

# *Producción y usos de C- ficocianina de Arthrospira maxima*

---

*Emma Gabriela Antonio Marcos*

COMITÉ TUTORIAL:

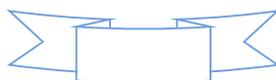
DIRECTOR: DR. OSCAR MONROY HERMOSILLO

ASESORA: DRA. EUGENIA OLGUÍN PALACIOS

ASESOR: DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

22-10-2019

---



## Contenido

Índice de figuras .....	iii
Índice de Cuadros.....	iv
Abreviaturas .....	v
RESUMEN .....	vi
Agradecimientos .....	1
CAPÍTULO 1: Introducción.....	2
1.1.    Justificación .....	2
1.2 OBJETIVOS .....	6
1.2.1 Objetivo general:.....	6
1.2.2. Objetivos particulares: .....	6
CAPÍTULO 2: <i>Arthrospira</i> como biofactoría.....	7
2.1. Morfología y taxonomía.....	7
2.2. <i>Arthrospira</i> como alimento funcional .....	8
2.3. Cultivos de cianobacterias: <i>Arthrospira</i> .....	9
2.3.1 Reactores <i>raceway</i> y fotobioreactores .....	13
2.4 Compuestos bioactivos de <i>Arthrospira</i> : C-ficocianina, $\beta$ -caroteno y ácido $\gamma$ linolénico.....	14
2.4.1. Usos generales de la C-FC, el $\beta$ C y el GLA.....	16
2.4.2 Mercado de la C-FC, el $\beta$ C y el GLA .....	17
2.5. Producción de C-ficocianina en <i>Arthrospira</i> .....	18
2.6. Producción de carotenoides en <i>Arthrospira</i> : $\beta$ -caroteno. ....	19
2.7. Producción del ácido $\gamma$ -linolénico en <i>Arthrospira</i> .....	21
2.8. Extracción de biocompuestos .....	22
2.8.1 Extracción de ficobiliproteínas.....	23
2.9. Pigmentos naturales: ficobiliproteínas .....	25

2.9.2. Materiales de recubrimiento .....	29
Capítulo 3: Usos antioxidantes de la ficocianina.....	33
3.1.1 Sustancias de oxígeno y nitrógeno reactivo.....	34
3.1.2 Evaluación de la capacidad antioxidante .....	35
3.2 Usos de terapéuticos de la C-ficocianina .....	36
3.2.1 Capacidad antioxidante de C-ficocianina .....	36
3.2.2. Antioxidantes y SOR en los espermatozoides.....	37
3.3 Hipótesis.....	39
4. Material y métodos .....	40
4.1. Microorganismos.....	40
4.2. Extracción y cuantificación.....	40
4.2.1. Extracción de $\beta$ -caroteno. ....	40
4.2.2. Extracción de ácido $\gamma$ -linolénico. ....	41
4.2.3 Extracción de C-FC de <i>Arthrospira</i> .....	41
4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante de C-FC.....	42
4.3.1. Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)).....	42
4.3.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).....	43
4.4. Evaluación de los recubrimientos como protectores de C-FC .....	43
4.4.1 Recubrimientos de C-FC .....	43
4.4.1 Evaluación del color de la C-FC como indicador de estabilidad.....	43
4.4.2 Evaluación de la termorresistencia C-FC recubierta. ....	44
4.5. Evaluación de C-FC en la preservación de semen de cerdo ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ).....	44
4.5. Concentraciones de C-FC.....	44
4.5.2. Obtención de los espermatozoides.....	44
4.5.3. Almacenamiento de espermatozoides .....	44
4.5.4. Determinación del daño al ADN de los espermatozoides.....	45

4.5.5. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	45
4.6. Análisis estadístico .....	45
5. Resultados y discusión .....	46
5.1. Cultivo de microorganismo .....	46
5.2 Análisis y cuantificación del ácido gamma linolénico y $\beta$ -caroteno.....	46
5.3. Extracción de C-ficocianina de <i>Arthrospira</i> .....	47
5.3. Evaluación de la capacidad antioxidante in vitro: ABTS y DPPH .....	49
5.4. Evaluación de los recubrimientos comestibles .....	52
5.5 C-ficocianina como protector de espermatozoides refrigerados de cerdo ( <i>Sus scrofa domesticus</i> ). .....	54
6. Conclusiones.....	58
7. Perspectivas de investigación. ....	59
8. Referencias.....	60

## Índice de figuras

Figura 1.- Línea fotosintética de la vía de transferencia de electrones en la membrana tilacoidal (Oliver <i>et al.</i> , 2012).....	13
Figura 2.- Estructura de C-ficocianina (Gupta <i>et al.</i> , 2011).....	15
Figura 3.- $\beta$ -caroteno (Pignolet <i>et al.</i> , 2013).....	15
Figura 4.- Ácido gamma linolénico (Koller <i>et al.</i> , 2014).....	16
Figura 5.- Estructura de ficocianina: A) estructura cristalina, B) subunidades $\alpha$ y $\beta$ , y C) estructura química (Fernández-Rojas <i>et al.</i> , 2014).....	27
Figura 6.- Ejes del sistema CIELAB se indican con los nombres L*, a* y b*.....	28
Figura 7. Curva estándar de C-ficocianina. $ABS_{620} = 1.0156 (X_{FC}) - 0.0287$ con $r^2 = 0.997$ .....	42
Figura 8. Cultivo de <i>A. maxima</i> LJGR1 con 10.6 mM de urea y 0.26 M de NaCl.....	46
Figura 9. Optimización de temperatura para obtener C-FC por el método de sonicación.....	48
Figura 10.- Inhibición de los radicales DPPH (A) y ABTS (B) de C-FC obtenida de <i>A. maxima</i> LJGR1 al minuto 30. Letras con diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) (letras en minúsculas diferencias	

significativas de las diferentes técnicas de extracción y mayúsculas diferencias significativas dentro las concentraciones de C-FC). .....	50
Figura 11. Purificación e IC <sub>50</sub> por radical DPPH. Son= sonicación, ■=purificación e  IC <sub>50</sub> . .....	51
Figura 12. Evaluación de la equivalencia de Trolox con el radical ABTS. ◆= sonicación 45°C ■= maceración, ▲ = sonicación 35°C, ●= enzimático.....	51
Figura 13.- (A) Degradación de C-FC y (B) Energía de activación de la degradación de C-FC con diferentes recubrimientos. ■= nopal (nop), □= pectina (pec), ▲ = inulina (In), ◆= dextrina (Dex), ○= amaranto (Am), ●= sábila (Sab), ◆=chia y — = sin recubrimiento (Wc). .....	52
Figura 14. Cambio de color ( $\Delta E^*$ ) de C-FC-recubrimiento durante 14 días. ■= <i>nopal</i> , □= pectin, ▲= inulin, ◆= dextrin, ○= amaranth, ●= aloe and ◆=chia.....	53
Figura 15.- Efecto de la C-FC en un extender de corta duración en la viabilidad de espermatozoides. Los valores se expresan como medias $\pm$ DE. Diferentes letras son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). ANOVA seguido de Duncan. ....	54
Figura 16.- Efecto de la dosis de C-PC a diferentes tiempos de almacenamiento en la motilidad progresiva de los espermatozoides a 4 ° C. Los valores se expresan como medias $\pm$ DE. Diferentes letras son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). ANOVA seguido de Duncan.....	55
Figura 17.- Efecto de la dosis de C-PC a diferentes tiempos de almacenamiento en el ADN de los espermatozoides a 4°C. Los valores se expresan como medias $\pm$ SEM. Diferentes letras son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). ANOVA seguido por Duncan.....	55
Figura 18.- Efecto de C-PC en el ADN de espermatozoides no dañado con PMot. ....	56
Figura 19.- Porcentaje de media de intensidad de fluorescencia (MIF) indicativos de SOR. Los valores se expresan como medias $\pm$ SEM. Diferentes letras son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). ANOVA seguido por Duncan.....	56

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1.-</b> Principales medios de cultivo para <i>Arthrospira</i> . .....	10
<b>Cuadro 2.- Precio de los biocompuesto C-ficocianina, <math>\beta</math>-caroteno y <math>\gamma</math>-linolénico.</b> .....	18
<b>Cuadro 3.-</b> Parámetro de C-ficocianina producido por <i>Arthrospira</i> .....	19
<b>Cuadro 4.-</b> Producción de carotenoides en <i>Arthrospira</i> . ....	20
<b>Cuadro 5.-</b> Determinación de $\beta$ -caroteno en <i>Arthrospira</i> .....	20

Cuadro 6.- <b>Determinación de ácido gamma linolénico en <i>Arthrospira</i></b> .....	22
Cuadro 7.- Recuperación de FC (mg g <sup>-1</sup> ) por diferentes tipos de extracción. ....	23
Cuadro 8.- Métodos de encapsulado y recubrimiento de ficocianina (FC).....	31
Cuadro 9.- Concentración de ácidos grasos y β-caroteno. ....	47
Cuadro 10.- Concentración (mg g <sup>-1</sup> ) y pureza (A <sub>620</sub> /A <sub>280</sub> ) de C-FC por diferentes técnicas de extracción.....	48
Cuadro 11.- Parámetro de color (CIELAB) de C-FC con diferentes recubrimientos.....	53

## Abreviaturas

2-OG	2-oxoglutarato
A	Antioxidante
AA	ácido araquidónico
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)
AFC	Aloficocianina
βC	β-caroteno
C-FC	C-ficocianina
DHA	ácido docosahexaenoico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
SOR	sustancias de oxígeno reactivo de ROS (reactive oxygen species)
SNR	sustancias de nitrógeno reactivo de RNS (reactive nitrogen species)
ET	transferencia de electrones
GLA	Ácido gamma linolénico
GS	ciclo de la glutamina y glutamato sintetasa
GOGAT	ciclo de glutamato sintetasa
HAT	transferencia de átomos hidrógeno
•OH	radical hidroxilo
PSII	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
PCB	Ficocianobilina
PEB	Ficoeritrobilina

# RESUMEN

La C-ficocianina (C-FC) es un biopigmento que se usa como un suplemento proteico y antioxidante pues contiene un cromóforo (ficocianobilina) que, por tener estructura similar a la bilirrubina, un antioxidante natural, tiene la capacidad de eliminar sustancias de nitrógeno y oxígeno reactivos. El género *Arthrospira*, (cianobacteria) produce una gran cantidad de este pigmento y una de sus especies, la *A. máxima*, que crece en ambientes alcalinos y salinos, fue cultivada en el Lago de Texcoco por los mexicas prehispánicos y más recientemente de 1967 a 1993 por Sosa Texcoco SA a escala industrial. Mundialmente se sigue produciendo debido a su alto contenido de biocompuestos de interés comercial. La cantidad y calidad de la C-FC acumulada que se puede recuperar de *A. máxima* depende principalmente de la fuente de N y del método de extracción.

El objetivo en este trabajo fue cultivar una cepa de *Arthrospira* en condiciones cercanas a las del Lago de Texcoco, con una fuente de nitrógeno alternativa y obtener este pigmento por diferentes métodos de extracción y de conservación para evaluar su capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

La cepa *A. maxima* LJGR1 fue cultivada en un fotobiorreactor de placa plana a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  con intensidad luminosa de  $108\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en un medio de 10.6 mM de urea y 0.26M de NaCl, con lo que se obtuvo una producción de  $11\ \text{mg C-FC L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Se evaluó la recuperación de C-FC por tres diferentes métodos de extracción: agitación, sonicación a 45 y  $35^{\circ}\text{C}$  y enzimático. A los extractos obtenidos se les evaluó su capacidad antioxidante por dos métodos *in vitro*, el DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) y el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Para conservar sus propiedades antioxidantes y el color original, se utilizaron diferentes materiales de recubrimiento de los cuales el mucílago de chía y los revestimientos de harina de amaranto conservaron mejor la actividad antioxidante de C-FC ante variaciones de temperatura y degradación de color a  $20^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Se evaluó como un suplemento antioxidante y proteico en un extensor de corta duración para la preservación de espermatozoides de *Sus scrofa domesticus* (cerdo) almacenados hasta 72 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Con los métodos de extracción, agitación y sonicación a 45°C se obtuvieron los mejores rendimientos de C-FC, la mayor pureza y la mínima inhibición de los radicales oxidantes: 215 mg C-FC g DPPH<sup>-1</sup>, 0.74, 92% y 29%; y 221 mg C-FC gABTS<sup>-1</sup>, 0.75, 87% y 27% respectivamente. Se observó una energía de activación de descomposición ( $E_a=60 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) con el mucílago de chíá. Sin recubrimiento, la descomposición de la C-FC fue de 80% y de solo 18% con mucílago de chíá a 60°C a los 15 días. La menor tasa de degradación del color ( $r\Delta E^*$ ) de 4.2 d<sup>-1</sup> se observó con harina de amaranto. Se encontró que la motilidad progresiva y el ADN de los espermatozoides de *Sus scrofa domesticus* (cerdo) permanecieron 20% vivos después de 48 horas con 138 µg mL<sup>-1</sup> C-FC. Obteniendo un buen resultado pues con 20% es posible la reproducción asistida.

**De esta tesis se publicaron dos artículos:**

- Antonio-Marcos, E., Hernández-Vázquez, L., Olgúin, E.J., Monroy, O., Navarro-Ocaña, A. 2016. C-phycoyanin from *Arthrospira maxima* LJGR1: production, extraction and protection. *Journal of Advances in Biotechnology*, Volume 5, 2: 659-666.
- Antonio-Marcos, E., Monroy-Hermosillo, O., Cortés-Barberena, E., Rodríguez-Tobón, E., Rivera-Martínez, J.G., Arenas-Ríos, E. 2018. Can C-phycoyanin be used as a sperm protector? *Journal Veterinary Mexico OA*, October-December vol. 5, No. 4. <http://veterinariamexico.unam.mx/index.php/vet/index>, ISSN 2007-5472.

## ***Agradecimientos***

Al comité de tesis: el Doctor Oscar Monroy Hermosillo, al Doctor Arturo Navarro Ocaña y a la Doctora Eugenia Olguín, por sus enseñanzas y ayuda en la elaboración de la presente tesis. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, por los proyectos: 228350 y 2012CB180128).

Al Dr. Eberto Novel Maldonada del Departamento de Biología Comparativa de la UNAM, por la facilitación de la cepa de *A. maxima* LJGR1. A la Dra. Patricia Severiano Pérez del Departamento de Química de la UNAM por la asesoría en la evaluación de color de C-FC por los parámetros del espacio CIELAB. A la Doctora Liliana Hernández del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco y a la Doctora Edith Arenas Ríos del Departamento de Biología de la Reproducción de la UAM-Iztapalapa por la colaboración que nos brindaron para probar las aplicaciones de C-FC.

# CAPÍTULO 1: Introducción

## 1.1. Justificación

La C-FC es un biopigmento que se extrae principalmente del género *Arthrospira* y se emplea como aditivo en la industria alimentaria e industria cosmética (Dixit & Suseela, 2013; Fernández-Rojas *et al.*, 2014). Es el único pigmento que tiene un cromóforo (ficocianobilina) con estructura similar a un antioxidante natural, la bilirrubina (Kuddus *et al.*, 2013; Pisoschi & Pop, 2015). Se han hecho diferentes estudios sobre este pigmento y se ha determinado que favorece el sistema inmunológico, el cual está estrechamente ligado al sistema nervioso y al sistema endocrino (Belay *et al.*, 2002), actúa como neuroprotector (Rimbau *et al.*, 1999; Pentón-Rol *et al.*, 2011), hepatoprotector (Ou *et al.*, 2011) y estimula el sistema de defensa de enzimas antioxidantes (Ivanova *et al.*, 2009). Tiene la capacidad de eliminar diferentes sustancias de oxígeno reactivo (SOR): hidroxilo  $\bullet\text{OH}$ , alcoxilo ( $\text{RO}\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) evaluados por métodos *in vivo* e *in vitro* (Romay *et al.*, 1998; Bhat & Madyastha, 2000; Ou *et al.*, 2011; Kuddus *et al.*, 2013). De igual manera disminuye sustancias de nitrógeno reactivo (SNR), suprimiendo la expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS) e inhibe la peroxidación de los lípidos microsomales hepáticos (Bhat & Madyastha, 2001; Kamble *et al.*, 2012).

*Arthrospira* son organismos procariontes fotosintéticos oxigénicos que producen distintos productos bioquímicos y poseen más tipos de pigmentos que las plantas, principalmente la C-FC (Schlebusch, 2012; Dixit & Suseela, 2013). Es el género de microalga (cianobacteria) más comercializada (Dadheech *et al.*, 2010; FAO, 2018). Las tres especies más comercializadas son *A. platensis*, *A. fusiformis* y *A. maxima* (Dadheech *et al.*, 2010; Gad *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011). En México esta última especie tiene un hábitat natural con un medio alcalino (pH 8.5 a 11) y salino (0.36-3.5% NaCl) (Ciferri *et al.*, 1983; FAO 2008; Dadheech *et al.*, 2010). En el Lago de Texcoco desde la época prehispánica los mexicas consumían y cultivaban el *tecuilatli*, como se nombraba a esta cianobacteria. Después de la conquista se dejó de producir y consumir hasta que en 1967 la compañía Sosa Texcoco, S.A. inició su cultivo en 1973 comercializando 150 toneladas, posteriormente se llegó a comercializar hasta 500 toneladas al año (Ciferri *et al.*, 1983;

Sasson, 1984). Desafortunadamente esta empresa cerró en 1993 y su producción a gran escala fue abandonada (FAO, 2008). En cambio, en África Central (Lago Chad), China, Estados Unidos, India y Japón se cultiva a gran escala y se comercializa por sus propiedades nutricionales, nutraceuticas, cosmetológicas y otros beneficios a la salud (Deng & Chow, 2010; Lu *et al.*, 2011; Grewe & Pulz; 2012; Sili *et al.*, 2012). Esto las hace atractivas para la investigación de bioprospección y la potencial comercialización de diferentes biomoléculas (Betancourt, 1997; Borowitzka, 2013). *A. máxima* es considerada como un alimento funcional, debido a que tiene biocompuestos como C-FC y algunos carotenoides, ácidos grasos insaturados, todos los aminoácidos esenciales y un alto contenido de proteína (55-70%), altas concentraciones de vitaminas y minerales (Liang *et al.*, 2004; Ramos-Molina, 2011; Singh & Dhar, 2011; Sotiroudis & Sotiroudis, 2013). Los pigmentos (C-FC y carotenoides) se les reconoce con nutraceuticos (Spolaore *et al.*, 2006) y actualmente hay una tendencia de utilizar colorantes naturales en diferentes industrias como: la alimentaria, de cosméticos y farmacéutica (Sekar & Chandramohan, 2008). Estos compuestos en general son inocuos, sin embargo, el número y gama de estos pigmentos son escasos en relación con las necesidades de las industrias (Ramos-Molina, 2011). Por este motivo, es conveniente optimizar e incrementar la gama de estos pigmentos.

El cultivo de *A. maxima* en condiciones naturales puede ser muy sencillo pues se adapta a diferentes hábitats y representa el 4% del total de la biomasa en la superficie de la tierra y son capaces de convertir la energía solar en energía química (Schlebusch, 2012; Dixit & Suseela, 2013). Está distribuida en el continente americano, tolera temperaturas mesófilas, aunque se ha establecido que crece mejor a 30°C (Ogbonda *et al.*, 2007; Dadheech *et al.*, 2010; Sili *et al.*, 2012). Todas estas condiciones indican que puede ser posible la recuperación de su producción en el Lago de Texcoco que conserva las condiciones para su cultivo.

Los factores que influyen en la producción de C-FC son: **1)** la concentración de selenio, **2)** fuente de carbono (Chen *et al.*, 2006; Chainapong *et al.*, 2012), **3)** la intensidad y tipo de luz (Loreto *et al.*, 2003; Chainapong *et al.*, 2012); **4)** el contenido y fuente de nitrógeno (Ajayan *et al.*, 2012; Öztürk-Ürek & Tarhan, 2012). Con base a diferentes experimentos el

parámetro con el que se obtiene una sobreproducción de este biopigmento es la fuente y concentración de nitrógeno (Chaiklahan *et al.*, 2010; Ajayan *et al.*, 2012; Öztürk-Ürek & Tarhan, 2012; Hifney *et al.*, 2013). La fuente de N más utilizada en los medios de cultivo es el nitrato. El nitrato en microorganismo fotosintético necesita reducirse a nitrito (a través de la reacción catalizada por nitrato reductasa) y más tarde a amoníaco (a través de la reacción catalizada por nitrito reductasa) (Converti *et al.*, 2006). Como este proceso requiere energía, el alga prefiere utilizar el nitrógeno reducido en la forma de urea que sin embargo es tóxica en altas concentraciones debido a la hidrólisis de este compuesto a amoníaco ya sea debido a las condiciones alcalinas o de la liberación de la ureasa (Converti *et al.*, 2006; Matsudo *et al.*, 2009). La urea es una fuente de N interesante ya que proporciona una ganancia energética debido a que su hidrólisis mediante la ureasa en medio alcalino es exergónica y produce CO<sub>2</sub> y amoníaco (Schlebusch, 2012; Oliver *et al.*, 2012) que puede ser fácilmente asimilado por *Arthrospira* (Converti *et al.*, 2006; Matsudo *et al.*, 2009). Sin embargo, se han hecho pocas investigaciones utilizando esta fuente alternativa de nitrógeno (Ajayan *et al.*, 2012).

Se sabe que la capacidad de C-FC para atrapar SOR y SNR se debe a su estructura cromófora, que es similar a la bilirrubina (Zheng *et al.*, 2013; Fernández-Rojas *et al.*, 2014). Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que la parte de apoproteína si afecta la función antioxidante debido a que interactúa con la parte cromófora (Zhou *et al.*, 2005). Debido a ello es posible que esta última parte sea muy sensible y por lo tanto el método de extracción es determinante. Los diferentes parámetros de los métodos de extracción dependen de las características fisicoquímicas del extracto, reproductibilidad, rapidez, limitación de los solventes, extracción enzimática, selectividad, transformación, protección del extracto molecular, costo y facilidad (Pasquet *et al.*, 2011). Los métodos de extracción más utilizados para obtener C-FC son maceración, agitación, sonicación y enzimático (Soundarapandian & Vasanthi, 2008; Chen *et al.*, 2010; Hemlata *et al.*, 2011; Banji *et al.*, 2013). Para optimizar la extracción hay que considerar las siguientes variables: temperatura, solvente, volumen de solvente, concentración de sales, tiempo de

extracción, poder del ultrasonido y duración del ciclo aplicado (Azuola & Vargas, 2007; Vilku *et al.*, 2008).

Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que retardan, previenen o eliminan el daño oxidativo de una molécula, previniendo las sustancias con oxígeno (SOR) y nitrógeno (SNR) reactivo, (Gutteridge & Halliwell, 2010). La capacidad antioxidante se puede evaluar por métodos *in vivo* e *in vitro* (Niki, 2010). Los métodos *in vitro* más utilizados son el ABTS y el DPPH (Kuskoski *et al.*, 2005). El fenómeno de oxidación es una ganancia de oxígeno o una pérdida de electrones que favorece las SOR y SNR que abarcan una variedad de pequeñas moléculas radicales y no-radicales. La propiedad antioxidante de C-FC tiene la capacidad de eliminar las SNR y SRO como:  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{RO}\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{NO}\bullet$ , y otros radicales como  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  y  $\text{DPPH}\bullet$  (Romay *et al.*, 1998; Bhat & Madyastha, 2000; Ou *et al.*, 2011; Kamble *et al.*, 2012; Kuddus *et al.*, 2013; Fernández-Rojas *et al.*, 2014).

Una forma de estabilizar este pigmento es utilizar algunos aditivos como material de recubrimiento. Los materiales de recubrimiento, biopelículas y encapsulamiento pueden retardar la degradación y extender la vida útil de pigmentos y compuestos bioactivos (Carvalho *et al.*, 2014; Lacroix & Dang, 2014). Se han investigado como potencial recubrimientos el mucílago de nopal y de chía, y la harina de amaranto, debido a su (Salgado-Cruz *et al.*, 2013). Debido a que protege al ingrediente sensible de influencias externas, pueden controlar la transferencia de humedad, la liberación del ingrediente y permeabilidad de los gases (Tapia-Blácido *et al.*, 2011; Salgado-Cruz *et al.*, 2013; Segura-Campos *et al.*, 2014; Salinas-Salazar *et al.*, 2014). Adicionalmente se ha determinado que las proteínas aisladas del amaranto actúan eficientemente como agente estabilizador (Fidantsi & Doxastakis, 2001) y que puede retener grupos odorantes como: monoterpeno, alcoholes, cetona, fenoles o esterres (Blaszczak *et al.*, 2013).

Los alimentos funcionales producen un beneficio a la salud más allá de sus propiedades nutricionales (Bernal *et al.*, 2011). *A. Maxima* es un alimento funcional que sintetiza C-FC (Carvalho *et al.*, 2006; Sotiroudis & Sotiroudis, 2013). Se ha demostrado en innumerables estudios que la C-FC tiene diferentes beneficios a la salud (Ou *et al.*, 2011; Pentón-Rol *et al.*, 2011; Tso *et al.*, 2012; Borowitzka, 2013; Koller *et al.*, 2014; Fernández-Rojas *et al.*,

2014). A pesar de las diferentes aplicaciones de C-FC, no se ha determinado su uso como extensor para la protección de espermatozoides. Debido a la estructura de C-FC, que tiene una parte apo-proteica y una no-proteica (tres cromóforos) (Fernández-Rojas *et al.*, 2014), se cree que puede tener doble función en los extensores, como proteína y antioxidante.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo general:**

Obtención de C-FC a partir de *Arthrospira máxima* cultivada en condiciones alcalinas con urea, para obtener el mejor rendimiento y conservando la actividad antioxidante *in vitro*, protección con recubrimientos comestibles y uso como suplemento en un extensor para la protección de espermatozoides.

### **1.2.2. Objetivos particulares:**

1. Cultivo de *A. maxima* LJGR1 en condiciones para obtener una sobreproducción de C-FC utilizando diferentes fuentes de nitrógeno y un mayor contenido de cloruro de sodio.
2. Extracción eficiente de C-FC de como antioxidante.
3. Protección de C-FC a la desnaturalización de sus proteínas utilizando recubrimientos naturales.
4. Evaluar la capacidad antioxidante de C-FC por dos métodos *in vitro* (ABTS y DPPH).
5. Evaluar la protección de C-FC de espermatozoides de *Sus scrofa domesticus*.

