



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



## Máster Universitario Oficial en Avances en Calidad y Tecnología Alimentaria

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**FACULTAD DE CIENCIAS Y FARMACIA, UNIVERSIDAD DE GRANADA**

# **Análisis de microcistinas RR y LR en el cultivo de microalgas hipersalinas**

Autora: Mercedes Ruiz Alamillo

Tutoras: María del Carmen Rivera González <sup>1</sup>

Monsalud del Olmo Iruela <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biothesan S.L.U. La Malahá (Granada)

<sup>2</sup>Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias.  
Universidad de Granada. (Granada)

Granada a 5 de septiembre de 2017

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

### **Agradecimientos**

Agradecer al Departamento de Botánica de la Universidad de Granada por permitirme desarrollar mi conocimiento en sus laboratorios, e iniciarme en el mundo de las algas.

Al Departamento de Química Analítica por la ayuda recibida y por enseñarme a utilizar los equipos necesarios que me han permitido realizar este trabajo.

Agradecer su conocimiento y dedicación a mis tutoras María del Carmen y Monsalud, sobre todo en los momentos de desesperación en mis primeros pasos en el campo de la investigación.

Agradecer a la empresa Biothesan por haberme escogido para compartir con ellos estos cinco meses y poder ser uno más de su familia. Gracias personalmente también al director de la empresa Luciano Vílchez por la entrega educativa y profesional.

Agradecer a mis padres por darme la oportunidad de estudiar el Máster de Avances en Calidad y Tecnología Alimentaria tan necesario para poder llegar a ser una excelente profesional en el campo de calidad alimentaria.

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

### ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	25
4. EXPERIMENTAL, MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
4.1 Localización.....	26
4.2 Toma de muestras.....	27
4.2.1 Muestras biológicas.....	28
4.2.2 Muestras químicas.....	28
4.3 Metodología de análisis de la ficoflora.....	28
4.4 Reactivos, disoluciones y equipos empleados en el análisis químico...30	
4.4.1 Patrones químicos.....	30
4.4.2 Disoluciones y material químico.....	33
4.4.3 Equipos para el análisis químico.....	34
4.5 Procedimiento cromatográfico.....	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1 Análisis de la ficoflora existente en la salina.....	37
5.2 Datos físico químicos de las muestras.....	39
5.3 Análisis de las microcistinas.....	40
5.3.1 Optimización de la separación cromatográfica.....	40
5.3.1.1 Composición de la fase móvil.....	40
5.3.1.2 Optimización de la temperatura.....	46
5.3.1.3 Estudio del gradiente de la fase móvil.....	47
5.3.1.4 Flujo de la fase móvil.....	49
5.3.1.5 Volumen de inyección.....	50
5.3.1.6 Reoptimización del gradiente.....	51
5.3.1.7 Identificación de las señales cromatográficas.....	53
5.3.2 Validación.....	54
5.3.2.1 Validación con agua ultrapura.....	54
5.3.2.2 Validación con agua hipersalinas.....	57
5.3.2.3 Análisis de muestras.....	59
6. CONCLUSIONES.....	60
Abreviaturas.....	61
Anexo .....	62

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

### 1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar, validar y aplicar la metodología de análisis mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de la presencia de las microcistinas LR y RR en agua de cultivos de microalgas hipersalinas. Para ello se evaluaron los cultivos de la empresa Biothesan SLU, ubicada en la salina continental de la Malahá (Granada) durante el periodo de mayo a julio de 2017 coincidiendo con los procesos de mayor proliferación, tanto de microalgas como de cianobacterias, en los tanques de almacenamiento de agua. Durante el periodo de experimentación se recogieron muestras de agua los días 20 de mayo, 26 de junio y 20 de julio, así como muestras de la biomasa existente para su caracterización taxonómica. Las muestras de agua fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el Departamento de Química Analítica para su posterior procesado y análisis, y las muestras biológicas conservadas en la cámara de cultivos del Departamento de Botánica, ambos de la Universidad de Granada. Las muestras que se llevaron al departamento de Botánica se fijaron con Lugol para su posterior conteo. Las muestras biológicas fueron contadas y clasificadas taxonómicamente mediante microscopia. Las muestras de agua fueron analizadas en el Departamento de Química Analítica para evaluar la posible presencia de microcistinas, tarea que constituyó el grueso de este trabajo. En el trabajo se discutió la metodología aplicada para la detección de toxinas como parte de los mecanismos de calidad y seguridad alimentaria que la empresa debe implantar para comercializar la producción de microalgas para consumo humano. Respecto de la hipótesis de partida previa a la realización de este trabajo se confirma la no presencia en el agua de las microcistinas LR y RR por encima de los límites de detección establecidos en el trabajo.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

### **Abstract:**

The objective of this work was to develop, validate and apply an analytical methodology using high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of the presence of microcystins LR and RR in water samples from cultures of hypersaline microalgae. In order to do so, we evaluated the biotypes of the company Biothesan SLU, located in the continental salt marsh of the Malahá (Granada) during the period from May to July of 2,017 coinciding with the processes of greater proliferation of both microalgae and cyanobacteria in the storage tanks of water. During the experiment period water samples were collected on May 20, June 26 and July 20, as well as samples of the existing biomass for its taxonomic characterization. The water samples were stored in the Department of Analytical Chemistry at -20°C for further processing and analysis, and the biological samples preserved in the chamber of cultures of the Department of Botany, both of the University of Granada. The samples that were taken to the Department of Botany were fixed with Lugol for later counting. The biological samples were counted and classified by taxonomic microscopy. The water samples were analyzed in the Analytical Chemistry Department, a task that constituted the bulk of this work. The work discussed the methodology applied for the detection of toxins as part of the mechanisms of quality and food safety that the company must implement to commercialize the production of microalgae for human consumption. Regarding the starting hypothesis prior to the accomplishment of this work, the concentration of microcystins LR and RR in the water samples analyzed is below the limits of detection established for the method.

### 2. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se ha realizado bajo el régimen de prácticas externas del Máster en Avances en Calidad y Tecnología Alimentaria en la empresa Biothesan S.L.U.

#### Descripción de la empresa

Biothesan es una empresa andaluza ubicada en la salina continental de la Malahá (Granada) especializada en nutrición para acuicultura. La empresa ha realizado diversos desarrollos de investigación en piensos para acuicultura marina y para diferentes especies (dorada, lubina o mújol). Además, cuenta con una salina continental dedicada al cultivo de microalgas hipersalinas y en un futuro próximo espera poder comercializar dichos cultivos como materia prima para piensos de acuicultura.

Los desarrollos e investigación realizados por la empresa en nutrición para peces son tendentes a conseguir dietas sostenibles con la mayor inclusión de proteínas unicelulares posible y que sustituyan a las tradicionales harinas y aceites de pescado.

Hasta la fecha los mejores resultados en dicha investigación se han conseguido con la inclusión de levaduras de desecho de la industria cervecera, tanto para *Chelon labrosus*, Risso, 1827 (mújol) [1] o para *Sparus aurata*, Linnaeus, 1758 (dorada) (dentro del proyecto Retos-Colaboración. Convocatoria 2014 N° RTC-2014-2353-2 “Desarrollo de piensos para peces marinos enriquecidos a partir de subproductos de la industria cervecera” Proyecto del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. (MINECO) ejecutado junto con Estrella de Levante S.A.U y la Universidad de Murcia.

---

[1] Vílchez-Gómez, L., Cámara-Ruiz, M., Guardiola, F. A. and Esteban, M. Á. (2017) 'Inclusión de levaduras de la industria cervecera en dietas para *Chelon labrosus* L.', in *XVI Congreso Nacional de Acuicultura*.

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

La empresa tiene previsto iniciar la comercialización en 2018 de microalgas hipersalinas como alimento vivo para el sector de la alimentación animal y en concreto para acuicultura marina y la acuariofilia por lo que es necesario contar con métodos que garanticen la detección de toxinas en los cultivos.

Además, con esta producción propia de microalgas de alta calidad se espera poder complementar dichas dietas en el perfil de ácidos grasos necesarios para el correcto desarrollo y crecimiento de los peces.

Este trabajo se engloba dentro de la evaluación de la posible presencia de toxinas o contaminantes tanto en el proceso de cultivo, como en el agua. Hasta la fecha la empresa no ha incluido en sus dietas ninguna materia prima propia (microalgas cosechadas en la salina), estando pendiente del proceso de autorización administrativa para ello.

### **El problema medioambiental que supone la inclusión de harinas y aceites de pescado en piensos para acuicultura o ganadería**

No es nuevo el problema existente a nivel mundial por el uso de harinas y aceites de pescado para su inclusión en piensos compuestos destinados a la acuicultura o para otras ganaderías [2]. Gran parte de la producción acuícola mundial está basada en estas materias primas que se incluyen en diferentes proporciones en las formulaciones de las dietas variando su grado de inclusión en función de la especie en cultivo. Este porcentaje varía entre un 5 y un 7 por ciento para tilapias o carpas, entre el 25 y el 42 por ciento para camarones o langostinos, y entre el 40 y el 55 por ciento para salmón, trucha u otros peces marinos como la dorada o lubina. La cantidad de pienso necesaria para producir un kilogramo de pez actualmente se encuentra entre 1,3 y 2,5 kilogramos (Kg) dependiendo también de la especie en cultivo y su coste

---

[2] New, M. B. and Wijkström, U. N. (2002) Use of Fishmeal and Fish Oil in Aquafeeds. Further thoughts on the fishmeal trap, *FAO Fisheries Circular No. 975*. Rome 71 pp. Available at: <http://www.fao.org/3/a-y3781e.pdf>.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

supone un porcentaje entre el 30 y el 60 % del total de los costes variables de producción de una instalación piscícola [3] y [4] .

