30,19%.

2. Estudio de correlación entre Contenido Total de Polifenoles (CTP) y Actividad Antioxidante (%) para cada una de las variables estudiadas

Se estudió la correlación entre el contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante en cada paso de la optimización del protocolo.

Los compuestos bioactivos varían en presencia y concentración en función de la cepa y las condiciones de cultivo (Abdullah y Valan Arasu, 2015; Agregán et al., 2018; Blagojević *et al.*, 2018; Cengiz Sahin, 2018; Lui et al., 2016; Soto-Sierra et al., 2018; Libro Vonshak, 2002, p148-150; 175). Además, la estabilidad de los compuestos en ocasiones se ve comprometida durante el proceso downstream, como pueden ser el secado y el almacenamiento (Arciniegas, 2020; Khanra et al., 2018; Santiago-Díaz et al., 2022; Scaglioni et al., 2018;). Abdullah y Valan Arasu (2015) estudiaron la composición y propiedades de espirulina disponible comercialmente en varios formatos. El CTP variaba significativamente entre unos y otros, yendo de 2,4 mg/g hasta 24,4 mg/g en otros. El CTP obtenido a partir del extracto óptimo alcanzó valores de 101,4 mg GAE/g. Cengiz Sahin (2018) obtuvo un CTP de 29,7 mg GAE/g en un extracto etanólico y de 52.4 mg GAE/g en un extracto acuoso de *A. platensis*. Blagojević et al. (2018) también detectaron en las cepas de *Arthrospira* un contenido fenólico menor que el obtenido en nuestras muestras (24,05 µg/g de biomasa). Por tanto, puede verse que el protocolo de optimización ha logrado aumentar considerablemente el CTP.

En cuanto a las condiciones de cultivo, Blagojević *et al.* (2018) indicaron la posibilidad de aumentar el contenido en polifenoles modificando las condiciones de nitrógeno. También resaltan que el contenido de compuestos fenólicos puede incrementarse significativamente manipulando otras condiciones de cultivo como la luz, la temperatura, el pH, la concentración de nitrato de sodio, la adición de fenilalanina y la radiación UV-B (Blagojević *et al.*, 2018; Cengiz Sahin, 2018). Lui et al. (2016) obtuvieron una mayor producción de caroteno, ficocianina, polisacáridos y otros antioxidantes por efecto del estrés salino, cultivando cepas de espirulina halotolerantes en medios salinos.

La espirulina utilizada en el estudio se cultivó por lotes en condiciones muy alcalinas sin nitrato de sodio (Sevenhills Wholefoods). Por lo tanto, es posible que pudiesen obtenerse unos resultados mejores modificando las condiciones de cultivo. Además el secado se hace por pulverización, no por liofilización. Algunos autores establecen que la liofilización es el método más adecuado para no afectar a la actividad de los biocompuestos (Kröger *et al.* 2019).

Por otra parte, la extracción de compuestos fenólicos depende de diferentes factores en función del método de extracción (Ramón y Gil-Garzón, 2021). Por ejemplo, para la extracción de polifenoles, el pH es un factor crucial. El pH ácido permite romper las interacciones proteína-polifenoles y está directamente implicado en la estabilidad de algunos compuestos fenólicos. Trillo (2015) observó que las catequinas y las epicatequinas se degradan a un rango de pH de entre 4 y 5. Por debajo de pH=4, el CTP no varía, aunque se observa la degradación gradual de catequinas y epicatequinas. A valores de pH por encima de 6, hay una disminución de CTP.

En cuanto a la correlación entre CTP y AA, algunos autores establecen que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante de espirulina (Agregán et al., 2018). Sin embargo, otros autores como Blagojević et al. (2018) no hallaron una correlación significativa entre los compuestos fenólicos detectados y la actividad antioxidante, por lo que propusieron que probablemente fuesen otros compuestos los que contribuían a la actividad antioxidante en las diferentes cepas de cianobacterias. Abdullah y Valan Arasu (2015) tampoco encontraron correlación en sus extractos. Cengiz Sahin (2018) realizó extractos acuosos e hidroalcohólicos de *A. platensis*, y encontró que los extractos acuosos mostraban una mayor actividad antioxidante y un menor CTP, por lo que concluyó que probablemente los compuestos fenólicos no eran los principales responsables de la actividad del extracto.

Para evaluar los resultados, también es importante contemplar qué técnica de ensayo de actividad antioxidante se ha utilizado. Blagojević et al. (2018) encontraron una correlación positiva entre el contenido fenólico y la AA medida mediante la técnica FRAP (Ferric-reducing/antioxidant power), y señalan que otros estudios también han encontrado que los compuestos fenólicos contribuyen de manera importante a la actividad antioxidante de microalgas mediante el ensayo FRAP, pero no en el ensayo DPPH. Se debe tener en cuenta que el ensayo FRAP también detecta carotenos específicos y xantofilas. Precisamente, Safafar et al. 2015 establecieron que los carotenoides eran los principales responsables del poder reductor férrico (FRAP) de las microalgas estudiadas, seguido de los compuestos fenólicos.

Sin embargo, en algunas de las variables estudiadas en este ensayo se ha visto una correlación significativa entre el CTP y la actividad antioxidante. Esta diferencia puede deberse a las variaciones entre el método de extracción usado por Blagojević et al. (2018) y el seguido en este estudio. Pese a que ambos realizamos una extracción asistida por ultrasonidos utilizando etanol como solvente, Blagojević et al. utilizaron EtOH 70% mientras que en este estudio se utilizó EtOH 50%. El porcentaje de solvente es un parámetro crítico que muestra claras diferencias sobre la actividad antioxidante

(Figura 7). Mayores concentraciones de etanol (70%) logran extraer una mayor cantidad de carotenoides y tocofenoles, que contribuyen significativamente a la actividad antioxidante. Blagojević et al. (2018) no hallaron una correlación significativa entre el CTP y la AA debido a que sus extractos contenían una mayor cantidad de carotenoides, mientras que el porcentaje de etanol utilizado en este estudio podría no logra extraer de forma tan efectiva estos compuestos, siendo en este caso los polifenoles los principales responsables de la AA en algunas variables de estudio.

Se debe tener en cuenta que el objetivo principal del procedimiento es la obtención de un extracto con la mayor actividad antioxidante posible. Por ello, fue esa variable, y no el Contenido Total de Polifenoles extraídos, la que condicionaba la selección del valor óptimo en cada paso de optimización del método.

2.1 Cantidad de alga

Ambas variables mostraron una correlación lineal directa fuerte (r Pearson = 0,85). La correlación es estadísticamente significativa (p -valor < 0,05). A mayor cantidad de alga se obtiene un contenido total de polifenoles mayor, y una mayor actividad antioxidante.

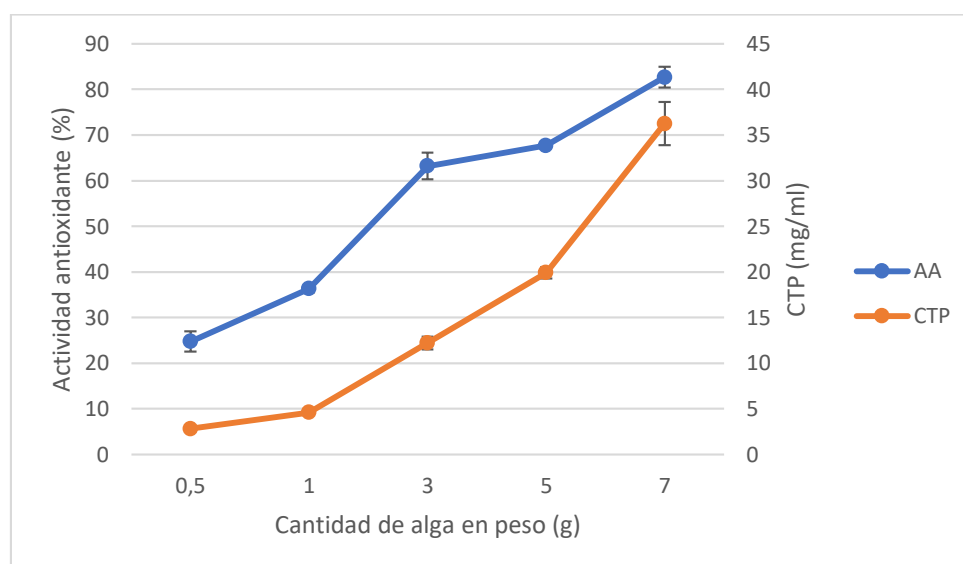


Figura 11: Efecto de la cantidad de alga sobre el contenido total de polifenoles (CTP) y la actividad antioxidante (AA) ($n=3$). Se representa la desviación estándar con las barras de error.

Como puede verse en la Figura 11, tanto la actividad antioxidante como el Contenido Total de Polifenoles aumentaron considerablemente al incrementar la cantidad de alga. Otros autores también utilizan cantidades altas de algas (<5g), que permiten la obtención de una mayor cantidad de compuestos fenólicos (Belda et al., 2016) y a su vez una mayor actividad antioxidante.

2.2 Volumen de solvente o extractante

En el estudio de estas variables, la *r* de Pearson (-0.18) indicó una correlación inversa débil, casi inexistente. Sin embargo, la correlación lineal no era estadísticamente significativa (*p*-valor = 0,64).

Como puede verse en la Figura 12, la actividad antioxidante permanece inalterada mientras que el contenido total de polifenoles disminuye significativamente con el aumento del volumen de solvente. El CTP se expresa en mg/ml, por lo que no hay una disminución real de la cantidad extraída, sino que disminuye la concentración de los mismos al aumentar el volumen. Es posible por tanto que la AA se mantenga porque al haber la misma cantidad de polifenoles en los diferentes extractos, a pesar de estar más diluidos, aportan la misma actividad antioxidante al extracto.

Con los valores obtenidos, no se puede afirmar que no hay una correspondencia entre ambas variables.