# CAPÍTULO 2: *Arthrospira* como biofactoría

## 2.1. Morfología y taxonomía.

*Arthrospira* (familia Oscillatoriaceae) son organismos fotosintéticos oxigénicos, no tóxica, filamentosos y sin diferenciación multicelular, con tolerancia a la sal por tener canales de doble vía (antiporter)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Dadheech *et al.*, 2010; Cheevadhanarak *et al.*, 2012). Su organización celular es típica de una bacteria Gram negativa, su pared celular está envuelta por su cápsula o vaina compuesta de polisacáridos y un número de capas débiles de peptidoglucano y lipolisacárido. Sus componentes celulares son ribosomas, fibrillas de ADN, ficobilisomas (membrana tilacoidal), vacuolas de gas, carboxisomas donde se fija el  $\text{CO}_2$  (RuBisco), gránulos de lípidos localizada cerca de la superficie celular y gránulos de cianoficina -copolímero de aspartato y arginina- (Sotiroudis & Sotiroudis, 2013). La forma helicoidal de los filamentos (o tricomas) es característica del género y se mantiene solo en un medio líquido o medio de cultivo. Los tricomas tienen una longitud de 50 a 500  $\mu\text{m}$  (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006) y un ancho de 3 a 4  $\mu\text{m}$ . La espirulina se reproduce por fisión binaria (FAO, 2008). Se multiplica por la fragmentación del tricoma (necridio), que tienen forma de hélice abierta (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006). Tiene 20 especies este generó las más representativa y comercializada a gran escala son: *A. platensis*, *A. maxima* y *A. fusiformis* (Dadheech *et al.*, 2010; Gad *et al.*, 2011). Algunas cepas de este género son nombradas comercialmente como *Spirulina*, aunque en estricto sentido son géneros diferentes (Cheevadhanarak *et al.*, 2012). Sin embargo, *A. maxima* era llamada como *S. maxima* (Setchell et Gardner y Bernard), *S. geitleri* u *O. pseudoplatensis* (Dadheech *et al.*, 2010; Sili *et al.*, 2012). *A. maxima* está distribuida en el continente americano, tiene vacuolas con gas, presenta nitrogenasa, produce sulfolípidos y tolera temperaturas mesófilas, aunque se ha establecido que crece mejor a 30 °C (Ogbonda *et al.*, 2007; Dadheech *et al.*, 2010; Sili *et al.*, 2012). Naturalmente crece en depósitos con alto contenido de sal en México, Estados Unidos, Asia y África Central (Deng & Chow, 2010).

La posición sistemática de las cianobacterias ha sido un tema de discusión, ya que estos organismos fotosintéticos se consideraron por primera vez algas (FAO, 2008). Las

cianobacterias ocupan una posición intermedia entre bacterias y las algas eucariotas, no poseen bacterioclorofila, sino clorofila a, y realizan fotosíntesis oxigénica; pero su estructura celular procariota las sitúa taxonómicamente dentro del grupo de las bacterias (Reino Procaryotae). No obstante, en un sentido más amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga suele referirse a aquellos microorganismos que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. En este contexto las cianobacterias son consideradas microalgas (Betancourt, 1997). En 1962 Stanier y Van Neil incorporaron algas verde-azules en el reino procariota y propusieron llamar a estos microorganismos cianobacterias. Esta designación fue aceptada y publicada por primera vez en 1974 en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (FAO, 2008).

## ***2.2. Arthrospira como alimento funcional***

El término de alimento funcional fue por primera vez utilizado en los años 80's en Japón y fueron adoptados de varias maneras alrededor del mundo. Un alimento funcional puede ser considerado como aquel que demuestra satisfactoriamente uno o más beneficios a la función del cuerpo, con efectos nutricionales y con la prevención o reducción de alguna enfermedad. El mercado nutracéutico es muy atractivo para muchos productos derivados a partir de microalgas (Bernal *et al.*, 2011; Borowitzka, 2013). Las microalgas tienen una diversidad evolutiva y filogenética, favoreciendo la producción de distintos productos bioquímicos. Esto las hace atractivas para la investigación bioprospección y la potencial comercialización de diferentes biomoléculas (Borowitzka, 2013). Juntas las microalgas forman alrededor del 50 % de la producción de biomasa primaria en la tierra y es la base de la alimentación marina (Jaspars y Folmer, 2013). *Arthrospira* es un alimento funcional debido a que al consumirla produce un beneficio a la salud más allá de sus propiedades nutricionales (Pentón-Rol *et al.*, 2011; Bertolin *et al.*, 2011; Grewe & Pulz; 2012; Borowitzka, 2013). También es considerada como suplemento alimentario o nutracéutico (Ötles & Pire, 2001; Grewe & Pulz; 2012; Mayank & Arya, 2013).

Las primeras microalgas comercializadas fueron *Chlorella* y *Arthrospira (Spirulina)* como alimento sano en Japón, Taiwán y México. *Arthrospira* fue de las primeras microalgas en

empezar a comercializarse a gran escala en Japón en los años 60's por ser un alimento funcional y sintetizar el pigmento de color azul, la C-FC (Carvalho *et al.*, 2006; Borowitzka, 2013). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONUAA o FAO por sus siglas en inglés) estimó que en 2016 se obtuvo una producción de 89,000 toneladas de esta microalga (peso fresco). Se produce en 11 países, sin embargo, China tiene aproximadamente el 99% de producción de microalgas, incluida la *Arthrospira* (FAO, 2018).

*Arthrospira* es un alimento de consumo seguro y de altamente digerible (~90%). Pertenece a la categoría enumeradas como GRAS (generalmente reconocido como seguro) y una clase A por la DSI-EC (información de suplementos dietéticos del comité de expertos) (Ötles & Pire, 2001; Karkos *et al.*, 2011; Marles *et al.*, 2011; Baylan *et al.*, 2012; Mayank & Arya, 2013). De igual manera está legalizada como suplemento dietético por las autoridades europeas, japonesas y la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos (Berto lin *et al.*, 2011). Contiene una concentración importante de proteína entre 50 a 70% y además contiene todos los aminoácidos esenciales: metionina, cisteína y lisina. Concentraciones altas y diferentes minerales -potasio, calcio, cobre, magnesio, hierro, selenio, zin y sodio- y vitaminas -vitamina B1, B2, B3, B6, B9, B12, C, D y E- (FAO, 2008; Singh & Dhar, 2011; Sotiroudis & Sotiroudis, 2013; Mayank & Arya, 2013). Tiene entre 6 a 13% ácidos grasos, los ácidos grasos saturados más distribuido son el ácido palmítico (35-46%) y ácido caprílico (3.5-4%); y de los ácidos grasos insaturados se reportan principalmente el GLA (8-22%), ácido linoleico (16-17.5%) (Ötles & Pire, 2001). Además, contiene 24% de carbohidratos y 4% fibra (Mayank & Arya, 2013). Tiene compuestos bioactivos con valor añadido como fenoles, tocoferoles,  $\beta$ -carotenos ( $\beta$ C), C-FC y ácido gama linoléico (GLA) los cuales tienen diversos efectos benéficos a la salud (Capelli & Cysewski, 2010; Pentón-Rol *et al.*, 2011; Bertolin *et al.*, 2011).

### **2.3. Cultivos de cianobacterias: *Arthrospira***

Para lograr un cultivo masivo de cianobacterias y microalgas en crecimiento activo es necesario un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos, condiciones adecuadas fisicoquímicas como T, pH, salinidad y luz como

fuerza de energía. La concentración de inóculo inicial es importante, debido a que a bajas concentraciones puede haber una pérdida celular por la fotooxidación y a altas hay una pérdida por respiración o por no utilizar la luz adecuadamente (Betancourt, 1997). En los últimos años la biomasa de las microalgas ha encontrado un auge de interés para la producción de diversos tipos de productos. Por lo tanto, la producción tiene que aumentar en varios órdenes de magnitud (Posten, 2009). La mayor parte de la producción de biomasa de microalgas se produce en estanques abiertos. Sólo unos pocos cientos de toneladas se producen en condiciones cerradas, fotobiorreactores. *Arthrospira* se produce en estanques abiertos principalmente y en menor medida en fotobiorreactores. El primer medio sintético y más utilizado para cultivar *Arthrospira* es el medio Zarrouk, se han empleado otros medios como Schlösser, Paoletti (Cuadro 1). También se han utilizado medios alternativos como suplementados con aguas residuales y medios suplementados con agua de mar (Lamela & Márquez, 2000; Olgún *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2011; Leema *et al.*, 2010). Los factores que favorecen el principalmente el rendimiento de C-FC son: la fuente de nitrógeno, carbono y luz (Loreto *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Chainapong *et al.*, 2012; Ajayan *et al.*, 2012; Öztürk-Ürek & Tarhan, 2012). Otros factores a considerar en los cultivos son la temperatura, intensidad de luz y el pH. La temperatura influye fuertemente en la actividad del oxígeno en el fotosistema II (PSII), la cual tiene una serie de efectos sobre las membranas de la cianobacteria y la disponibilidad de nutrientes. Se ha establecido que la temperatura óptima para *A. maxima* es de 30-35°C (Malakar *et al.*, 2012).

**Cuadro 1.-** Principales medios de cultivo para *Arthrospira*.

Reactivo	Schlösser (g L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Zarrouk (g L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Paoletti (g L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	13.6	16.8	15.2
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4	-----	8.9
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.5	0.5
NaNO <sub>3</sub>	2.5	2.5*	---
KNO <sub>3</sub>	-----	-----	2.6
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	1	---
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	---	---	1.88
NaCl	1	1	0.92
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.20	0.2	0.25

<b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0.04	0.02	0.05
<b>FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O</b>		0.01	---
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>		0.08	---
<b>Fe<sub>2</sub>EDTA</b>			1 mL
<b>Metales</b>	6 mL	1 mL	---
<b>Micronutrientes</b>	1 mL	1 mL	1 ml
<b>Vitamina B<sub>12</sub></b>	0.15 mg	---	---

<sup>a</sup>Rodrigues *et al.*, 2011. <sup>b</sup>Lamela & Márquez-Rocha, 2000; micronutrientes (g L<sup>-1</sup>): 2.85 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 MnCl<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 0.22 ZnSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 0.079 CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O y 0.015 MoO<sub>3</sub>. Solución metales (mg L<sup>-1</sup>): 23 NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, 96 K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O, 48 NiSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O, 18 NaWO<sub>4</sub>2H<sub>2</sub>O, 40 Ti<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 44 Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O.

En general las cianobacterias son capaces de utilizar una amplia gama de fuentes de nitrógeno (N), sin embargo, la más utilizada en los medios de cultivo es el nitrato. Todas las fuentes de N son convertidas a amonio e incorpora a la célula mediante el ciclo de la glutamina y glutamato sintetasa (GS-GOGAT) (Schlebusch, 2012; Oliver *et al.*, 2012). La GS cataliza la incorporación de amonio a glutamato, y la GOGAT que cataliza la transferencia reductiva del grupo amina de la glutamina al 2-oxoglutarato (2-OG) para dar dos moléculas de glutamato (Navarro, 1998; Schlebusch, 2012). La asimilación de nitrógeno en forma de amonio se da por medio del 2-oxoglutarato (2-OG). Dos proteínas responden al 2-OG: 1) la proteína traductora de señal (PII) y 2) el factor de transcripción de control de nitrógeno NtcA. La proteína PII regula la asimilación de N, mediante la interacción de proteínas diana o blanco y regula el metabolismo. El NtcA regula la expresión de genes que codifican la asimilación de amonio (Oliver *et al.*, 2012). La incorporación del amonio es necesario para la formación de aminoácidos que son necesarios para sintetizar proteínas (Sili *et al.*, 2012; Stal, 2012). El uso de urea es particularmente atractivo desde el punto de vista económico y energético. Proporciona una ganancia energética debido a su hidrólisis en amoniaco en medio alcalino, por lo tanto puede ser fácilmente asimilado por *Arthrospira* (Danesi *et al.*, 2011). La urea es degradada por la enzima ureasa, que requiere un cofactor de Ni, liberando dos moléculas de amonio y una de CO<sub>2</sub> por cada molécula de urea hidrolizada (Schlebusch, 2012; Oliver *et al.*, 2012). Sin embargo la urea es tóxica en altas concentraciones debido a la hidrólisis de este compuesto a amoníaco ya sea debido a las condiciones alcalinas o de la liberación de la ureasa. Como consecuencia, el control del suministro de urea durante el cultivo es un requisito fundamental; en niveles

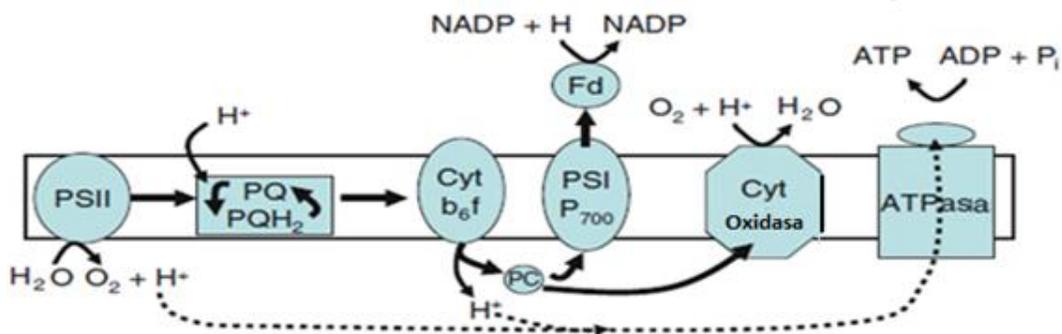
altos una porción de la fuente de nitrógeno se pierde por emisión de gases y el crecimiento es inhibido por la toxicidad de amoníaco, mientras que concentraciones demasiado bajas dificulta el crecimiento por limitación de nitrógeno (Converti *et al.*, 2006; Matsudo *et al.*, 2009).

*Arthrospira* puede crecer con grandes cantidades de CO<sub>2</sub> alrededor de un 18% (Chu, 2012). Sin embargo, el crecimiento sostenido se da con bicarbonato de sodio. *A. maxima* crecía naturalmente con bicarbonato-carbonato en el Lago de Texcoco (Sili *et al.*, 2012; Stal, 2012). El bicarbonato es catalizado por anhidrasas carbónicas a CO<sub>2</sub>, como se muestra en la siguiente ecuación:  $2 \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ . El CO<sub>2</sub> es un sustrato de la enzima RubisCO que incorpora carbono al ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Sili *et al.*, 2012; Stal, 2012). Durante la incorporación de dos iones de bicarbonato, las cianobacterias consumen una en forma de dióxido de carbono y liberar el otro en la forma de carbonato, que conduce al aumento progresivo del pH (Santos *et al.*, 2011).

La intensidad y distribución media de luz son importantes para la producción de biomasa y metabolitos secundarios (Mc. Donald, 2003; Carvalho *et al.*, 2006). Los metabolitos secundarios se producen en fases subsecuentes al crecimiento y son considerados como bioactivos (Azmir *et al.*, 2013). Las cianobacterias tiene fotosíntesis oxigénica que requiere de dos fotosistemas que están regulada por la intensidad de luz. La luz es un nutriente esencial para las células fotosintéticas y se cuantifica por la incidencia de fotones a través de unidad de superficie por unidad de tiempo ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). La fluencia de fotón es medida en unidades de  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  donde un mol es  $6.023 \cdot 10^{23}$  (número de Avogrado) fotones o quanta. La unidad más practica que expresa la densidad de flujo de fotones fotosintética (PPF) es  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Por ejemplo, la irradiación solar es aproximadamente  $1000 \text{ W m}^{-2}$  o 100000 lux, en la que el PPF (400 a 700 nm) es  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Mc. Donald, 2003).

Una intensidad luminosa alta puede causar la fotoinhibición en el centro de reacción del PSII. El PSII es un complejo multímero captador de luz (ficobilisoma) que genera electrones por la oxidación del agua a oxígeno y H<sup>+</sup>. Estos electrones son trasportados al fotosistema I (PSI) que está asociada con la clorofila  $\alpha$ , y da como resultado la reducción de ferredoxina

a  $\text{NADP}^+$  (figura 1). Esto genera energía y reductantes para el metabolismo de la célula y la fijación del carbono (Schlebusch, 2012; Oliver *et al.*, 2012). *Arthrospira* obtiene mejores rendimientos de biomasa con luz blanca y roja (Soundarapandian & Vasanthi, 2008; Chainapong *et al.*, 2012).



**Figura 1.-** Línea fotosintética de la vía de transferencia de electrones en la membrana tilacoidal (Oliver *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Reactores *raceway* y fotobioreactores

El cultivo de las cianobacterias puede realizarse en diferentes fotobioreactores, estanques entre otros recipientes como botellas, bolsas. Sin embargo, se ha visto que se obtiene una mayor productividad de esta cianobacteria cuando se utiliza fotobiorreactores (Del Valle, 2008). *Arthrospira* es cultivada principalmente en sistemas abiertos, utilizando estanques naturales como en el Lago de Chad y en reactores *raceway* (Lu *et al.*, 2011; Sili *et al.*, 2012). Este último sistema se emplea más para la comercialización de *Arthrospira* cultivada principalmente en Tailandia, EU y China (Shimamatsu, 2004; Lu *et al.*, 2011; Sili *et al.*, 2012). Sin embargo, la producción de C-FC requiere sistemas cerrados capaces de controlar todos los parámetros físicos y químicos. Por lo que, desde la década de 1980, se han desarrollado sistemas cerrados: fotobioreactores tubulares y de placa plana (Carlozzi, 2008). Ambos fotobioreactores favorecen la actividad fotosintética y son los más utilizados en la producción de *Arthrospira* (Carvalho *et al.*, 2006).

El principal parámetro que afecta a un reactor es la penetración de la luz, esto es importante en la eficiencia de la fotosíntesis. La energía que requiere una célula depende de la máxima incidencia total radiante ( $I_0$ ) y de la concentración de biomasa. La  $I_0$ , depende de la naturaleza de la luz, intensidad y posición relativa de la fuente de luz, todos

estos parámetros pueden ser manipulados y controlados. Otro factor importante en los cultivos es la transferencia de gases; debido a que la mayoría de los medios se enriquecen con CO<sub>2</sub>, el cual favorece una mezcla de nutrientes y también favorece la mezcla de la biomasa. Después de los requerimientos de nutrición, un parámetro crítico es el mezclado, debido a que es necesario recircular el cultivo en el reactor. Un mal mezclado favorece que el sistema se encuentre en tres fases: líquido, gas y sólido; lo cual promueve a una degradación de la transferencia de radio de trasferencia de masa. Las técnicas de mezclado pueden ser bombeo, agitación mecánica o por burbujeo de gas, por ejemplo, CO<sub>2</sub>. La transferencia de CO<sub>2</sub> ocurre entre la fase gaseosa y líquida de los cultivos, principalmente dos procesos se incrementan en el área de interfaz pueden ser dividido en: modelo pasivo, cuando el gas se difunde dentro del cultivo; y modelo activo, cuando se utiliza un equipo extra para airear el medio de cultivo, expandiendo el área del gas con el medio de cultivo. Otro factor importante en los fotobiorreactores es el O<sub>2</sub>, debido a que una acumulación de esta molécula en el medio inhibe fotosíntesis de la microalga, en *Arthrospira* se recomienda concentraciones menores a 35 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (Carvalho et al, 2006).

#### ***2.4 Compuestos bioactivos de Arthrospira: C-ficocianina, β-caroteno y ácido γ linolénico***

En *Arthrospira* los compuestos bioactivos de mayor importancia y valor agregado en el mercado son la C-FC, el β-caroteno (βC) y el ácido γ linolénico (GLA) (Yamaguchi, 1997). La C-FC (figura 2) es una ficobiliproteína de color azul que se sintetiza y comercializa principalmente en *Arthrospira*, aunque también se produce en otras cianobacterias como *Scenedesmus*, *Anabaena*, algas rojas y criptofitas (Betancourt, 1997; Sekar & Chandramohan, 2008; Ramos-Molina, 2011). Se encuentra en agregados multiméricos llamados ficobilisomas. Los ficobilisomas están dispuestos en varillas espaciadas regularmente en la superficie protoplasmática de la membrana tilacoidal y son asociadas con el fotosistema II. A nivel celular la C-FC funciona como: 1) antioxidante, 2) fuente de nitrógeno y 3) como pigmento accesorio -la fotosíntesis puede funcionar en ausencia de las ficobiliproteínas- (Betancourt, 1997; Eriksen, 2008). Se puede utilizar como nutracéutico debido a que tiene diferentes propiedades benéficas a la salud (Borowitzka,

2013). A nivel clínico se recomienda consumir de 4.5 g de *Arthrospira* por día, es decir de 675-900 mg C-FC por día (McCarty *et al.*, 2010).

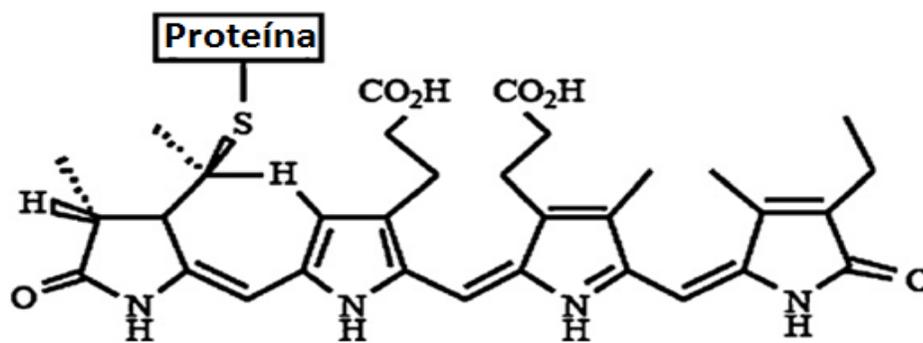


Figura 2.- Estructura de C-ficocianina (Gupta *et al.*, 2011).

Los carotenoides son los pigmentos más distribuidos en la naturaleza con alrededor de 600 variedades (Kiokias & Oreopoulou, 2006). Son tetraterpenos liposolubles, que forman una serie de dobles enlaces conjugados que conforman un sistema de cromóforo (Goswami *et al.*, 2010). Juegan importantes roles en los organismos fotosintéticos: 1) actúan como pigmentos accesorios y 2) protegen los aparatos fotosintéticos del estrés oxidativo asociándose con la clorofila (Kiokias & Oreopoulou, 2006; Singh & Dhar, 2011). Además, en algunas microalgas juegan un rol importante en el mecanismo de fotoprotección junto con la proteína carotenoide naranja (OCP) (Pilbrow *et al.*, 2012; Kirilovsky & Kerfeld, 2012). En *Arthrospira* el 80% de sus carotenoides son  $\beta$ C (figura 3), el resto son fucoxantina y criptoxantina (Pignolet *et al.*, 2013; Mayank & Arya, 2013). Tiene hasta 10-1000% más de  $\beta$ C por gramo de biomasa que otros vegetales (Rodríguez-Amaya, 1997). Este pigmento es el carotenoide que se le asigna 100% de actividad de provitamina A y se estima que 60% de la vitamina A dietaria proviene de las provitaminas A (Rodríguez-Amaya, 1997; Kim *et al.*, 2012). Se recomienda ingerir 1-6 mg en adultos y 10-30 mg en adultos mayores al día (Sánchez *et al.*, 1999).

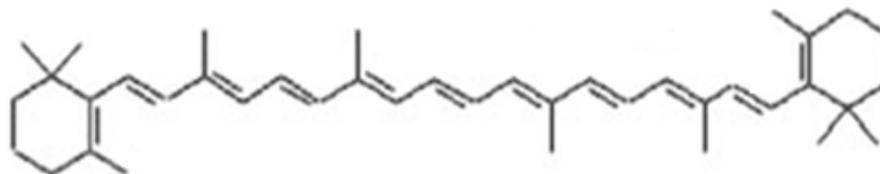


Figura 3.-  $\beta$ -caroteno (Pignolet *et al.*, 2013).

El GLA (figura 4) es un ácido graso omega 6 ( $\omega$ -6), actualmente se obtiene de semillas de *Borago officinalis* (borraja; 18-26%), *Ribes nigrum* (grosella negra; 15-20%), *Oenothera* (onagra, 7-10%) (Horrobin, 1992; Kim *et al.*, 2012; Tso *et al.*, 2012). El GLA obtenido de *Arthrospira* tiene una ventaja ya que el isómero del ácido linolénico está ausente, lo cual facilita la purificación del GLA (Mahajan & Kamat, 1995) y representa alrededor del 94% de los glicolípidos (Grewe & Pulz, 2012). La función biológica de los lípidos es como componente estructural de membrana, importante molécula de almacenamiento energético e importante señal molecular (Bernal *et al.*, 2011). Se emplea en suplementos alimenticios y fórmulas infantiles (25-50 mg GLA  $d^{-1}$ ) (Horrobin, 1992) y se recomienda consumir de 20-25.5 mg GLA  $d^{-1}$  para una persona adulta de 60 kg (Tso *et al.*, 2012).

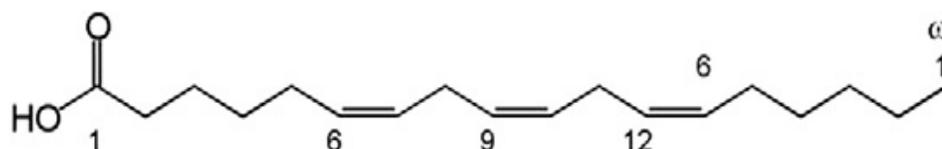


Figura 4.- Ácido gamma linolénico (Koller *et al.*, 2014).

#### 2.4.1. Usos generales de la C-FC, el $\beta$ C y el GLA.

En la industria alimentaria y cosmética se utilizan como aditivos el  $\beta$ C, el GLA y la C-FC (Liang *et al.*, 2004; Del Campo *et al.*, 2007; Borowitzka, 2013; Bhakar *et al.*, 2014). Favorecen el sistema inmunológico, el cual está estrechamente ligado al sistema nervioso y el sistema endocrino. Debido a ello, el deterioro del sistema inmunitario tiene consecuencias de gran alcance en el cuerpo (Belay *et al.*, 2002). Adicionalmente tienen propiedades farmacéuticas como anti-inflamatorio, antitumoral y previenen enfermedades asociadas a la inflamación como aterosclerosis y artritis, puede prevenir algunas enfermedades cardiovasculares y efecto antilipídémico (Sánchez *et al.*, 1999; Belay *et al.*, 2002; Manconia *et al.*, 2009; Goswami *et al.*, 2010; Pentón-Rol *et al.*, 2011; Tso *et al.*, 2012; Koller *et al.*, 2014). El  $\beta$ C y la C-FC se utilizan principalmente como colorantes y antioxidantes (Carranco *et al.*, 2011; Kamble *et al.*, 2012; Borowitzka, 2013). Ambos compuestos tienen propiedades fluorescentes y se utilizan como biomarcadores (Betancourt, 1997; Spolaore *et al.*, 2006). El GLA ayuda en tratamientos de alcoholismo, depresión, síntomas pre-mestruales, en deficiencia de zinc, en el crecimiento celular y

síntesis de la membrana celular (Horrobin, 1992; Tiburcio *et al.*, 2007; Kovač *et al.*, 2013). La **C-FC** pueda también ser neuroprotector (Rimbau *et al.*, 1999; Pentón-Rol *et al.*, 2011), hepatoprotector (Ou *et al.*, 2011), estimula el sistema de defensa de enzimas antioxidantes (Ivanova *et al.*, 2009). En experimentos *in vivo*, se recomienda consumir 100-200 mg kg<sup>-1</sup> como protector neuronal y para disminuir la hepatotoxicidad de compuestos químicos (Belay *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2010). También se ha evaluado como antiinflamatorio y se recomienda de 25-200 mg kg<sup>-1</sup> (Romay *et al.*, 2003).