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en 2013 por primera vez la acuicultura puso a nivel mundial más productos acuáticos en la mesa que la pesca. Concretamente 73,8 millones de toneladas (Mt) frente a 93,4 Mt capturadas por la pesca, ya que a estas últimas hay que restarle los 24 Mt toneladas que no van destinados al consumo humano y que son destinadas a la producción de harinas y aceites de pescado [5]. De esta producción mundial de harinas de pescado el sector de la acuicultura utiliza un 68,2 por ciento y el resto son utilizadas para la alimentación de otras ganaderías (a una inclusión por debajo del 5 por ciento) o recientemente para alimentación humana [6] .

El uso de estas materias primas es cada vez más limitado tanto por precio como por el descenso de las pesquerías [7,8] y su obtención incrementa la presión extractiva sobre los caladeros en un intento de incrementar su disponibilidad en el mercado, suponiendo una clara alteración del equilibrio ecológico en ecosistemas ya de por si sometidos a otras presiones medioambientales como son el cambio climático, la contaminación, la degradación del hábitat, la sobrepesca o las malas prácticas.

---

[3] Burnell, G. and Allan, G. (2009) *New technologies in aquaculture*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

[4] Rana, K.J.; Siriwardena, S.; Hasan, M.R. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 541. Rome, FAO. 2009. 63p. Available at: <http://www.fao.org/docrep/012/i1143e/i1143e.pdf>

[5] FAO. (2014) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014, Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Rome 244 pp. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>

[6] FAO. (2016) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016, Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Rome 249 pp.

[7] Tacon, A. G. J. and Metian, M. (2008) 'Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 285(1–4), pp. 146–158. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.015.

[8] Tacon, A.G.J.; Metian, M.; Hasan, M.R. FAO (2009). Feed ingredients and fertilizers for farmed aquatic animals: sources and composition. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 540. Rome,. 209p. Available at: <http://www.fao.org/docrep/012/i1142e/i1142e00.htm>

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

La FAO estima que la proporción de poblaciones de peces explotadas a niveles sostenibles ha disminuido del 90 % en 1.974 al 68,6 % en 2.013 estimándose que actualmente el 31,4 % de las poblaciones de peces se encuentran en un nivel de explotación no sostenible. Es necesario resaltar la situación existente por cercanía en el Mediterráneo y el Mar Negro que alcanzan niveles alarmantes habiendo disminuido las capturas un tercio desde 2.007.

### La acuicultura como solución a la crisis alimentaria mundial

Frente al problema descrito hay que poner de manifiesto que el consumo per cápita de pescado a nivel mundial actual es de 19,2 Kg [5] y que aproximadamente un 53 % proviene de la acuicultura, proporción que no deja de aumentar año tras año a favor de la acuicultura frente a la pesca. Es este crecimiento significativo del consumo de pescado el que ha permitido mejorar la dieta de la población mundial, contribuyendo de forma destacada a la seguridad alimentaria y la nutrición adecuada, proporcionando a más de 3.100 millones de personas (el 43 por ciento de la población mundial) el 20 por ciento de las proteínas per cápita de origen animal, además de ácidos grasos esenciales (omega 3 de cadena larga), vitaminas (D, A y B) o minerales (calcio, yodo, hierro y selenio) [6].

Así y frente al problema de una población mundial que crece exponencialmente y la dificultad cada vez mayor de obtener proteínas de calidad o ácidos grasos esenciales la FAO ha promovido tanto el crecimiento de la acuicultura como en concreto la acuicultura de microalgas. Éstas, aunque tradicionalmente han sido cosechadas y utilizadas en alimentación humana (como la espirulina o dihé en el Chad por más de 5000 años) [9,10] podrían consolidarse como una solución

---

[9] FAO. (2010) Unas algas del Chad, ricas en nutrientes, podrían ayudar a combatir la malnutrición, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://www.fao.org/news/story/es/item/44447/icode/>

[10] Espectador (2014) Espirulina, la alga que podría ser la solución a la desnutrición en Colombia. Universidad Nacional lidera el proyecto. <http://www.elespectador.com/noticias/nacional/espirulina-alga-podria-ser-solucion-desnutricion-colomb-articulo-508735>

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

a la desnutrición de millones de personas. Bien incluidas en piensos para acuicultura a través de su uso directo como se muestran a modo explicativo en los links de la FAO [11].

### Las microalgas, su interés para la acuicultura y otros sectores

Es a partir de los años 60 cuando se realizan los primeros cultivos industriales de microalgas [12] en el Instituto Tecnológico de Massachusetts.

A partir de estos inicios la carrera tecnológica y de investigación ha sido exponencial en la búsqueda de nuevas cepas cultivables y sobre todo desarrollos tecnológicos y tecnologías que permitan su cultivo. Y aunque las microalgas pueden ser excelentes productos para otros sectores como son la nutraceutica, la nutrición humana, la obtención de energía, o más recientemente el sector de los fertilizantes para agricultura [13] es su utilización para alimentación en acuicultura donde su uso está generalizado y cumplen su función de manera más eficiente.

Tradicionalmente las microalgas se han utilizado en diferentes sistemas de producción acuícola, y el desarrollo tecnológico de su cultivo ha ido ligado de manera inseparable a los cultivos larvarios de diferentes especies de peces. Y es sobre todo en la acuicultura marina (dorada, lubina o corvina), de igual manera a como sucede en la naturaleza, donde son una fuente esencial de nutrientes como proteínas, ácidos grasos, vitaminas o minerales.

Hasta la fecha, el cultivo de las microalgas y zooplancton es insustituible en el desarrollo y cultivo larvario de casi todas las especies cultivadas en acuicultura.

---

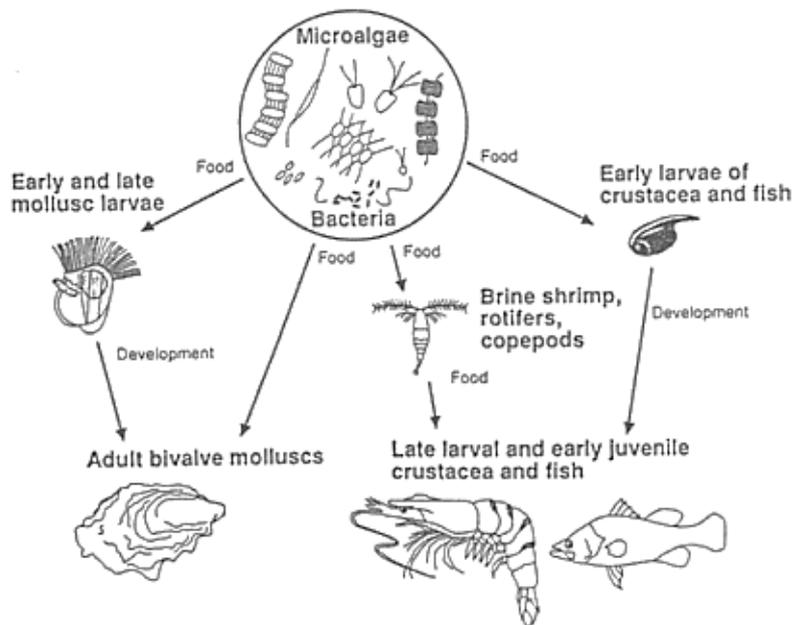
[11]FAO (2017) Microalgae in feed for global malnutrition. Hunger crisis. <http://www.fao.org/#sthash.pIFTe2V.dpbs>

[12] Burlew, J. S. (1953) *Algal Culture From Laboratory to Pilot Plant, Algal culture, From laboratory to pilot plant.*

[13] Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D. J. and Chang, J. S. (2017) 'Microalgae biorefinery: High value products perspectives', *Bioresource Technology*, 229, pp. 53–62. doi: 10.1016/j.biortech.2017.01.006

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

Su aporte se realiza como primera alimentación exógena para las larvas, en vivo, mediante técnicas de aguas verdes o mediante el enriquecimiento de zooplancton, y justo después de la eclosión de los huevos de los peces, crustáceos o moluscos. Así las microalgas y el plancton constituyen el alimento inicial durante un periodo de tiempo que varía según las especies cultivadas entre cinco y cincuenta días aproximadamente, justo después de la eclosión y antes de agotar las larvas los recursos del saco vitelino y hasta que el desarrollo larvario les permite adquirir alimentación inerte (piensos) [14,15]. En la siguiente Figura 1, se presenta un esquema del uso de las microalgas en acuicultura y su modo de alimentación para diferentes cultivos.



**Figura 1.** The central role of microalgae in mariculture [7]

Hay que reflejar que ésta es su principal aplicación industrial, y la que ha permitido mejorar sustancialmente en los últimos veinte años las técnicas de su cultivo.