Cabe destacar la importancia de la relación soluto-solvente, ya que al aumentar la relación mejora la transferencia de masa y se aprovecha mejor la capacidad extractiva del solvente. Es fundamental establecer un volumen que permita aprovechar la capacidad extractiva del disolvente evitando la saturación del mismo, y obtener la mayor concentración del analito de interés (Valdés-Hernández et al., 2015). Como se ha comentado anteriormente, el valor óptimo se escoge en función de la actividad antioxidante que muestran los extractos, y se estableció el volumen de 20ml al ser el más económico. Paralelamente, es el que permite lograr la mayor concentración de polifenoles totales (Figura 12).

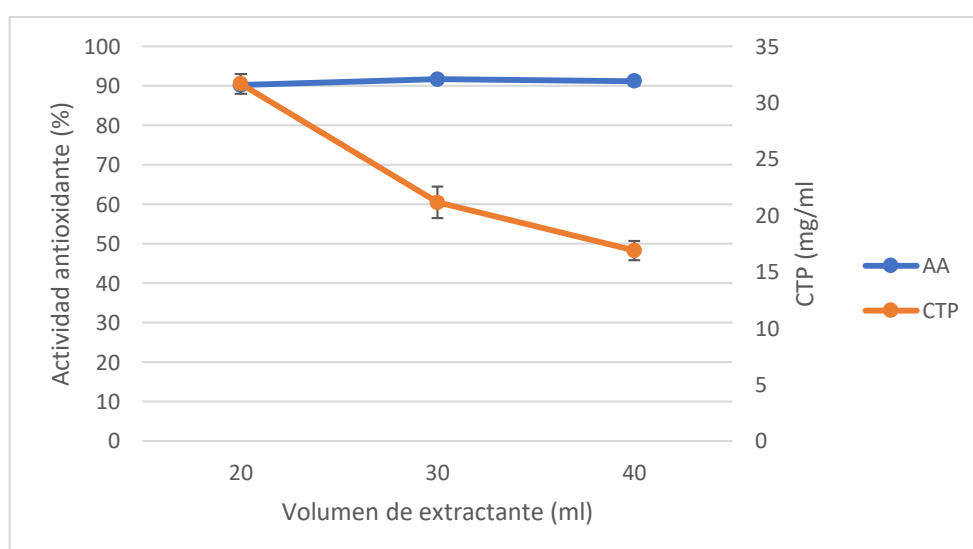


Figura 12: Efecto del volumen de extractante sobre el contenido total de polifenoles (CTP) y la actividad antioxidante (AA) (n=3). Se representa la desviación estándar con las barras de error.

2.3 Tipo de solvente

En la valoración del tipo de solvente, se observó una correlación lineal directa fuerte (r Pearson = 0,87). La correlación lineal entre ambas variables es estadísticamente significativa (p valor < 0,05). Puede verse cómo el etanol y el metanol extrajeron una cantidad similar de polifenoles totales, mientras que la acetona extrajo una menor cantidad, siendo asimismo el solvente que consiguió extraer una menor actividad antioxidante (Figura 13).

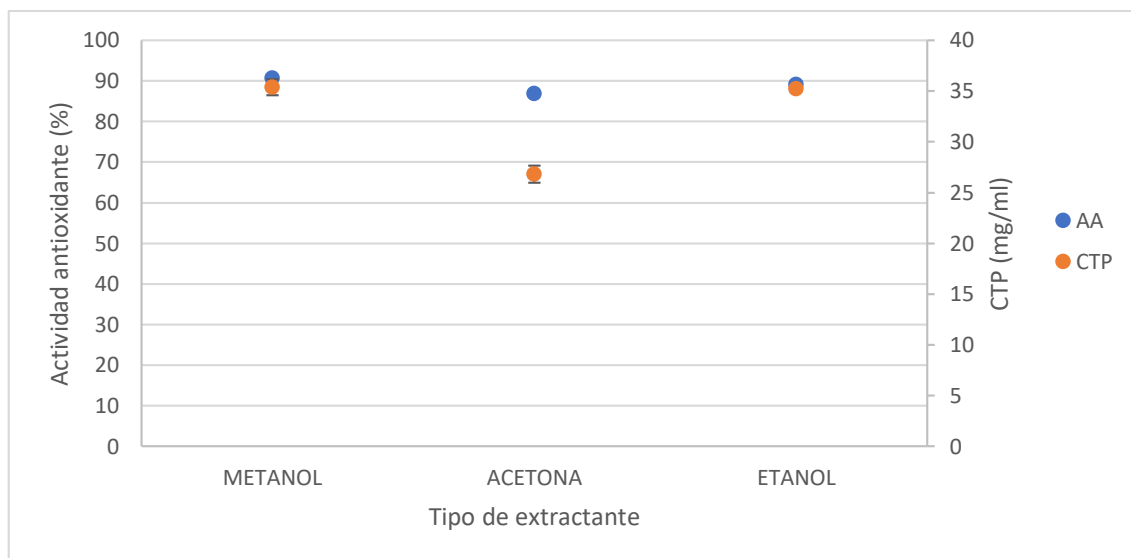


Figura 13: Efecto del tipo de extractante sobre el contenido total de polifenoles (CTP) y la actividad antioxidante (AA) ($n=3$). Se representa la desviación estándar con las barras de error.

Hay discrepancias entre los autores sobre cuál es el solvente óptimo para obtener el contenido fenólico de las microalgas. Cengiz Sahin (2018) obtuvo un CTP de 29,7 mg GAE/g en un extracto etanólico y de 52.4 mg GAE/g en un extracto acuoso de *A. platensis*. Jerez-Martel et al. (2017) identificaron el perfil fenólico de algunas cepas de algas y cianobacterias, entre ellas *A. platensis*, y vieron que el rendimiento de extracción era dos veces mayor en agua que en metanol. Sin embargo, Sabeena Farvin y Jacobsen (2013) comprobaron que el CTP de los extractos etanólicos era mayor que el de los extractos acuosos en varias especies de algas.

Rahim et al. (2021) valoraron extractos de etanol, acetona y metanol (al 100%), y obtuvieron un mayor contenido de fenoles y flavonoides con los extractos metanólicos. De hecho, a diferencia de lo observado en nuestros resultados, obtuvieron que el metanol extraía la mayor cantidad de fenoles y flavonoides seguido de la acetona, y que el etanol era el solvente que menor cantidad de ambos compuestos obtuvo.

Como se ha comentado anteriormente, el tipo de solvente determina qué compuestos se extraerán de forma eficiente. Tanto el etanol como el metanol extraen taninos,

polifenoles y terpenoides. Además, el etanol extrae flavonol y alcaloides, y el metanol extrae antocianina, saponinas y flavonas. Por su parte, la acetona sólo es capaz de extraer de forma eficiente los flavonoides (Arciniegas, 2020). Esto se corresponde directamente con los resultados reflejados en la Figura 13. Tanto el etanol como el metanol son capaces de extraer diversos tipos de polifenoles, por lo que el CTP obtenido es mayor que el de la acetona, que solamente es capaz de extraer una subclase.

Estos resultados también coinciden con los de Do et al. (2014), que observaron en una matriz vegetal que el rendimiento de extracción aumentaba al aumentar la polaridad del solvente (metanol > etanol > acetona). Hay que añadir que Catarino et al. (2019) mostraron que la mayoría de compuestos fenólicos eran fácilmente solubles en solventes menos polares que el agua, por lo que es adecuado usar estos solventes en diferentes concentraciones en vez de realizar extractos acuosos.

El CTP obtenido mediante EAU con solvente etanólico es mayor que el que obtuvieron Shukla et al. (2009) utilizando una mezcla de diclorometano y etanol. El CTP obtenido a partir del extracto óptimo alcanzó valores de 101,4 mg GAE/g.

2.4 Porcentaje de solvente

El porcentaje de solvente es otra variable crítica. Blagojević et al. (2018) establecen que mayores concentraciones de etanol (70%) logran extraer una mayor cantidad de carotenoides y tocofenoles, que contribuyen significativamente a la actividad antioxidante. Aunque el etanol facilita la coextracción de moléculas de baja polaridad, puede afectar negativamente a la capacidad de extracción de carbohidratos y otros fitoquímicos (Klinchongkon et al., 2017). Por su parte, Do et al. (2014) vieron que aumentando la concentración de agua en el disolvente, aumentaba el rendimiento de actividad antioxidante. Señalaban que se podrían haber extraído compuestos distintos a los fenoles y que aportasen esa mayor actividad, ya que las proteínas y los carbohidratos son más solubles en agua que en etanol y acetona. Todos estos autores coinciden en que el uso combinado de agua y solvente orgánico facilita la extracción de compuestos de diferentes solubilidades. Los rendimientos de los extractos acuosos de metanol, etanol y acetona ensayados por Do et al. (2014) fueron más altos que los rendimientos de los extractos de agua, metanol, etanol y acetona al 100%.

En el estudio estadístico a nivel de porcentaje de solvente, la *r* de Pearson indica una correlación lineal directa moderada (r Pearson = 0.44), pero la correlación no es estadísticamente significativa (p valor = 0,24). Observando las líneas de tendencia (Figura 14), puede verse cómo ambas tienen una tendencia descendente. Un mayor

porcentaje de solvente obtiene una menor actividad antioxidante. En la representación del CTP, el valor de polifenoles extraídos con etanol al 60% está ligeramente por debajo de la línea de la tendencia. En cuanto al comportamiento del CTP extraídos, hay diferencias significativas entre todos los valores estudiados. A 50% se logran unos $35'6 \pm 1,8$ mg/ml, que disminuyen a $27,9 \pm 0,3$ mg/ml a 60%, y vuelven a aumentar a $30 \pm 0,1$ mg/ml con etanol al 70%. Por lo tanto, se observan dos comportamientos: la concentración disminuye con el paso de 50% a 60%, y vuelve a aumentar con el paso a 70% (Figura 14).