#### **2.4.2 Mercado de la C-FC, el βC y el GLA**

Los pigmentos de origen natural (biopigmentos) carotenoides y C-FC son de gran importancia y se estima que en 2020 tendrán un valor de 1.5 billones de dólares (Carvalho *et al.*, 2014). Los carotenoides más comercializados son βC, luteína, astaxantina, cathaxantina, annato y licopeno. El βC y la astaxantina representan la mayor parte de pigmentos de obtención de forma natural por microalgas. El βC se obtiene de forma sintética (75%) y natural (25%) con un valor en el mercado de 2010 de US\$ 270 millones. El país que tiene la mayor producción es Australia y sus compañías más representativas son: Betatene y Western Biotechnology (con 17-20 ton) y Aqua Carotene (Del campo *et al.*, 2007; Rosenberg *et al.*, 2008; Borowitzka, 2013). Tiene un valor en el mercado que depende del grado de pureza alimentario o grado analítico (Cuadro 2). El mercado de las ficobiliproteínas está valuado entre US\$ 50-60 millones anuales (Sili *et al.*, 2012; Borowitzka, 2013). Las empresas que venden FC son: cyanotech Corporation, Prozyme Inc., Dainippon Ink & Chemicals Inc. (500 ton), entre otras. Su precio se determina por su grado de pureza. La pureza se define como la relación de las absorbancias a 620 nm y 280 nm ( $A_{620}/A_{280}$ ) donde: A es la absorbancia de las muestras a 620 nm (ficocianina) y 280 nm (todos los aminoácidos aromáticos). El grado alimentario tiene una pureza < 0.7 y el costo de la calidad analítica es de < 4.0 (Cuadro 2). Los ácidos grasos poliinsaturados más comercializados de las microalgas y empleados en suplementos nutricionales y en fórmulas infantiles son: ácido araquidónico (AA), ácido gamma linolénico (GLA), ácido eicosapentenoico y ácido docosahexaenoico (DHA). Estos ácidos grasos tienen un gran potencial en el mercado de fórmulas infantiles a nivel mundial con una venta de 10

billones. El DHA es el de mayor venta en el mercado mundial con un valor de US\$ 50 por Kg (Spolaore *et al.*, 2006; Koller *et al.*, 2014). El GLA tiene un valor en el mercado mayor al DHA (Cuadro 2).

**Cuadro 2.-** Precio de los biocompuesto C-ficocianina,  $\beta$ -caroteno y  $\gamma$ -linolénico.

Biocompuestos	<sup>A</sup> (US\$ 100 mg <sup>-1</sup> )	<sup>B</sup> (US\$ Kg <sup>-1</sup> )
C-ficocianina	1250 <sup>b</sup> -1363 <sup>c</sup>	100-1300 <sup>a</sup>
$\beta$ -caroteno	532 <sup>c</sup>	100-999 <sup>a</sup> ; 300-3000 <sup>d</sup>
Ácido $\gamma$ -linolénico	- 173 <sup>c</sup>	40-170 <sup>a</sup>

<sup>A</sup>Grado analítico (Ip>4), <sup>B</sup>grado alimenticio (Ip<0.7). <sup>a</sup><http://spanish.alibaba.com>; <sup>b</sup><http://www.prozyme.com>-2015; <sup>c</sup><http://www.sigmaaldrich.com>-2015; <sup>d</sup>Rosenberg *et al.*, 2008.

## 2.5. Producción de C-ficocianina en *Arthrospira*

Los factores que influyen en la producción de FC son: **1)** la concentración de selenio, **2)** fuente de carbono (Chen *et al.*, 2006; Chainapong *et al.*, 2012), **3)** la intensidad y tipo de luz (Loreto *et al.*, 2003; Chainapong *et al.*, 2012); **4)** el contenido y fuente de nitrógeno (Ajayan *et al.*, 2012; Öztürk-Ürek & Tarhan, 2012). Se han hecho diferentes investigaciones utilizando estos parámetros, reportando una producción de entre 40-195 mg FC g<sup>-1</sup> (Cuadro 3). La concentración media reportada es de 100 a 150 mg C-FC g<sup>-1</sup>, obtenida de medios de cultivos con 29.4 mM NaNO<sub>3</sub> e intensidad luminosa entre 85 a 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 30-35°C (Cuadro 3). Sin embargo, los mejores rendimientos de C-FC de entre 180-195 mg g<sup>-1</sup>, se han obtenido en medios de cultivos con diferentes concentraciones y fuente de nitrógeno e intensidad luminosa 30-80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o con luz natural a 26-35°C (Cuadro 3). Con base a los experimentos del Cuadro 3 el parámetro que determina en mayor medida la producción de C-FC es la fuente y concentración de nitrógeno. Sin embargo, en este generó de cianobacteria y en particular en *A. maxima* se han hecho pocas investigaciones utilizando fuentes de nitrógeno alternativa, como la urea (Ajayan *et al.*, 2012). La investigación reportada por Ajayan *et al.*, (2012) utilizando urea obtuvieron una mayor concentración (148 mg g<sup>-1</sup>) que al utilizar nitrato de potasio (121 mg g<sup>-1</sup>). Sin embargo, se obtiene la mayor concentración de C-FC (Cuadro 3), cuando se utiliza una mayor cantidad de NaNO<sub>3</sub> (Öztürk-Ürek & Tarhan, 2012), en combinación con otras fuentes de nitrógeno

como urea (Chaiklahan *et al.*, 2010) y en combinación con concentraciones altas de NaCl (Hifney *et al.*, 2013).

Cuadro 3.- Parámetro de C-ficocianina producido por *Arthrospira*.

Referencia	Condiciones de cultivo	Luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Fuente N (mM)	FC ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Chaiklahan <i>et al.</i> , 2010	<i>A. platensis</i> . Zarrouk ( $8 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ ) y medio 2* (20% efluente UASB) a $26^\circ\text{C}$ . $0.28 \text{ g X L}^{-1}$	Luz natural (120)	$29.4 \text{ NaNO}_3 + 1.6 \text{ NH}_3 + 3.3 \text{ urea}$	195
Hifney <i>et al.</i> , 2013	<i>Arthrospira</i> sp. Zarrouk con $0.3^*$ , $0.6^*$ , $0.9 \text{ M NaCl}$ a $30^\circ\text{C}$ .	14.5, 28, $48^*$	0, 7, 15, $29.4^* \text{ NaNO}_3$	190
Öztürk-Ürek & Tarhan, 2012	<i>A. maxima</i> . Zarrouk a $28^\circ\text{C}$ .	30	10, 30, $50^* \text{ NaNO}_3$	190
Ruengjitchachawalya <i>et al.</i> , 2002	<i>A. platensis</i> . Zarrouk a 20, 25 and $35^\circ\text{C}^*$ .	80	$29.4 \text{ NaNO}_3$	180
Chainapong <i>et al.</i> , 2012	<i>A. platensis</i> . Medio autotrófico y mixotrófico a $25-30^\circ\text{C}$ . $1 \text{ g X L}^{-1}$	Natural, azul, rojo, amarillo*	$29.4 \text{ NaNO}_3$	175
Ajayan <i>et al.</i> , 2012	<i>A. platensis</i> . Medio de cultivo de Kaushik a $28-30^\circ\text{C}$ . $1.4 \text{ g X L}^{-1}$	$58-72^*$ , 30-36	$24.7 \text{ KNO}_3$ , $41.6 \text{ urea}^*$	148
Bhattacharya <i>et al.</i> , 2005.	<i>Arthrospira</i> . Zarrouk a $28^\circ\text{C}$ .	120	$29.4 \text{ NaNO}_3$	148
Chen <i>et al.</i> , 2006.	<i>A. platensis</i> . Zarrouk ( $4^* \text{ g acetato L}^{-1}$ ) y Se ( $350, 450^*$ y $600 \mu\text{g L}^{-1}$ ) a $30^\circ\text{C}$ . $1.9 \text{ g X L}^{-1}$	50	$29.4 \text{ NaNO}_3$	148
Minkova <i>et al.</i> , 2003.	<i>A. fusiformis</i> . Medio Aiba y Ogawa (AO) a $32^\circ\text{C}$ .	400	$29.4 \text{ NaNO}_3$	128
Sarada <i>et al.</i> , 2011	<i>A. platensis</i> . Zarrouk a $30^\circ\text{C}$ .	140	$29.5 \text{ NaNO}_3$	128
Hongsthong <i>et al.</i> , 2007.	<i>A. platensis</i> . Filamentos rectos* y espiral en Zarrouk a $35^\circ\text{C}$ .	100	$29.4 \text{ NaNO}_3$	126
Boussiba & Richmond, 1980.	<i>A. platensis</i> . Zarrouk a $35^\circ\text{C}$ .	$85^*$ , 175	$3.7, 29.4^* \text{ NaNO}_3$	100
Doke, 2005.	<i>Arthrospira</i> sp. Medio modificado (CFTRI) a $30^\circ\text{C}$ .	37-63	$17.6 \text{ NaNO}_3$	86
Leema <i>et al.</i> , 2010.	<i>A. platensis</i> . Zarrouk y suplementado con agua de mar, $26^\circ\text{C}$ . $3 \text{ g X L}^{-1}$	140	$35.3 \text{ NaNO}_3$	48
Lamela & Márquez, 2000.	<i>A. maxima</i> . Medio mineral o con agua de mar a $23^\circ\text{C}$ : $2.7 \text{ g X L}^{-1}$ .	230	12, 24, $29.4^* \text{ NaNO}_3$	45
Hu <i>et al.</i> , 2011	<i>A. maxima</i> . Zarrouk. $2.1 \text{ g X L}^{-1}$	150	$29.4 \text{ NaNO}_3$	43
Gordillo <i>et al.</i> , 1999.	<i>A. platensis</i> . Zarrouk y modificado con $\text{CO}_2$ (0.35 y 1%) a $25^\circ\text{C}$ .	100	1, $29.4^* \text{ NaNO}_3$	42

\*Tratamiento óptico. X= biomasa.

## 2.6. Producción de carotenoides en *Arthrospira*: $\beta$ -caroteno.

Se acumula gran cantidad de carotenoides en *Arthrospira*, principalmente en respuesta a: 1) la intensidad y tipo de luz; 2) la concentración de NaCl (Chainapong *et al.*, 2012); 3) la fuente de nitrógeno (Ajayan *et al.*, 2012), pero no es tan determinante como en el caso de la FC; 4) la temperatura (Hu *et al.*, 2011).

En los cuadros 4 y 5 se reportan la concentración de carotenoides (C) y la de  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ C) respectivamente con diferentes factores y medios de cultivo de *Arthrospira*. Se reportan una concentración promedio de 3-5 mg  $\beta$ C g<sup>-1</sup> en medios de cultivo con nitratos a 25-35 mM e intensidad luminosa de 50-140  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> a 20-30°C. La mejor concentración de  $\beta$ C se da en medio sin fosfatos o con 0.9 M NaCl y en medios con 29.4 mM NaNO<sub>3</sub> e intensidad luminosa de 48.4  $\mu$ mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, obteniendo 13 mg  $\beta$ C g<sup>-1</sup>. Con base a estos resultados, puede empezarse a considerar a *Arthrospira* como una fuente importante de  $\beta$ C (Cuadro 5), que de hecho es mucho mayor a lo reportado en diferentes vegetales (Rodríguez-Amaya, 1997). Un factor importante para una mayor concentración de  $\beta$ C es el NaCl. Se ha reportado que no existe diferencia en cultivos control con 0.017 M NaCl o con concentraciones de 0.4 a 0.6 M NaCl (Cuadro 5). Sin embargo, a concentraciones de 0.9 M NaCl, aumenta la concentración de  $\beta$ C (Cuadro 5) obteniendo 13 mg g<sup>-1</sup> (Hifney *et al.*, 2013).

Cuadro 4.- Producción de carotenoides en *Arthrospira*.

Referencia	Condición de medio de cultivo	Luz ( $\mu$ mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fuente N (mM)	C (mg g <sup>-1</sup> )
Gordillo <i>et al.</i> , 1999.	<i>A. platensis</i> . Zarrouk y CO <sub>2</sub> (0.35* y 1%) a 25°C.	100	1, 29.4 NaNO <sub>3</sub>	24
Hu <i>et al.</i> , 2011	<i>A. maxima</i> . Zarrouk a 10, 20*, 40°C. 2.1 g X L <sup>-1</sup>	150	29.4 NaNO <sub>3</sub> .	23
Öztürk-Ürek & Tarhan, 2012	<i>A. maxima</i> . Zarrouk.	30	10, 30, 50* NaNO <sub>3</sub>	5
Chainapong <i>et al.</i> , 2012	<i>A. platensis</i> . Medio mixotrófico y autotrófico.	Natural, azul, rojo, amarillo*	29.4 NaNO <sub>3</sub>	4.6
Deniz <i>et al.</i> , 2011.	<i>Arthrospira sp.</i> Schlösser: 0.2 y 0.4 M NaCl y Cu (II) a 28°C. 1.2 g X L <sup>-1</sup>	25	29.4 NaNO <sub>3</sub>	4
Ajayan <i>et al.</i> , 2012	<i>A. platensis</i> . Medio de cultivo de Kaushik a 28-30°C. 1.4 g X L <sup>-1</sup>	58-72, 30-36*	24.7 KNO <sub>3</sub> , 41.6 urea*	3
Lamela & Márquez, 2000	<i>A. maxima</i> . SOT y 3 medios con agua de mar (0.6 M NaCl) a 23°C.	230	29.4*, 23.5, 11.8* NaNO <sub>3</sub>	2.2
Hongsthong <i>et al.</i> , 2007.	<i>A. platensis</i> . Zarrouk con filamentos rectos* y espiral a 35°C.	100	29.4 NaNO <sub>3</sub>	1.6
Soundarapandian & Vasanthi, 2008	<i>A. platensis</i> . Zarrouk 32°C.	37	29.4 NaNO <sub>3</sub>	2-3

\* Tratamiento óptico. X= biomasa.

Cuadro 5.- Determinación de  $\beta$ -caroteno en *Arthrospira*.

Referencia	Condiciones de cultivo	Luz ( $\mu$ mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Fuente N (mM)	$\beta$ C (mg g <sup>-1</sup> )
Hifney <i>et al.</i> , 2013.	<i>Arthrospira sp.</i> Zarrouk con 0.3, 0.6, 0.9* M NaCl a 30°C.	14.5, 28, 48*	0, 7.3, 14.7, 29.4* NaNO <sub>3</sub>	13

<b>Miranda et al., 1998.</b>	<i>A. maxima</i> . Paoletti a 20°C.	60	24.7 KNO <sub>3</sub>	4.4
<b>Leema et al., 2010.</b>	<i>A. platensis</i> . Zarrouk* y medio con agua de mar (0.2*-0.6 M NaCl), 26°C. 3 g X L <sup>-1</sup>	140	35.3 NaNO <sub>3</sub>	4
<b>Chen et al., 2006.</b>	<i>A. platensis</i> . Zarrouk con 2-4 g acetato L <sup>-1</sup> * y selenio a 30°C. 1.2 g X L <sup>-1</sup>	50	29.4 NaNO <sub>3</sub>	3
<b>Chainapong et al., 2012</b>	<i>A. platensis</i> . Mixotrófico (1 g acetato L <sup>-1</sup> ) y autotrófico.	Natural, azul, rojo, amarillo	29.4 NaNO <sub>3</sub>	1.2

\* Tratamiento óptico. X= biomasa.

## 2.7. Producción del ácido $\alpha$ -linolénico en *Arthrospira*

La producción de GLA en cianobacterias es regulada principalmente por: **1)** la intensidad de luz (Mühling *et al.*, 2005); **2)** la temperatura (Ruengjitchatchawalya *et al.*, 2002); y **3)** la concentración y fuente de nitrógeno (Mahajan & Kamat, 1995; Sharma *et al.*, 2011).

La concentración media de GLA reportada en *Arthrospira* es de 12-15 mg g<sup>-1</sup> cuando se cultivada con: 29.4 mM NaNO<sub>3</sub> a 20-25°C e intensidad luminosa bajas de 72  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o 10-20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 33-35°C y cuando se utiliza urea como fuente de nitrógeno (Cuadro 6). La mayor concentración de GLA reportado es de 38-50 mg g<sup>-1</sup> en cultivos deficientes de nutrientes a 25±2°C y 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Cuadro 6). También se han hecho experimentos con medios de cultivo suplementados con aceite y ácidos grasos (Cuadro 6), donde se han obtenido de 14-20 mg GLA g<sup>-1</sup> (Ronda & Lele, 2008; Kim *et al.*, 2012).

En general se podría cultivar *Arthrospira* para obtener concentraciones medias de FC,  $\beta\text{C}$  y GLA, sí se emplea un medio de cultivo con 29.4 mM de NaNO<sub>3</sub> a 30-33°C e intensidad luminosa de 50-80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Cuadros 3, 5 y 6). También se reportan concentraciones importantes de carotenoides y GLA cuando hay limitación en el medio a 25°C y 50-100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Cuadro 4 y 6). No existen muchas investigaciones para mejorar la producción de estos biocompuesto con otras fuentes de nitrógeno diferentes al nitrato de sodio utilizado en el medio de cultivo Zarrouk. Solo se han reportado por Ajayan *et al.*, (2012) y Mahajan & Kamat, (1995), este último autor ha realizado una investigación donde utiliza diferentes tipos de nitrógeno. En ambas investigaciones se ha determinado que se mejoran los rendimientos de GLA, la C-FC y carotenoides con urea que con otras fuentes de nitrógeno (Cuadro 3, 4 y 6). Con base Hifney *et al.*, (2013) otro parámetro poco

estudiado es el compuesto, cloruro de sodio (NaCl). Éste incrementa la concentración de la C-FC y del  $\beta$ C a 30°C e intensidad luminosa baja (Cuadro 2 y 5).

Cuadro 6.- Determinación de ácido gamma linolénico en *Arthrospira*.

Referencia	Condiciones de cultivo	Luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Fuente N (mM)	GLA ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Bhakar <i>et al.</i> , 2014	<i>Arthrospira</i> . Zarrouk con nutrientes limitados a 25±2°C.	55-60	12*, 18, 29.4 NaNO <sub>3</sub>	50
Ramadan <i>et al.</i> , 2008.	<i>A. platensis</i> . Medio deficiente a 25±2°C.	48	Nutriente deficiente	38
Kim <i>et al.</i> , 2012.	<i>A. platensis</i> . SOT y suplementado (ácido graso* y 10 mM de acetato*, glucosa, citrato) a 28°C.	100	29.4 NaNO <sub>3</sub>	20
Hu <i>et al.</i> , 2011	<i>A. maxima</i> . Zarrouk a 10, 20*, 40°C. 2.1g X L <sup>-1</sup>	150	29.4 NaNO <sub>3</sub>	17
Ronda & Lele, 2008	<i>A. platensis</i> . SOT medium with oil* at 25*, 33 and 36°C.	24, 48 y 72*	29.4 NaNO <sub>3</sub>	15
Mahajan & Kamat, 1995.	<i>A. platensis</i> . SOT y modificado a 15, 25*, 35*, 40°C.	19.2	10-50 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KNO <sub>3</sub> , NaNO <sub>3</sub> , urea*, (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .	13.5
Mühling <i>et al.</i> , 2005	<i>Arthrospira</i> . Zarrouk y Zarrouk con 0.02 M glucosa* a 20*, 30°C.	10*, 60 y 70	29.4 NaNO <sub>3</sub>	13
Oliveira <i>et al.</i> , 1999	<i>A. maxima</i> y <i>A. platensis</i> . Medio mineral a 20*, 40°C.	180	24.7 KNO <sub>3</sub>	13

\* Tratamiento óptico. X= biomasa.

## 2.8. Extracción de biocompuestos

La extracción de compuestos naturales es la base para un crecimiento de la industria nutracéutica (Denery *et al.*, 2004). Los procesos de extracción de los lípidos y pigmentos son técnicas principalmente desarrolladas de procesos fitoquímicos en plantas superiores y microalgas (Pasquet *et al.*, 2011). El procedimiento de extracción de pigmentos en general incluye dos pasos: el aislamiento de un extracto crudo y la purificación de este extracto. Algunas técnicas de extracción son las siguientes: ultrafiltración, CO<sub>2</sub> supercrítico, extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas. Estas técnicas tienen como objetivo ser eficientes para la obtención de pigmentos (Cisneros-Ruiz *et al.*, 2005). Todos estos métodos de extracción involucran dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto (Cisneros & Rito, 2005; Azuola & Vargas, 2007). En estos sistemas de extracción se necesitan diferentes solventes. Un solvente que es usado con frecuencia

son los fosfatos, esto se debe a que tienen diferentes ventajas tales como bajo costo, amplia aplicación, y un rango de pH de 6 a 9 bajo el cual los sistemas son estables (Cisneros-Ruiz *et al.*, 2005).

En países como China se cultivan *A. maxima* y *A. platensis* a gran escala con una producción de aproximadamente 89000 toneladas (FAO, 2018). Pero la mayor parte de esta producción no se utiliza para obtener biocompuestos de *Arthrospira*. Debido a esto, se realizaron diferentes técnicas de extracción para obtener el mayor rendimiento de este pigmento. Ya que la recuperación y actividad de ficobiliproteínas depende del tipo de solvente y método de extracción. Las ficobiliproteínas son moléculas hidrosolubles, para su extracción se han utilizados diferentes tipos de disolventes (Batista *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007).

### 2.8.1 Extracción de ficobiliproteínas.

Existen diferentes grupos funcionales que favorecen la capacidad antioxidante de los compuestos (Erkan *et al.*, 2008). Se sabe que la capacidad de C-FC para atrapar SOR y SNR, se debe a su estructura cromófora, que es similar a la bilirrubina (Zheng *et al.*, 2013). Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que la parte de apoproteína si afecta la función antioxidante debido a que interactúa con la parte cromóforos (Zhou *et al.*, 2005). Debido a ello es posible que esta última parte sea la más afectada y por lo tanto el método de extracción es determinante.

La extracción de biocompuestos de organismos fotosintéticos como *Arthrospira* puede ser más económico que la síntesis química de colorantes, por lo cual el método de extracción debe permitir la mayor productividad (Azuola & Vargas, 2007). Debido a esto, se han investigado diferentes métodos de extracción y disolventes para la recuperación de ficobiliproteínas (Cuadro 7).

Cuadro 7.- Recuperación de FC (mg g<sup>-1</sup>) por diferentes tipos de extracción.

Autor-año / método de extracción	FC (mg g <sup>-1</sup> )							
	Soni-mace	Mace.	Agit.	Hom	Des-co	Enzim.	Soni.	N-líq.
Banji <i>et al.</i> , 2013	148							
Chen <i>et al.</i> , 2010	146-152							
Doke, 2005			13.4	82	86			
Hemlata <i>et al.</i> , 2011		97-101		128		85-104	100	125
Licet, 2008						153		

Patel <i>et al.</i> , 2005.	171							
Pumas <i>et al.</i> , 2011							55-60	
Niu <i>et al.</i> , 2007			95		95		104	
Ramos-Molina, 2011			110-144 <sup>2</sup>					
Sarada <i>et al.</i> , 1999			150	178	178			
Silveira <i>et al.</i> , 2007		105 <sup>1</sup>						
Soundarapandian & Vasanthi, 2008					102	102	82	110

Mace = maceración, Soni = sonicación, Hom = homogenización, Des-co = descongelación, Enzim = enzimático, N-líq = nitrógeno líquido, Agit= agitación. Superíndice (<sup>1,2</sup>) método de maceración y agitación con diferentes solventes, mayor concentración con buffer de fosfato.

Como se observa en el Cuadro 7 los métodos de extracción más utilizados para obtener FC son maceración, agitación, sonicación, descongelación y enzimático (Sarada *et al.*, 1999; Doke, 2005; Soundarapandian & Vasanthi, 2008; Chen *et al.*, 2010; Hemlata *et al.*, 2011; Banji *et al.*, 2013). Como base a estos datos se determinó realizar tres diferentes métodos de extracción para obtener C-FC: agitación, sonicación y enzimático. Para optimizar esta extracción hay que considerar las siguientes variables: temperatura, solvente, concentración de sales, volumen de solvente, tiempo de extracción, poder del ultrasonido y duración del ciclo aplicado (Azuola & Vargas, 2007; Vilkhū *et al.*, 2008). Las moléculas de ficobiliproteínas son hidrosolubles y para su extracción se han utilizados diferentes tipos de disolventes como: agua, buffer de fosfatos y acetatos, cloruro de sodio y de calcio. La mayor concentración de C-FC se obtiene con buffer de fosfato, que tiene diferentes ventajas como bajo costo, amplia aplicación y un rango de pH de 6 a 9 (Batista *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2007; Hemlata *et al.*, 2011).

En la extracción por agitación el choque osmótico provoca la ruptura de las paredes celulares y la consiguiente salida del material citoplasmático. La posterior centrifugación tiene como objeto la eliminación de componentes estructurales más pesados (paredes celulares, orgánulos citoplasmáticos de gran tamaño) (Ramos-Molina, 2011).

La extracción asistida por ultrasonido o sonicación; utiliza sonidos de alta frecuencia, que favorece que las partículas sólidas y líquidas vibren y se aceleren ante la acción ultrasónica, reduciendo el tamaño de las partículas del material vegetal aumentando el área de exposición al solvente y a la cavitación producida (Azuola & Vargas, 2007; Vilkhū *et al.*, 2008). El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de

los constituyentes solubles por difusión y proceso osmótico. Para optimizar esta técnica hay que considerar las siguientes variables: temperatura, solvente, volumen de solvente, tiempo de extracción, tamaño de la punta de prueba, poder del ultrasonido y duración del ciclo aplicado (Azuola *et al.*, 2007). Existen tres diferentes tipos de transductores: de manejo de líquidos, magnéticos y piezoeléctricos. La piezoelectricidad es la habilidad de los cristales para generar un voltaje en respuesta a un estrés mecánico aplicado. Ejemplos de estos equipos son los baños ultrasónicos utilizados en equipos experimentales. Son los equipos más ampliamente utilizados; usan cargas con distintas polaridades hacia las cuales el material responde por contracción o expansión. Altamente eficientes (>95%) y pueden utilizarse en un amplio rango de frecuencias (Azuola *et al.*, 2007).