[14] Brown, M. R., Jeffrey, S. W. and Garland, C. D. (1989) 'Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review.', *Rep. CSIRO Mar. Lab. AI:ISSN 0725-4598*, p. 50 pp.

[15] Lavens, P. and Sorgeloos, P. (1996) *Manual on the production and use of live food for aquaculture.*, *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

Su importancia en el aporte de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) a través de la cadena alimentaria, o su alto contenido en metabolitos antioxidantes, provitaminas, junto con su facilidad para su crecimiento en cultivo (de manera exponencial) hacen que además se estén utilizando en otro tipo de aplicaciones.

Respecto a estas nuevas aplicaciones que van desde la alimentación humana, la inclusión en piensos para rumiantes u otras ganaderías, cremas solares, biodiesel, o fertilizantes hay que decir que su potencialidad dada la reciente incorporación a estos mercados (últimos 10 años) es inmadura y necesita de mayores esfuerzos de investigación, para que sean una realidad consolidada en nuestra vida cotidiana [16].

Es y sobre todo de un tiempo a esta parte donde han ganado importancia los desarrollos y cultivos directamente dedicados a la nutraceutica, alimentos funcionales preventivos, o inmunoestimulantes frente a enfermedades, o también como antioxidantes supresores del envejecimiento celular o los procesos degenerativos ligados a este. Es en este campo donde las microalgas hipersalinas como las presentes en la salina de la Malahá han tenido mayor aplicación tecnológica [16].

Así desde los años ochenta la *Dunaliella salina*, Teodoresco 1905 ha sido una de las microalgas más estudiadas a nivel mundial, estando descrita como una de la fuente más interesante para la producción de betacaroteno [17]. En la siguiente Figura 2 se muestra la estructura y tipo de los carotenoides que dicha microalga produce habitualmente.

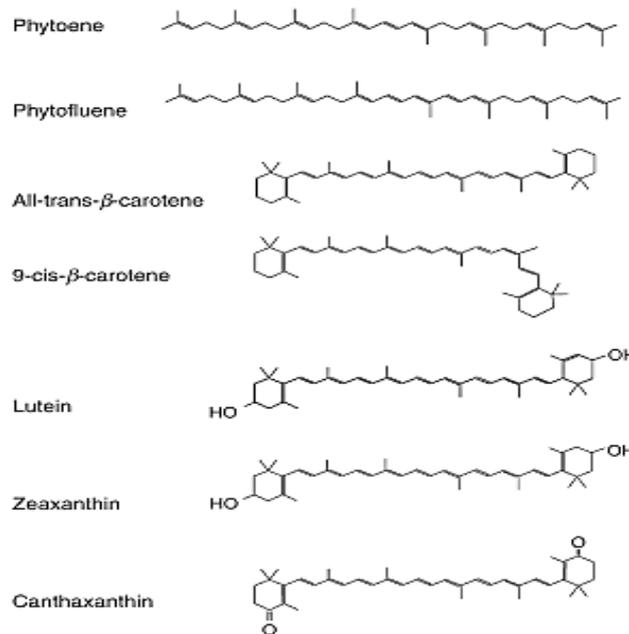
---

[16] Kim, S. K., & Chojnacka, K. (Eds.). (2015). *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*, 2 Volume Set. John Wiley & Sons.

[17] Hosseini Tafreshi, A., & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of applied microbiology*, 107(1), 14-35.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

Entre ellos se encuentra el fitoeno, fitoflueno, trans- $\beta$ -caroteno, 9-cis- $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina y cantaxantina.



**Figura 2.** Estructura de los carotenos más comunes en la microalga *Dunaliella sp.* extraído de [17].

### Ventajas y desventajas de los cultivos de microalgas frente a otro tipo de producciones vegetales

Es necesario llegado a este punto analizar las ventajas y desventajas de los cultivos de microalgas, y que en cierto modo tienen frente a otro tipo de producciones vegetales.

Sus ventajas son muchas, e importantes, y entre otras están descritas la rapidez de su crecimiento que es exponencial, que su cultivo se realiza en volumen en vez de en superficie, por lo que necesitan menor espacio de tierra cultivable o ninguna respecto a otras producciones vegetales. Además su cultivo se puede realizar en sitios donde la producción de otros cultivos es imposible (desiertos, zonas áridas, ...) y, recientemente gracias también al desarrollo de nuevas tecnologías para su cultivo el consumo de agua para su producción roza la tasa cero, pudiendo cultivarse una y otra vez en el mismo sustrato (agua).

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

Sus desventajas también son importantes, y entre ellas destacar la novedad de su cultivo, así como el desconocimiento de algunos aspectos técnicos necesarios para su consolidación. Hemos de tener en cuenta que la agricultura lleva aparejado un desarrollo tecnológico de más de 9.000 años, (se inició en el Valle del Nilo aproximadamente en el 7.000 a.C.), por lo que podemos considerar la “agricultura de microalgas” como un recurso interesante, pero en sus primeras etapas de desarrollo tecnológico.

También son patentes sus problemas y que es necesario solucionar y solventar respecto a sus costes de su producción o el control de los cultivos y sus contaminaciones.

Respecto a los costes de producción, si bien su crecimiento es exponencial, el escalado de sus cultivos choca habitualmente con un balance energético negativo, siendo necesario incorporar más energía al proceso de producción (para la circulación del agua o como iluminación) que el rendimiento que se obtiene por la venta de la biomasa.

Respecto de las contaminaciones (tanto biológicas como químicas) donde es necesario hacer un mayor esfuerzo de control por parte de las empresas productoras y de la Administración, ya que al ser también una gama de productos absolutamente nuevos, las técnicas de control o los mecanismos de calidad y seguridad alimentaria están en muchos casos por determinar.

### **Especies cultivables y diferentes modalidades de cultivo de microalgas**

Actualmente y a nivel mundial existen ciento treinta empresas dedicadas al cultivo de diferentes microalgas y con diferentes fines. En la siguiente Tabla (Tabla 1), se relacionan las especies tradicionalmente utilizadas como alimento vivo o habitualmente incorporadas como materia prima a piensos extruidos.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

**Tabla 1.** Especies tradicionalmente utilizadas como alimento vivo e incorporadas actualmente como materia prima en piensos [18].

Microalga	Pescado			Mariscos			Camarón		
	Agua Verde	Presa Viva: Rotifier, Artemia and Copépodos		Programar	Conjunto	Reproductores	Fase de Zoea	Fase larval	Reproductores
		Crecimiento	Enrique. EPA						
Nannochloropsis	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Tetraselmis	++	++	++		+++	+++	+++	+++	+++
Isochrysis	++		+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Phaeodactylum		+		+++	++		+++	+++	

Las microalgas juegan un papel nutricional crucial para los animales marinos. El fitoplancton es la base de la cadena alimentaria marina, la mayoría de los invertebrados marinos dependen de las microalgas durante todo su ciclo de vida.

En la tabla anterior hace referencia al hecho explicado anteriormente, en los criaderos de acuicultura para la cría de peces, camarones y mariscos, especialmente para el cultivo de presas vivas y el enriquecimiento de Rotifier y Artemia. Las microalgas también pueden usarse para realizar la técnica de agua verde ampliamente utilizada para mejorar el crecimiento de las larvas de peces, su supervivencia y el desarrollo de un sistema inmunológico alto.

En las instalaciones de Biothesan, además de poderse realizar el cultivo de las anteriores especies usadas en acuicultura se cuenta con producción natural de las siguientes especies, que se recogen en la siguiente Tabla (Tabla 2).

[18] Phyto boom (2013). Ideas frescas, Aquaculture (<http://phytobloom.com/aquaculture>)

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

**Tabla 2.** Especies naturales que se encuentran en las instalaciones de la empresa Biothesan.

Especies de la empresa Biothesan
<i>Dunaliella salina</i>
<i>Dunaliella viridis</i>
<i>Geitlerinema sp1</i>
<i>Synechococcus salinorum</i>
<i>Aphanoteces halophytica</i>

Es necesario también exponer que los cultivos de microalgas se pueden realizar de muy diferentes formas, y quizás es esta elección del sistema de cultivo el parámetro que determina en mayor medida tanto la viabilidad empresarial como la posible presencia de contaminaciones o no en los cultivos. En la siguiente Tabla 3 se refleja una comparación de los diferentes sistemas de producción de microalgas.

**Tabla 3** Comparación básica de los diferentes sistemas de cultivo de microalgas.

Comparación básica de los sistemas de cultivo de microalgas				
	Coste de implantación	Coste operativo	Productividad	Fiabilidad (**)
<b>Estanques poco profundos</b>	+(*)	+	+	++
<b>Raceways</b>	+++	++	+++	+++(+)
<b>Reactores tubulares</b>	+++++	++++	++++	+++
<b>Fermentadores</b>	+++++	+++++(***)	+++++	+++++
<b>(*) Depende de coste del suelo</b>				
<b>(**) Dependen de la especie (no todas las especies se pueden cultivar)</b>				
<b>(***) Potencialmente es más barato si no requieren iluminación</b>				

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

En la anterior tabla (Tabla 3), se muestra una comparación básica referida a los sistemas de cultivo de microalgas con mayor o menor efecto de implantación y productividad entre otras, dependiendo de si se utilizan estanques de poca profundidad o fermentadores que aumentan la productividad y si tienen menor riesgo de contaminaciones pero también acompañadas de sus desventajas porque tiene un alto coste de implantación como por ejemplo en el caso de los fermentadores.