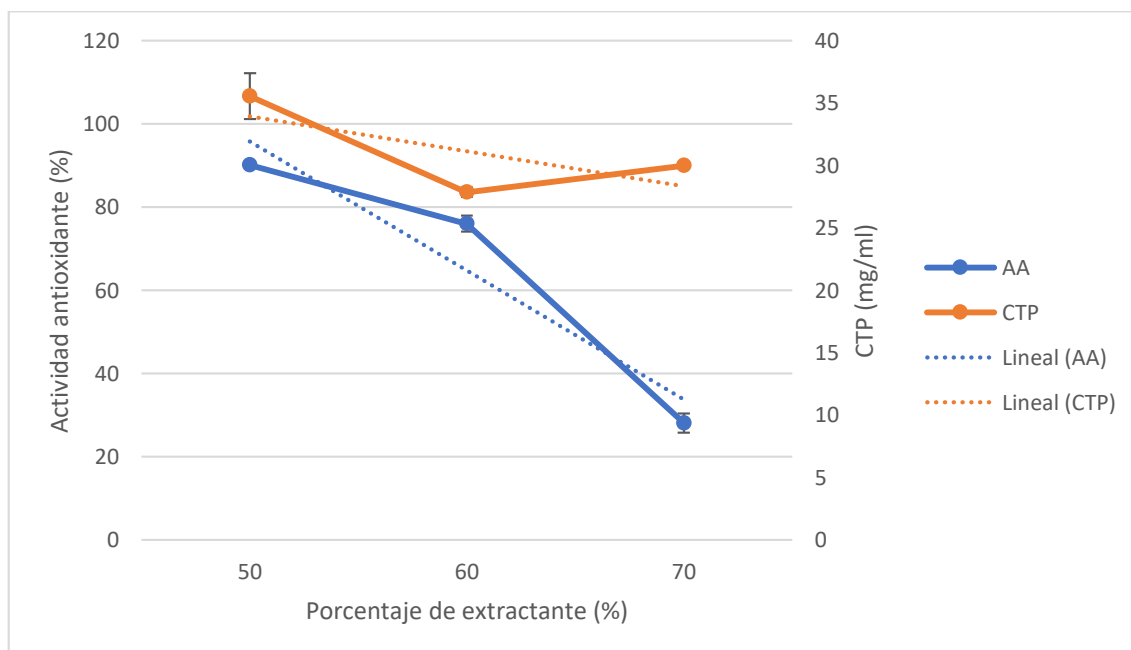


Figura 14: Efecto del porcentaje de extractante sobre el contenido total de polifenoles (CTP) y la actividad antioxidante (AA) (n=3). Se representa la desviación estándar con las barras de error.

A la vista de los resultados obtenidos, podría parecer que no hay correspondencia entre el CTP y la AA observados. No obstante, el coeficiente de Pearson muestra un valor de 0,44, que quiere decir que hay una correlación directa moderada, pero con un p valor de 0,24, lo que indica que no es estadísticamente significativo. Por tanto, no se puede concluir que la AA se deba exclusivamente a los polifenoles o a la presencia de otros compuestos presentes en el extracto, ya que el porcentaje de etanol afecta al rendimiento de extracción de diferentes compuestos bioactivos y a su actividad (Arciniegas, 2020).

Para entender el efecto que tienen las diferentes concentraciones de etanol y agua en el solvente, puede ser interesante ver cómo se comportan individualmente extractos acuosos y extractos etanólicos de *A. platensis*. Cengiz Sahin (2018) realizó un estudio comparando ambos extractos, y esperaba que al haber obtenido un mayor CTP en los

extractos acuosos que en los extractos etanólicos, la actividad de eliminación de radicales DPPH del extracto acuoso sería mayor. Sin embargo sus resultados mostraron la tendencia contraria. Lo mismo sucedió en el estudio de Sabeena Farvin y Jacobsen (2013): aunque los extractos acuosos tenían un contenido fenólico más bajo, las AA era más alta. Los autores explicaron el resultado por la presencia de otros compuestos como polisacáridos de bajo peso molecular, pigmentos, proteínas o péptidos que pueden contribuir a la actividad de captación de radicales en el extracto acuoso. El número y la posición estructural de los grupos –OH en los compuestos fenólicos también juegan un papel importante en las actividades de eliminación de radicales de los compuestos relacionados (Brand-Williams et al. 1995). Otra posible razón puede ser la diferencia de cantidades de enzimas antioxidantes en dos extractos (Cengiz Sahin, 2018).

Valdés-Hernández et al. (2015) también observaron un comportamiento diferencial en función del porcentaje de solvente empleado. En su caso, aumentaba el CTP hasta el valor de concentración de 60%, y disminuía posteriormente a medida que aumentaba la concentración etanólica. Estos autores justifican el aumento de CTP debido a que probablemente, a esa concentración se estén extrayendo fenoles que no se encontraban libres, sino asociados entre sí en forma de macromoléculas (como el quercetín, que se ha hallado en los extractos optimizados, Tabla 1), o asociados a la matriz por puentes de hidrógeno. Estas asociaciones se mantienen por grupos hidroxilo que hacen que el compuesto sea menos polar, y que, por lo tanto, se favorezca su extracción por disolventes menos polares (como soluciones hidroalcohólicas con menos contenido de agua). Sin embargo, la relación etanol-agua debe ajustarse adecuadamente ya que la combinación de ambos presenta múltiples beneficios a la extracción. El agua provoca la inflamación de la matriz y facilita que el etanol altere los enlaces entre el soluto y la matriz. Además, aumentan la permeabilidad de la pared vegetal, facilitando la acción del ultrasonidos y permitiendo una extracción de fenoles eficiente tanto de elevada, como de media y baja polaridad (Valdés-Hernández et al., 2015). Por otra parte, Arciniegas (2020) añade que el uso de solventes hidroalcohólicos de etanol en las extracciones permite reducir la temperatura óptima del proceso y mejora la eficiencia de extracción de polifenoles. Aunque un porcentaje elevado de etanol provoca un cambio de solubilidad de la mezcla hidroalcohólica, disminuyendo el rendimiento de la extracción. Valdés-Hernández et al. (2015) también comentaron que la disminución del CTP que observaron podría deberse a que el aumento de concentración de etanol provoca un aumento de viscosidad. La mayor viscosidad puede dificultar en cierto grado la transferencia de masa. Puesto que el disolvente es más viscoso, es más difícil que difunda a través de la matriz y disminuye la eficiencia de extracción

No obstante, la matriz empleada por Valdés-Hernández et al. (2015) es una planta (decir cuál), muy diferente de una microalga acuática como es espirulina, lo que podría explicar la diferencia de tendencia obtenida. En todo caso, la correlación entre el CTP y la AA derivadas del porcentaje de extractante empleado no es concluyente.

2.5 Tiempo de extracción

El coeficiente de Pearson (-0,42) indica que hay una correlación lineal inversa moderada, aunque no se puede afirmar con seguridad (p valor $> 0,05$).

La representación (Figura 14) muestra que la tendencia es prácticamente lineal. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los valores de actividad antioxidante (p valor = 0,32) ni entre los valores de CTP (p valor = 0,16) en los diferentes valores ensayados. Por tanto, podría establecerse que ambas variables muestran la misma tendencia.

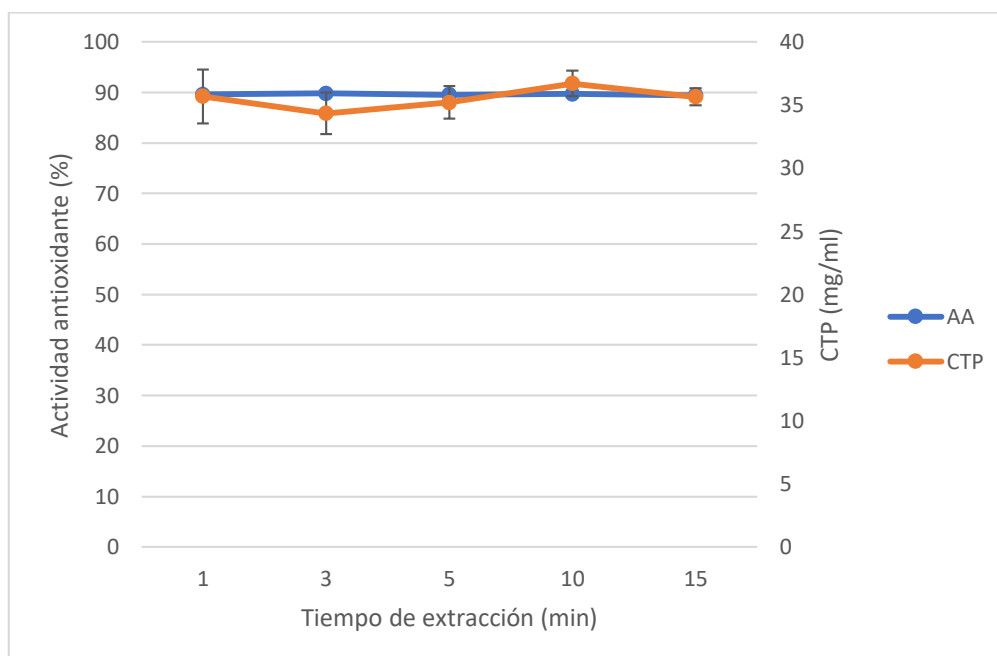


Figura 14: Efecto del tiempo de extracción sobre el contenido total de polifenoles (CTP) y la actividad antioxidante (AA) ($n=3$). Se representa la desviación estándar con las barras de error.

Cabe comentar que la extracción durante amplios periodos de tiempo (empleando además altas temperaturas) puede provocar la inestabilidad o descomposición de ciertos compuestos fenólicos como las antocianinas y el ácido gálico, y por lo tanto disminuir la actividad de los extractos obtenidos (Arciniegas, 2020; Belwal *et al.*, 2018). En este caso, los tiempos ensayados son lo suficientemente breves como para no afectar significativamente al Contenido Total de Polifenoles ni a la actividad del extracto.