La extracción enzimática es de interés a nivel industrial, debido a que se pueden obtener altos rendimientos y conservar sus propiedades antioxidantes (Carrera, 2003; Pasquet *et al.*, 2011). Algunas enzimas que se han utilizado para mejorar las tasas de pigmentos extraíbles son xilanasas, pectinasas y celulasas. fueron propuestas y validadas para los tejidos de plantas superiores y macroalgas. El cual podría ser de interés para investigar en microalgas (Pasquet *et al.*, 2011). La aplicación de enzimas está en función de la naturaleza de la muestra y la enzima. Produce la degradación y remoción de compuestos digeribles como: pigmentos, proteínas, almidones, entre otros (Torres-Castro & Vargas Aguilar, 2010). Las enzimas se pueden obtener de diferentes fuentes como tejido animal, vegetal o mediante procesos de fermentación específico utilizando microorganismos. A nivel industrial generalmente se obtienen de microorganismos. Las empresas más importantes a nivel mundial de producción de enzimas son: Novo Nordisk (Dinamarca) con el 50% de las ventas, Gist Brocades (Holanda) y Rhom and Haas (Alemania). La producción de enzima a nivel industrial se ha desarrollado en paralelo con las aplicaciones de estas en la industria alimentaria (Carrera, 2003).

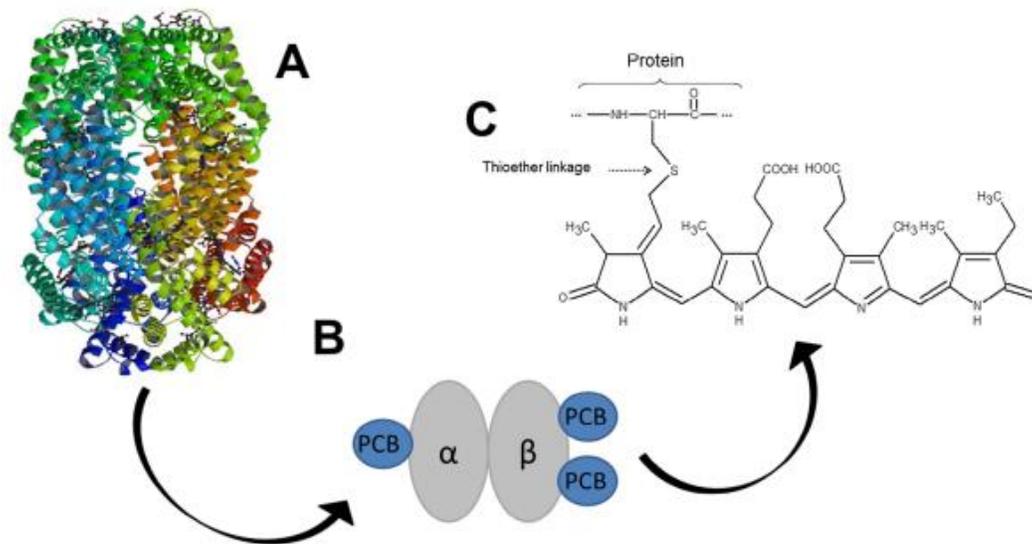
## **2.9. Pigmentos naturales: ficobiliproteínas**

Las microalgas son una fuente importante de colorantes naturales o biopigmentos, que son de interés en biotecnología. Son estructuras químicas capaces de absorber la luz visible 380-750 nm. Los pigmentos más comercializados son los carotenoides:  $\beta$ -caroteno,

zeaxantina, astaxantina y luteína; y las ficobiliproteínas: ficocianina y ficoeritrina (Ramos-Molina, 2011; Carvalho *et al.*, 2014). Estos últimos grupos de colorantes tienen un enorme potencial para sustituir colorantes sintéticos. Además, constituyendo una alternativa para el incremento y diversificación de la oferta actual de pigmentos naturales existente en el mercado (Ramos-Molina, 2011).

Las ficobiliproteínas son macromoléculas cromóforas representan entre 40-60% de las proteínas solubles en la célula y se pueden leer en una escala de longitud de onda de 495 a 650 nm. Las ficobilinas se pueden dividir en tres grupos con base a sus propiedades espectrales: ficoeritrina (560 nm), ficocianina (620 nm) y aloficocianina (650 nm). Se componen de dos unidades no polipépticas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), que contienen uno o más enlaces covalentes de cadenas de cromóforos tetrapirrólicos (Apt *et al.*, 1995). Son una familia de pigmentos hidrófilos de color brillante con fluorescencia estable. Forman agregados de forma esférica llamado ficobilisomas, unidos a la superficie exterior de la membrana tilacoidal por puentes de sulfuros y asociadas con el fotosistema II (Apt *et al.*, 1995; Ramos-Molina, 2011). Se organizan en orden a su máxima absorción, de la siguiente forma: Ficoeritrina  $\rightarrow$  ficocianina (FC)  $\rightarrow$  aloficocianina (AFC)  $\rightarrow$  clorofila (Ramos-Molina, 2011).

La ficobiliproteína más representativa de *Arthrospira* es C-ficocianina (C-FC). La C-FC representa un 20 a 30 % de la biomasa esto dependerá de las condiciones de crecimiento de esta microalga (Lamela *et al.*, 2000; Eriksen, 2008). Existen dos tipos de ficocianina (FC) que se compone de una parte proteica y otra no proteica que tiene cromóforos llamado ficocianobilina (PCB) o ficoeritrobilina (PEB). Las que tienen solo PCB en las subunidades proteica  $\alpha$  y  $\beta$  son C-FC (ilustración 5); y las que tienen una PEB en la subunidad  $\beta$  son R-ficocianina. El cromóforo es un tetrapirrol de cadena abierta (figura 5-C) y representa 4% del peso molecular de las ficobiliproteínas (Gantt, 1975; Fernández-Rojas *et al.*, 2014). Es responsable de la capacidad de absorber luz en la región visible y en consecuencia de su capacidad de coloración (Carvalho *et al.*, 2014). Se capta la luz y transfieren la energía en la siguiente dirección: C-FC  $\rightarrow$  AFC  $\rightarrow$  PSII con una eficiencia entre 90-100% (Apt *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2006; El-Baky & El-Baroty, 2012).



**Figura 5.-** Estructura de ficocianina: A) estructura cristalina, B) subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y C) estructura química (Fernández-Rojas *et al.*, 2014).

La C-ficocianina se utiliza como aditivo y colorante en la industria de alimentos y la industria de cosméticos, con un valor de mercado de alrededor de 10-50 millones de dólares anuales. Se utiliza por ejemplo en gomas de mascar, sorbetes de hielo, refrescos, dulces, en lápiz de labios y perfiladores de ojos entre otros productos (Liang *et al.*, 2004; Spolaore *et al.*, 2006; Chaiklahan *et al.*, 2011). En pequeñas cantidades se puede utilizar como marcador bioquímico de inmunidad debido a sus propiedades fluorescentes (Chaiklahan *et al.*, 2011; Grewe & Pulz; 2012). El costo de la ficocianina es muy variable y depende de la pureza, que se define como la relación de la absorbancia a 620nm y 280nm ( $A_{620}/A_{280}$ ) (Moraes *et al.*, 2011; Chaiklahan *et al.*, 2011).

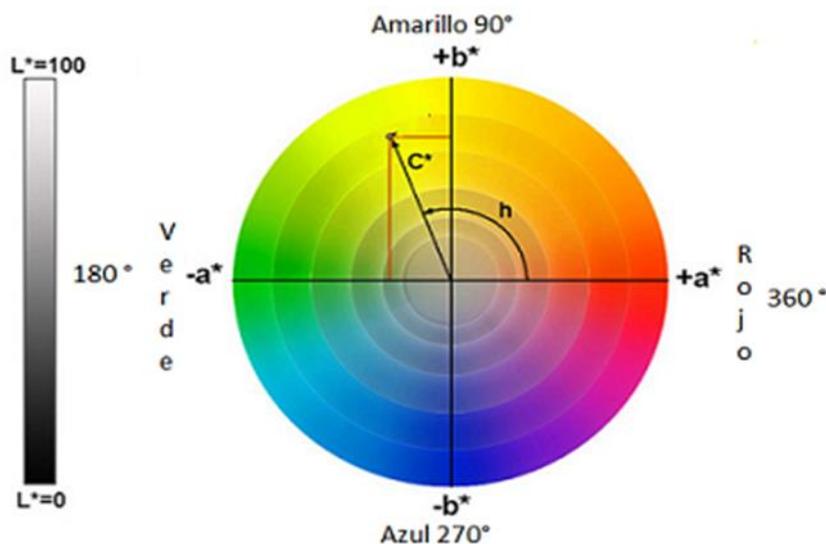
Las aplicaciones prácticas de la medida del color requieren medidas reproducibles. Los extractos crudos de FC de *Anabaena*, *Synechocystis* y *Arthrospira* se han añadido a diferentes alimentos, los cuales han sido evaluados por los parámetros del espacio CIELAB. Que es una técnica que se puede reproducir y evaluar el color (Ramos-Molina, 2011). También se han evaluado estos parámetros en pigmentos como betalaínas encapsulado con quitosano y maltodextrina (Gandía-Herrero *et al.*, 2013).

El color es una percepción que genera el cerebro, la retina del ojo distingue la longitud de onda que capta la parte visible del espectro electromagnético (Ramos-Molina, 2011).

Los principales atributos de color son: brillo, tono y saturación; estos dos últimos atributos son los principales atributos de la cromaticidad. El **Tono**: es la cualidad que normalmente se identifica con el color perceptible como rojo, verde o azul; **Brillo**: es un término relacionado con el concepto de luz y oscuridad considerando al color como fuente de luz reflejante; **Saturación**: es la claridad o pureza del color, un color saturado parece claro y brillante mientras que un color insaturado parece pálido (Ramos-Molina, 2011).

### 2.9.1.1. Técnicas de colorimetría

Existen tres técnicas para evaluar el color: 1) serie de sistemas visuales; 2) un sistema físico en el cual un espectro de reflexión o transmisión se obtiene y se usa directamente o se convierte a un sistema triestímulo; y 3) un colorímetro que es un sistema de colorimetría triestímulo, que calcula las señales de una muestra por reflexión o transmisión en unidades referidas cómo ve el color el ojo humano, CIELAB (Ramos-Molina, 2011).



**Figura 6.-** Ejes del sistema CIELAB se indican con los nombres  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .

El espacio de color CIELAB tiene como parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  y  $h^\circ$  (Gandía-Herrero *et al.*, 2013). Tiene una transformación matemática del espacio XYZ en el cual se fija un blanco de referencia y cuyos valores de triestímulo son  $(X_n, Y_n, Z_n)$ . Los tres ejes del sistema CIELAB se indican con los nombres  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  (ilustración 6). Los ejes del sistema

CIELAB representan la luminosidad,  $L^*$ , (rango de 0-negro a 100-blanco), y dos coordenadas de color:  $a^*$  (valores positivo tonos rojos y negativos tonos verdes) y  $b^*$  (valores positivo tonos amarillos a negativos en tonos azules). Los asteriscos sirven para distinguir el espacio de color CIELAB de otros con nombres similares. Los colores deben verse sobre un fondo que vaya de blanco a gris medio por un observador adaptado a un iluminante que no sea demasiado distinto a la luz natural del mediodía (Ramos-Molina, 2011; Gordillo *et al.*, 2015).  $h^\circ$  corresponde al tono, definido como el ángulo (en grados) (Gandía-Herrero *et al.*, 2013) y  $C^*$  representa la cromaticidad depende de la tonalidad y aparece en el mismo plano que  $h^\circ$  (figura 6). Se le observa a  $10^\circ$  y con un estándar de luminosidad de D65, que corresponde a la luz natural del día (Gordillo *et al.*, 2015).

## 2.9.2. Materiales de recubrimiento

Existen diferentes materiales de recubrimiento: polímeros sintéticos, proteínas de origen animal y origen vegetal, azúcares, gomas, ceras, lípidos, polisacáridos naturales y sintéticos (Fang & Bhandari, 2010; Chaiklahan *et al.*, 2012; Nesterenko *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014). Estos recubrimientos pueden usarse como revestimiento individual o como material de embalaje en encapsulamiento (Nesterenko *et al.*, 2013). El material de recubrimiento más utilizado en la industria de alimento es la maltodextrina, por ejemplo, para proteger al  $\beta$ -caroteno y betalaínas (Gandía-Herrero *et al.*, 2013; Donhowe *et al.*, 2014; Botrel *et al.*, 2014). Para proteger diferentes pigmentos se han utilizado diferentes materiales de recubrimiento como proteína de suero; pero principalmente se han utilizado polisacáridos como: maltodextrina, alginato, quitosano y pectina (Donhowe *et al.*, 2014; Gandía-Herrero *et al.*, 2013; Ge *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014). Las proteínas son eficientes como barrera de lípidos, oxígeno y aromas en condiciones de baja humedad relativa, pero no son eficientes como barreras de vapor de agua porque presentan grupos hidrófilos en su estructura molecular (Tapia-Blácido *et al.*, 2011). Se ha determinado, que la absorción de agua es un factor crítico para la estabilidad de las micropartículas, porque el agua puede afectar el proceso de oxidación (Botrel *et al.*, 2014). Para compensar esto se ha utilizado diferentes polisacáridos, los cuales son más eficientes como barrera de la humedad (Lacroix & Dang, 2014). Otro material de recubrimiento utilizado en alimentos

son las gomas por su eficiencia de encapsulación y estabilidad. Las variaciones de costo, calidad y suministro limitan el uso de algunas gomas (Kanakdande *et al.*, 2007). Es importante la diversificación y la disminución de costo de materiales de recubrimiento. Por lo que en este trabajo se utilizan diferentes materiales de recubrimiento de origen mexicano con perspectivas a ser utilizados como aditivo para proteger la degradación de C-FC.

#### **2.9.2.1. Degradación de C-ficocianina**

La aplicación de materiales en pigmentos como C-FC es importante, debido a que en la industria se ve limitada el uso de este pigmento por la precipitación de las proteínas y la pérdida de color azul. Este pigmento se degrada drásticamente entre 50-60°C y su parte proteica se desnaturaliza irreversiblemente a partir de los 65°C (Pumas *et al.*, 2011; Chaiklahan *et al.*, 2012; Martelli *et al.*, 2014). Debido a que estas proteínas son muy sensibles a la agregación y al medio ambiente (Chen *et al.*, 1996; Chaiklahan *et al.*, 2012). Una forma de estabilizar la C-FC es usando la tecnología de encapsulado (Yan *et al.*, 2014) y al utilizar algunos aditivos como materiales de recubrimiento (Chaiklahan *et al.*, 2012).

#### **2.9.2.2. Recubrimiento en C-FC**

Los materiales de recubrimiento o conservante comestible pueden mejorar las cualidades ópticas y tener una mejor estabilidad térmica y mecánica de los compuestos activos (Mishra *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 1996). Debido a que protege al ingrediente sensible de influencias externas porque: controlan la transferencia de humedad, la liberación del ingrediente y permeabilidad de los gases (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>), y evita la pérdida de sabor y aroma (Fang & Bhandari, 2010; Lacroix & Dang, 2014).

Se ha encapsulado por diversas tecnologías compuestos como enzimas, lípidos, microorganismos, agentes aromatizantes, acidulantes, edulcorantes, colorantes, vitaminas y minerales (Fang & Bhandari, 2010; Lacroix & Dang, 2014). El método de encapsulado y el tipo de alimento o recubrimiento que se aplique, influyen en la digestión de pigmentos (Donhowe *et al.*, 2014). Los recubrimientos que se ha utilizado para encapsular la C-FC se observan en el cuadro 8 (Chen *et al.*, 1996; Manconi *et al.*, 2010; Chaiklahan *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014). Como se observa en la tabla 8 se han utilizado el alginato y quitosano

como recubrimientos para encapsular la C-FC (Manconi et al., 2010; Yan *et al.*, 2014). Se ha, mejora la propiedad de mucoadherencia de FC cuando se utiliza el quitosano como recubrimiento (Manconi *et al.*, 2010). También se mejora la mucoadherencia utilizando la microencapsulación FC/alginato/quitosano (Yan *et al.*, 2014).

**Cuadro 8.-** Métodos de encapsulado y recubrimiento de ficocianina (FC).

Referencia	Pared o aditivo	FC (mg mL <sup>-1</sup> )	Método de recubrimiento
Batista <i>et al.</i> , 2006	32% de aceite vegetal en agua	0.75	En aceite y agua a 4°C.
Chaiklahan <i>et al.</i> , 2012	Glucosa, sucrosa y sorbitol.	1	Se adiciona 20% aditivo.
Chen <i>et al.</i> , 1996.	TMOS (Silano tetrametoxi)	0.05	TMOS: F (1:2, v/v)
Manconi <i>et al.</i> , 2010	Quitosano (Q) y goma xantana (X)	35	Mezcla 0.5% Q con 2 a 10% X. Mezcla se le adiciona FC.
Martelli <i>et al.</i> , 2014.	Metilglioxal (MGO), glucosa, sucralosa, fructosa.	8	100-200 µL de FC con 100 mM MGO y azúcares a 37°C.
Yan <i>et al.</i> , 2014	Alginato (A) y quitosano (Q).	1.5:1 FC-AQ	FC-A 1.5:1 y 2.5% de CaCl <sub>2</sub> . Mezcla con 2% de Q.

De igual manera se han hecho diferentes pruebas para determinar la termorresistencia de FC, en donde se ha observado que diferentes tipos de azúcares se tienen mayor resistencia a diferentes temperaturas (60-80°C) (Pumas *et al.*, 2011). Para evaluar las propiedades de fluorescencia se ha encapsulado a las ficobiliproteínas con la técnica de sol-gel con matriz de silicato; siendo mejor para recubrir la ficoeritrina que ficocianina y aloficocianina (Chen *et al.*, 1996).

### 2.9.2.3 Materiales de recubrimiento de origen mexicano

Los aditivos de origen mexicano a destacar son la harina de amaranto, el mucílago de nopal y de chí, debido a su potencial como recubrimiento (Salgado-Cruz *et al.*, 2013). Otro material de recubrimiento extraído del agave es la inulina (Botrel *et al.*, 2014).

La variedad de nopal Milpa Alta es la más comercializada en México y recientemente se investiga para utilizarse en películas y recubrimientos de alimentos. La epidermis del nopal tiene dos capas donde se almacenan mucílago. El mucílago es un hidrocoloide el cual forma enlaces moleculares que son capaces de retener gran cantidad de agua. La estructura del mucílago se conforma de un polisacárido ramificado de ácido galacturónico y ramnosa como unidad central. Se ha reportado una composición bromatológica para el mucílago del nopal obtenida con etanol de: 1g de proteína, 64g de carbohidratos, 2.3g de

grasa, 20g de ceniza y 3 g Ca<sup>2+</sup>; la composición reportada con acetona como solvente es: 3g de proteína, 69g de carbohidratos, 0.9g grasa, 26g ceniza y 2.6g Ca<sup>2+</sup>. Este mucílago tiene un peso molecular de 2.3\*10<sup>4</sup> a 4.3\*10<sup>6</sup> Da, el cual tiene la capacidad de utilizarse en recubrimientos y películas comestibles (Salinas-Salazar *et al.*, 2014).

Las especies más cultivadas de amaranto son *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus*. Las dos últimas especies existen diferentes cepas de origen mexicano (Tapia-Blácido *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2009). El amaranto se conforma de glicerol, amilosa y amilopectina, proteína (14-17%) con alta cantidad de lisina y grasa (5-9%). El mayor tipo de biomacromoléculas son: amilosa y amilopectina, ambas están relacionada con la propiedad de termorresistencia (Kong *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009). El amaranto es un interesante material para la formulación de encapsulados y biopelículas comestibles. También se ha determinado que tienen propiedades como barrera de vapor de agua como resultado de estos biopolímeros y su interacción natural con los lípidos en la harina de amaranto (Kong *et al.*, 2009; Tapia-Blácido *et al.*, 2011). Adicionalmente se ha determinado que las proteínas aisladas del amaranto actúan eficientemente como agente estabilizador (Fidantsi & Doxastakis, 2001) y que puede retener grupos odorantes como: monoterpeno, alcoholes, cetona, fenoles o esteres (Blaszczak *et al.*, 2013).

La chía fue utilizada como alimento por los aztecas, es nativa del sur de México y norte de Guatemala. Las semillas son numerosas y pequeñas de color blanco y negro (Capitani *et al.*, 2012). Su composición bromatológica reportada es: 15-27% de proteína, 29-30% de fibra, 26-33% de grasas y un 4-5.4% de cenizas (Segura-Campos *et al.*, 2014). La fibra dietética incluye celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, goma, mucílago y otros polisacáridos (Capitani *et al.*, 2012). El mucílago de chía tiene una composición de  $\beta$ -D-xilopiranosil,  $\alpha$ -D-glucopiranosil y el ácido 4-O-metil-  $\alpha$ -D- glucopiranosilurónico, en un radio de 2:1:1. Este mucílago tiene un gran potencial en la industria de alimento como recubrimiento (Segura-Campos *et al.*, 2014).

La inulina tiene actividad funcional como fibra y puede ser una alternativa como material de recubrimiento. Recientemente se ha utilizado como material de recubrimiento de proteínas. La inulina está compuesta por una mezcla de polisacáridos de cadenas de

fructosa ( $\beta$ -(2->1) D-fructosil-fructosa). Este compuesto tiene beneficios a la salud como el incremento de absorción mineral, efectos en la funcional intestinal, modula el apetito y reduce la incidencia de cáncer (Botrel *et al.*, 2014).

## Capítulo 3: Usos antioxidantes de la ficocianina.

Se puede definir un antioxidante como la sustancia natural o sintética que retarda, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula (Gutteridge & Halliwell, 2010). Durante los últimos años los antioxidantes se presentan como compuestos de gran interés sometidos a un gran número de estudios médicos y biotecnológicos (Deng & Chow, 2010; Karkos *et al.*, 2011; Kuddus *et al.*, 2013; Antonio-Marcos *et al.*, 2016). Actualmente en el mercado hay un gran número de suplementos alimenticios que contienen antioxidantes sintéticos o naturales. Los cuales ofrecen cumplir tres beneficios: (a) prevención de varios tipos de cáncer, (b) mantenimiento del sistema inmune y (c) salud del corazón (Schofield, 2007).

Los antioxidantes se clasifican por su función en: 1) antioxidantes que previenen, 2) antioxidantes que atrapan o de barrido y 3) antioxidantes de novo o que reparan. Los antioxidantes de barrido remueven rápidamente las especies de oxígeno reactivas (SOR) y las especies de nitrógeno reactivas (SNR), antes de que éstas dañen moléculas biológicas esenciales (Niki, 2010). Los antioxidantes se pueden clasificar también por su origen en natural o sintético. Los antioxidantes sintéticos autorizados para alimento son: la butilhidroxianisol (BHA,  $C_{11}H_{16}O_2$ ), el butilhidroxitolueno (BHT,  $C_{15}H_{24}O$ ), el galato de propilo (PG) y butil hidroquinona (TBHQ) (Kishk & Al-Sayed, 2007). Estos antioxidantes fueron autorizados para usarse en alimentos, sin embargo, se ha observado que se pueden acumular en los tejidos y órganos del cuerpo (Lugo-Cervantes, 2003). Por otro lado, los antioxidantes de origen natural no presentan estos problemas. Los antioxidantes de origen natural pueden ser: biocompuestos (pigmentos), cofactores (coenzima Q), fenoles, minerales, vitaminas (Huang *et al.*, 2005; Ratnam *et al.*, 2006).

El fenómeno de oxidación es una ganancia de oxígeno o una pérdida de electrones que favorece las SOR y SNR que abarcan una variedad de pequeñas moléculas radicales y no-radicales (Kamble *et al.*, 2012). La reacción de oxidación es generalmente poco deseada

pero inevitable; la respiración celular, la oxidación mitocondrial, el estrés y la peroxidación lipídica se consideran fuentes de radicales y daño oxidativo. Las SOR se producen con la luz solar, luz ultravioleta, radiación de ionización, reacciones químicas y el proceso de metabolismos. Las SNR son generadas por el óxido nítrico sintetasa (NOS), generando óxido nítrico,  $\text{NO}^\bullet$  (Valko *et al.*, 2007; Donaghy *et al.*, 2015). Los antioxidantes pueden actuar inhibiendo a las SOR y SNR mediante dos mecanismos: **1)** mediante antioxidantes endógenas (enzimas) y **2)** mediante antioxidantes exógenos, obtenidos de a dieta (Huang *et al.*, 2005). La capacidad antioxidante depende de la suma de los diferentes compuestos y del microambiente en el que se encuentre el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios (Kuskoski *et al.*, 2005).

### **3.1.1 Sustancias de oxígeno y nitrógeno reactivo**

El daño oxidativo de las moléculas se genera por los efectos ocasionados por las SOR y las SNR (Barja, 2014). Las SOR incluye a los radicales libres derivados del oxígeno y otras sustancias o moléculas que no son radicales pero que pueden participar en la formación de estos. Los radicales libres son partículas cuyas cargas negativas y positivas no se encuentran interiormente neutralizadas, como sucede con la mayoría de otras moléculas. Debido a su elevada energía y a su baja estabilidad, los radicales libres liberan parte de esa energía al reaccionar con otras moléculas, y una de las moléculas puede convertirse en otro radical libre y perpetuar el proceso (Huang *et al.*, 2005). Las SOR más representativas son: superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e hidroxilo ( $^\bullet\text{OH}$ ); el radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  normalmente se forma primero y su efecto puede ser magnificado ya que produce otros tipos de radicales y agentes oxidantes. El radical hidroxilo ( $^\bullet\text{OH}$ ) es extremadamente reactivo con la mayoría de las moléculas biológicas (Kishk & Al-Sayed, 2007; Donaghy *et al.*, 2015).

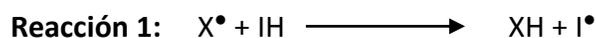
Las SNR inician con la generación de óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), es una especie altamente reactiva y se difunde a través de la membrana. El  $\text{NO}^\bullet$  es un radical que presenta un electrón no apareado, el cual reacciona rápidamente con otros radicales libres y con metales de transición. Este radical con el radical superóxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) forman peroxinitrito,  $\text{ONOO}^-$  (Donaghy *et al.*, 2015).