Actualmente hay dos principales sistemas de cultivo para la producción de microalgas: sistemas cerrados y sistemas abiertos. Los sistemas de cultivo abiertos son los más comunes pero han tenido muchas dificultades lo cual ha favorecido el desarrollo de sistemas de cultivo cerrados. Éstos permiten un importante control de los parámetros, disminuyendo sustancialmente los problemas presentes en los sistemas abiertos [19].

En la siguiente tabla (Tabla 4) se refleja una comparativa entre los sistemas abiertos y cerrados de cultivo. Sus ventajas e inconvenientes

**Tabla 4.** Comparación de sistemas abiertos y cerrados en el cultivo actual de las microalgas.

SISTEMAS ABIERTOS		SISTEMAS CERRADOS	
Ventajas	Inconvenientes	Ventajas	Inconvenientes
<b>Bajos costes de inversión</b>	Menor producción	Sistemas más controlados y seguros	Costes muy altos
<b>Menor mantenimiento</b>	Baja eficiencia	Menor riesgo de contaminación	
<b>Facilidad de construcción</b>	Más susceptibles a la contaminación	Cultivos masivos	
<b>Alta durabilidad</b>	Control más difícil		
	Baja accesibilidad de las células a la luz, evaporación		

[19] Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

Se adjunta a este trabajo y como información complementaria el **Anexo I**, en el que se incluye fotos realizadas desde el microscopio de las especies que se encuentra en las salinas de la Malahá (Granada).

### **La problemática de las contaminaciones de los cultivos**

Como sucede con cualquier otra producción vegetal o con cualquier otro alimento o producción destinada al consumo humano (carne, productos de la pesca, hongos, lácteos, etc...), o en la potabilización de agua se pueden producir contaminaciones indeseables e introducirlas en la cadena de alimentación.

Es, reiteramos, la novedad de su cultivo lo que implica que las medidas y parámetros tanto de Calidad como de Seguridad Alimentaria para el sector no estén asumidas o realmente implantadas, ni por parte de los productores o importadores, ni por parte de la Administración. Siendo necesario como ha sucedido en otros sectores una mayor regulación y control.

Como se puede comprobar en la tabla anterior (Tabla 4) para ambos sistemas, tanto abiertos como cerrados, y para todos los cultivos de diferentes especies de microalgas pueden producirse contaminaciones y éstas, como en cualquier cultivo vegetal, son fundamentalmente de dos tipos:

#### 1.- Contaminaciones del agua (medio de cultivo):

Metales pesados, fitosanitarios o contaminantes emergentes, que se incorporan a la producción y se pueden bioacumular.

#### 2.- Contaminaciones biológicas de los cultivos:

Crecimiento indeseado de cianobacterias, dinoflagelados o zooplancton depredador que pueden generar toxinas indeseables en la cadena de alimentación. (En otro tipo de cultivos o producciones podríamos hablar de micotoxinas)

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

Las primeras contaminaciones son fruto de cada vez una peor calidad de las aguas y de la presión antrópica sobre las masas de agua (superficiales o subterráneas) y están reguladas de manera clara para cualquier tipo de producción vegetal y por analogía para los cultivos de microalgas. Además, este tipo de contaminaciones se llevan analizando desde hace años, tanto por productores, como por laboratorios agroalimentarios públicos y relativamente son sencillos los métodos para implementar las medidas de control en la producción de microalgas por extensión y analogía.

Así para evitar las primeras la empresa tiene implantado determinados puntos de control de calidad en metales pesados, fitosanitarios u otros productos contaminantes, realizando para ello análisis periódicamente sobre el agua de cultivo y los cultivos.

Respecto de las segundas y fruto de la dificultad que supone escalar en volumen los cultivos microbiológicos sin crecimientos indeseables y de manera axénica ya que es casi inevitable los crecimientos de cianobacterias u otros microorganismos indeseables la preocupación es, y dado que los productos de la empresa se van a introducir en la cadena alimentaria humana, implantar la mejor metodología que minimice los riesgos y la posibilidad de que algunas de estas cianobacterias produzcan toxinas, y que estas alcancen la cadena de alimentación.

### **Las biotoxinas producidas por microalgas y cianobacterias**

Tanto microalgas como cianobacterias son productoras de ficotoxinas y cianotoxinas respectivamente, estas toxinas son bioacumuladas por otros organismos como moluscos, crustáceos o peces, pudiendo así llegar al hombre u otros depredadores por vía alimentaria, o a través de la ingestión del agua contaminada o eutrofizada donde se han producido floraciones nocivas o "*blooms*" algales de las especies "potencialmente tóxicas"

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

La dificultad de su medición y el número existente de ellas hace que sea necesario un mayor control sobre las mismas. La literatura científica es extensa en este sentido y excede del objeto de este trabajo realizar una revisión en profundidad sobre las biotoxinas producidas por las microalgas o cianobacterias.

Si es necesario realizar, y de manera previa al desarrollo del trabajo realizado, un breve resumen de su tipología y de las especies productoras de las mismas.

Así y aunque a veces una misma cepa puede o no producir toxinas y depende de múltiples condiciones, la prudencia y el alto nivel de toxicidad de estas sustancias se plasma en los límites legales permitidos por extensión y se recogen en el Reglamento (CE) Nº 853/2004 [20] del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal y en Real Decreto 140/2003, [21] de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

En el primero se recoge la definición de "Biotoxinas marinas": las sustancias tóxicas acumuladas en los moluscos bivalvos, en particular debido a la ingestión de plancton que contenga dichas toxinas.

---

[20] Reglamento (CE) num.853/2004 de la Comisión, de 29 de abril de 2004, relativo a las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

[21] Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero de 2003, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano ( BOE num.45, de 21 de febrero de 2003).

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

En el Capítulo V de dicha norma: “normas sanitarias para los moluscos bivalvos vivos” se recogen los límites permitidos para cada una de ellas:

- a) en el caso de las toxinas paralizantes de molusco ("Paralytic Shellfish Poison": PSP), 800 microgramos por kilogramo;
- b) en el caso de las toxinas amnésicas de molusco ("Amnesic Shellfish Poison": ASP), 20 miligramos de ácido domoico por kilogramo;
- c) en el caso del ácido ocadaico, las dinofisistoxinas y las pectenotoxinas, 160 microgramos de equivalentes de ácido ocadaico por kilogramo;
- d) en el caso de las yesotoxinas, 1 miligramo de equivalente de yesotoxina por kilogramo; y
- e) en el caso de los azaspirácidos, 160 microgramos de equivalentes de azaspirácido por kilogramo.

Y en el caso de las cianotoxinas la normativa que las recoge en Real Decreto 140/2003 [13], de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, solo establece un límite de 1 µg/L y con una nota al pie de página en la que solo se analizará dicha toxina cuando:

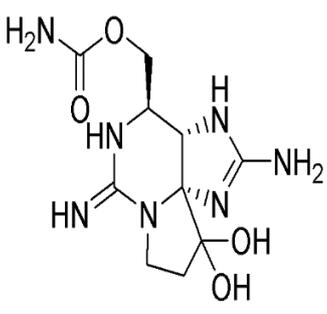
Sólo se determinará cuando exista sospecha de eutrofización en el agua de la captación, se realizará determinación de microcistina a la salida de la ETAP o depósito de cabecera”. (ETAP- Estación de tratamiento de agua potable).

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

La FAO tiene además un excelente manual de toxinas marinas [22] en el que se puede ampliar esta información, y respecto a las cianotoxinas es necesario acudir al manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 1999) [23].

A modo de resumen y en la siguientes tablas (Tablas 5 y 6) se recogen las especies de microalgas y cianobacterias habitualmente productoras de biotoxinas y su tipología, además de la diversidad de efectos que provocan.

**Tabla 5.** Resumen de la clasificación marina y efectos de las ficotoxinas.

FICOTOXINAS		
Clasificación de las ficotoxinas marinas	Efectos	Estructura de la saxitoxina
Saxitoxinas	Respuesta con una agresión externa	
Brevetoxinas	Bioacumulativas por otros organismos (moluscos, peces...)	
Yessotoxinas	Dañinas a nivel económico y ambiental	
Grupo del ácido okadaico	Marea roja [24]	
Grupo de las iminas cíclicas		

[22] FAO (2005) 'Biotoxinas marinas', *Food Science and Technology International*, 2(1), p. 292. doi: 10.1177/108201329600200102.

[23] World Health Organization (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, Retrieved March. doi: 10.1046/j.1365-2427.2003.01107.x.