2.6 Potencia de extracción

De la misma manera, pese a que la r de Pearson (-0,31) indica una correlación inversa moderada, la correlación no es estadísticamente significativa (p valor = 0,5). No hay diferencias significativas entre las potencias estudiadas en cuanto a actividad antioxidante (p valor = 0,09) ni respecto a contenido total de polifenoles (p -valor = 0,13), (Figura 15).

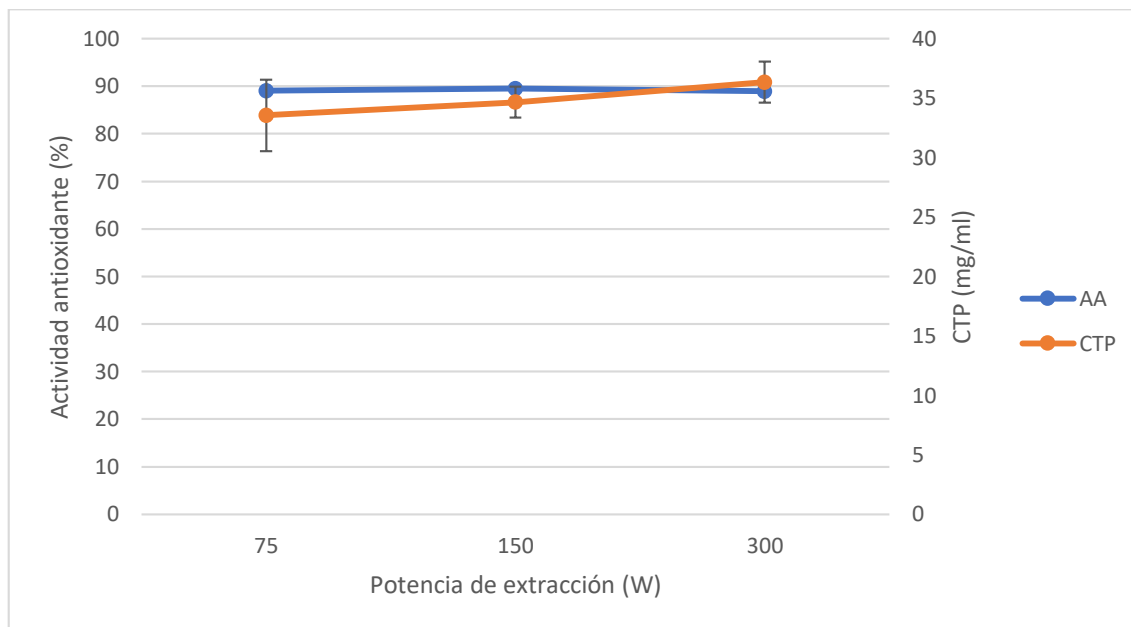


Figura 15: Efecto de la potencia de extracción sobre el contenido total de polifenoles (CTP) y la actividad antioxidante (AA) ($n=3$). Se representa la desviación estándar con las barras de error.

2.7 Temperatura de extracción

Por último, la r de Pearson (-0,55) indica una correlación lineal inversa moderada, aunque el p -valor (0,13) indica que no puede afirmarse con seguridad.

Estudiando ambas variables por separado, puede verse que, respecto a la actividad antioxidante, 25 y 35 °C son significativamente diferentes (y mejores) que 45°C (Figura 10). En cuanto al contenido total de polifenoles (Figura 17), no hay diferencias significativas entre 45 y 25°C. Sin embargo, se obtiene una cantidad significativamente menor de polifenoles a 25°C que a 45°C. Estos datos demuestran que ambas variables (Actividad antioxidante y CTP) no obtienen los mismos resultados (Figura 16).

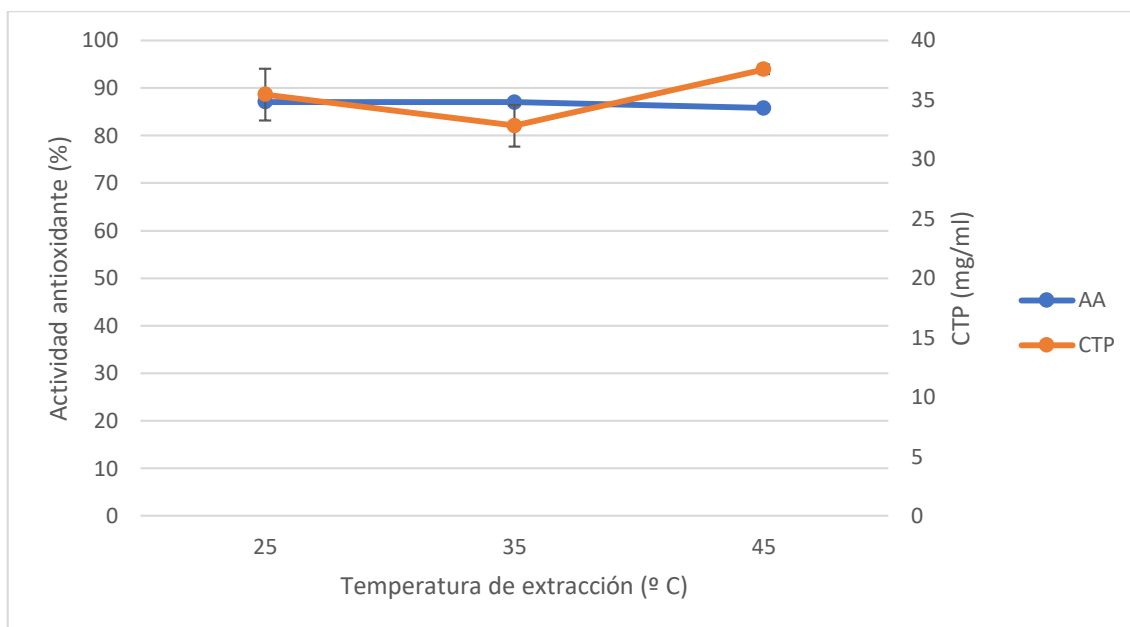


Figura 16: Representación de la correlación entre el contenido total de polifenoles (CTP) y la Actividad antioxidante. Se representa la desviación estándar con las barras de error.

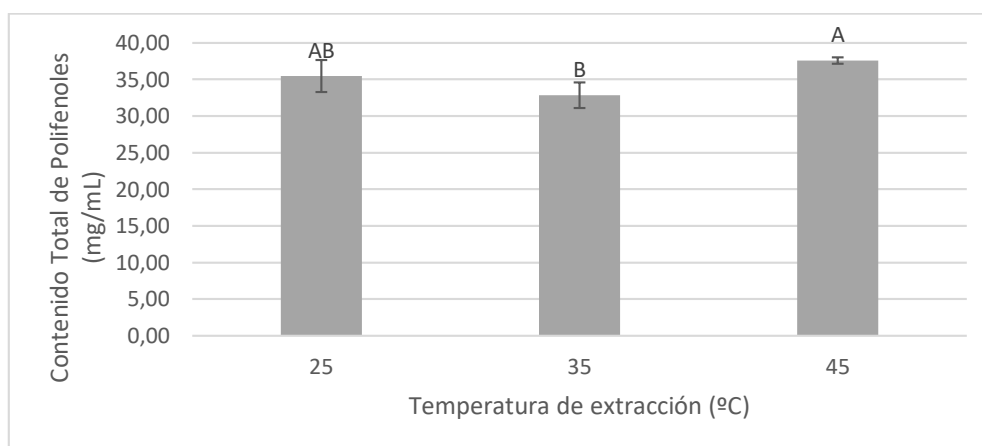


Figura 17: Efecto de la temperatura de extracción sobre el contenido total de polifenoles (mg/ml) de los extractos (n=3). Se refleja además la desviación estándar y el resultado de la comparación post hoc de las variables. Los valores con letras diferentes son significativamente ($p < 0.05$) diferentes.

Generalmente, la temperatura influye positivamente en la extracción, facilitando la transferencia de masa al aumentar la solubilidad del soluto en el disolvente. Sin embargo, los resultados muestran que la variación de CTP es muy pequeña, aunque significativa. Podría deberse a que en el proceso de extracción asistida por ultrasonidos prima la lixiviación física, y un cambio de 10°C de diferencia entre cada valor estudiado no es suficiente para apreciar un aumento destacable del CTP. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Valdés-Hernández et al. (2015), en la que se realiza una extracción SL en una matriz vegetal.

La extracción de polifenoles presenta una cinética dependiente de la temperatura, en la cual mejora el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos con el aumento de la temperatura (Bucić-Kojić et al., 2013). Aunque el aumento de temperatura compromete la estabilidad de las catequinas y provoca su degradación (Li et al., 2012; Wang et al., 2006). En la Figura 16 se observa cómo el CTP se mantiene más o menos estable y no sigue una tendencia creciente, ya que el aumento del rendimiento se produce a temperaturas muy elevadas durante tiempos cortos (Trillo, 2015). Sin embargo, estas temperaturas aseguran la integridad de epicatequinas y catequinas, ya que en presencia de elevadas temperaturas se acelera la epimerización (reacción de isomerización de epicatequinas hacia catequinas) (Wang y Helliwell, 2000).

Como conclusión, los parámetros del ultrasonidos no están marcando si la AA está condicionada por el CTP o no, mientras que en el caso de Cantidad de alga y Tipo de extractante sí hay una correspondencia directa entre la AA y el CTP.

No obstante lo anterior, se ha realizado una caracterización del extracto antioxidante optimizado a fin de detectar la posible presencia de otras sustancias antioxidantes.

3. Caracterización del extracto antioxidante

Los extractos son mezclas complejas, formadas por diferentes componentes activos en niveles generalmente bajos. La actividad de los componentes depende de su concentración relativa, de los efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos que provoquen los unos sobre los otros, y de la presencia de otros compuestos que interfieran (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009; Santiago-Díaz et al., 2022).