### 3.1.2 Evaluación de la capacidad antioxidante

Se puede evaluar la capacidad antioxidante por métodos *in vitro* o *in vivo* (incluyen *ex vivo*). Los métodos *in vitro* utilizan radicales no biológicos para evaluar la capacidad antioxidante (Gutteridge & Halliwell, 2010). Son los más empleados, sin embargo, solo nos dan una aproximación de lo que ocurre en vivo. Sin embargo, es una herramienta de valor incalculable para los estudios clínicos (Huang *et al.*, 2005).

Pueden ser divididos en dos grandes grupos los métodos *in vitro*: métodos basados en reacciones de transferencia de átomos hidrógeno (HAT) y métodos basados en reacciones de transferencia de electrones (ET). Los métodos basados en ET miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, el cual cambia de color cuando es reducido. El grado de decoloración se correlaciona con las concentraciones de antioxidantes en las muestras (Huang *et al.*, 2005). Estas reacciones de eliminación las SOR, se dan en los métodos de capacidad antioxidante *in vitro*, siendo el ABTS<sup>•+</sup> y DPPH<sup>•</sup> los radicales más utilizados (Kuskoski *et al.*, 2005).

Las reacciones de la eliminación de SOR y SNR (X<sup>•</sup>) por antioxidantes de barrido (IH) se puede dar por: la donación de un átomo de hidrógeno (reacción 1) o por la donación de electrones seguido por la transferencia de protones (reacción 2); para dar compuestos estables (XH) y antioxidante derivado del radical (Niki, 2010):



#### 3.1.2.1 Radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) ABTS

El método ABTS, es de los métodos espectrofotométricos más utilizado para determinar la capacidad antioxidante *in vitro*. Debido a su simplicidad operacional, ha sido utilizado en muchos laboratorios de investigación para evaluar la capacidad antioxidante de compuestos y muestras de alimentos (Huang *et al.*, 2005). El proceso de oxidación del ABTS en presencia de persulfato de potasio forma el radical catión ABTS<sup>•+</sup> con cuatro absorbancias de 414, 654, 734-754 y 820nm. El radical ABTS<sup>•+</sup> puede ser disuelto tanto en medio acuoso como en etanol acidificado lo cual permite evaluar compuestos hidrofílico y lipófilo. El radical ABTS<sup>•+</sup> que se caracterizan por poseer un color verde-azul intenso se

reduce a un color transparente cuando se le adiciona un antioxidante (Huang *et al.*, 2005; Kuskoski *et al.*, 2005).

Durante el proceso de oxidación se presenta un cambio de coloración en la solución provocado por la formación de radicales ABTS<sup>•+</sup> que se caracterizan por poseer un color verde-azul intenso que absorbe en la región visible. En presencia de antioxidantes reductores y donadores de hidrógenos la reacción se detiene y la absorbencia del ABTS<sup>•+</sup> disminuye, relacionando así la capacidad antioxidante de la muestra (Gharibzahedi *et al.*, 2013). En la siguiente función la capacidad antioxidante del antioxidante (CTX) dona un electrón al radical ABTS<sup>•+</sup> para volverlo no radical:  $CTX + ABTS^{•+} = CTX^{\bullet} + ABTS^+$ .

### **3.1.2.2 Radical 2, 2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)**

El método DPPH es simple, es un radical nitrógeno de larga vida, que no muestra similitud alguna con los radicales peroxilo altamente reactivos. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo pueden reaccionar lentamente o incluso ser inertes con el DPPH (Huang *et al.*, 2005).

En su forma de radical estable el DPPH<sup>•</sup> se encuentra disponible en forma comercial y presenta un máximo de absorción UV-vis a 515-517nm. Los extractos de cianobacterias pueden reducir este radical por ambos mecanismos de eliminación de sustancias reactivas, HAT y ET. La reducción del radical DPPH<sup>•</sup> (color violeta) a DPPH-H (color amarillo) que indica que es un potencial dador de un átomo de H y tiene la capacidad de reducir o ceder electrones a los radicales libres y general una molécula estable (Huang *et al.*, 2005; Pumas *et al.*, 2011; Gharibzahedi *et al.*, 2013). La reducción del radical DPPH<sup>•</sup> por un antioxidante (AH) se muestra en la siguiente ecuación:  $DPPH^{\bullet} + AH = DPPH - H + A^{\bullet}$ .

## ***3.2 Usos de terapéuticos de la C-ficocianina***

### ***3.2.1 Capacidad antioxidante de C-ficocianina***

La C-FC es un pigmento con propiedades antioxidante para combatir sustancias de oxígeno reactivo. Esta propiedad se debe a la parte cromófora (ficocianobilina) de la C-FC, que tiene una estructura similar a la bilirrubina que es un antioxidante natural en el plasma (Kuddus *et al.*, 2013). Tienen la capacidad de eliminar diferentes SOR: hidroxilo

$\bullet\text{OH}$ , alcoxilo ( $\text{RO}\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) evaluados por métodos *in vivo* e *in vitro* (Romay *et al.*, 1998; Bhat & Madyastha, 2000; Ou *et al.*, 2011; Kuddus *et al.*, 2013). Los dos primeros radicales ( $\bullet\text{OH}$  y  $\text{RO}\bullet$ ) se pueden atrapar o secuestrar de manera poco eficiente incluso *in vivo*, porque reaccionan rápidamente con lípidos, proteínas y carbohidratos (Niki, 2010). También este pigmento, disminuye SNR, suprimiendo la expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS) e inhibe la peroxidación de los lípidos microsomales hepáticos (Bhat & Madyastha, 2001; Kamble *et al.*, 2012).

### **3.2.2. Antioxidantes y SOR en los espermatozoides.**

La C-FC tiene una parte apo-proteína y un no-proteica (tres cromóforos) segmentos que pueden ser muy reactivos a otras proteínas. El segmento de proteína de C-FC está compuesto por dos apoproteínas  $\alpha$  y una  $\beta$  que pueden funcionar como un suplemento proteico en el extensor, ya que puede reaccionar con proteínas de membrana. Este segmento de proteínas está relacionado con el segmento no proteico (ficocianibina) a través de cisteínas y enlaces tioéter (Fernández-Rojas *et al.*, 2014). El componente no proteico puede capturar o prevenir la formación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (RNS y ROS) como el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), el radical alcoxilo ( $\text{RO}\bullet$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) (Fernández-Rojas *et al.*, 2014). Como antioxidante, puede retrasar, reducir y evitar que RNS y ROS puedan alterar moléculas esenciales (Niki, 2010), debido a un estrés oxidativo (EO) causado por un desequilibrio en la producción de ROS y una alteración en el sistema de defensa antioxidante (Aitken<sup>a</sup> *et al.*, 2014; Mata-Campuzano *et al.*, 2014). El EO, relacionado con los procesos de envejecimiento (Fernández-Rojas *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016), conduce a una pérdida de la integridad de la membrana debido a un incremento de la permeabilidad, inactivación de enzimas celulares, daño del ADN y apoptosis celular (Walczak-Jedrzejowska *et al.*, 2012; Amini *et al.*, 2015). Estas alteraciones están relacionadas con los defectos de los espermatozoides, como la infertilidad masculina (Agarwal *et al.*, 2016; Nekoonam *et al.*, 2016). Durante la capacitación de espermatozoides de mamíferos, se necesita un evento oxidativo, una cantidad limitada de ROS (O'Flaherty, 2015; Aitken<sup>b</sup> *et al.*, 2014).

Los espermatozoides de cerdo se consideran un sistema modelo porque son muy vulnerables al EO debido a la presencia abundante de ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática (Jin Hwang & Young Kim, 2013). Se han almacenado con criopreservación (Jin Hwang y Young Kim, 2013) pero los mejores resultados se encuentran a 15-17°C (Pinart *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2015). Debido en parte a que se ha determinado que a temperaturas de almacenamiento espermatozoides de verracos a 16°C tiene una menor susceptibilidad al daño del ADN durante el almacenamiento que a 5°C, que podría estar asociada con cambios marcados en el empaque de la cromatina (Fraser & Strzeżek, 2004). Sin embargo, esta temperatura no es fácil de mantener en las condiciones rurales de México, ya que solo están disponibles los refrigeradores normales a 4°C.

En la reproducción animal asistida, como la inseminación artificial, el almacenamiento de espermatozoides es necesario hasta que la hembra se insemine. En la industria porcina se protegen los espermatozoides y se inhibe el crecimiento bacteriano con extensores comerciales que proporcionan una fuente de energía, aseguran un pH y una presión osmótica adecuada. Se ha desarrollado una amplia gama de extensores comerciales para la conservación óptima del semen de verraco a una temperatura de 15 a 17°C durante períodos cortos (3 a 4 días), medios (5 a 6 días), largos (7 a 8 días) y extralargos (más de 8 días). Sin embargo, existe poca información sobre el efecto del extensor sobre la fertilidad del semen refrigerado (Pinart *et al.*, 2015). Kortowo-3 es un extensor a corto plazo que se ha utilizado en el almacenamiento refrigerado de semen de verraco a 5°C (Dziekonska & Strzeżek, 2011) con adición de proteínas para mejorar los parámetros espermáticos (Fraser & Strzeżek, 2004). Usualmente se usa en los extensores para semen de carnero y verraco, yema de huevo como un componente proteico (Valle *et al.*, 2012; Malo *et al.*, 2011). La yema de huevo y la leche son los dos principales protectores criogénicos de membrana comúnmente utilizados en medios de refrigerados para la preservación a largo plazo del semen, solos o en combinación con otras proteínas (Valle *et al.*, 2012).

### **3.2.2.1. Preservación de espermatozoides de *Sus scrofa domesticus*.**

En la reproducción animal asistida, como la inseminación artificial, el almacenamiento de espermatozoides es necesario hasta que la hembra se insemine. En la industria porcina se protegen los espermatozoides y se inhibe el crecimiento bacteriano con extensores comerciales que proporcionan una fuente de energía, aseguran un pH y una presión osmótica adecuada. Se ha desarrollado una amplia gama de extensores comerciales para la conservación óptima del semen de verraco a una temperatura de 15 a 17°C durante períodos cortos (3 a 4 días), medios (5 a 6 días), largos (7 a 8 días) y extralargos (más de 8 días). Sin embargo, existe poca información sobre el efecto del extensor sobre la fertilidad del semen refrigerado (Pinart *et al.*, 2015). Kortowo-3 es un extensor a corto plazo que se ha utilizado en el almacenamiento refrigerado de semen de verraco a 5°C (Dziekonska & Strzezek, 2011) con adición de proteínas para mejorar los parámetros espermáticos (Fraser & Strzeżek, 2004). Usualmente se usa en los extensores para semen de carnero y verraco, yema de huevo como un componente proteico (Valle *et al.*, 2012; Malo *et al.*, 2011). La yema de huevo y la leche son los dos principales protectores criogénicos de membrana comúnmente utilizados en medios de refrigerados para la preservación a largo plazo del semen, solos o en combinación con otras proteínas (Valle *et al.*, 2012).

### **3.3 Hipótesis**

- La urea como fuente de nitrógeno y el incremento de cloruro de sodio favorecerá la biosíntesis de C-FC en los cultivos de *A. máxima*.
- La extracción por sonicación obtendrá un mayor rendimiento de C-FC y sin degradar la actividad antioxidante.
- La evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* determinara si no se desnaturalizo la C-FC en el proceso de extracción.
- La C-FC requiere de recubrimientos ricos en proteínas y polisacárido para mantener su termorresistencia y color.
- La C-FC como suplemento en un extensor preserva por mayor tiempo a espermatozoides almacenado a 4 °C.

## 4. Material y métodos

### 4.1. Microorganismos

Se cultivaron las cepas unialgales de *A. maxima* y *A. maxima* LJGR1. En este trabajo solo se dan los resultados de esta última cepa, ya que se tiene una pureza de C-FC de 0.75 a diferencia de 0.26 en la cepa *A. maxima*.

La cepa *A. maxima* registrada como LJGR1 fue aislada del material silvestre proveniente del Lago Recreativo de Texcoco (Gerencia del Lago de Texcoco, CNA). Es una cepa unialgal de *A. maxima* Setchell et Gardner 1917 aislada y cultivada por la M. en C. Guadalupe Vidal y la Biól. Jimena Gutiérrez, bajo la dirección del Dr. Eberto Novelo Maldonado. Cultivada en el laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Se cultivó esta cepa en fotobiorreactores de acrílico de placa plana (50 x 30 x 5 cm<sup>3</sup>) agitados mediante difusores de aire. Utilizando medio Zarrouk modificado con 10.6 mM (624 mg L<sup>-1</sup>) urea y 0.26M (15 g L<sup>-1</sup>) NaCl a 30±2°C e intensidad luminosa de 108 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> durante 14 días, a una concentración inicial de biomasa X<sub>0</sub> de 0.06 a 0.08 g L<sup>-1</sup>. Se determina la biomasa de esta cepa por peso seco, empleando el método de Bhattacharya *et al.*, (2005). Se toman 10 mL del cultivo agitado de *A. maxima* cada 2 días. Posteriormente, las muestras se filtran con papel y se dejan a peso constante durante 24 h en una estufa (mapsa modelo HDP-867) a 105°C, por triplicado.

### 4.2. Extracción y cuantificación

#### 4.2.1. Extracción de β-caroteno.

Se extrajo por maceración el βC de 10 mg de *A. maxima* LJGR1 con 3 mL etanol: hexano (v/v). Se le adicionó 1 mL de agua y 2 mL de hexano se agitó y centrifugó a 1000 xg por 5 min. El extracto se disuelve con diclorometano. El extracto disuelto se analizó bajo las siguientes condiciones: se evaluó y cuantifico por HPLC con una columna Nova-Pack C18 (3.9\*300 mm) con una mezcla isocrática metanol: acetonitrilo (9:1, v/v) y flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> (modificado de Leema *et al.*, 2010). Se lee a 450nm utiliza como estándar betacaroteno SIGMA a 95%, las muestras se hacen por triplicado.

#### **4.2.2. Extracción de ácido $\gamma$ -linolénico.**

Método modificado de Kim *et al.*, (2012) se pesó 10 mg de biomasa de *A. maxima* en base seca en 1 mL de metanol-ácido clorhídrico (20:1) a 30°C por 20-24 horas. Se decanta y se le adiciona 1 mL de hexano y 1 mL agua destilada. Se cuantificó por cromatografía de gases (GC-14 gas chromatograph): columna GC, T inyección (250°C) y T detección (270°C), se extrae con hexano. Teniendo como estándar a CL-10 (sigma).

#### **4.2.3 Extracción de C-FC de *Arthrospira*.**

Se agitó durante 4 horas a 300 rpm para extraer la biomasa de *A. maxima* con diferentes concentraciones de solventes para obtener la C-FC. Se utilizaron los siguientes solventes: cloruro de sodio al 5% y buffer de fosfato de sodio a 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 M a pH 6.5. De estos disolventes se obtienen un mayor rendimiento de extracción con los buffers de fosfato a 0.025 M para dos muestras comerciales y de 0.1 M para la muestra de *A. maxima* LJGR1. El sobrenadante fue cuantificado por espectrofotometría a 620 nm. Una vez que se determinó el tipo y cantidad de disolvente en todas las muestras de *Arthrospira* se optimizó el rendimiento de C-FC por tres diferentes técnicas de extracción: agitación, sonicación y enzimático.

En todas las extracciones se extrae C-FC de *Arthrospira* con buffer de fosfato de sodio 0.025 M y 0.1 M a pH 6.5 en una relación 1:10 (10 mg de biomasa: 1mL de buffer).

##### **4.2.3.1. Extracción por agitación**

Se agitó a 300 rpm por 4 horas a temperatura ambiente. La solución fue centrifugada a 4800 xg por 10 min (Chaiklahan *et al.*, 2011) y el sobrenadante fue cuantificada por espectrofotometría a 620 nm.

##### **4.2.3.2. Extracción por sonicación**

Con un Sonicador Cole-Parmer 8892 con una frecuencia de 40 kHz a 25 min (Oh *et al.*, 2011) a diferentes temperaturas (5, 15, 25, 35, 45, 55 y 65°C). De éstas temperatura se determinará en cual se obtiene una mayor concentración de C-FC. La solución fue centrifugada a 4800 xg por 10 min (Chaiklahan *et al.*, 2011) y el sobrenadante fue cuantificado por espectrofotometría a 620 nm.

#### 4.2.3.3. Extracción por método enzimático.

Se añade 15% de lisozima a la suspensión y se agita por 2 horas a 200 rpm a 37°C (Sekar & Chandramohan, 2008). La solución fue centrifugada a 4800 xg por 10 min (Chaiklahan *et al.*, 2011) y el sobrenadante fue cuantificado por espectrofotometría a 620nm.

#### 4.2.3.4. Curva estándar de C-ficocianina

Se utilizaron varias concentraciones de una muestra estándar de C-FC (Sigma-Aldrich), figura 7. Con esta curva patrón se determinan la cantidad de C-FC de las muestras analizadas.

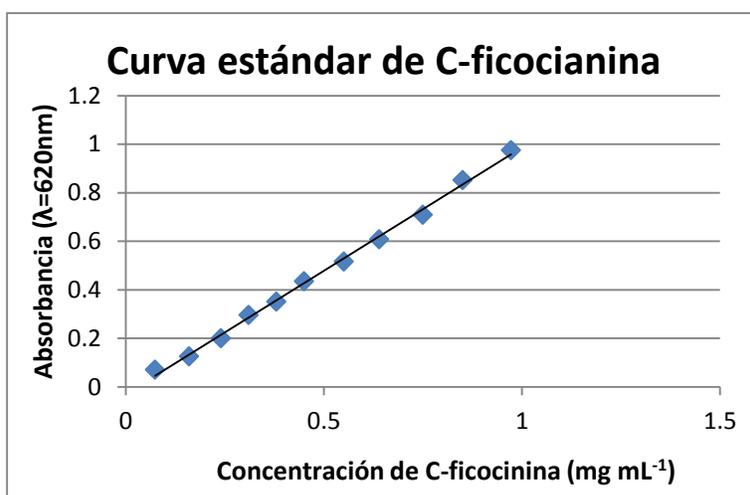


Figura 7. Curva estándar de C-ficocianina.  $ABS_{620} = 1.0156 (X_{FC}) - 0.0287$  con  $r^2 = 0.997$ .

### 4.3. Evaluación de la capacidad antioxidante de C-FC

#### 4.3.1. Método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)).

El radical catión de ABTS<sup>•+</sup> se produce al reaccionar 7 mM ABTS y 2.45 mM persulfato de potasio, la cual se afora a 10 mL con agua destilada. Esta solución se deja reposar por 12-16 h en la oscuridad. Para realizar las determinaciones, primero se mide la absorbancia de la solución del radical ABTS. Esta absorbancia debe ser de  $0.7 \pm 0.02$  nm a una longitud de onda de 754 nm (Kuskoski *et al.*, 2005; Tung *et al.*, 2009). La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) es definido como la concentración mM de Trolox que es equivalente a la capacidad antioxidante de compuesto investigado (Erkan *et al.*, 2008). El antioxidante sintético de referencia Trolox, se prepara a una concentración de 0.08-1.3 mM.

#### **4.3.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).**

Se forma el radical DPPH añadiendo 1.1 mg de este compuesto aforado en 10 mL de metanol (modificado de Kuskoski *et al.*, 2005). Se lee a una longitud de onda de 517nm. La actividad antioxidante se expresa como IC<sub>50</sub>, definido como la concentración que se requiere para disminuir el 50% de la concentración inicial del DPPH (Erkan *et al.*, 2008).

En ambas técnicas se añade 100 µL del radical en los pozos de la placa y se adiciono 100 µL de diferentes concentraciones de extractos. Se utiliza el equipo Epoch, que cuenta con un software de Gen 5.

#### **4.4. Evaluación de los recubrimientos como protectores de C-FC**

Los recubrimientos utilizados son: inulina (obtenida del jugo de Agave Tequilana Weber, vendida por Enature), dextrina amarilla (Droguería Cosmopolita S.A. de C.V.), pectina de cáscara de cítricos (SIGMA), mucilago de chíá (*Salvia hispanica* L., NATURCHIAMEX Products S.A. de C.V.), harina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), mucilago de nopal (*Opuntia ficus indica*) y aloe (*Aloe barbadensis*).

##### **4.4.1 Recubrimientos de C-FC**

Se mezcló 10 mg de recubrimientos con 10mg de C-FC (1:1) posteriormente a esta mezcla se le añadió 10 mL de buffer de fosfato, esto se hace por triplicado. De esta solución con una concentración final de 1 mg C-FC mL<sup>-1</sup> se evalúa el color.

Para evaluar la termo-resistencia se mezcló 1 mg de C-FC con los diferentes recubrimientos en una relación 1:10 (w:w).

##### **4.4.1 Evaluación del color de la C-FC como indicador de estabilidad**

El color se midió durante 15 días a una temperatura de 20±2°C, en dos lotes por duplicado. Se evaluaron los parámetros CIELAB ( L\*, a\*, b\*, C\* y h°) y espectrofotómetro con un software SpectraMagic, con un observador 10° e iluminación primaria D65. La diferencia entre la condición inicial del tratamiento y final se evalúan con ΔE\* (Tello-Ireland *et al.*, 2011).

#### **4.4.2 Evaluación de la termorresistencia C-FC recubierta.**

Se evaluaron las muestras a 60, 70, 80 y 90°C por 30 min en baño maría (modificado de Chaiklahan *et al.*, 2012). Se midió por espectrofotometría a 620 nm la cantidad remanente de C-FC y se reporta como la fracción perdida.

#### **4.5. Evaluación de C-FC en la preservación de semen de cerdo (*Sus scrofa domesticus*).**

##### **4.5. Concentraciones de C-FC**

La C-FC fue obtenida a partir de la cianobacteria *A. maxima* LGJR1 por sonicación a 45°C. Con las siguientes concentraciones: 0.0345, 0.069, 0.138 y 0.207 g C-FC L<sup>-1</sup>.

##### **4.5.2. Obtención de los espermatozoides**

Se utilizaron eyaculados frescos de verracos F2 línea maxter/pietrain de 1 año y de fertilidad comprobada, provenientes de la granja de producción animal especializada en cerdos, de la Universidad Autónoma de Chapingo. El eyaculado fue obtenido por masturbación (técnica de mano enguantada), la porción gelatinosa se separó por filtración al momento de obtener la muestra, del mismo modo se descartaron muestras que presentaron algún contaminante. La muestra fue transportada al Laboratorio de Reproducción Animal Asistida de la UAM-Iztapalapa, protegida de la luz y a 17°C en diluyente Duragen de larga duración (10 días) (Who, 2010; Roca *et al.*, 2006). Al llegar al laboratorio las muestras fueron colocadas en un baño de circulación ajustado a 17°C. Se evaluó la calidad espermática determinando: movilidad, viabilidad y concentración espermática usando las técnicas recomendadas por la OMS en 2010 con algunas modificaciones.

##### **4.5.3. Almacenamiento de espermatozoides**

Se realizaron alícuotas de 30 x 10<sup>6</sup> espz mL<sup>-1</sup> y se almacenaron a 4°C durante 0, 24, 48 y 72 hs en un medio especializado para almacenamiento de espz de cerdo *Kortowo-3* (69.3 mM de fructosa, 64.6 mM de citrato de sodio, 8 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 14.2 mM de acetato de potasio y gentamicina a 0.25 g L<sup>-1</sup> a pH 6.8), suplementado con diferentes concentraciones de C-FC y un extensor sin C-FC.

La suspensión diluida de espz se incubaron durante 2 hs a T ambiente y posteriormente se almacenaron a 4°C en los tiempos antes mencionados (Dziekonska & Strzezek, 2011). Al terminar el tiempo de almacenamiento de los espz se realizó un estudio de la movilidad, viabilidad y morfología en cada uno de los tiempos, así como la determinación del daño al DNA y la formación de SOR.

#### **4.5.4. Determinación del daño al ADN de los espermatozoides.**

Mediante citometría de flujo (FACScan, Becton-Dickinson) con un láser de argón azul de 488 nm con naranja de acridina para mostrar fluorescencia; verde (530 nm, fotodetector FL-1) sin daño con doble cadena o rojo / naranja (620 nm, fotodetector FL-3) para ADN dañado con cadena simple (Evenson & Jost, 2000; Gadella & Harrison, 2002; Arenas-Ríos *et al.*, 2016).

#### **4.5.5. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).**

Las concentraciones de espermatozoides intracelulares ROS ( $H_2O_2$ ,  $HO^\bullet$  y  $ONOO^\bullet$ ) se cuantificaron con citometría de flujo usando diacetato de diclorofluoresceína 2', 7' (DCFH-DA), una sonda permeable a las células que es altamente sensible a la oxidación celular y flúorese cuando se oxida a DCF. Los resultados se expresan como la intensidad media de fluorescencia (IFM) de las células vivas que muestran una respuesta fluorescente (Mayorga-Torres *et al.*, 2016). Citómetro de flujo (480 nm / 520 nm; FACScan, Becton-Dickinson, San Jose, CA, EE. UU.). El software Flowing se utilizó para analizar los datos, que se normalizaron y expresaron como índice de fluorescencia (FI) = (intensidad de fluorescencia media \*% de eventos de entrada).

### **4.6. Análisis estadístico**

Se determinó por el paquete estadístico SPSS versión 15, con un nivel de significación  $P < 0.05$ . ANOVA seguida de Duncan.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Cultivo de microorganismo

La cepa *A. maxima* LJGR1 se cultivó en medio Zarrouk modificado con 10.6 mM (624 mg L<sup>-1</sup>) urea y 0.26M (15 g L<sup>-1</sup>) NaCl. Después de 14 días, se registró una densidad de biomasa de 0.99 g L<sup>-1</sup> (Figura 8). Teniendo una velocidad específica de crecimiento  $\mu = \ln(X_0 - X) / t$  de 0.255 y un tiempo de duplicación  $t = (\ln 2 / \mu)$  de 2.71. Con una ecuación de cinética de crecimiento  $y = 0.2552x - 2.755$  con  $R^2 = 0.9994$ .