[24] Alonso-Rodríguez, R. (2004). *El fitoplancton en la camaronicultura y larvicultura: importancia de un buen manejo*. Unam.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

**Tabla 6.** Resumen de las cianotoxinas junto con los efectos que provocan en la salud [25].

	Clases	Subclasificación	Efectos sobre la salud
<b>Cianotoxinas</b>	Dermatoxinas	Aplasiatoxina	Dermatitis severa
		lyngbyatoxina	Inflamación gastrointestinal (ingestión)
	Neurotoxinas	Anatoxina-a Anatoxina-a (s) Saxitoxinas	Afectan al sistema nervioso de los vertebrados
	Hepatoxinas	Microcistinas Nodularinas	Deterioro del hígado (necrosis) Hemorragias internas mortales
	Citotoxinas	Cilindrospermopsina	Afectan al hígado, riñón, bazo y corazón

### Métodos para el análisis de microcistinas

Las cianobacterias pueden producir diferentes grupos de toxinas en el medio ambiente. Las cianotoxinas se pueden encontrar en una amplia gama de muestras ambientales incluyendo agua, peces y plantas acuáticas.

En bibliografía se han encontrado diversos métodos para su análisis, poniéndose de manifiesto la utilidad de la cromatografía líquida con diferentes detectores para analizar, en un único barrido, múltiples toxinas.

---

[25] Sevilla Miguel, E., Peleato Sánchez, M. L., Escolana Llanas, M., Moya Jaraba, A., & Vergara Larrayad, Y. (2005). Efectos de OX-VIRIN sobre la cianotoxina microcistina. *Tecnología del Agua*, (265), 80-83.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

La extracción en fase sólida con un intercambiador catiónico (SPE) acoplada a la cromatografía líquida con detección de fluorescencia y trampa de iones para espectrometría de masas en tándem [26] se ha empleado para la cualificación de diversas toxinas en muestras ambientales. El protocolo empleado para la extracción de las cianotoxinas de las muestras de pescado y plantas acuáticas permite distinguir entre toxinas libres y enlazadas.

La determinación de cuatro microcistinas hepatotóxicas junto con nodularia en agua de lago en Grecia se ha abordado mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con triple cuadrupolo [27]. El estudio ha permitido poner de manifiesto la presencia, concentración y variación estacional de las microcistinas. Así mismo se ha puesto de manifiesto que estas cianotoxinas no están presentes en el agua de bebida tratada.

La cromatografía líquida con detección UV se ha utilizado para estudiar la biodegradación anóxica de microcistinas disueltas e intracelulares en sedimentos de lago como vía para la biorremediación en el tratamiento posterior de cianobacterias. [28].

---

[26] Al-Sammak, M. A., Hoagland, K. D., Snow, D. D., & Cassada, D. (2013). Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples. *Toxicon*, 76, 316-325.

[27] Kaloudis, T., Zervou, S. K., Tsimeli, K., Triantis, T. M., Fotiou, T., & Hiskia, A. (2013). Determination of microcystins and nodularin (cyanobacterial toxins) in water by LC-MS/MS. Monitoring of Lake Marathonas, a water reservoir of Athens, Greece. *Journal of hazardous materials*, 263, 105-115.

[28] Wu, X., Wang, C., Tian, C., Xiao, B., & Song, L. (2015). Evaluation of the potential of anoxic biodegradation of intracellular and dissolved microcystins in lake sediments. *Journal of hazardous materials*, 286, 395-401.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) con un líquido iónico se ha empleado para la extracción “in situ” de dos microcistinas analizadas posteriormente mediante CL con detección UV y espectrometría de masas [29]. El empleo de la espectrometría de masas permite incrementar la sensibilidad dos órdenes de magnitud.

La cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UPLC) acoplada a un triple cuadrupolo se ha utilizado recientemente para el análisis de 22 cianotoxinas pertenecientes a grupos diferentes [30]. Se ha podido evaluar el contenido intra y extracelular de estas toxinas en agua de bebida detectando la presencia de varias de ellas en agua de embalses destinados al consumo público.

### **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La cromatografía líquida es una técnica separativa ampliamente utilizada para determinar los compuestos de una mezcla basándose en interacciones específicas entre los analitos y la columna. A diferencia de la cromatografía de gases, no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra.

Actualmente la automatización y la miniaturización han sido muy importantes en el desarrollo de la cromatografía líquida, y en función del diámetro interno de la columna y de los caudales utilizados, las técnicas de HPLC se han clasificado en diversas categorías. La terminología actualmente usada se muestra en la Tabla 7.

---

[29] Yu, H., Clark, K. D., & Anderson, J. L. (2015). Rapid and sensitive analysis of microcystins using ionic liquid-based in situ dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1406, 10-18.

[30] Pekar, H., Westerberg, E., Bruno, O., Lääne, A., Persson, K. M., Sundström, L. F., & Thim, A. M. (2016). Fast, rugged and sensitive ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for analysis of cyanotoxins in raw water and drinking water—First findings of anatoxins, cylindrospermopsins and microcystin variants in Swedish source waters and infiltration ponds. *Journal of Chromatography A*, 1429, 265-276.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

**Tabla 7.** Terminología usada en técnicas de cromatografía líquida.

Nombre	Diámetro interno de la columna	Velocidad de flujo	Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Longitud (cm)
<b>HPLC convencional</b>	3.2-4.6 mm	0.5-2.0 mL $\text{min}^{-1}$	3-10	3-25
<b>HPLC microbore</b>	1.5-3.2 mm	100-500 $\mu\text{L min}^{-1}$	3-8	15-25
<b>Micro-LC</b>	0.5-1.5 mm	10-100 $\mu\text{L min}^{-1}$	3-5	5-15
<b>LC capilar</b>	150-500 $\mu\text{m}$	1-10 $\mu\text{L min}^{-1}$	3-5	5-15
<b>Nano-LC</b>	10-150 $\mu\text{m}$	10-1000 nL $\text{min}^{-1}$	3-5	5-15

### Cromatografía de líquidos capilar (CLC)

En los últimos años, para incrementar la eficacia de la separación, la sensibilidad de la detección y disminuir los tiempos de análisis con respecto al uso de columnas convencionales de HPLC, se ha reducido el diámetro interno de las columnas así como el tamaño de partícula del material de empaquetamiento.

La CLC se considera una técnica de separación miniaturizada, la cual está cobrando gran importancia actualmente por las ventajas que aporta con respecto a las técnicas convencionales. Lo que caracteriza este tipo de técnicas es el uso de columnas de diámetro interno reducido. En general mejoran la sensibilidad, la resolución y permiten la reducción del consumo de disolventes y volumen de muestra.

La cromatografía de líquidos capilar ha sido empleada para identificar, y cuantificar compuestos de interés, como aminoácidos, proteínas, alérgenos, plaguicidas, antibióticos o micotoxinas.

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

Este tipo de cromatografía utiliza una columna de separación más pequeña (<0,5 mm) que en HPLC convencional que utiliza una columna de 4,6 mm de diámetro interno. Al no ser necesario grandes diluciones, tiene una gran facilidad para acoplarse a diferentes técnicas de detección, como por ejemplo un espectrómetro de masas, resonancia magnética nuclear, fluorescencia o absorción UV.

La mejora de la velocidad de separación junto con el reducido flujo de fase móvil que se obtiene con este tipo de micro-columnas, permiten reducir la sobrepresión. Otra opción de análisis que permite esta técnica es la posibilidad de conectar micro-columnas en serie para mezclas complejas. El escaso volumen en el que se eluyen los analitos aumenta la sensibilidad en 20 órdenes de magnitud en la respuesta del detector.

Debido al diámetro interno de la columna que se utiliza en este tipo de técnica y al caudal de la fase móvil, el tamaño de muestra y uso de disolventes son mínimos, y en consecuencia los residuos que se generan, lo que reduce el impacto medioambiental.

### **3. OBJETIVOS**

El principal objetivo de la empresa y por el cual se ha realizado este método químico para la identificación de microcistinas en agua, es la comercialización de algunas de sus especies para la producción de piensos para acuicultura.

El objetivo químico de este trabajo fue evaluar la presencia de microcistinas LR y RR en el agua de los cultivos de las cepas de microalgas hipersalinas producidas de manera natural en las instalaciones de la empresa Biothesan ubicadas en la salina continental de la Malahá (Granada).

Para abordar esta evaluación se ha desarrollado y validado un método analítico basado en el empleo de la cromatografía de líquidos capilar con detector de diodos en fila estableciéndose los parámetros de calidad que lo caracterizan.

### 4. EXPERIMENTAL, MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 4.1 Localización

La experimentación se ha llevado a cabo en las instalaciones del Departamento de de Química Analítica y en el Departamento de Botánica de la Universidad de Granada, además de las instalaciones de la empresa Biothesan, S.L ubicadas en la salina continental de la Malahá (Granada), que a continuación se presentan en la siguiente imagen Figura 3.