La mayoría de los estudios sobre los antioxidantes presentes en *Arthrospira platensis* se centran en la actividad del pigmento C-ficocianina, carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados (Kepekçi y Saygideger 2012; Scaglioni et al., 2018), aunque los ácidos fenólicos también tienen un papel fundamental en la actividad antioxidante de las especies de *Arthrospira* (Blagojević et al., 2018). Puesto que la bibliografía indica que la actividad antioxidante se asocia a pigmentos, polisacáridos y polifenoles, se caracterizaron estos compuestos.

3.1 Perfil de polifenoles

La determinación de compuestos fenólicos como moléculas individuales en los extractos es de gran importancia para la actividad de captación de radicales DPPH. Esta actividad depende de la estructura química de los compuestos, así como de la cantidad y ubicación de los grupos hidroxilo en ellos (Agregán et al., 2018; Quideau et al., 2011). Por ejemplo, el ácido cafeico que tiene dos grupos hidroxilo tiene mayor actividad antioxidante que el ácido cumárico, que es un homólogo del ácido cafeico pero con un solo grupo hidroxilo. Por lo tanto, es importante caracterizar individualmente los compuestos fenólicos presentes en los extractos porque tienen un impacto significativo en su actividad antioxidante (Agregán et al., 2018).

Se caracterizaron los compuestos fenólicos recogidos en la Tabla 1 presentes en extractos por triplicado obtenidos siguiendo el protocolo optimizado. Hubo variaciones entre las réplicas que se pueden apreciar en forma de desviaciones estándar elevadas. Se recomiendan ensayos posteriores para tratar de conseguir una mejor reproducibilidad de los resultados.

Tabla 1: Concentración de polifenoles determinados por HPLC-DAD en los extractos obtenidos a partir de las condiciones óptimas. Los valores reflejan el promedio \pm desviación estándar para los experimentos por triplicado (n=3).

| Longitud de onda (nm) | Polifenol | Concentración ($\mu\text{g/g}$) $\pm \sigma$ |
|-----------------------|----------------------|--|
| 270 | Fluoroglucinol | n.d. |
| | Ácido gálico | 625,54 \pm 74,76 |
| | Catequina | n.d. |
| | Ácido vanílico | 1125,61 \pm 90,69 |
| | Epicatequina | n.d. |
| | Ácido protocatéquico | n.d. |
| | Rutina | n.d. |
| 324 | Ácido gentísico | n.d. |
| | Ácido clorogénico | n.d. |
| | Ácido cafeico | 17,68 \pm 11,53 |
| | Ácido cumárico | 12,13 \pm 6,48 |
| | Ácido ferrúlico | 17,86 \pm 4,66 |
| 373 | Miricetina | n.d. |
| | Quercetín | 9,66 \pm 0,80 |

n.d. = Los compuestos anotados como n.d. (Not Detected) no fueron detectados.

Los cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda (Figura 18) permitieron identificar y cuantificar parte de los polifenoles presentes en el extracto. Algunos de los picos presentes en ellos, sin embargo, no pudieron ser identificados con seguridad al no coincidir los tiempos de retención con los tiempos caracterizados por el grupo de investigación. Para confirmar con seguridad la identificación de esos picos, se recomiendan ensayos posteriores con muestras enriquecidas en los compuestos de interés. Otros investigadores también registraron dificultades para detectar los compuestos en sus muestras. Por ejemplo, Blagojević et al. (2018) estudiaron la presencia de ácido gálico, clorogénico, quínico, catequina, epicatequina, kaempferol, rutina y apiín en diferentes cepas de cianobacterias, pero sólo pudieron detectar la presencia de catequina en las cepas del género *Arthrospira*. Por su parte, Jerez-Martel et al. (2017) buscaron ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido siríngico, ácido protocatequico y ácido clorogénico, sin obtener resultados en *A. platensis*.

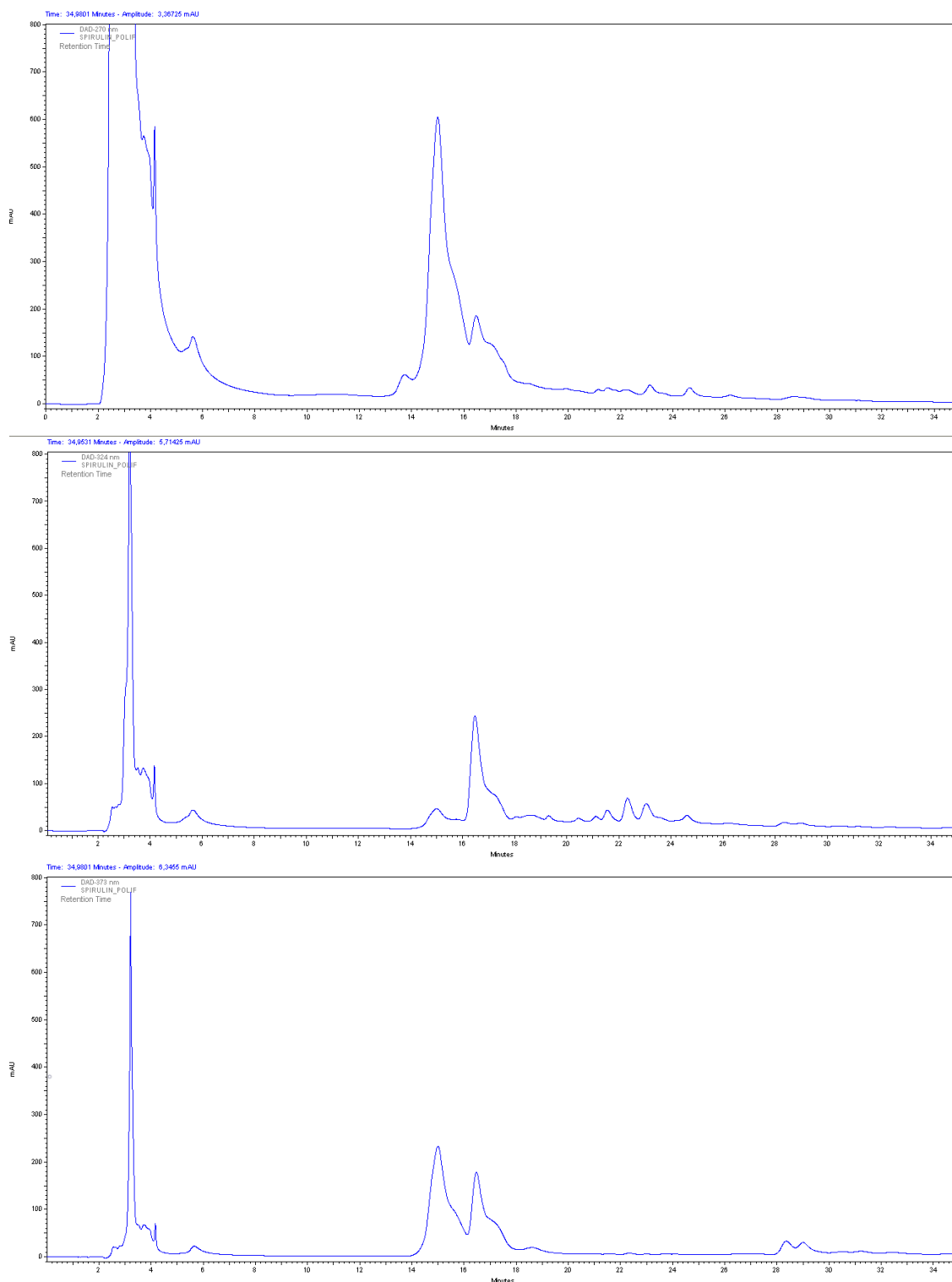


Figura 18: Cromatogramas HPLC-DAD (270nm, 324nm y 373nm, respectivamente) que muestran los polifenoles encontrados en las muestras obtenidas con las condiciones óptimas de extracción.

Blagojević et al. (2018) detectaron catequina en extractos de espirulina y otras cianobacterias. Otros estudios también detectan catequina y epicatequina (Machu et al., 2015) En este estudio, los picos del cromatograma no coincidían con los tiempos de retención establecidos para estos compuestos. Tampoco se ha detectado ácido quínico, que es uno de los compuestos más abundantes en *Arthrospira maxima* y se ha

detectado también en *A. platensis* (Miranda et al., 1998; Abd El-Baky et al., 2009). Blagojević et al. (2018) detectaron ácido quínico en todas las cepas de cianobacterias estudiadas menos en *Arthrospira*. El estudio de Blagojević et al. (2018) puede ser más preciso ya que contaban con un espectrómetro de masas en tándem acoplado al HPLC. Aunque cabe señalar que el ácido quínico existe de forma natural en forma de ésteres como el ácido clorogénico, que se forma como producto del ácido quínico y el ácido cafeico (Blagojević et al., 2018). El ácido cafeico sí que se ha detectado en los extractos ($17,68 \pm 11,53 \mu\text{g/g d.w.}$). Se valoró la posible presencia de ácido clorogénico en el extracto, pero se descartó finalmente al no mostrar la evolución característica del compuesto en los diferentes cromatogramas.

Cengiz Sahin (2018) realizó un análisis cromatográfico similar al realizado en este estudio. Los tiempos de retención de los patrones aparecen más desplazados en el tiempo que los patrones realizados por el grupo de investigación. En algunos de los casos esto ha influido en la identificación de los polifenoles, al hallar picos en tiempos más desplazados de lo esperado. Cengiz Sahin (2018) realizó pinchazos de 65 minutos, mientras que en nuestro caso los pinchazos fueron de 40 minutos. Quizás aumentar el tiempo de análisis mejoraría la resolución de los picos en el cromatograma.