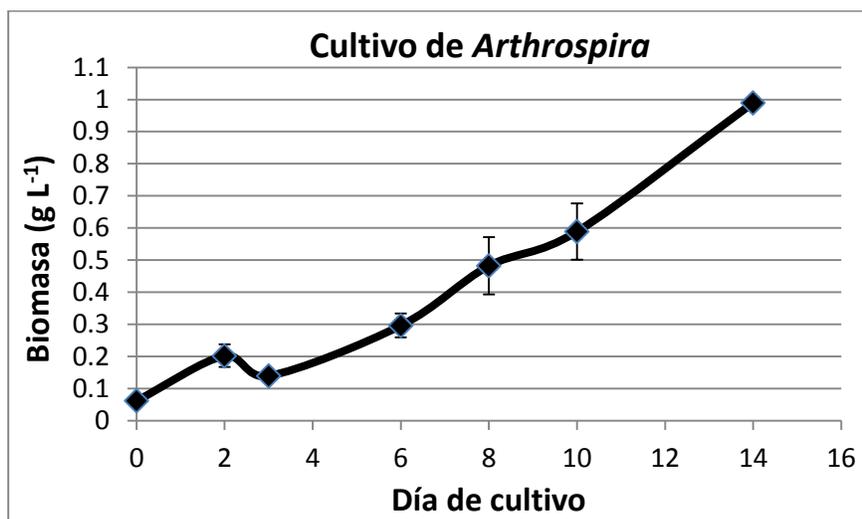


Figura 8. Cultivo de *A. maxima* LJGR1 con 10.6 mM de urea y 0.26 M de NaCl.

### 5.2 Análisis y cuantificación del ácido gamma linolénico y $\beta$ -caroteno

Los resultados de la evaluación de los ácidos grasos (AG) y  $\beta$ C se observan en el Cuadro 9. El ácido graso con mayor concentración en este experimento fue el ácido palmítico seguido del ácido gamma linolénico, lo que es similar a lo reportado por otros autores donde el ácido palmítico (C16) tiene entre 35-46% que es un ácidos grasos saturados; y de los ácidos grasos insaturados se reportan principalmente el GLA (8-22%), ácido linoleico (C18:2, 16-17.5%), ácido oleico (C18:1, 2-5%) (Ötles & Pire, 2001). La mejor concentración GLA es de 2.45 mg g<sup>-1</sup> en *A. maxima* LJGR1, esta concentración es similar a la reportada por Mahajan & Kamat, (1995) cuando utilizan medio SOT a 20  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 24°C. Sin embargo, Mahajan & Kamat (1995) obtuvieron 13.5 mg GLA g<sup>-1</sup> cuando se le añadió 10-30 mM de urea, la principal diferencia de este experimento y el reportado en esta tesis

fueron los parámetros físicos (30°C y 108  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Las concentraciones más altas de GLA se favorecen cuando el medio está limitado en nutrientes (Ramadan *et al.*, 2008; Bhakar *et al.*, 2014).

Cuadro 9.- Concentración de ácidos grasos y  $\beta$ -caroteno.

Concentración de AG* ( $\text{mg g}^{-1}$ )					$\beta\text{C}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )
C16	C18	C18:1	C18:2	C18:3	
6 $\pm$ 0.1	0.048	0.36 $\pm$ 0.07	1.8 $\pm$ 0.2	2.45 $\pm$ 0.2	46 $\pm$ 0.4

\*Ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido gamma linolénico (C18:3).

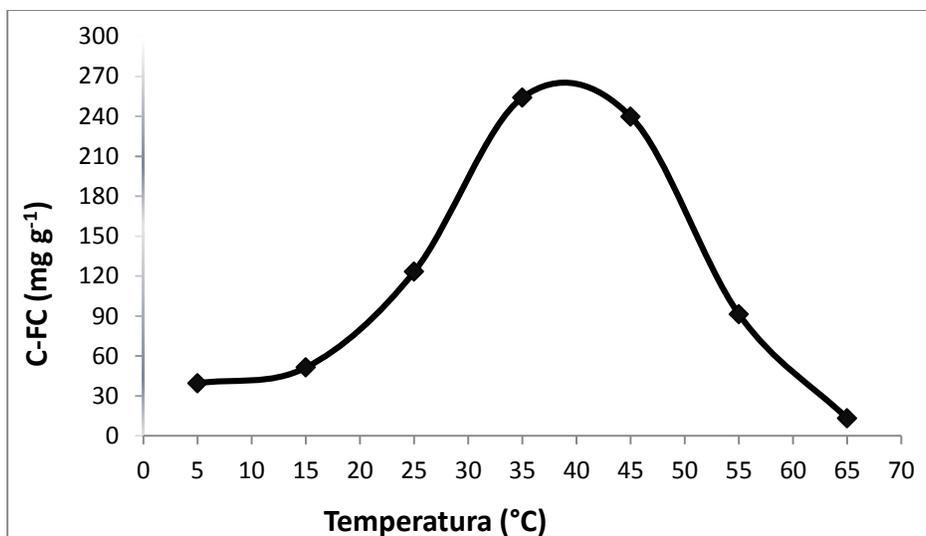
En este trabajo se obtuvo una concentración importante de  $\beta\text{C}$  con 46 $\pm$ 0.4  $\text{mg } \beta\text{C g}^{-1}$  (Cuadro 9). Se ha reportado que el  $\beta\text{C}$  se acumula en respuesta a la concentración de cloruro de sodio NaCl. Debido a que esta *A. maxima* LJGR1 fue cultivada con 0.26 M NaCl., es posiblemente que se obtuvieron resultados superiores de  $\beta\text{C}$  a lo reportado por otros autores (Hifney *et al.*, 2013).

### 5.3. Extracción de C-ficocianina de *Arthrospira*

En este trabajo se utiliza el método de agitación para determinar el tipo y concentración del solvente, que dio como resultado un mejor rendimiento con buffer de fosfato de sodio 0.1 M a pH 6.5, para la cepa *A. maxima* LJGR1. En experimentos de otros autores, también se han tenido mejores rendimientos con buffer de fosfato para obtener este pigmento, Cuadro 7 (Silveira *et al.*, 2007; Hemlata *et al.*, 2011).

Después se eligen el método de extracción por agitación, sonicación y enzimáticos que son de los más utilizados para extraer FC y dónde se han obtienen rendimientos altos (Cuadro 7). Para el método de sonicación se optimiza la temperatura de extracción (figura 9), utilizando temperaturas de 5°C a 65°C con intervalos de 10°C.

Debido a que en general se utiliza a bajas temperaturas, se ha demostrado que la C-FC se empieza a degradar a partir de 47°C (Chaiklahan *et al.*, 2012). Obteniendo la mayor recuperación de C-FC a 35 a 45°C. Sin embargo, a 55°C la concentración de C-FC disminuye 50-64% en comparación a 35°C.



**Figura 9.** Optimización de temperatura para obtener C-FC por el método de sonicación.

En el Cuadro 10 se observan las concentraciones y pureza de C-FC con los diferentes métodos de extracción, por triplicado. La mejor concentración de C-FC se obtiene por la extracción enzimática, obteniendo  $281 \pm 1 \text{ mg g}^{-1}$  de *A. maxima* LJGR1. Los métodos de agitación y sonicación a  $45^\circ\text{C}$  tienen rendimientos similares, obteniendo  $215 \pm 17 \text{ mg g}^{-1}$  y  $221 \pm 13 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente; con una pureza de 0.75 mayor a la obtenida por el método enzimático de 0.29. Estas últimas concentraciones son superiores a lo reportado por otros autores que han obtenido una concentración del alrededor de  $195 \text{ mg C-FC g}^{-1}$  (Chaiklahan *et al.*, 2010; Öztürk-Ürek & Tarhan, 2012; Hifney *et al.*, 2013).

**Cuadro 10.-** Concentración ( $\text{mg g}^{-1}$ ) y pureza ( $A_{620}/A_{280}$ ) de C-FC por diferentes técnicas de extracción.

Extracción	mg C-FC g <sup>-1</sup>	A <sub>620</sub> /A <sub>280</sub>
Enzimática	$281 \pm 1.3^a$	$0.29 \pm 0.0014^c$
Agitación	$215 \pm 17^b$	$0.74 \pm 0.025^a$
Sonicación 35°C	$187 \pm 13^c$	$0.63 \pm 0.025^b$
Sonicación 45°C	$221 \pm 13^b$	$0.75 \pm 0.06^a$

Letras con diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) (tratamientos dentro de las muestras de *Arthrospira*).

En este trabajo cultivamos la cepa de *A. maxima* LJGR1 a 0.26 M NaCl y con 10.6 mM de urea, en donde se ha logrado obtener entre un 13 a 32% más a los mejores valores reportados. Es sabido que la urea puede ser tóxica para la célula a altas concentraciones, sin embargo, en este trabajo se obtienen buenos rendimientos de C-FC. Debido probablemente a que el carbono necesario para la generación del sorbitol se favorece

gracias a la degradación de la urea, que genera CO<sub>2</sub> (Schlebusch, 2012) y la intensidad de luz alta (108 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) favorece la cantidad de electrones debido a la fotosíntesis, lo que finalmente favorece la concentración del pigmento-proteína de C-FC.

### **5.3. Evaluación de la capacidad antioxidante in vitro: ABTS y DPPH**

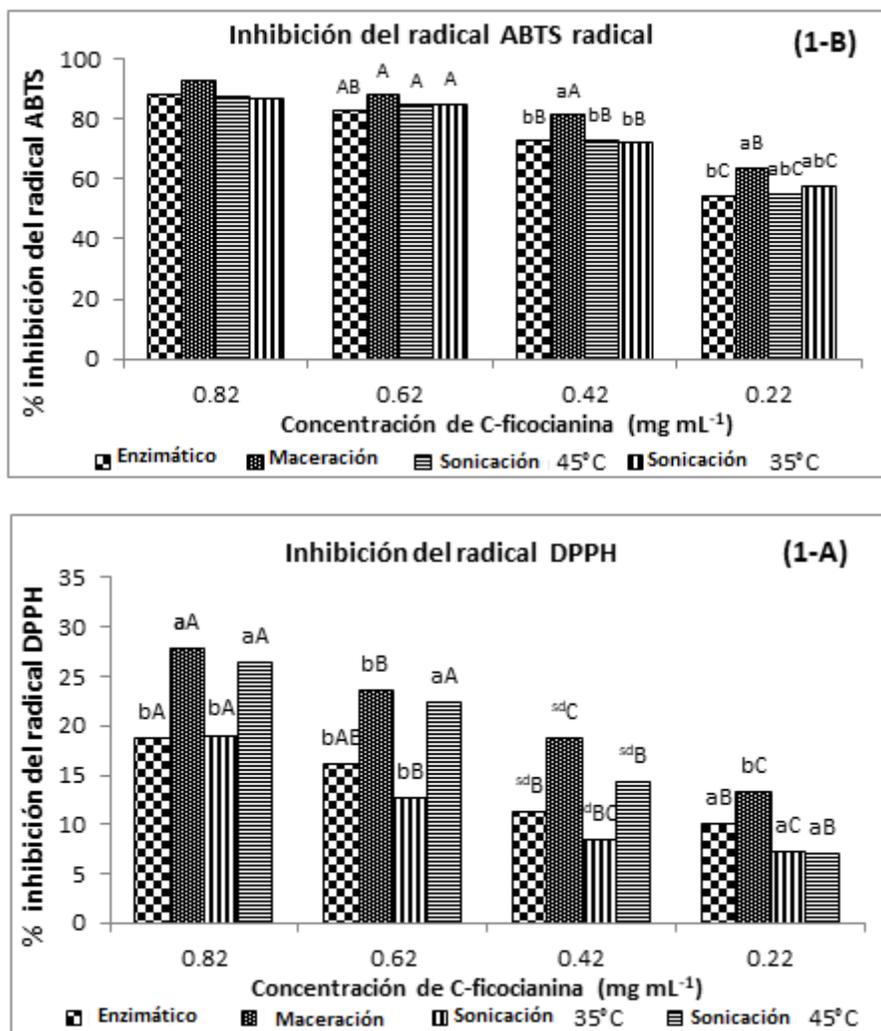
En la figura 10 se muestran los resultados de la evaluación de la capacidad antioxidante al minuto 30, por los métodos ABTS y DPPH. La C-FC de *A. maxima* LJGR1 inhiben el radical ABTS entre 82-92% sin haber diferencia significativa en concentraciones de 82 o 62 μg C-FC mL<sup>-1</sup> y entre los métodos de extracción (figura 10).

A diferencia del radical DPPH cuando se evalúa a estas concentraciones, si influye el tipo de extracción que se utilice para extraer la FC. Obteniendo una inhibición del 26-37% del radical DPPH con el método de sonicación a 45°C y a 62 o 82 μg C-FC mL<sup>-1</sup>.

Chen & Wong (2008) reportaron porcentajes de inhibición similares a los obtenidos en este trabajo (figura 10); obtuvieron un 80% de inhibición del radical ABTS y 45% de inhibición para el radical DPPH, con 5 μM y 16 μM de C-FC, respectivamente. También Madhyastha *et al.*, (2009) han reportado concentraciones similares de inhibición (37-45%) del DPPH con 16 μM de C-FC. El-Baky & El-Baroty, (2012), han reportado una inhibición del 80% del radical ABTS con 50 μg C-FC mL<sup>-1</sup>. Sin embargo, se han obtenido una inhibición del 42-50% del radical ABTS que es menor a lo obtenido en este trabajo (Madhyastha *et al.*, 2009). Una inhibición del radical DPPH del 85-95% con 50 μg C-FC mL<sup>-1</sup> y pureza de 2.25, que es mayor a lo reportado (El-Baky & El-Baroty, 2012). Esto podría ser explicado en alguna medida a la pureza de C-FC, ya que en el trabajo reportado por Gantar *et al.* (2012), se inhibía el radical DPPH un 75% con una pureza de 1.5 y 15% con una pureza de 0.8, en cepas comerciales de *Spirulina*.

En la figura 11, se observa la gráfica de inhibición del 50% del radical DPPH (IC<sub>50</sub>) por la C-FC extraída por sonicación y agitación. Obteniendo un IC<sub>50</sub> en promedio de 1.5 a 2.3 mg mL<sup>-1</sup>, por los métodos de sonicación al 45 y 35°C. Chen y Wong (2008) reportan un IC<sub>50</sub> = 0.7 mg mL<sup>-1</sup>. Otros autores han reportado un IC<sub>50</sub> de 0.08 y 1.75 mg C-PC mL<sup>-1</sup> con purezas de 0.58 y 1.5 respectivamente (Gantar *et al.*, 2012 y Thangam *et al.*, 2013)<sup>1</sup>. Como se muestra, la pureza es determinante en la inhibición del radical DPPH\*. La inhibición del

radical ABTS (como TEAC) depende del método de extracción en el que el tratamiento con sonicación a 45°C produce los mejores resultados (figura 12) obtener una concentración TEAC inicial de 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y una tasa de incremento de 0.73  $\mu\text{g mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ . Un equivalente Trolox de  $219 \pm 2.1 \mu\text{M g}^{-1}$  se obtiene a través de sonicación a 45°C. Este resultado es mayor a lo reportado en otras frutas como la granada, guanábana y aceitunas, se obtuvieron  $81 \pm 2.4$ ,  $6 \pm 0.1$  y  $23.6 \pm 0.1 \mu\text{M g}^{-1}$ , respectivamente (Fu *et al.*, 2012). Se evaluó la biomasa de *A. platensis* SAG obteniendo un equivalente de trolox de  $108.5 \pm 2.2 \mu\text{M g}^{-1}$ , donde se observó una correlación de actividad antioxidante con ficobiliproteína, más que con carotenoides en esta cianobacterias (Tarko *et al.*, 2012).



**Figura 10.-** Inhibición de los radicales DPPH (A) y ABTS (B) de C-FC obtenida de *A. maxima* LJGR1 al minuto 30. Letras con diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) (letras en minúsculas diferencias significativas de las diferentes técnicas de extracción y mayúsculas diferencias significativas dentro las concentraciones de C-FC).

Otros autores que evaluaron las proteínas miofibrilares del duodeno de la carpa (*Cyprinus carpio* L.) alcanza concentraciones similares de equivalente de Trolox a los obtenidos en el presente trabajo. Obteniendo  $232 \pm 4.5 \mu\text{M g}^{-1}$  en experimentos *in vitro* y  $173 \pm 5.7 \mu\text{M g}^{-1}$  con experimentos *ex vivo* (Borawska *et al.*, 2016).

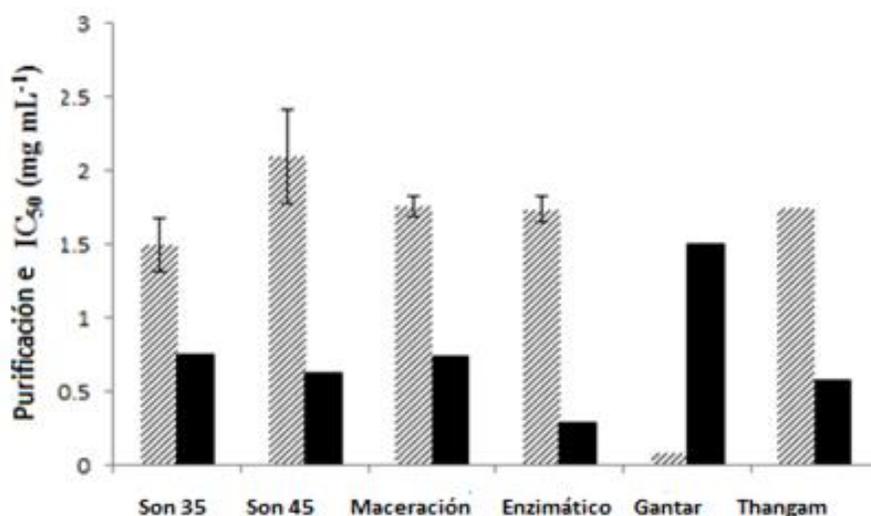


Figura 11. Purificación e IC<sub>50</sub> por radical DPPH. Son= sonicación, ■=purificación e ▨ IC<sub>50</sub>.

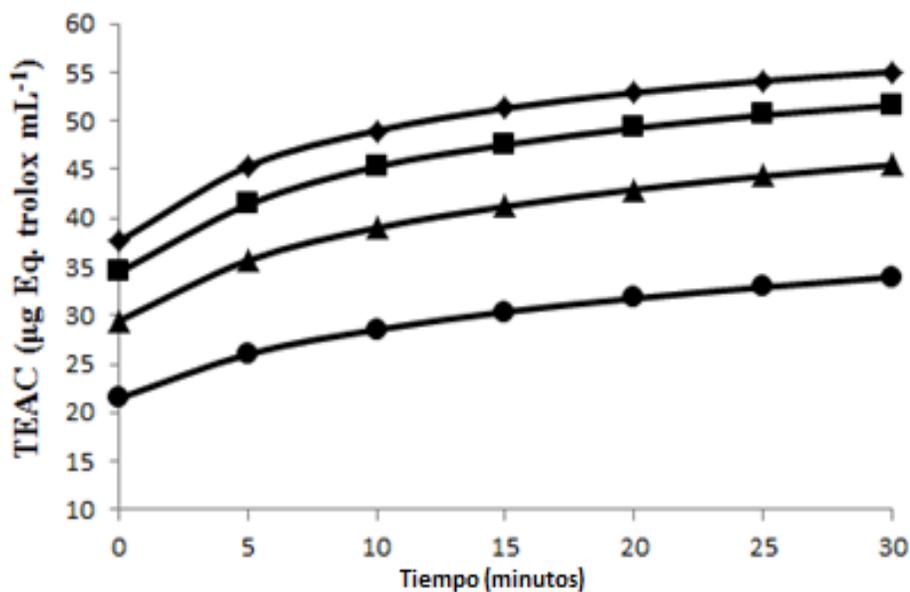
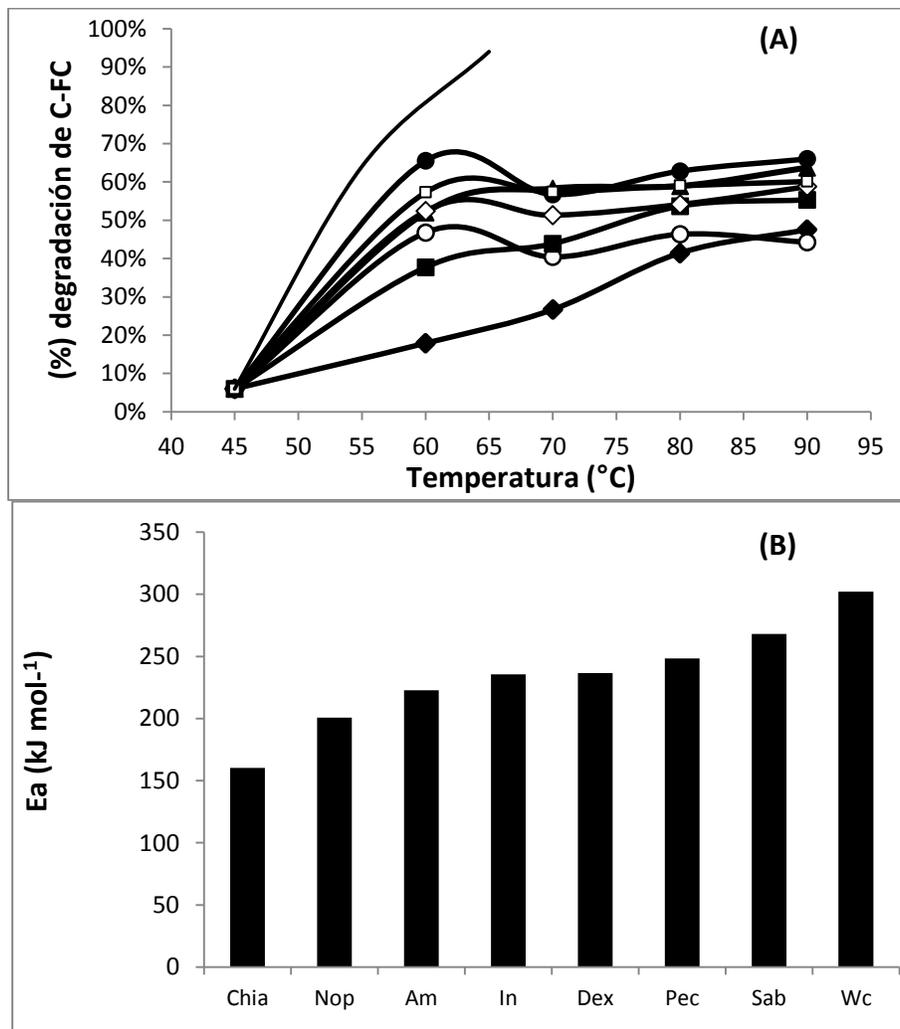


Figura 12. Evaluación de la equivalencia de Trolox con el radical ABTS. ◆= sonicación 45°C ■= maceración, ▲= sonicación 35°C, ●= enzimático.

#### 5.4. Evaluación de los recubrimientos comestibles

En este trabajo se utilizaron materiales de recubrimientos comestibles biodegradables y originarios de México como: la harina de amaranto, el mucilago de chía, nopal y sábila. Como se observa en la figura 13, los diferentes materiales de recubrimientos favorecen una menor degradación de C-FC de *A. maxima* LJGR1 que cuando no se utiliza ningún recubrimiento. La C-FC se degrada en todas las muestras de *Arthrospira* un 18-21% cuando se utiliza mucílago de chía a 60°C. Esto se ve reflejado al evaluar la energía de activación de los recubrimientos que tienen correlación con el cambio de temperatura de 60-90°C después de 30 minutos (figura 13-B).



**Figura 13.-** (A) Degradación de C-FC y (B) Energía de activación de la degradación de C-FC con diferentes recubrimientos. ■= nopal (nop), □= pectina (pec), ▲= inulina (In), ◇= dextrina (Dex), ○= amaranto (Am), ●= sábila (Sab), ◆=chía y — = sin recubrimiento (Wc).

Una degradación del 20% similar a la reportada en este trabajo, fue reportado por Antelo *et al.*, (2008) utilizando sorbitol al 30% y un pH de 5-6 a 59-62°C. En otros experimentos se han reportado una degradación de 30-40% de C-FC cuando se adiciona de 20-40% de glucosa a 60°C (Chaiklahan *et al.*, 2012), y cuando se utiliza una solución de fructosa saturada a 80°C por 30 min (Martelli *et al.*, 2014). Con base a estos dos reportes podemos decir que el recubrimiento de chía a 60°C tiene un porcentaje similar a los obtenidos con sorbitol y superior a la glucosa. Este mismo recubrimiento (chía) a 80°C es similar a lo obtenido por fructosa saturada.

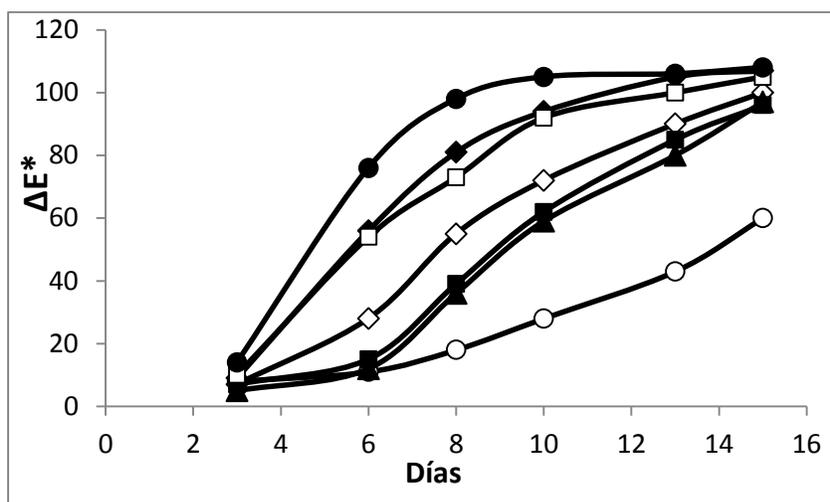


Figura 14. Cambio de color ( $\Delta E^*$ ) de C-FC-recubrimiento durante 14 días. ■= nopal, □= pectin, ▲= inulin, ◇= dextrin, ○= amaranth, ●= aloe and ◆=chia.

Cuadro 11.- Parámetro de color (CIELAB) de C-FC con diferentes recubrimientos.

	Inicial					15 días				
	Amaranto	Nopal	Inulina	Chia	Dex	Amaranto	Nopal	Inulina	Chia	Dex
L*	98.9±0.5	99.9±0.13	100.5±0.0	97±1.3	99.8±0.2	100.6±0.2	102±0.01	101.7±0.2	99±0.5	101.5±0.1
a*	-3.2±0.4	-1.7±0.04	-2.54±0.0	-3±0.5	-3.3±0	-1.2±0.14	-0.45±0.01	-0.6±0.02	-0.6±0	-0.73±0.1
b*	-2.9±0.5	-0.8±0.08	-2.5±0	-1.8±0.5	-2.2±0.6	0.39±0.16	1.3±0.058	0.83±0.28	2.5±0.3	1.6±0.06
C*	4.3±0.6	1.9±0.06	3.54±0.07	3.5±0.7	4±0.6	1.3±0.08	1.4±0.05	1.05±0.16	2.6±0.3	1.8±0.05
h°	222±2	205±1.7	224±0.64	211±5	213.7±5	161.9±8.8	109.3±1.3	127±16	104±2.3	114±3
	$\Delta E^*$					60	96	97	107	100

Se evaluó el color de C-FC con los parámetros del espacio CIELAB con diferentes recubrimientos y se determinó la degradación de C-FC por medio de  $\Delta E^*$ . Este pigmento

tiene un color azul, las tonalidades azules están en el rango de 270° hasta 180°. Como se muestra en el cuadro 11, los materiales de recubrimiento de amaranto, nopal, inulina, chíá, dextrina inicialmente tienen un tono (h°) de 224±0.64 a 211±5. Se obtiene un  $\Delta E^*$  de 60 con una tasa de incremento de 4.2 d<sup>-1</sup>. Lo que refleja que la degradación de color de C-FC en *A. maxima* LJGR1 con este recubrimiento es menor (figura 14).