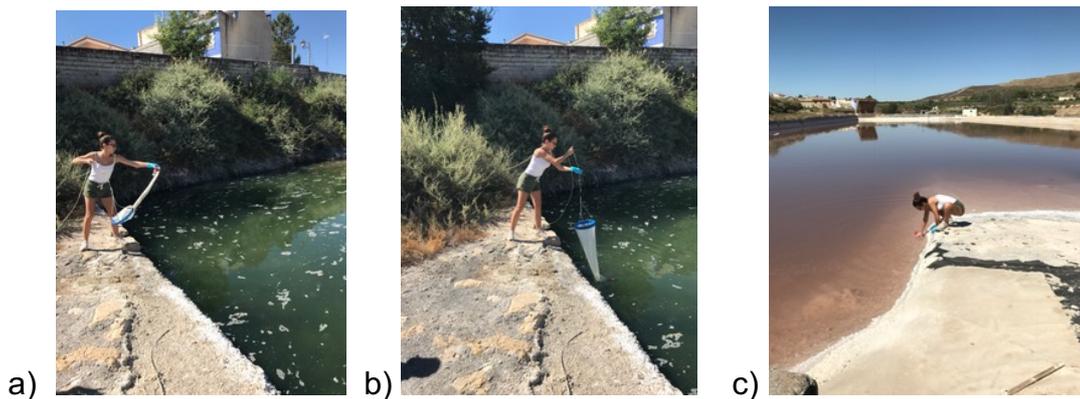


**Figura 3.** Imagen de la salina continental de la Malahá (Granada). En la imagen se pueden ver los puntos de toma de muestras: Nacimiento, LM1 y LM2, así como los cristalizadores utilizados para la obtención de la sal en el periodo de verano a otoño (LM3 a LM11).

### 4.2 Toma de muestras

Durante la experimentación se realizaron tres tomas de muestra los días 20 de mayo, 26 de junio y 20 de julio. Dichas muestras fueron etiquetadas, separadas y refrigeradas hasta su conservación, para su posterior análisis, en los departamentos de la Universidad de Granada.

Se midieron diferentes parámetros físicos del agua en cada muestreo realizado, datos que se recogen en la siguiente Tabla 13, utilizando un pHmetro digital y termómetro marca Hanna y un salinómetro de Baumé. En las siguientes imágenes (Figura 4) se muestra el procedimiento seguido para el muestreo biológico.



**Figura 4.** a) y b) Procedimiento de recogida de fitoplancton en la balsa de nacimiento, y c) ilustra la toma de los valores de pH y temperatura en la balsa ML1.

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

### **4.2.1 Muestras biológicas**

Las muestras destinadas al análisis de la ficoflora presente en los puntos de muestreo predefinidos y sobre los que la empresa lleva control (Nacimiento, LM1 y LM2) se obtuvieron mediante su recogida en botes de cristal de 50 ml, fijadas con Lugol (Panreac) y almacenadas en frío hasta su recuento en el Departamento de Botánica.

### **4.2.2 Muestras químicas**

Las muestras destinadas al análisis de las microcistinas se recogieron en los mismos puntos de muestreo predefinidos y se obtuvieron mediante llenado de botes de cristal de 50 ml, a los que no se les adicionó ningún reactivo, y fueron etiquetadas y congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesado. Cuando se iban a analizar se descongelaron y se filtraron empleando un filtro de jeringa de nylon de  $0,2\ \mu\text{m}$ .

### **4.3 Metodología de análisis de la ficoflora**

El análisis de la ficoflora existente en la salina se realizó sobre las muestras obtenidas previamente y según el método descrito por Vicente et al. [31].

El conteo se llevó a cabo utilizando cámaras de Utermöhl, en las cuales la muestra permanecía 48 horas, tiempo estándar para que su sedimentación sea completa. Las células sedimentadas en el portaobjetos luego eran observadas en un microscopio invertido Marca Zeiss el cual dispone de diferentes aumentos y con diferentes objetivos de magnificación (40x, 100x) según el tamaño de las células que se querían observar.

---

[31] Vicente, E., de Hoyos, C., Sánchez, P. and Cambra, J. (2005) *Procolos de Muestreo y Análisis para Fitoplancton, Metodología para el Establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva Marco del Agua*.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



**Figura 5.** Diferentes tamaños de cámaras de Utermöhl para el conteo de la ficoflora.

En la empresa se utilizan las cámaras de 50 ml y las muestras recogidas fijadas con Lugol. Se utiliza Lugol para fijarlas además de que le produce un color anaranjado y que sea más fácil el conteo de células en el microscopio.

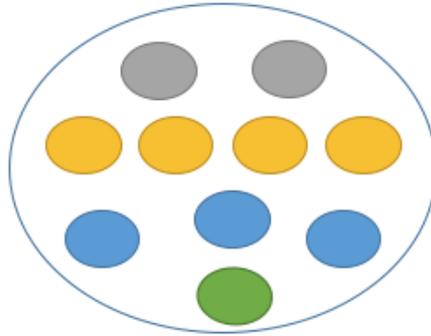
Para el cálculo del biovolumen y el número de células existente por mililitro se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Céls/ ml} = \frac{N^{\circ} \text{ de clases contadas}}{N^{\circ} \text{ campos}} \times \frac{\text{Factor (objetivo)}}{\text{Volumen de la cámara (ml)}}$$

- Células/mililitro =
- (Número de clases contadas/ Número de campos)
- \*(Factor/Volumen de la cámara (ml))
- Donde el número de clases contadas se corresponde con las especies presentes
- El Número de campos corresponden a las veces que subdivides el portaobjetos
- El factor con el objetivo de magnificación utilizado

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

Los campos contados se marcan sobre la placa portaobjetos tal cual se muestra en la Figura 6:



**Figura 6.** Portaobjetos posicionado en el microscopio listo para el recuento de células existentes.

### 4.4 Reactivos, disoluciones y equipos empleados en el análisis químico

#### 4.4.1 Patrones químicos

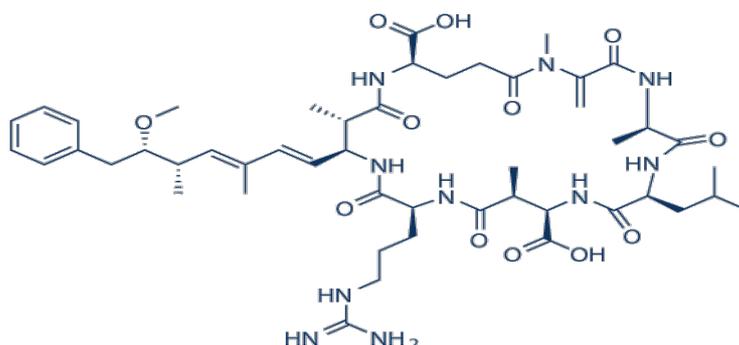
Los patrones analíticos microcistina RR (MC-RR) y microcistina LR (MC-LR) con un grado de pureza  $\geq 99\%$  fueron suministrados por Enzo Life Sciences (Postfach, Alemania).

La microcistina LR [32] es una toxina heptapeptídica de origen natural. Esta toxina puede actuar como un promotor tumoral inhibiendo selectivamente la fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A). No es permeable a las células excepto en las células del hígado, que parecen tener un sistema funcional de captación. Es absorbida por los hepatocitos a través del transportador de aniones orgánicos multiespecíficos. No induce ningún efecto sobre la piel del ratón o fibroblastos humanos debido a la impermeabilidad de las membranas celulares. No tiene efecto sobre las proteínas quinasas.

---

[32] Enzo life sciences, microcystin-LR (Analytical Standard) <http://www.enzolifesciences.com/ALX-350-431> ( consultada agosto 2017)

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



**Figura 7.** Estructura química de la microcistina LR [33]

**Tabla 8.** Características físico-químicas de la microcistina - LR.

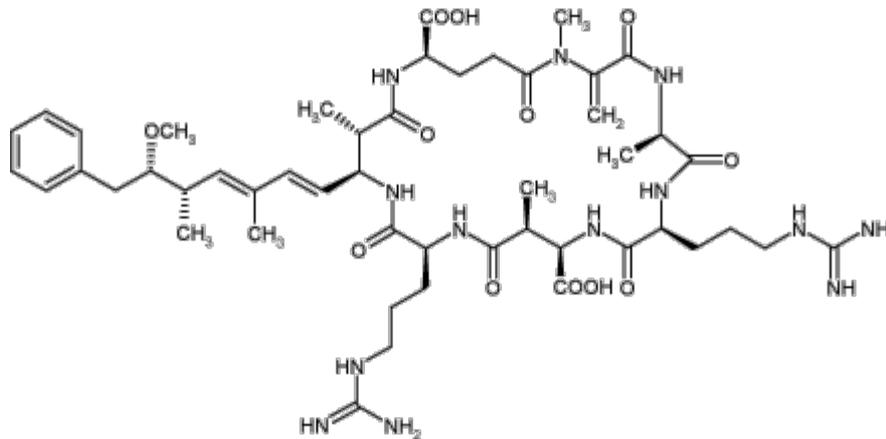
Fórmula	$C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$
Máxima absorbancia	239 nm
Solubilidad	MeOH, EtOH, DMSO
Temperatura de almacenamiento	-20°C
pKa [34]	3,3

[33] Microcistina-LR 101043-37-2, Directorio Industry( consultada agosto 2017)

[34]Rivasseau, C., Martins, S., & Hennion, M. C. (1998). Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 799(1), 155-169.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

La microcistina RR [35], es un potente inhibidor de la proteína fosfatasa 2A (PP2A).