En los extractos analizados, los compuestos fenólicos más abundantes han sido el ácido vanílico ($1125,61 \pm 90,69 \mu\text{g/g d.w.}$) y el ácido gálico ($625,54 \pm 74,76 \mu\text{g/g d.w.}$). Estos resultados coinciden con lo expuesto por Abd El-Baky et al. (2009) y Shalaby y Shanab (2013), que dijeron que eran dos de los fenoles principales de *A. platensis*. Cengiz Sahin (2018) realizó un análisis de extractos acuosos y extractos etanólicos de *A. platensis*. También halló que el compuesto más abundante era el ácido vanílico en ambos extractos (11, 63 y 8,47 ppm, respectivamente). Sin embargo, el ácido gálico fue el segundo componente más abundante en el extracto acuoso (1,45 pmm), pero no en el etanólico (0,024 ppm). En el extracto hidroalcohólico utilizado en este estudio, se obtuvieron 369,33 ppm de ácido vanílico y 218,94 ppm de ácido gálico. Estos compuestos de bajo peso molecular son más solubles y más fácilmente extraíbles. Los polifenoles más apolares, de mayor tamaño, con un elevado peso molecular o una estructura compleja son más difícilmente extraíbles y sería necesario utilizar una cantidad de solvente mayor (Trillo, 2015), como es el caso de la rutina. Aunque aumentar el volumen de solvente implicaría una mayor dilución de los compuestos en el extracto, por lo que podría no ser eficiente. Trillo (2015) comparó el perfil de polifenoles a partir de una extracción acuosa frente a una hidroalcohólica. Observó que el agua presente en ambas muestras permitía extraer eficientemente compuestos de bajo peso molecular como el ácido gálico, la catequina o la epicatequina, que son considerados los compuestos con mayor actividad antioxidante. Sin embargo, la extracción

hidroalcohólica lograba obtener otros polifenoles de interés. El ácido vanílico y el ácido gálico tienen una elevada actividad antioxidante. Entre otros, son mejores eliminadores de radicales libres que muchas flavonas monoméricas o flavonoles utilizados (Santiago-Díaz et al., 2022).

En el extracto también se ha detectado ácido cafeico ($17,68 \pm 11,53 \mu\text{g/g d.w.}$), lo cual coincide con los resultados obtenidos por Abdullah y Valan Arasu (2015). Cengiz Sahin (2018) detectó ácido cafeico en el extracto etanólico, pero no en el extracto acuoso de *A. platensis*. Por lo tanto, este compuesto se obtiene gracias a que el solvente utilizado en la extracción es hidroalcohólico. Se observa el efecto de la optimización, ya que Cengiz Sahin (2018) detectó 0,473 ppm del compuesto, mientras que en el extracto analizado se detectaron 10,20 ppm. En el extracto optimizado también se encontraron ácido cumárico y ácido ferrúlico ($12,13 \pm 6,48$ y $17,86 \pm 4,66 \mu\text{g/g d.w.}$, respectivamente). Cengiz Sahin (2018) detectó ácido p-cumárico tanto en extractos acuosos como etanólicos de espirulina, obteniendo cantidades similares (e inferiores a las detectadas en el extracto optimizado). Goiris et al. (2014) también detectaron ácido p-cumárico pero en menor proporción ($0,92 \mu\text{g/g d.w.}$). En cuanto al ácido ferrúlico, sólo lo detectó en extractos etanólicos, por lo que la extracción de este compuesto se debe a la parte etanólica del extractante utilizado. Koen et al. (2014) detectaron una cantidad muy baja ($0,97 \text{ ng/g d.w.}$) de ácido ferrúlico en extractos obtenidos por sonicación con metanol, lo que parece mostrar que el etanol es mejor extractante de este compuesto que el metanol. Asimismo, la cantidad de quercetín y de ácido gálico detectados por Muszyńska et al. (2018) en extractos metabólicos de *A. platensis* son muy inferiores a los detectados en este estudio con extractos hidroalcohólicos. En otras especies de cianobacterias, los ácidos gálico, cumárico y ferrúlico también fueron detectados como compuestos principales (Babaoğlu Aydaş et al., 2013). Miranda et al. (1998) señalaron que el ácido cafeico, entre otros, puede ser responsable de la actividad antioxidante de *A. maxima*. Abd El-Baky et al. (2009) mostraron que los compuestos fenólicos más abundantes en esta especie coincidían con los encontrados en el estudio: ácido gálico, ácido cafeico, el ácido vanílico y el ácido ferrúlico, aunque además reportaron otros compuestos como los ácidos clorogénico, cinámico, p-OH-benzoico y quínico, lo cual coincide con los resultados de Cengiz Sahin (2018).

Por último, en el extracto optimizado se halló quercetín ($9,66 \pm 0,80 \mu\text{g/g}$). Cengiz Sahin (2018) detectó quercetín en extractos acuosos de *A. platensis*, pero no en los extractos etanólicos. Obtuvo 0,584 ppm del compuesto, mientras que con el extracto hidroalcohólico utilizado en el protocolo optimizado en este estudio se han detectado 3,38 ppm.

3.2 Contenido de Polisacáridos

Abdullah y Valan Arasu (2015) caracterizaron variedades de espirulina disponibles comercialmente, y encontraron que, entre los azúcares, las hexosas (glucosa, fructosa, galactosa y ramnosa) eran las que presentaban una mayor concentración (73,85%). Chaiklahan et al. (2013) vieron que la ramnosa y la glucosa componían el 53% y el 13% de los azúcares totales, respectivamente. Wang et al. (2018) también encontraron que los principales monosacáridos presentes en espirulina fueron glucosa y ramnosa.

En este estudio, se determinaron las hexosas totales del extracto por triplicado mediante el Test de DuBois. Ensayando diferentes diluciones (1:10, 1:50, 1:100), se obtuvieron los mejores resultados con la dilución a 1:50 (V:V). El extracto presenta una concentración media de hexosas de $1,18 \pm 0,02$ mg/ml. Santiago-Díaz et al. (2022) señalan que el porcentaje de carbohidratos varía en función de la especie de microalga, y que además puede variar según el proceso de secado mediante el que se obtiene la biomasa. Mientras que en algunos estudios que valoran los polisacáridos presentes en espirulina la obtienen por liofilización, la espirulina utilizada en este estudio se obtuvo de la casa comercial Sevenhills Wholefoods, que la seca por pulverización.

Chaiklahan et al. (2013) y Wang et al. (2018) señalan que el método de extracción y las variables como la temperatura, el tiempo o el pH tienen un importante efecto sobre la extracción de los polisacáridos y su actividad. Wang et al. (2018) concluyeron además que la extracción alcalina y la extracción asistida por ultrasonidos eran las mejores técnicas, logrando obtener en torno a un 9% de polisacáridos en los extractos de espirulina.

3.3 Contenido de pigmentos fotosintéticos

“Muchos estudios experimentales han atribuido los efectos beneficiosos de la espirulina a su capacidad antioxidante debido a su contenido en compuestos fenólicos, ficobiliproteínas y otros fitoquímicos” (Martínez-Galero et al., 2016)

Los diferentes ensayos permitieron cuantificar el contenido de pigmentos azules, clorofila y carotenoides presentes en el extracto crudo.

3.3.1 Pigmentos azules (C-FC, FE, APC)

Se midieron los extractos a diferentes longitudes de onda y se cuantificó el contenido de los diferentes pigmentos, que queda recogido en la Tabla 2.

Tabla 2: Concentración de pigmentos azules presentes en los extractos

| Pigmento | Concentración (mg/ml) |
|----------------------|-----------------------|
| C-Ficocianina (CFC) | 0,033 ± 0,0016* |
| Ficoeritrina (FE) | 0,026 ± 0,0007* |
| Aloficocianina (AFC) | 0,073 ± 0,0033* |

*Los valores reflejan el promedio ± desviación estándar para los experimentos por triplicado

Se obtuvieron 0,094mg/g d.w. de C-FC. Scaglioni et al. (2018) señalan que la C-Ficocianina es una de las principales biliproteínas de la espirulina, y representa el 20% de su peso seco. Además como antioxidante es hasta 20 veces más eficaz que otros antioxidantes como el ácido ascórbico (Vitamina C).

Rahim et al. (2021) realizaron una extracción de ficobiliproteínas de *A. platensis* con fosfato de potasio. Obtuvieron 18,25±1,81 mg/g de C-ficocianina (CFC), 5,34±0,14 mg/g de Aloficocianina (APC) y 3.47±0.23 mg/g de ficoeritrina (PE). Con el protocolo de extracción optimizado se han logrado extraer 0,094±0,0004 mg/g de CFC, 0,208±0,009 mg/g de AFC y 0,074±0,002 mg/g de FE. Tavakoli et al. (2021) ensayaron extracciones asistidas por ultrasonidos de espirulina con agua y con soluciones hidroalcohólicas a diferentes concentraciones. Obtuvieron que la mayor concentración de CFC se obtuvo utilizando agua como solvente, y con 20 minutos de sonicación.

Blagojević et al. (2018) destacan la importancia de las condiciones de cultivo de las cianobacterias, ya que la producción de metabolitos valiosos como las ficobiliproteínas y los ácidos grasos se puede incrementar cultivando las cepas en condiciones diazotróficas o no diazotróficas, en función de la cepa.

Además, se calcularon los criterios de pureza (Tabla 3):

Tabla 3: determinación de la pureza de los pigmentos en el extracto

| Pigmento | Ratio | Pureza | Ratio Contamin. | Resultado |
|----------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
| C-Ficocianina (C-FC) | A_{620}/A_{280} | 0,007107606 | | |
| Ficoeritrina (FE) | A_{565}/A_{280} | 0,009062904 | A_{620}/A_{565} | 0,784252586 |
| Aloficocianina (APC) | A_{650}/A_{280} | 0,019896757 | A_{650}/A_{620} | 2,799361429 |

Las ratios por encima de 4 indican la pureza del compuesto con respecto a otras proteínas. Como puede verse en las Tablas 2 y 3, hay muy pocos pigmentos azules, tanto en términos de concentración como de pureza. Esto se debe a que la extracción de este tipo de compuestos se realiza en agua en lugar de en solventes orgánicos.

Además, son muy poco estables (Pez Jaeschke et al., 2021). Pese a que el extractante tiene un 50% de agua, este puede ser el motivo por el que no se encuentre una alta presencia de este tipo de pigmentos en la muestra.