### 5.5 C-ficocianina como protector de espermatozoides refrigerados de cerdo (*Sus scrofa domesticus*).

La viabilidad de los espermatozoides después del almacenamiento a 4°C, con C-FC como antioxidante y proteína en un extendedor, se deteriora rápidamente después de 24 horas al pasar del 90% a alrededor del 16% a las 72 horas. La mejor concentración de C-FC, que preserva la viabilidad 16±6% más que con otras dosis, es de 138 µg mL<sup>-1</sup>. Considerando que una viabilidad de los espermatozoides del 20% es adecuada para la reproducción asistida, se puede concluir que C-FC puede preservar hasta 16±6% de la viabilidad de los espermatozoides durante 72 horas, después de lo cual los espermatozoides ya no son útiles para la inseminación (figura 15).

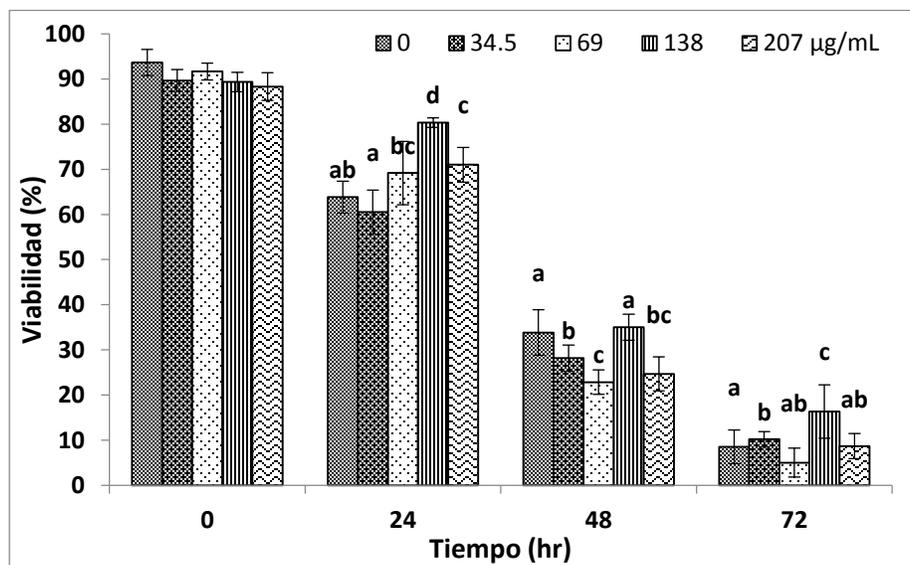
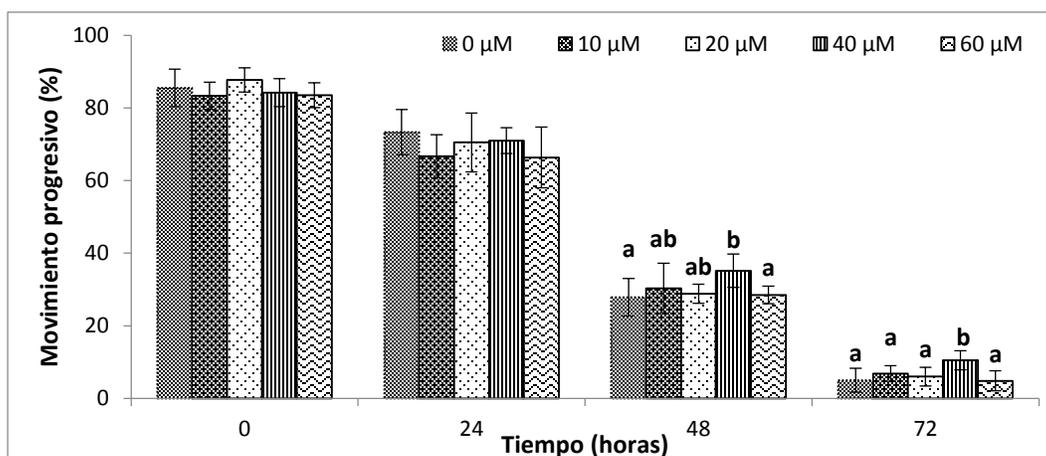


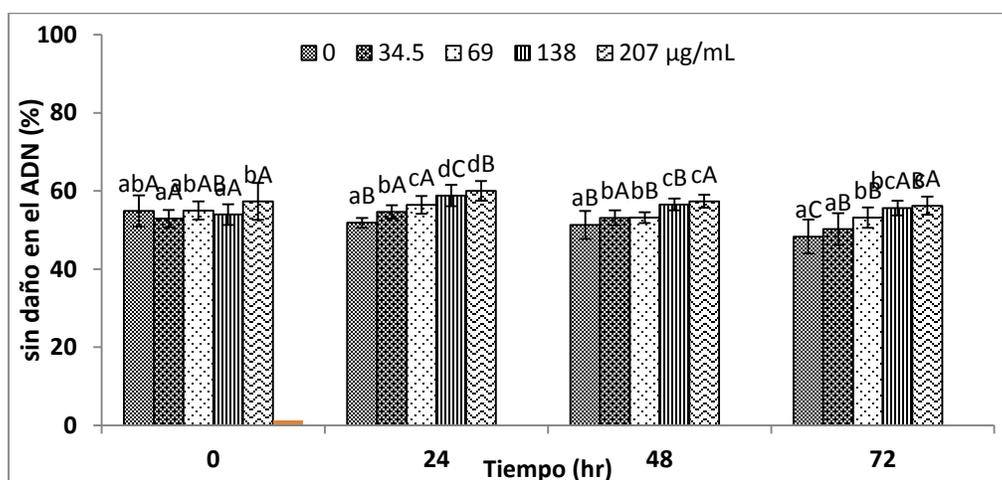
Figura 15.- Efecto de la C-FC en un extender de corta duración en la viabilidad de espermatozoides. Los valores se expresan como medias ±DE. Diferentes letras son significativamente diferentes (P≤0.05). ANOVA seguido de Duncan.

Sin embargo, la motilidad progresiva (PMot), que se ve afectada por las ROS intracelulares, es de alrededor del 90% de la viabilidad (figura 16), mientras que el daño

en el ADN es cercano al 40% de todos los espermatozoides (figura 17), por lo tanto, la fracción de Los espermatozoides con PMot que tienen ADN intacto son solo menos de la mitad de los PMot (figura 18). A partir de ahí, se puede concluir que la C-FC como suplemento proteico del extensor, es insuficiente para proteger la membrana de los espermatozoides. En el otro segmento no proteico, parece que la C-FC como antioxidante tiene buenos resultados, ya que la intensidad de fluorescencia media (MIF) (figura 19) de los espermatozoides restantes con PMot y el ADN no dañado también tienen un MIF bajo, lo que indica un buen control de Las ROS intracelulares.



**Figura 16.-** Efecto de la dosis de C-PC a diferentes tiempos de almacenamiento en la motilidad progresiva de los espermatozoides a 4 ° C. Los valores se expresan como medias  $\pm$ DE. Diferentes letras son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). ANOVA seguido de Duncan.



**Figura 17.-** Efecto de la dosis de C-PC a diferentes tiempos de almacenamiento en el ADN de los espermatozoides a 4°C. Los valores se expresan como medias  $\pm$  SEM. Diferentes letras son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). ANOVA seguido por Duncan.

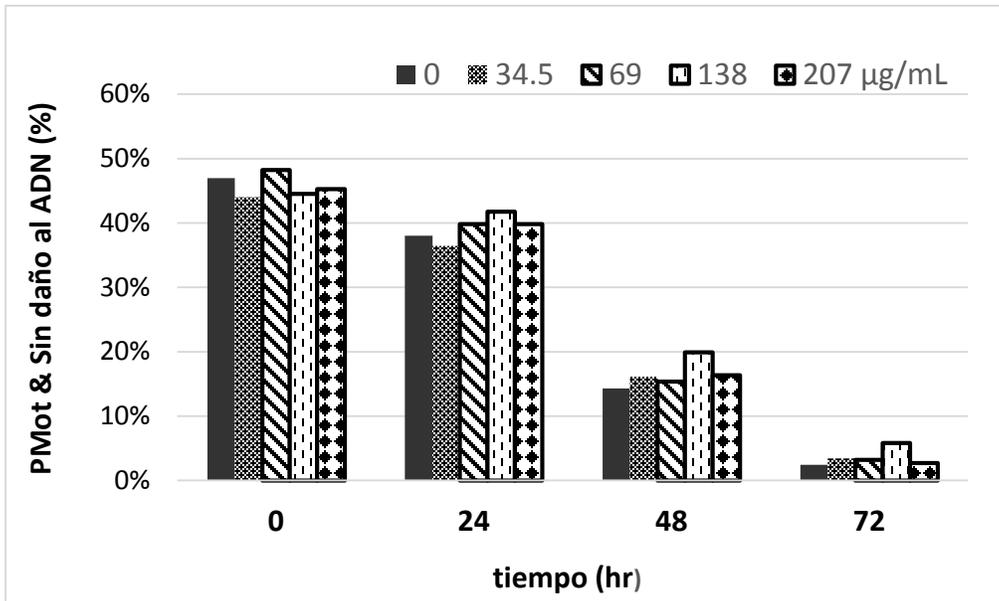


Figura 18.- Efecto de C-PC en el ADN de espermatozoides no dañado con PMot.

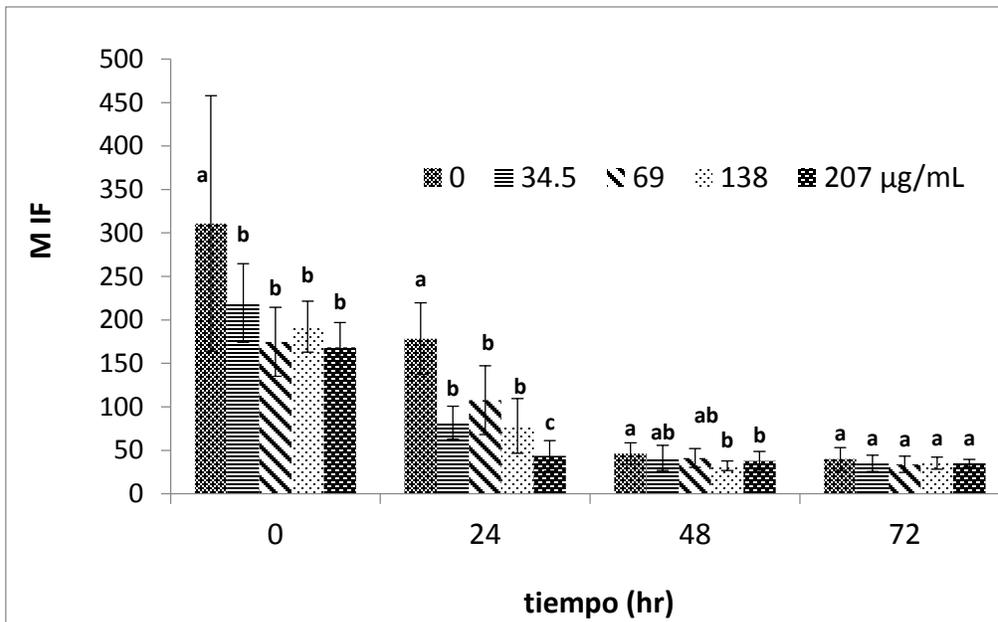


Figura 19.- Porcentaje de media de intensidad de fluorescencia (MIF) indicativos de SOR. Los valores se expresan como medias  $\pm$  SEM. Diferentes letras son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). ANOVA seguido por Duncan.

Se ha determinado que las temperaturas de almacenamiento de 5°C o menos inducen efectos de estrés frío en los espermatozoides de verraco (Teixeira *et al.*, 2015), que es uno de los factores más importantes que explican la permeabilidad irreversible y pérdida de integridad de las membranas plasmáticas que causan un rendimiento celular

distorsionado y, finalmente, la muerte celular. Se sabe que ciertas proteínas son capaces de proteger a los espermatozoides del estrés por frío y la desestabilización de las membranas plasmáticas (Dziekonska & Strzeżek, 2011), por lo tanto, se han utilizado diferentes proteínas en los extendedores (Fraser & Strzeżek, 2004; Malo *et al.*, 2011; Valle *et al.*, 2012). El extensor Kortowo-3 se ha utilizado en almacenamiento refrigerado (Fraser & Strzeżek, 2004; Dziekonska & Strzeżek, 2011) con motilidad progresiva similares a la obtenidas en este trabajo. Sin embargo, cuando se complementa con lipoproteínas de pollo y yema de huevo de avestruz el extensor, se obtiene un PMot más alto (70%) a las 48 horas que sin las proteínas (Fraser y Strzeżek, 2004), mientras que en el presente trabajo se obtiene el 35% de PMot con 138  $\mu\text{g}$  de C-PC  $\text{mL}^{-1}$  a las 48 horas (figura 16). Además, se obtiene un 28% de PMot sin agregar C-PC al extensor, que es un resultado similar al obtenido por Fraser & Strzeżek, (2004) a 5°C. Por lo tanto, la apoproteína C-PC no funciona tan bien como otras proteínas (yema de huevo o lipoproteínas) para estos parámetros espermáticos. En general, estas proteínas protegen a los espermatozoides de las sustancias de los medios oxidantes mediante uniones de cisteína u otras uniones entre las proteínas de membrana espermática y las proteínas extensoras (Teixeira *et al.*, 2015).

Sin embargo, se sabe que el ADN del jabalí tiene una mayor resistencia al proceso de congelación y descongelación que cualquier otro espermatozoide de mamíferos. Esta resistencia puede relacionarse con la cantidad de residuos de cisteína en la protamina 1 que forma los enlaces disulfuro y la cromatina de espermatozoides estabilizadora. Estos residuos se asociaron negativamente con la susceptibilidad de los espermatozoides al estrés oxidativo, pero al mismo tiempo los compuestos antioxidantes bioactivos del té de mate (como los flavonoides) también pueden proteger el ADN del espermatozoide del verraco (Luño *et al.*, 2015). Estos conceptos contradictorios pueden explicar por qué la concentración de daño en el ADN con y sin C-PC exhibe una diferencia significativa (figura 16), aunque no tan grande como en otras especies de mamíferos (Hernández *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2011) y Diferencia entre 138 y 207  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$  C-PC.

El extensor tiene algún efecto sobre la calidad espermática, aunque no interfiere con su fertilidad y prolificidad (Pinart *et al.*, 2015). Esto es importante ya que después de 48 horas, el 20% del espermatozoide original todavía tiene motilidad progresiva sin daño en el ADN (figura 18). Además, la inseminación artificial (IA) se realiza dentro de los 3 días posteriores a la recolección (Pinart *et al.*, 2015).

## 6. Conclusiones

El cultivo *Arthrospira maxima* LJGR1 en un fotobiorreactor de placa plana usando altas concentraciones de urea (10.4 mM) y NaCl (0.26 M). Se tiene una sobre producción de C-FC obteniendo  $221 \pm 13$  mg  $g^{-1}$  con una pureza de  $0.75 \pm 0.06$ . Esta concentración se obtiene por medio de extracción por sonicación a  $45^{\circ}C$ .

Se obtuvieron concentraciones similares con el método de agitación obteniendo  $215 \pm 17$  mg C-FC  $g^{-1}$  con una pureza de  $0.74 \pm 0.025$ . Con el método enzimático se obtiene  $281 \pm 1.3$  mg C-FC  $g^{-1}$  pero con una pureza menor de  $0.29 \pm 0.025$

Además de la producción de C-FC, *Arthrospira* tiene otros dos biocompuestos con valor agregado en el mercado: el  $\beta C$  y el GLA. En este trabajo se obtuvo también una sobreproducción del  $\beta C$  obteniendo  $46 \pm 0.4$  mg  $g^{-1}$  y una concentración baja de GLA  $2.45 \pm 0.2$  mg  $g^{-1}$ .

Se obtiene un  $IC_{50}$  de  $1.5$  mg C-FC  $mL^{-1}$  y un equivalente de Trolox de  $55$   $\mu g$   $mL^{-1}$  o  $219$   $\mu M$   $g^{-1}$ . Este equivalente de Trolox es de 3 a 10 veces superior a lo reportados por otros autores en frutas como granada y oliva. Esto es importante porque significa que puede inhibir más eficientemente las SOR que favorecen diferentes enfermedades degenerativas.

Para proteger la propiedad antioxidante presente en la C-FC, se determinó que el mucilago de chíá protege un 82% la C-FC a temperaturas de  $60-90^{\circ}C$ . Comparada con una pérdida del 80% de C-FC sin recubrimiento. Otro parámetro para determinar la propiedad antioxidante es evaluando el color. Los materiales de recubrimiento que favorecen el color durante 6 días son: harina de amaranto, mucilago de nopal e inulina. El amaranto es el que conserva mejor el color con una tasa de incremento ( $r_{\Delta E^*}$ ) de  $4.2$   $d^{-1}$  a diferencia del nopal a  $7.4$   $d^{-1}$  e inulina a  $7.6$   $d^{-1}$ . Por tanto, el recubrimiento de harina de amaranto y

mucilago de chía se podrían empezar a considerar para alargar la vida de anaquel de la C-FC y que favorecen la capacidad antioxidante de este pigmento.

Como se esperaba, la parte de la proteína del biopigmento C-PC no aumenta los parámetros espermáticos en un extensor a corto plazo (Kortowo-3), ya que están mejorados con otro tipo de proteínas como la yema de huevo. Sin embargo, la porción antioxidante del biopigmento induce la reducción de ROS, por lo que podría usarse como antioxidante con extensores de almacenamiento a corto y largo plazo.

Después de 48 horas de almacenamiento a 5°C, 20% de los espermatozoides aún tienen motilidad progresiva sin daño en el ADN cuando se mantienen con 138 µg mL<sup>-1</sup> C-PC y se pueden usar en inseminación asistida.

## 7. Perspectivas de investigación.

En este trabajo se logró la producción de C-ficocianina (C-FC) cuando se cultivó *A. maxima* LJGR1 en un medio Zarrouk modificado con 10.4 mM urea y 0.26 M NaCl. Esta cepa es originaria del conjunto lacustre del Valle de México y se cultivaba en la época prehispánica como alimento. Sin embargo, actualmente no se cultiva a gran escala y no tiene valor agregado en el mercado mexicano (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006; Bertolin *et al.*, 2011). Por lo que una perspectiva, es cultivar *Arthrospira* a gran escala para obtener biomasa y C-FC para comercializarlos como suplemento alimenticio.

Otra perspectiva es hacer microencapsulamiento con amaranto y mucilago de chía para poder proteger la degradación de C-FC y poder controlar la cantidad liberada de este pigmento que podría utilizarse en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos. También con más estudios clínicos podría utilizarse en tratamientos como paliativos para diversos tipos de cáncer, para obesidad y diabetes.

## 8. Referencias

- Aitken, R.J., Lambourne, S., Gibb, Z. 2014. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of Sperm Physiology-Oxidative Stress and the Functionality of Stallion Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34: 17-27.
- Ajayan, K.V., Selvaraju, M., Thirugnanamoorthy, K. (2012). Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: an *in-vitro* study. *Biomass and Bioenergy*, 47: 436-441.
- Amini, M.R., Kohram, H., Shahaneh, A.Z., Zhandi, M., Sharideh, H., Nabi, M.M. 2015. The effects of different levels of vitamin E and vitamin C in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cell Tissue Bank*, 16: 587-592.
- Anel-López, L., Álvarez-Rodríguez, M., García-Álvarez, O., Álvarez, M., Maroto-Morales, A., Anel, L., de Paz, P., Garde, J.J., Martínez-Pastor, F. 2012. Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 135: 37-46.
- Antelo, F.S., Anschau, A., Costa, J.A.V., Kalil, S.J. (2010). Extraction and Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* in Conventional and Integrated Aqueous Two-Phase Systems. *J. Braz. Soc.*, 21 (5): 921-926.
- Antonio-Marcos, E., Hernández-Vázquez, L., Olguín, E.J., Monroy, O., Navarro-Ocaña, A. 2016. C-phycoerythrin from *Arthrospira maxima* LJGR1: production, extraction and protection. *Journal of Advances in Biotechnology*, Volume 5, 2: 659-666.
- Arenas-Ríos, E. 2009. Enzimas Anti-especies reactivas de oxígeno, como reguladores en los procesos de espermatogénesis, maduración y almacenamiento prolongado de espermatozoides en el murciélago *Corynorhinus mexicanus*. Doctorado., Universidad Autónoma Metropolitana.
- Arenas-Ríos, E., Rodríguez-Tobón, A., López-Trinidad, B.P., Rodríguez-Tobón, E., Ruiz-Valderrama, L., León-Galván, M.A. 2015. Capítulo 6: Participación de las especies reactivas de oxígeno, desde la formación de espermatozoides, hasta la capacitación espermática. Ciencias Biológicas y Químicas-La labor investigadora e innovadora en México, Science Associated Editors, L.L.C:
- Apt, K.E., Collir, J.L., Grossman, A.R. 1995. Evolution of the phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology*, 248: 76-96.
- 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: 426-436.
- Azuola, R., Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, 20 (4): 30-40.
- Banji, D., Banji, O.J.T., Pratusha, N.G., Annamalai, A.R. (2013). Investigation on the role of *Spirulina platensis* in ameliorating behavioral changes, thyroid dysfunction and oxidative stress in offspring of pregnant rats exposed to fluoride. *Food Chemistry*, 140: 321-331.
- Barja, G. (2014). Chapter one: The mitochondrial free radical theory of aging. *Process in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 127: 1-27.
- Bashandy, S.A., El Awdan, S. A., Ebaid, H., Alhazza, I.M. 2016. Antioxidant Potential of *Spirulina platensis* Mitigates Oxidative Stress and Reprotoxicity Induced by Sodium Arsenite in Male Rats. *Oxidative Medicine and cellular Longevity*, Vol. 2016, Article ID 7174351, 8 pages.
- Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C. & Thomas, M. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol*, 130: 1910-7.

- Batista, A.P., Raymundo, A., Sousa, I., Empis, J., Franco, J.M. (2006). Color Food Emulsions- Implications of Pigment Addition on the Rheological Behavior and Microstructure. *FOBI*, 1: 216-227.
- Baylan, M., Özcan, B.D., Işık, O., Akar, M. (2012). A Mini Review on *Spirulina*. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (1): 31-34.
- Belay, A. (2002). The Potential Application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 5 (2): 37-47.
- Bernal, J., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55: 758-774.
- Bertolin, T.E., Farias, D., Guarienti, C., Souza-Petry, F.T., Colla, L.M., Vieira-Costa, J.A. (2011). Antioxidant Effect of Phycocyanin on Oxidative Stress Induced with Monosodium Glutamate in Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 (4): 733-738.
- Betancourt, L.F. (1997). Tesis Doctoral: Producción, purificación y caracterización de ficocianina de *Synechococcus* sp. I09201 aislada en aguas de Cuba. Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña; pp. 13-50.
- Bhat, V.B., Madyastha, K.M. (2000). C-phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275: 20-25.
- Bhat, V.B., Madyastha, K.M. (2001). Scavenging of peroxy nitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285: 262-266.
- Bhakar, R.N., Brahmdudd, Pabbi, S. (2014). Total lipid accumulation and fatty acid profiles of microalga *Spirulina* under different nitrogen and phosphorus concentrations. *Egyptian Journal of Biology*, 16: 57-62.
- Bhattacharya, S., Shivaprakash, M.K. (2005). Evaluation of three *Spirulina* species grown under similar conditions for their growth and biochemicals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 333-336.
- Blaszczak, W., Misharina, T.A., Fessas, D., Signorelli, M., Górecki, A.R. (2013). Retention of aroma compounds by corn, sorghum and amaranth starches. *Food Research International*, 54: 338-344.
- Borowitzka, M.A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialization. *J Appl Phycol*, 25: 743-756.
- Botrel, D.A., Fernandes, B.R.V., Borges, S.V., Yoshida, M.I. 2014. Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. *Food Research International*, 62: 334-352.
- Boussiba, S., Richmond, E.A. (1980). C-Phycocyanin as a Storage Protein in the Blue-Green Alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125: 143-147.
- Capelli, B., Cysewski, G.R. (2010). Potential health benefits of *Spirulina* microalgae. A review of the existing literature. *Nutra foods*, 9(2): 19-26.
- Capitani, M.I., Spotorno, V., Nolasco, S.M., Tomás, M.C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina.
- Carranco, M.E.J., Calvo, M.C.C., Pérez-Gil, F.R. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61 (3): 233-241.
- Carrera, J.E. (2003). Producción y aplicación de enzimas industriales. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 1 (1): 9-15.
- Carlozzi, P. (2008). Closed photobioreactor assessments to grow, intensively, light dependent microorganisms: a twenty-year Italian outdoor investigation. *The Open Biotechnology Journal*, 2: 63-72.

- Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X. (2006). Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnology Prog.* 22: 1490-1506.
- Carvalho, J.C., Cardoso, L.C., Ghiggi, V., Woiciechowski, A.L., Vandenberghe, S.L.P., Soccol, C.R. (2014). Chapter 4: Microbial Pigments. S.K. Brar *et al.* (eds.) Book: Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals.
- Cathcart, R., Schwiers, E. & Ames, B. N. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem*, 134: 111-6.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Siangdung, W., Paithoonrangsarid, K., Bunnag, B. (2010). Cultivation of *Spirulina platensis* using pig wastewater in a semi-continuous process. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20 (3): 609-614.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Loha, V., Tia, S., Bunnag, B. (2011). Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*, 102: 7159-7164.
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., Bunnag, B. (2012). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47: 659-664.
- Chainapong, T., Traichaiyaporn, S., Deming, R.L. (2012). Effect of light quality on biomass and pigment production in photoautotrophic and mixotrophic cultures of *Spirulina platensis*. *Journal of Agricultural Technology*, 8 (5): 1593-1604.
- Cheevadhanarak, S., Paithoonrangsarid, K., Prommeenate, P., Kaewngam, W., Musigkain, A., Tragoonrung, S., Tabata, S., Kaneko, T., Chaijaruwanich, J., Sangsrakru, D., Tangphatsornruang, S., Chanprasert, J., (...), Tanticharoen, M. (2012). Draft genome sequence of *Arthrospira platensis* C1 (PCC9438). *Standards in Genomic Sciences*, 6: 43-53.
- Chen, Z., Kaplan, D.L., Yang, K., Kumar, J., Marx, K.A., Tripathy, S.K. (1996). Phycobiliproteins Encapsulated in Sol-Gel Glass. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 7: 99-108.
- Chen, T., Zheng, W., Yang, F., Bai, Y., Wong, Y.S. (2006). Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (1): 103-107.
- Chen, H.B., Wu, J.Y., Wang, C.F., Fu, C.C., Shieh, C.J., Chen, C.I., Wang, C.Y., Liu, Y.C. (2010). Modeling on chlorophyll *a* and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. *Biochemical Engineering Journal*, 53: 52-56.
- Chu, W. (2012). Review Article: Biotechnological applications of microalgae. *JeJSME*, 6(1): S24-S37.
- Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the Edible Microorganism. *Microbiological Reviews*, pp. 551-578.
- Cisneros, R. M., Rito, P.M. (2005). Estrategias de bioingeniería para la recuperación primaria de productos biológicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4 (001): 131-139.
- Converti, A., Scapazzoni, S., Lodi,., Carvalho, J.C.M. 2006. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33:8-16.
- Dadheech, P. K., Ballot, A., Casper, P., Kotut, K., Novelo, E., Lemma, B., Pröschold, T., Krienitz, L. (2010). Phylogenetic relationship and divergence among planktonic strains of *Arthrospira* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) of African, Asian and American origin deduced by 16S-23S and phycocyanin operon sequences. *Phycologia* 49 (4), 361-372.
- Del Campo, A.J., García-González, M., Guerrero, G.M. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 1163-1174.
- Denery, J.R., Dragull, K., Tang, C.S., Li, Q.X. (2004). Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Analytica Chimica Acta*, 501: 175-18.

- Deng, R., Chow, T.J. (2010). Hypolipidemic, Antioxidant, and Anti-inflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics* 28: e33–e45.
- Deniz, F., Saygideger, S.D., Karaman, S. (2011). Response to copper and sodium chloride excess in *Spirulina* sp. (Cyanobacteria). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87: 11-15.
- Dixit, R.B., Suseela, M.R. (2013). Cyanobacteria: potential candidates for drug discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103: 947-961.
- Doke, J.M. (2005). An Improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Spirulina* sp. *International Journal of Food Engineering*, 1 (5), article 2, pp. 1-11.
- Donaghy, L., Hong, H.K., Jauzein, C., Choi, K.S. (2015). The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, 42: 91-97. *LWT-Food Science and Technology*, 57: 42-48.
- Donhowe, E.G., Flores, F.P., Kerr, W.L., Wicker, L., Kong, F. (2014). Characterization and *in vitro* bioavailability of  $\beta$ -carotene: effects of microencapsulation method and food matrix. *LWT-Food Science and Technology*, 57: 42-48.
- Dziekonska, A. & Strzezek, J. 2011. Boar variability affects sperm metabolism activity in liquid stored semen at 5 degrees C. *Pol J Vet Sci*, 14: 21-7.
- El-Baky, H.H., El-Baroty, G.S. (2012). Characterization and bioactivity of phycocyanin isolated from *Spirulina maxima* grown under salt stress. *Food & Function*, 3: 381-388.
- El-Desoky, G.E., Bashandy, Samir, A., Alhazza, I.M., Al-Othman, Z.A., Aboul-Soud, M.A.M., Yusuf, K. 2013. Improvement of Mercuric Chloride-Induced Testis Injuries and Sperm Quality Deteriorations by *Spirulina platensis* in Rats. *PLOS ONE*, Vol. 8, issue 3, e59177.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carcosin acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 110: 76-82.
- Eriksen, N.T. (2008). Production of phycocyanin a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80: 1-14.
- Evenson, D. & Jost, L. 2000. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci*, 22: 169-89.
- FAO, 2008. A review on culture, production and use of *spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1034*. Rome, pp. 4-17. ISSN 2070-6065.
- FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals, pp. 24-26.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 510-523.
- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 11: 375-392.
- Fidantsi, A., Doxastakis, G. (2001). Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21: 119-124.
- Gad, A.S., Khadrawy, Y.A., El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hassan, N.S., Abdel-Wahhab, A.A. (2011). Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. *Nutrition*, 27: 582-589.
- Gadella, B. M. & Harrison, R. A. 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod*, 67: 340-50.

- Gandía-Herrero, F., Cabanes, J., Escribano, J., García-Carmona, F., Jiménez-Atiénzar, M. (2013). Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as powders of different colors. *J. Agric. Food Chem.*, 61: 4294-4302.
- Gantt, E. (1975). Phycobilisomes: Light-Harvesting Pigment Complexes. *BioScience*, 25 (12): 781-788.
- Ge, X., Wan, Z., Song, N., Fan, A., Wu, R. (2009). Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose. *Journal of Food Engineering*, 94: 122-128.
- Gharibzahedi, S.M.T., Razavi, S.H., Mousavi, S.M. (2013). Comparison of antioxidant and free radical scavenging activities of biocolorant synthesized by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 cells grown in batch, fed-batch and continuous cultures. *Industrial Crops and Products*, 49: 10-16.
- Gordillo, F.J.L., Jiménez, C., Figueroa, F.L. Niell, F.X. (1999). Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). *Journal of Applied Phycology*, 10: 461-469.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F.J., González-Miret, M.L., Quijada-Morín, N., Rivas-Gonzalo, J.C., García-Estévez, I., Heredia, F.J. (2015). Application of differential Colorimetry to Evaluate Anthocyanin Flavonol-Flavanol Ternary Copigmentation Interactions in Model Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 7645-7653.
- Goswami, G., Chaudhuri, S., Dutta D. (2010). The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. *World J Microbiol Biotechnol.*, 26: 1925-1939.
- Grewe, C.B., Pulz, O. (2012). The Biotechnology of Cyanobacteria. Book: Ecology of Cyanobacteria II by Whitton, B.A., pp. 708-720.
- Gupta, M., Dwivedi, U.N., Khandelwal, S. (2011). C-phycoyanin: An effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin. *Toxicology Letters*, 204: 2-11.
- Gupta, N.K., Gupta, K.P. (2012). Effects of C-phycoyanin on the representative genes of tumor development in mouse skin exposed to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Environmental toxicology and pharmacology*, 34: 941-948.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. (2010). Antioxidantes: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393: 561-564.
- Harrison, R. A., Ashworth, P. J. & Miller, N. G. 1996. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev*, 45: 378-91.
- Health Canada. (2015). Natural Health Product: SPIRULIN-*Spirulina platensis*. [www.hc-sc.gc.ca](http://www.hc-sc.gc.ca)
- Hemlata; Pandey, G., Bano, F., Fatma, T. (2011). Studies on *Anabaena* sp. NCCU-9 with special reference to phycocyanin. *J. Algal Biomass Utiln.* 2 (1): 30-51.
- Herrero-Martín, S. (2010). Tesis doctoral: puesta a punto de metodologías rápidas para la detección y determinación de compuestos orgánicos en matrices ambientales. Universidad de Salamanca.
- Hifney, A.F., Issa, A.A. E-S., Fawzy, M.A. (2013). A biotic stress induced production of  $\beta$ -carotene Allophycocyanin and Total Lipids in *Spirulina* sp. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 4 (2): 16-27.
- Hongsthong, A., Sirijuntarut, M., Prommeenate, p., Thammathorn, S., Bunnag, B., Tanticharoen, M. (2007). Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis. *Molecular Biotechnology*, 36: 123-130.
- Horrobin, D.F. (1992). Nutritional and Medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog. Lipid Res.* 31 (2): 163-194.

- Hu, H., Yeguang, L., Chuantao, Y., Yexin, O. (2011). Isolation and characterization of a mesophilic *Arthrospira maxima* strain capable of producing docosahexaenoic acid. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (7): 697-702.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (6), 1841-1856.
- Ivanova, K.G., Stankova, K.G., Nikolov, V.N., Georgieva, R.T., Minkova, K.M., Gigova, L.G., Rupova, I.T., Boteva, R.N. (2009). The biliprotein C-phycoyanin modulates the early radiation response: A pilot study. *Mutation Research*, 695: 40-45.
- Jimenez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J. A., García, A., Betancourt, M. & Fierro, R. 2003. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*, 59: 1171-80.
- Jin Hwang, Y., Young Kim, D. 2013. Effects of Ginsenoside-Rg1 on Post-thawed Miniature Pig Sperm Motility, Mitochondria Activity, and Membrane Integrity. *J. Emb. Trans.* 28, 1: 63-71.
- Kamble, S.P., Gaikar, R.B., Padalia, R.B. (2012). Extraction and purification of C-phycoyanin from dry *Spirulina* and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Asian Pacific of Tropical Biomedicine*, pp. 1-4.
- Kanakdande, D., Bhosale, R., Singhal, R.S. (2007). Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydrate Polymers*, 67: 536-541.
- Karkos, P.D., Leong, S.C., Karkos, C.D., Sivaji, N., Assimakopoulos, D.A. (2011). Review: *Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, ID 531053, pp. 1-4.
- Kim, E.K., Choi, G.G., Kim, H.S., Ahn, C.Y., Oh, H.M. (2012). Increasing  $\gamma$ -linolenic acid content in *Spirulina platensis* using fatty acid supplement and light-dark illumination. *J Appl Phycol*, 24: 743-750.
- Kiokias, S., Oreopoulou, V. (2006). Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7: 132-139.
- Kirilovsky, D., Kerfeld, C.A. (2012). The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 158-166.
- Kishk, Y.F.M., Al-Sayed, H.M.A. (2007). Free-radical scavenging and antioxidative activities of some polysaccharides in emulsions. *LWT*, 40: 270-277.
- Kovač, D.J., Simeunović, J.B., Babić, O.B., Mišan, A.C., Milovanović, I.L. (2013). Algae in food and feed. *Food and Feed Research*, 40 (1): 21-31.
- Koller, M., Muhr, A., Braunegg, G. (2014). Review: Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, 6: 52-63.
- Kong, X., Bertoft, E., Bao, J., Corke, H. (2008). Molecular structure of amylopectin from amaranth starch and its effect on phytochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43: 377-382.
- Kong, X., Bao, J., Corke, H. (2009). Physical properties of *Amaranthus* starch. *Food Chemistry*, 113: 371-376.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., Al-Hazimi, A. (2013). Review Article: Recent Developments in production and Biotechnological Applications of C-phycoyanin. *BioMed Research International*, p.p. 1-9.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y tecnología de alimentos*, Campiñas. Octubre-diciembre, pp. 726-732.

- Lamela, T., Márquez, R.F.J. (2000). Producción de ficocianina en cultivos de *Arthrospira maxima* en agua de mar. *Ciencias Marinas*, 26 (4): 607-619.
- Lacroix, M., Dang, V. K. (2014). Chapter 11: Edible Coating and Film. Materials: Proteins. Book: Innovations in Food Packaging, pp. 277- 294.
- Leema, J.T.M., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N.V., Dheenan, P.S., Karthikayulu, S. (2010). High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*, 101: 9221-9227.
- Liang, S., Liu, X., Chen, F., Chen, Z. (2004). Current microalgal health food R & D activities in China. *Hydrobiology*, 512: 45-48.
- Licet, A.B.V. (2008). Tesis de maestría: cultivo de *Arthrospira platensis* (división Cyanophita) a diferentes salinidades y fuente de nitrógeno como estrategia para modificar su composición bioquímica. Universidad de Oriente. Cumaná-Venezuela, pp. 1-41, anexo 35.
- Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., Cai, T., Cai, Y. 2016. Medical Application of *Spirulina platensis* Derived C-Phycocyanin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2016, Article ID 7803846, 14 pages.
- López-Brea, G. J. 1995. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis Univ. Complutense de Madrid, pp. 2-15.
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J., Morales, E. (2003). Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación con la concentración de nitrógeno e irradiación. *Gayana Botánica*, 60 (2): 83-89.
- Lu, Y.M., Xiang, W.Z., Wen, Y.H. (2011). *Spirulina (Arthrospira)* industry in Inner Mongolia of China: current status and prospects. *J Appl Phycol.*, 23: 265-269.
- Lugo-Cervantes, C. (2003). Colorantes naturales, usos y perspectivas. *Énfasis Alimentación*, abril (2): 66-69.
- Mahajan, G., Kamat, M. (1995).  $\gamma$ -Linolenic acid production from *Spirulina platensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 43: 466-469.
- Malakar, E., Kalita, M.C. (2012). A perspective towards development and commercialization of potential BGA biofertilizers of Assam, North East India and carrier materials for BGA mass production and inoculum development. *Annals of Biological Research*, 3 (1): 814-828.
- Manconi, M., Mura, S., Manca, M.L., Fadda, A.M., Dolz, M., Hernandez, M.J., Casanovas, A., Díez-Sales, O. (2010). Chitosomes as drug delivery systems for C-phycocyanin: Preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 392: 92-100.
- Manconia, M., Pendás, J., Ledón, N., Moreira, T., Sinico, C., Saso, L., Fadda, A.M. (2009). Phycocyanin liposomes for topical anti-inflammatory activity: *in-vitro in-vivo* studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61: 423-230.
- Marles, R.J., Barrett, M.L., Barnes, J., Chavez., Gardiner, P., Ko, R., Mahady, G.B., Dog, T.L., Sarma, N.D., Giancaspro, G.L., Sharaf, M., Griffiths, J. (2011). United States Pharmacopeia Safety Evaluation of *Spirulina*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51: 593-604.
- Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*, 49: 154-159.
- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul, J., López-Urueña, E., *et al.*, Álvarez, M. 2014. Refrigeration storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal Reproduction Science*, 151: 137-147.
- Matsudo, M.C., Bezerra, R.P., Sato, S., Perego, P., Converti, A., Carvalho, J.C.M. (2009). Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 52-57.

- Mayank., Rachana, A. (2013). *Spirulina*: A potencial Nutraceutical for Human. 2<sup>nd</sup> International Conference on *Emerging Trends in Engineering & Technology*. April 12, 13: 1-5.
- McCarty, M.F., Barroso-Aranda, J., Contreras, F. (2010). Potential complementarity of high-flavanol cocoa poder and spirulina for health protection. *Medical Hypotheses*, 74: 370-373.
- Mc. Donald, M.S. 2003. Photobiology of higher plants. John Wiley & Sons Ltd, pp. 17-30.
- Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E., Busheva, M.Ch. (2003). Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, 102: 55-59.
- Miranda, M.S., Cintra, R.G., Barros, S.B.M., Mancini-Filho, J. (1998). Antioxidant activity of the microalgas *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31: 1075-1079.
- Mishra, S.K., Shrivastav, A., Mishra, S. (2008). Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, 43: 339-345.
- Mühling, M., Belay, A., Whitton, B.A. (2005). Variation in fatty acid composition of *Arthrospira (Spirulina)* strains. *Journal of Applied Phycology*, 17: 137-146.
- Navarro, G.M.T. (1998). Tesis: desarrollo de estrategias moleculares para el estudio de la asimilación de nitrato en algas. Facultad de Ciencias Universidad de Córdoba.
- Nekoonam, S., Nashtaei, M.S., Naji, M., Zangi, B.M., Amidi, F. 2016. Effect of trolox on sperm quality in normozospermia and ologozospermia during cryopreservation. *Cryobiology* 72: 106-111.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2013). Review: Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42: 469-479.
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, 49: 503-515.
- Niu, J.F., Wang, G.C., Lin, X.Z., Zhou, B.C. (2007). Large-scale recovery of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, 850: 267-276.
- Ogbonda, K.H., Aminigo, R.E., Abu, G.O. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*, 98: 2207-2211.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Mercado, G., Pérez, T. (2003). Annual productivity of *Spirulina (Arthrospira)* and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *Journal of Applied Phycology*, 15: 249-257.
- Oliveira, M.A.C.L., Monteiro, M.P.C., Robbs, P.G., Leite, S.G.F. (1999). Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquaculture International*, 7: 261-275.
- Oliver, R.L., Hamilton, D.P., Brookes, J.D., Ganf, G.G. (2012). Physiology, Blooms and Prediction of Planktonic Cyanobacteria. Book: *Ecology of Cyanobacteria II* by Whitton, B.A., pp. 158-178.
- Ötles, S., Pire, R. (2001). Fatty Acid Composition of *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae. *Journal of AOAC International*, 84 (6): 1708-1714.
- Ou, Y., Zheng, S., Lin, L., Li, Q. (2011). C-phycoyanin from *Spirulina maxima* protects hepatocytes against oxidative damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 1: 8-11.
- Öztürk-Ürek R., Tarhan L., (2012). The relationship between the antioxidant system and phycoyanin production in *Spirulina maxima* with respect to nitrate concentration. *Turkish Journal of Botany*, 36: 1-9.

- Pasquet, V., Chérourvriér, J-R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J-M., Bérrar, J-B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J-P., Picot, L. (2011). Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry* 46: 59-67.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., Ghosh, P.K. (2005). Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, 40: 248-255.
- Pentón-Rol, G., Marín, P. J., Pardo, A. G., Martínez, S. G., Acosta, M. E.F., Valdivia, A. A., Lagumersindez, D. N., Rodríguez, J. E., Llopiz, A. A., López, S. P.A., Guillén, N. G., Pentón, A. E. (2011). C-phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Research Bulletin*, 86: 42-52.
- Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, pp. 1-15.
- Pilbrow, J., Garama, D., Carne, A. (2012). Carotenoid-binding proteins; accessories to carotenoid function. *Acta Biochimica Polonica*, 59 (1): 163-165.
- Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97: 55-74.
- Plessis, S.S., McAllister, D.A., Luu, A., Savia, J., Agarwal, A., Lampiao, F. 2010. Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. *Andrologia*, 42: 206-210.
- Ponce-Canchihuamán, J.C., Pérez-Méndez, O., Hernández-Muñoz, R., Torres-Durán, P.V., Juárez-Oropeza, M.A. (2010). Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids in health and disease*, 9 (35): 2-7.
- Pumas, C., Vacharapiyasophon, P., Peerapornpisal, Y., Leelapornpisid, P., Boonchum, W., Ishii, M., Khanongnuch, C. (2011). Thermostability of phycobiliproteins and antioxidant activity from four thermotolerant cyanobacteria. *Physiological Research*, 59: 166-174.
- Ramadan, M.F., Asker, M.M.S., Ibrahim, Z.H. (2008). Functional bioactive compounds and biological activities of *Spirulina platensis* lipids. *Czech J. Food Sci.*, 26: 211-222.
- Ramírez-Moreno, L., Olvera Ramírez, R. (2006). Usos tradicionales y actuales de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia. Revista de ciencia y tecnología de America*, 31 (9): 657-663.
- Ramos-Molina, A. (2011). Tesis doctoral: Obtención y purificación de ficocianinas mediante cromatografía de absorción en lecho expandido. Escalado del proceso, caracterización físicoquímica y aplicación como colorantes naturales. Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Jaén, pp. 1-44, 60-68, 118, 206-240 y 261-289.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Ravi Kumar, M.N.V. (2006). Review: Role of antioxidants in prophylaxis and therapy a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113: 189-207.
- Rimbau, V., Camins, A., Romay, C., González, R., Pallás, M. (1999). Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 276: 75-78.
- Roca, J., Hernández, M., Carvajal, G., Vázquez, J. M. & Martínez, E. A. 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci*, 84: 2692-9.
- Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M. (2011). Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. *Bioresource Technology*, 102: 6587-6592.
- Rodríguez, S., Coro, R.M., Matos, M., Subirós, N., Ancheta, O., Gaya, J.A., Fortuny, A., Galán, L., Rodríguez, J.M., Severo, N., Plasencia, C., Berlanga, J., García del Barco, D. 2012. Primera

- evidencia del efecto otoprotector de la ficocianina en ratas. Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas. Primera Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal, pp: 1-12.
- Rodríguez-Amaya, D.B. (1997). Tesis de Doctorado: "Carotenoides y preparación de alimentos: la retención de los carotenoides provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados". Departamento de ciencias de Alimento, Universidad Estatal de Campinas, Brasil, pp. 7-23.
- Romay, C., Armesto, J., Remirez, D., González, R., Ledon, N., García, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*, 47: 36-41.
- Romay, Ch., González, R., Ledón, N., Remirez, D., Rimbau, V. (2003). C-phycoyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Current Protein and Peptide Science*, 4: 207-216.
- Ronda, S.R., Lele, S.S. (2008). Culture conditions stimulating high  $\gamma$ -linolenic acid accumulation by *Spirulina platensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 693-697.
- Rosenberg, J., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current opinion in Biotechnology*, 19: 430-436.
- Ruengjitchachawalya, M., Chirasuwan, N., Chaiklahan, R., Bunnag, B., Deshniun, P., Tanticharoen, M. (2002). Photosynthetic characterization of a mutant of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 14: 71-76.
- Ruen-ngam, D., Shotipruk, A., Pavasant, P. (2011). Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and technology*, 46: 64-70.
- Salgado-Cruz, M.P., Calderón-Domínguez, G., Chanona-Pérez, J., Farrera-Rebollo, R. R., Méndez-Méndez, J.V., Díaz-Ramírez, M. (2013). Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage release characterization. A microstructural and image analysis study. *Industrial Crops and Products*, 51: 453-462.
- Sánchez, A., Flores-Cotera, L.B., Langley, E., Martín, R., Maldonado, G., Sánchez, S. (1999). Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41: 175-191.
- Sarada, R., Manoj., Pillai, G., Ravishankar, G.A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass son phycocyanin yield analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, 34: 795-801.
- Sarada, D.V.L., Kumar, C.S., Rengasamy, R. (2011). Purified C-phycoyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 27:779-783.
- Sasson, A. 1984. Las biotecnologías: desafíos y promesas. UNESCO, París, pp. 213. ISBN: 92-3-302091-6.
- Schlebusch, M. (2012). Dissertation Doctor of philosophy: "Analysis of the SII0783 functions in PHB synthesis in *Synechocystis* PCC 6803: a crucial role of NADPH in N-starvation". Department of mathematic and Natural Science; Universität Tübingen, pp. 1-16 y 54-60.
- Schofield, L. (2007). Antioxidants: a most fruitful category. *Nutraceuticals World*, 10(3): 52-64.
- Segura-Campos, M.R., Ciau-Solís, N., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D. 2014. Chemical and functional proprieties of chia seed (*Salvia hispanica* L.) gum. *International Journal of Food Science*, Vol. 20014, pp. 1-5.
- Sekar, S., Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20: 113-136.

- Sharma, N.K., Tiwari, S.P., Tripathi, K., Rai, A.K. (2011). Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *J Appl Phycol*, 23: 1059-1081.
- Shimamatsu, H. (2004). Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia*, 512: 39-44.
- Sili, C., Torzillo, G., Vonshak, A. (2012). *Arthrospira (Spirulina)*. Book: Ecology of Cyanobacteria II by Whitton, B.A., pp. 689-701.
- Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J. (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98: 1629-1634.
- Singh, N.K., Dhar, D.W. (2011). Phylogenetic relatedness among *Spirulina* and related cyanobacterial genera. *World J Microbiol Biotechnol.*, 27: 941-951.
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Converti, A. 2005. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243: 217-224.
- Sotiroudis, T.G., Sotiroudis, G.T. (2013). Health aspects of *Spirulina (Arthrospira)* microalga food supplement. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78 (3): 395-405.
- Soundarapandian, P., Vasanthi, B. (2008). Effects of chemical Parameters on *Spirulina platensis* Biomass Production: Optimized Method for Phycocyanin Extraction. *International Journal of Zoological Research*, 4 (1): 1-11.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (2): 87-96.
- Stal, L.J. (2012). Cyanobacteria Mats and Stromatolites. Book: Ecology of Cyanobacteria II by Whitton, B.A., pp. 86-94.
- Tapia-Blácido, D., Sobral, P.J., Menegalli, F.C. (2005). Development and characterization of biofilms base on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering*, 67: 215-223.
- Tapia-Blácido, D., Sobral, P.J., Menegalli, F.C. (2011). Optimization of amaranth flour films plasticized with glycerol and sorbitol by multi-response analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 1731-1738.
- Teixeira, S.M.P., Chaveiro, A., Silva, M. 2015. The effects of three extender son refrigerated boar semen. *South African Journal of Animal Science*, 45 (No. 1): 82-88.
- Tello-Ireland, C., Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., López, J., Di Scala, K. (2011). Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, color, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 2112-2118.
- Tiburcio, P.C., Galvez, F.C.F., Cruz, L.J., Gavino, V.C. (2007). Optimization of low-cost drying methods to minimize lipid peroxidation in *Spirulina platensis* grown in the Philippines. *Journal Application Phycology*, 19: 719-726.
- Torres-Castro, M. P., Vargas-Aguilar, G.M. 2010. Modificación enzimática de la fibra dietaria del pergamino del café (*Coffea arabica* L.). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1 (2): 262-271.
- Tso, P., Caldwell, J., Lee, D., Boivin, G.P., DeMichele, S.J. (2012). Comparison of growth, serum biochemistries and n-6 fatty acid metabolism in rats fed diets supplemented with high-gamma-linolenic acid safflower oil or borage oil for 90 days. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 1911-1919.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Review: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44-84.

- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry– A review. *Innovative Food science and emerging Technologies*, 9 (2): 161-169.
- Who. 2010. World Health Organization-Laboratory manual for the examination and processing of human semen-5<sup>th</sup> ed.
- Xu, D., Yuan, F., Gao, Y., Panya, A., McClements, D.J., Decker, E.A. (2014). Influence of whey protein-beet pectin conjugate on the properties and digestibility of  $\beta$ -carotene emulsion during *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 156: 374-379.
- Yamaguchi, K. (1997). Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of Applied Phycology*, 8: 487-502.
- Yan, M., Liu, B., Jiao, X., Qin, S. (2014). Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and Bioproducts Processing*, 92: 89-97.
- Yu, D., Simon, L., Lewis, S.E.M. 2011. The impact of Sperm Processing and Cryopreservation on Sperm DNA integrity, in A. Zini and A. Agarwal (eds.), *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. Springer Science+Business Media, pp. 397-409.
- Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., McCarty, M.F., Fujii, M., Ikeda, N., Kobayashi, K., Sonoda, N., Takayanagi, R. (2013). Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304: R110-R120.
- Zhou, Z.P., Liu, L.N., Chen, X.L., Wang, J.X., Chen, M., Zhang, Y.Z., Zhou, B.C. (2005). Factors that affect antioxidant activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 29: 313-322.