**Figura 8.** Estructura química de la microcistina RR.

**Tabla 9.** Características físico-químicas de la microcistina - RR.

Fórmula	$C_{49}H_{75}N_{13}O_{12}$
Máxima absorbancia	239 nm
Solubilidad	80% MeOH:H <sub>2</sub> O
Temperatura de almacenamiento	-20°C
pKa [34]	3,4

MC-LR y MC-RR junto con las MCs LA y YR, son las más frecuentes. La OMS recomienda el consumo seguro de agua con cantidades inferiores a 1,0 µg/L de microcistina LR, siendo ésta (MC-LR) 10 veces más tóxica que la MC-RR. Últimos estudios acreditan que la MC-LR, causa toxicidad en el aparato reproductor del género masculino, sobre el desarrollo potencial de la próstata [36]. Además es una de las más estudiadas debido a que es la que más se encuentra en el agua potable provocando efectos negativos en la salud humana [37].

[35] Enzo life sciences, microcystin-RR (Analytical Standard) <http://www.enzolifesciences.com/ALX-350-431> (consultada agosto 2017)

[36] Zhang, H., Wang, L., Shen, S., Wang, C., Xiang, Z., Han, X., & Li, D. (2017). Toxic effects of microcystin-LR on the development of prostate in mice. *Toxicology*, 380, 50-61.

[37] Park, J. A., Jung, S. M., Yi, I. G., Choi, J. W., Kim, S. B., & Lee, S. H. (2017). Adsorption of microcystin-LR on mesoporous carbons and its potential use in drinking water source. *Chemosphere*, 177, 15-23.

### 4.4.2 Disoluciones y material químico

Para la optimización del método se partió de una disolución madre de 10 µg/ mL de cada analito. Dichas disoluciones se prepararon en MeOH y 80% MeOH para MC-LR y MC-RR respectivamente y se almacenaron en un congelador a -20°C, siendo estables durante al menos 6 meses.

Las disoluciones intermedias conteniendo los dos analitos en una concentración de 1 mg/L se preparaban tomando con jeringa un volumen de 10µL de la disolución madre y llevando a un volumen final de 100 µL con agua ultrapura en insertos contenidos en viales topacio para evitar su exposición a la luz.

Todos los reactivos empleados en este trabajo son de grado analítico y los disolventes de grado HPLC. El agua empleada en todo el trabajo fue agua ultrapura (18.2 mΩcm<sup>-1</sup>) obtenida mediante el sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU). El acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH) y ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se obtuvieron de VWR International (West Chester, Pensilvania, EE.UU). El ácido acético (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) se adquirió en Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA).

Como fase móvil se empleó una disolución de ácido acético al 0.05% preparada con agua ultrapura que correspondía a la fase acuosa y acetonitrilo con un ≥ 99 % de pureza en la fase orgánica.

Los filtros de jeringa de nylon de 0,2µm Acrodisc ( Pall Corp., MI EE.UU), fueron utilizados para la filtración de las muestras, antes de la inyección en el equipo de cromatografía. Los viales fueron de 1,50 ml de color topacio e insertos de 180µm y 250µm con pies poliméricos suministrados por Agilent technologies, Andaluza de instrumentación ( Murcia, España).

### 4.4.3 Equipos para el análisis químico

El equipo utilizado para llevar a cabo el análisis químico era un sistema de cromatografía de líquidos capilar, marca Agilent Technologies, modelo 1200. Está equipado con una bomba capilar con sensor de flujo capilar (máximo caudal: 20 $\mu$ L/min), automuestrador con un dispositivo de microdosificación que proporciona volúmenes de inyección de 0,01- $\mu$ L. Contiene un desgasificador automático (G1379B Agilent), junto con horno de columnas y detector de bacteria de diodos (DAD), con capacidad de medir a diferentes longitudes de onda. En nuestro estudio las medidas se realizaron a 238 nm.



**Figura 9.** Cromatógrafo de líquidos capilar

La columna que se ha utilizado es Zorbax XDB-C18 (Agilent Technologies) de fase inversa (150mm, 0.5mm, 5 $\mu$ m tamaño de partícula). Todos los cromatogramas obtenidos han sido procesados con el programa Agilent HP ChemStation Versión A.09.01 (Agilent technologies, Alemania).

Para la preparación de disoluciones se han utilizado además otros equipos como un vórtex multitubo BenchMixer<sup>TM</sup> modelo XL (Edison, Nueva Jersey, EEUU) y una centrífuga Modelo Universal 320R (Hettich, Leipzig, Alemania).

### 4.5 Procedimiento cromatográfico propuesto

Antes de proceder con el análisis, el cromatógrafo de líquidos capilar requiere un acondicionamiento. En primer lugar se realiza la purga durante 20 minutos de todas las conducciones del equipo para eliminar el aire. A continuación se empieza a pasar la fase móvil por la columna, subiendo poco a poco el flujo hasta llegar a 10 µl/min y esperar durante veinte minutos mientras se equilibra la columna con la composición inicial de fase móvil: 80% de acuoso y 20% de orgánico. Durante esta etapa es fundamental el control de la presión. En nuestro caso oscila entre 65 y 67 bares, dependiendo del porcentaje de fase orgánica. Terminado el acondicionamiento y con el vial de muestra preparado, se procede a inyectarla en el cromatógrafo empleando las condiciones recogidas en la Tabla 10.

El gradiente comienza con 20% de acetonitrilo y 80% de una disolución de ácido acético en agua al 0,05%; a los 5 minutos alcanza un 60% de acetonitrilo que se mantiene durante 7 minutos o sea, hasta el minuto 12. Durante los próximos 5 minutos la fase móvil vuelve a las condiciones iniciales y se mantiene durante 5 minutos para conseguir el equilibrio de la columna. El tiempo total de análisis es de 22 minutos.

Al finalizar la sesión, es imprescindible limpiar la columna para eliminar posibles restos de analitos o matriz y evitar que se obstruya. La limpieza de la columna consiste en un gradiente que comienza en un 30% de acetonitrilo y va incrementándose hasta alcanzar el 100%. La fase acuosa está compuesta por agua ultrapura. El tiempo de limpieza total de la columna es de 98 minutos con un flujo de 10 µl/min.

En la siguiente tabla (Tabla 10) se especifican los parámetros que se utilizaron para la realización del análisis.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

**Tabla 10.** Parámetros del equipo de medida para el análisis de las muestras

Parámetro	Características	
Columna	Columna C18 de 150 mm × 0,5 mm y 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Zorbax XDB-C18)	
Flujo	10 µl/min	
Volumen de inyección	8 µl	
Temperatura	20 °C	
Fases móviles	Trabajo	A <sub>1</sub> : H <sub>2</sub> O + 0,05% Ac. Acético B <sub>1</sub> :Acetonitrilo
	Limpieza	A <sub>2</sub> : H <sub>2</sub> O B <sub>2</sub> : Acetonitrilo

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Análisis de la ficoflora existente en la salina.

De los conteos realizados sobre las muestras recogidas se obtuvieron los siguientes datos biológicos que se muestran en las siguientes tablas tras su conteo.

**Tabla 11.** Datos obtenidos de las tres balsas en el conteo de especies el 20 de mayo.

20 DE MAYO 2017			
Especies	Balsa de nacimiento	Balsa ML1	Balsa ML2
<i>Dunaliella salina</i>	16.918	21	43
<i>Dunaliella viridis</i>	4.393	275	556
<i>Geitlerinema sp</i>	30.203	1.482	0
<i>Synechococcus salinilum</i>	1.153	9.965	0
<i>Aphanoteces halophytica</i>	0	2.014	0

En el mes de mayo se destacó el aumento de la *Geitlerinema sp*, a continuación de la *Dunaliella salina* en la balsa de nacimiento.

**Tabla 12.** Datos obtenidos de las tres balsas en el conteo de especies el 26 de junio.

26 DE JUNIO 2017			
Especies	Balsa de nacimiento	Balsa ML1	Balsa ML2
<i>Dunaliella salina</i>	1.251	823	99
<i>Dunaliella viridis</i>	1.317	654	0
<i>Geitlerinema sp</i>	6.028	7.147	0
<i>Synechococcus salinilum</i>	1.449	2.503	0
<i>Aphanoteces halophytica</i>	1.449	10.935	0

En el mes de junio sigue siendo destacada la *Geitlerinema s* en la balsa de nacimiento, y *Aphanoteces halophytica* tiene un aumento en la balsa ML1.