Por otra parte, en la Tabla 3 puede observarse que no hay presencia (contaminación) de R-ficocianina ($A_{620}/A_{565} > 0,005$).

Sin embargo, este criterio de evaluación de pureza ha sido ampliamente criticado y la pureza debe establecerse y corroborarse por otras técnicas como la electroforesis en condiciones desnaturizantes o la cromatografía líquida de alta resolución (Ruiz, 2012).

3.3.2 Carotenos

Puesto que el principal carotenoide en espirulina es el β -caroteno (Wu et al., 2016), se realizó una cuantificación de los carotenos presentes en los extractos. Se obtuvo una concentración de carotenos totales de $36,26 \pm 1,63 \mu\text{l/ml}$.

La espirulina contiene asimismo otros carotenoides del grupo de las astaxantinas como la zeaxantina, la β -criptoxantina, la mixoxantofila y la equinenona (Asghari et al., 2016), que podrían determinarse por cromatografía de alta resolución. Rahim et al. (2021) realizaron un extracto de *A. platensis* con acetona para cuantificar los carotenoides totales del alga, obteniendo un resultado de 1.69 ± 0.07 . Aunque no puede usarse como referencia para discutir los resultados obtenidos, ya que el método de extracción llevado a cabo no es el indicado para la extracción selectiva de carotenoides. Tavakoli et al. (2021) ensayaron extracciones asistidas por ultrasonidos de espirulina con agua, etanol y con soluciones hidroalcohólicas a diferentes concentraciones. La mayor concentración de carotenoides se obtuvo tras 20 minutos de sonicación utilizando etanol como solvente.

3.3.3 Clorofila

Del mismo modo, Rahim et al. (2021) cuantificaron la clorofila A y B de las muestras de espirulina realizando una extracción con acetona. Obtuvieron $7.44 \pm 0.07 \text{ mg/g}$ de clorofila A y $6.41 \pm 0.12 \text{ mg/g}$ de clorofila B. Los extractos obtenidos a partir de las condiciones optimizadas contienen $13,06 \pm 0,97 \mu\text{l/ml}$ de clorofila total, siendo $5 \pm 0,38 \mu\text{l/ml}$ de clorofila A y $8,06 \pm 0,59 \mu\text{l/ml}$ de clorofila B. Tavakoli et al. (2021) encontraron que las condiciones óptimas de extracción de clorofila A eran 10 minutos de sonicación utilizando etanol puro como solvente, y para la clorofila B eran necesarios 30 minutos.

Por último, con vistas a próximos estudios, cabe señalar que pese a obtener buenos rendimientos, experimentos como el de Blagojević et al. (2018) demuestran que la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de cianobacterias es inferior a la de antioxidantes sintéticos como el BHT. Por ello, sigue siendo necesaria la optimización en los procesos upstream (estimulación de producción de compuestos antioxidantes durante el cultivo y mantenimiento de las propiedades en las técnicas de recolección) como downstream (procesamiento de las muestras y protocolos de extracción y/o purificación).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. El método de extracción optimizado permite obtener un extracto de una elevada actividad antioxidante (>85%) a partir de unas condiciones muy convenientes bajo el punto de vista analítico-ambiental, utilizando 5g de espirulina y 20ml de etanol 50%, en apenas 1 minuto a 75W y temperatura ambiente (25°C).
2. El estudio de correlación ha demostrado que no hay una correlación directa entre el contenido en polifenoles y la actividad antioxidante en todas las variables estudiadas, lo que sugiere que la actividad antioxidante pueda ser debida a otras sustancias como los pigmentos o los polisacáridos, o a la diferente actividad de los polifenoles presentes en el extracto. Los parámetros del ultrasonidos no muestran correlación, mientras que en el caso de Cantidad de alga y Tipo de extractante hay una correspondencia directa entre la AA y el CTP.
3. La caracterización individual de polifenoles ha mostrado la presencia de ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferrúlico y quercetina. Además, en el extracto se ha determinado la presencia de polisacáridos y pigmentos, entre los que se encuentran carotenos, clorofila A y B, y ficobiliproteínas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Aty, A., Mohamed, A., & Samhan, F. (2014). *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of two fresh water cyanobacterial species, *Oscillatoria agardhii* and *Anabaena sphaerica*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4, 69-75.
- Abd El-Baky, H.H., El Baz, F.K., El-Baroty, G.S. (2009). Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *African Journal of Biotechnology*, 8, 7059–7067
- Agregán, R., Munekata, P. E. S., Franco, D., Carballo, J., Barba, F. J., & Lorenzo, J. M. (2018). Antioxidant Potential of Extracts Obtained from Macro- (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*) and Micro-Algae (*Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*) Assisted by Ultrasound. *Medicines (Basel)*, 5(2). <https://doi.org/10.3390/medicines5020033>
- Al-Dhabi, N. A., & Valan Arasu, M. (2016). Quantification of Phytochemicals from Commercial Spirulina Products and Their Antioxidant Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 7631864. <https://doi.org/10.1155/2016/7631864>
- Amna Kashif, S., Hwang, Y. J., Park, J. K. (2018). Potent Biomedical Applications of Isolated Polysaccharides from Marine Microalgae Tetraselmis Species. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41, 1611–1620. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30167786>
- Anastas, P. T., y Warner, J. C. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press.
- Arciniegas, V. (2020). *Recuperación de compuestos bioactivos de subproductos de la industria alimentaria mediante el empleo de mezclas etanol/agua presurizadas* [Tesis Doctoral Universidad de Burgos]. Burgos
- Asghari, A., Fazilati, M., Latifi, A. M., Salavati, H., & Choopani, A. (2016). A Review on Antioxidant Properties of Spirulina. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 3(1), 345-351.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

- Babaoğlu Aydaş, S., Ozturk, S., Aslim, B. (2013). Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates. *Food Chemistry*, 136, 164–169
- Belda, M., Sánchez, D., Bover, E., Prieto, B., Padrón, C., Cejalvo, D., Lloris, J.M. (2016) Extraction of polyphenols in *Himantalia elongata* and determination by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector prior to its potential use against oxidative stress, *Journal of Chromatography B* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.00>
- Belda, M. (2017). *Obtención y caracterización por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) de un extracto del alga Himantalia elongata con propiedades antioxidantes y su aplicación en la lesión por isquemia-reperfusión intestinal*. [Tesis doctoral Universidad Católica de Valencia "San Vicente Mártir".]. Valencia
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.018>
- Blagojević, D., Babić, O., Rašeta, M., Šibul, F., Janjušević, L., & Simeunović, J. (2018). Antioxidant activity and phenolic profile in filamentous cyanobacteria: the impact of nitrogen. *Journal of Applied Phycology*, 30(4), 2337-2346. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1476-4>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.
- Bryant, D.A. (1982). Phycoerythrin and phycocyanin: Properties and occurrence in cyanobacteria. *The Journal of General Microbiology*, 128, 835-844.
- Bucić-Kojić, A., Sovová, H., Planinić, M., Tomas, S. (2013). Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. *Food Chemistry*, 136, 1136-1140
- Čagalj, M., Skroza, D., Razola-Diaz, M. D. C., Verardo, V., Bassi, D., Frleta, R., Generalic Mekinic, I., Tabanelli, G., & Simat, V. (2022). Variations in the Composition,

- Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Cystoseira compressa* during Seasonal Growth. *Marine Drugs*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/md20010064>
- Catarino, M.D., Silva, A.M.S., Mateus, N., Cardoso, S.M. (2019). Optimization of phlorotannins extraction from *Fucus vesiculosus* and evaluation of their potential to prevent metabolic disorders. *Marine Drugs*, 17 <https://doi.org/10.3390/md17030162>
- Cengiz Sahin, S. (2018). The potential of *Arthrospira platensis* extract as a tyrosinase inhibitor for pharmaceutical or cosmetic applications. *South African Journal Of Botany*, 119, 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.09.004>
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Triratana, P., Loha, V., Tia, S., & Bunnag, B. (2013). Polysaccharide extraction from *Spirulina sp.* and its antioxidant capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.046>
- Ciferri, O. (1983). Spirulina, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47(4), 551–578, 198
- Coulombier, N., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2021). Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. *Marine Drugs* 2021, 19, 549.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). URL InfoStat versión 2020. In <http://www.infostat.com.ar>
- Do, Q., Angkawijaya, A., Tran-Nguyen, P., Huynh, L., Soetaredjo, F., Ismadji, S., & Ju, Y. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 22(3), 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Farvin, K.S., Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138, 1670–1681
- Finamore, A., Palmery, M., Bensehaila, S., & Peluso, I. (2017). Antioxidant, Immunomodulating, and Microbial-Modulating Activities of the Sustainable and Ecofriendly Spirulina. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 3247528. <https://doi.org/10.1155/2017/3247528>

- Gomont, M. (1892 '1893'). Monographie des Oscillariées (Nostocacées Homocystées). Deuxième partie. - Lyngbyées. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Série 7 16: 91-264, pls 1-7.*
https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43076
- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., De Paepe, D., E Baart, G.J., De Cooman, L., Posewitz, M. (2014). Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *Journal of Phycology*, 50(3), 483–492.
<https://doi:10.1111/jpy.12180>
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2022). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>
- Hernández Lepe, M. A., Wall-Medrano, A., Juárez-Oropeza, M. A., Ramos-Jimenez, A., & Hernandez-Torres, R. P. (2015). Spirulina and Its Hypolipidemic and Antioxidant Effects in Humans: A Systematic Review. *Nutrición Hospitalaria*, 32(2), 494-500. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.2.9100>
- Hipkins, M. F., & Baker, N. R. (1986). Photosynthesis, energy transduction. *IRL Press, Oxford, United Kingdom.*, 51-101.
- IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Jacobo-Velázquez, D.A., Cisneros-Zevallos, L. (2009). Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. *Journal of Food Science*, 74, R107–R113.
- Jerez-Martel, I., García-Poza, S., Rodríguez-Martel, G., Rico, M., Afonso Olivares, C., Gómez-Pinchetti, J. (2017). Phenolic profile and antioxidant activity of crude extracts from microalgae and cyanobacteria strains. *Journal of Food Quality*, 4, 1–8.
- Joshi, D., y Adhikari, N. (2019). An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Journal Of Pharmaceutical Research International*, 28(3), 1-18.
<https://doi.org/10.9734/JPRI/2019/v28i330203>
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents on the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 330, 213-217.

- Kawasaki, H., Shimanouchi, T., Kimura, Y. (2019). *Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. Journal of Chemistry*, 1–14. doi:[10.1155/2019/9502856](https://doi.org/10.1155/2019/9502856)
- Kazir, M., Abuhassira, Y., Robin, A., Nahor, O., Luo, J., Israel, A., Golberg, A., & Livney, Y. D. (2019). Extraction of Proteins from Two Marine Macroalgae, *Ulva sp.* and *Gracilaria sp.*, for Food Application, and Evaluating Digestibility, Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of the Protein Concentrates. *Food Hydrocolloids*, 87, 194–203. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.047>
- Kepekçi, R. A., y Saygideger, S. D. (2012). Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 24, 897-905.
- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O., Gayen, K., & Bhowmick, T. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food And Bioproducts Processing*, 110, 60-84. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>
- Klinchongkon, K., Chanthong, N., Ruchain, K., Khuwijitjaru, P., & Adachi, S. (2017). Effect of Ethanol Addition on Subcritical Water Extraction of Pectic Polysaccharides from Passion Fruit Peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13138>
- Kolmakova, A. A., & Kolmakov, V. I. (2019). Amino Acid Composition of Green Microalgae and Diatoms, Cyanobacteria, and Zooplankton (Review). *Ecological Physiology of Hydrobionts and Biotechnology*, 12, 452–461.
- Kröger, M., Klemm, M., Nelles, M. (2019). Extraction Behavior of Different Conditioned, *S. Rubescens*. *Energies*, 12, 1336
- Kurd, F., & Samavati, V. (2015). Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: extraction and in vitro anti-cancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 498-506. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.005>
- Lamuela-Raventós, R. M. (2018). Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. In *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* (107-115). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>

- Li, N., Taylor, L. S., Ferruzzi, M. G., Mauer, L. J. (2012). Kinetic Study of Catechin Stability: Effects of pH, Concentration, and Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12531-12539.
- Luisetti, J., Lucero, H., & Ciappini, M. C. (2020). Estudio preliminar para optimizar la extracción de compuestos fenólicos bioactivos de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *RECyT*, 33.
- Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., El Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., Bakri, Y., & Wahby, I. (2015). Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: PUFA profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology*, 215, 13-19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26113214>
- Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., & Jurikova, T. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*, 20(1), 1118-1133. <https://doi.org/10.3390/molecules20011118>
- Malavasi, V., Soru, S., Cao, G. (2020). Extremophile Microalgae: The Potential for Biotechnological Application. *Journal of Phycology*, 56, 559–573.
- Martinez-Galero, E., Perez-Pasten, R., Perez-Juarez, A., Fabila-Castillo, L., Gutierrez-Salmean, G., & Chamorro, G. (2016). Preclinical antitoxic properties of *Spirulina* (*Arthrospira*). *Pharmaceutical Biology*, 54(8), 1345-1353. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1077464>
- Medina, N. C. (2017). *Efecto del ultrasonido en la extracción y nanoencapsulación de polifenoles de limón persa (Citrus latifolia)* Mérida, Yucatán.
- Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B.M., Mancini-Filho, J. (1998). Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological*, 31, 1075–1079
- Moreno, L. (2016). *ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA C-FICOCIANINA* [Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Almería]. Almería
- Munir, M. T., Kheirkhah, H., Baroutian, S., Quek, S. Y., & Young, B. R. (2018). Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin. *Journal of Cleaner Production*, 183, 487–494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.166>
- Muszyńska, B., Lazur, J., Jękot, B., Krakowska, A., Szewczyk, A., & Sułkowska-Ziaja, K. et al. (2018). Release of bioactive substances from formulations containing

- Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 75(5), 1187-1199. <https://doi.org/10.32383/appdr/85111>
- Nowicka-Krawczyk, P., Mühlsteinová, R., Hauer, T. (2019). Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria). *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36831-0>
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic Stresses as Tools for Metabolites in Microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216–1226.
- Pez Jaeschke, D., Rocha Teixeira, I., Damasceno Ferreira Marczak, L., & Domeneghini Mercali, G. (2021). Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143, 110314. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110314>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységú, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 586–621
- Ramón, C., & Gil-Garzón, M. A. (2021). Efecto de los parámetros de operación de la extracción asistida por ultrasonido en la obtención de polifenoles de uva: una revisión. *TecnoLógicas*, 24(51). <https://doi.org/10.22430/22565337.1822>
- Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, por el que se aprueba la lista positiva de los disolventes de extracción que se pueden utilizar en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes, y el contenido máximo en residuos de los productos alimenticios, BOE núm. 208, 94132 a 94137 (2011).
- Rey, L., & May, J. (2016). *Freeze drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products* (3rd ed.). Informa Healthcare
- Ruiz, E. (2012). *Obtención y purificación de ficoeritrina mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. Escalado del proceso, caracterización fisicoquímica y aplicación como colorante natural*. [Tesis doctoral Universidad de Jaén, Escuela politécnica superior de Linares]. Jaén.
- Sabeena Farvin, K.H., Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138, 1670-1681
- Safafar, H., van Wagenen, J., Møller, P., Jacobsen, C. (2015) Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some

- microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs*, 13, 7339–7356
- Sanchez-Bonet, D., Garcia-Oms, S., Belda-Antoli, M., Padron-Sanz, C., Lloris-Carsi, J. M., & Cejalvo-Lapena, D. (2021). RP-HPLC-DAD determination of the differences in the polyphenol content of *Fucus vesiculosus* extracts with similar antioxidant activity. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1184, 122978. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122978>
- Sansone, C., y Brunet, C. (2019). Promises and Challenges of Microalgal Antioxidant Production. *Antioxidants*, 8, 199. <https://doi.org/http://doi.org/10.3390/antiox8070199>
- Santiago-Diaz, P., Rivero, A., Rico, M., & Gomez-Pinchetti, J. L. (2022). Characterization of Novel Selected Microalgae for Antioxidant Activity and Polyphenols, Amino Acids, and Carbohydrates. *Marine Drugs*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/md20010040>
- Scaglioni, P. T., Quadros, L., de Paula, M., Furlong, V. B., Abreu, P. C., & Badiale-Furlong, E. (2018). Inhibition of Enzymatic and Oxidative Processes by Phenolic Extracts from *Spirulina sp.* and *Nannochloropsis sp.* *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 344-353. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5495>
- Shalaby, E.A., Shanab, S.M.M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42, 556–564.
- Shukla, V., Vashistha, M., & Singh, S. N. (2009). Evaluation of antioxidant profile and activity of amalaki (*Embllica officinalis*), spirulina and wheat grass. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24(1), 70-75.
- Shyam, R., Singh, S., P, V., VK, S., R, B., SB, S., & PK., B. (2007). Wheat grass supplementation decreases oxidative stress in healthy subjects. A comparative study with spirulina. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13, 789-791.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2003). Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera Lam.*) Leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2144.

- Solutions. Sevenhills Wholefoods. (2022). Acceso 29 Junio 2022, en <https://sevenhillswholefoods.freshdesk.com/support/solutions/>
- Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, 36, 175-192. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>
- Tavakoli, S., Hong, H., Wang, K., Yang, Q., Gahrue, H., & Zhuang, S. (2021). Ultrasonic-assisted food-grade solvent extraction of high-value added compounds from microalgae *Spirulina platensis* and evaluation of their antioxidant and antibacterial properties. *Algal Research*, 60, 102493. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102493>
- Trillo, J. L. (2015). Extracción y purificación de productos naturales de interés industrial [Trabajo fin de master (practicum), Universidad de Almería].
- Valdés-Hernández, G. V., Cruz-Viera, L., & Comet-Rodríguez, R. (2015). Influencia de las condiciones de operación en la extracción de polifenoles a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. *Revista CENIC. Ciencias Químicas.* , 46, 135-145. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181643224032>
- Vonshak, A. (2002). *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). *Fisiología, Biología Celular y Biotecnología* (pp. 5-6/16; 148-150; 175). Taylor & Francis Ltd 1997.
- Wang, H., Helliwell, K. (2000). Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, 70, 337-344.
- Wang, R., Zhou, W., Wen, R-A. H. (2006). Kinetic Study of the Thermal Stability of Tea Catechins in Aqueous Systems Using a Microwave Reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5924-5932.
- Wang, B., Liu, Q., Huang, Y., Yuan, Y., Ma, Q., Du, M., Cai, T., & Cai, Y. (2018). Extraction of Polysaccharide from *Spirulina* and Evaluation of Its Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 3425615. <https://doi.org/10.1155/2018/3425615>
- Wen, L., Lin, L., You, L., Yang, B., Jiang, G., & Zhao, M. (2011). Ultrasound-assisted extraction and structural identification of polysaccharides from *Isodon lophanthoides* var. *gerardianus* (Bentham) H. Hara. *Carbohydrate Polymers*, 85, 541–547.
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klimova, B., Wan, D., & Kuca, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview.

Archives of Toxicology, 90(8), 1817-1840. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>

Yan, Y. L., Yu, C. H., Chen, J., Li, X. X., Wang, W., & Li, S. Q. (2011). Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*. *Carbohydrate Polymers*, 83 (1), 217–224.

Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., Li, S., Peng, N., Liang, Y., & Zhao, S. (2016). Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysate of *Spirulina platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1216-1223. <https://doi.org/10.4014/jmb.1601.01033>

Zhou, Z. P., Liu, L. N., & Chen, X. L. (2005). Factors that effect antioxidant activity of C-phycocyanins from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 313–322.