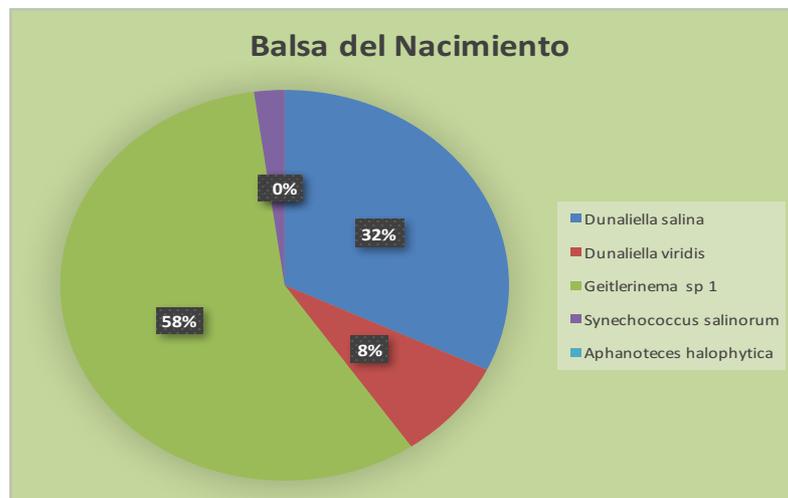
## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

**Tabla 14.** Datos obtenidos de las tres balsas en el conteo de especies el 20 de julio.

20 DE JULIO 2017			
Especies	Balsa de nacimiento	Balsa ML1	Balsa ML2
<i>Dunaliella salina</i>	1.173	235	198
<i>Dunaliella viridis</i>	2.142	518	0
<i>Geitlerinema sp</i>	3.257	941	0
<i>Synechococcus salinilum</i>	7.083	7.482	0
<i>Aphanoteces halophytica</i>	1.482	0	0

En el mes de julio la especie que más floración tiene es el *Synechococcus salinilum*.

A continuación en la siguiente figura (Figura 11) se indica el porcentaje en resumen de las especies existentes en la balsa de nacimiento, promedio de los tres muestreos realizados.



**Figura 11.** Gráfico de la balsa de nacimiento que muestra los porcentajes de promedio de tres meses

Este gráfico hace referencia al promedio realizado en los meses de mayo a julio lo cual se destaca como principal especie *Geitlerinema sp* 58%, y en segundo lugar *Dunaliella salina* con un 32 %.

### 5.2 Datos físico químicos de las muestras

La Tabla 14 recoge los datos de pH, T<sup>a</sup> y salinidad correspondiente a cada una de ellas.

**Tabla 14.** Datos de pH, T<sup>a</sup> y salinidad de los tres muestreos realizados

Fecha del muestreo	Balsas	pH	Salinidad (Baume)	Temperatura (°C)
	NTO	7,55	19	22,6
<b>20/05/17</b>	ML1	7,40	20	23,4
	ML2	7,33	21	23,9
	NTO	7,11	18	26
<b>29/06/17</b>	ML1	7,30	20	26,8
	ML2	7,3	24	27
	NTO	7,23	20	27,8
<b>20/07/17</b>	ML1	7,3	22	28,8
	ML2	7,2	25	30

Dentro de las especies descritas y presentes en la salina no hay, en bibliografía, datos concluyentes sobre su producción de toxinas, y en especial en ambientes hipersalinos, que han sido poco estudiados. Incluso algunos trabajos relacionan el incremento de salinidad con la disminución de la producción de toxinas [38].

Una de las metodologías empleadas para poner de manifiesto la presencia de biotoxinas producidas por microalgas o cianobacterias es la evaluación de la existencia en el medio de *Artemia salina* [39] y hay que significar que en las balsas LM1 y LM2 la existencia de este crustáceo es permanente, por lo que de existir sustancias tóxicas su presencia no sería posible. Aun así, es necesario un mayor estudio en este sentido a cerca de la posible presencia de

---

[38]Latała, A., Nędzi, M., & Stepnowski, P. (2010). Toxicity of imidazolium ionic liquids towards algae. Influence of salinity variations. *Green Chemistry*, 12(1), 60-64.

[39]Pino Pérez, O., & Jorge Lazo, F. (2010). Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de protección vegetal*, 25(1), 34-43.

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

sustancias especialmente tóxicas teniendo en cuenta que el interés de la empresa se centra en la producción de piensos para acuicultura.

### **5. 3 Análisis de microcistinas**

#### **5.3.1 Optimización de la separación cromatografía**

##### **5.3.1.1 Composición de la fase móvil**

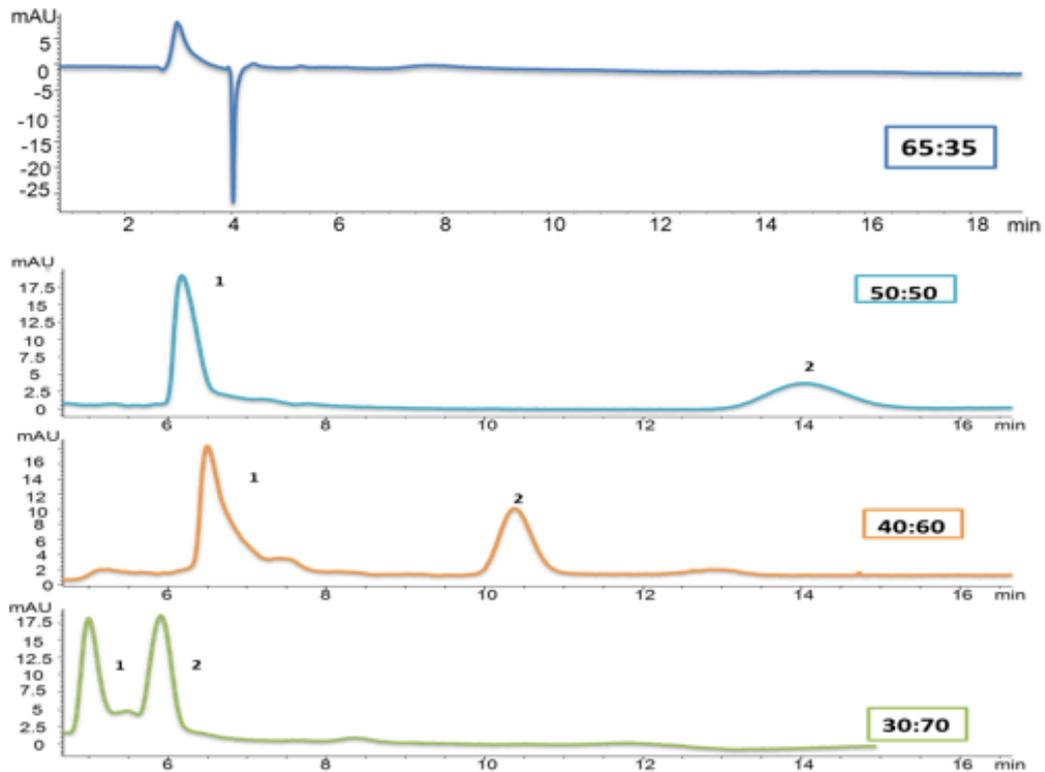
El estudio de la composición de la fase móvil se llevó a cabo tomando como punto de partida las condiciones recogidas en bibliografía [40]. Inicialmente se ensayó la mezcla agua/metanol y agua/acetonitrilo a distintas proporciones obteniéndose los resultados que se recogen en las Figuras 12 y 13.

Las condiciones cromatográficas empleadas para este estudio fueron: un flujo de 9  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 20°C y 8  $\mu\text{L}$  de volumen de inyección. La muestra inyectada era una mezcla de MC-LR y MC-RR a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{L}$ .

---

[40] H. Yu, K.D. Clark, J.L. Anderson (2015), Rapid and sensitive analysis of microcystins using ionic liquid-based *in situ* dispersive liquid–liquid microextraction, J. Chromatogr. A 1406 .10–18

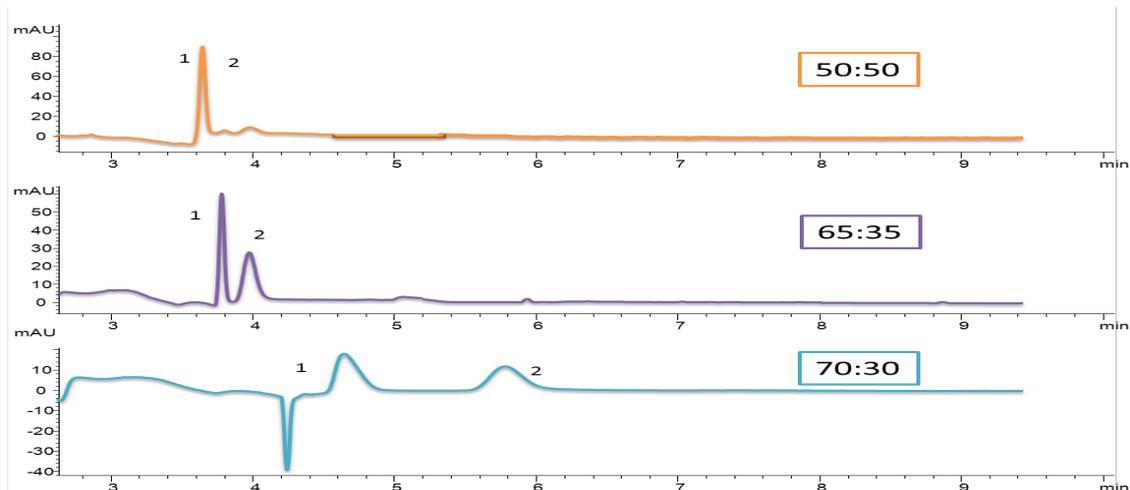
A) Metanol



**Figura 12.** Composición de la fase móvil: agua/metanol.

Según se observa en la figura para un porcentaje de metanol del 35% los analitos permanecen en la columna al tiempo de análisis ensayado. Al incrementar el porcentaje de metanol se van acortando los tiempos de retención de los analitos a la vez que se observa un incremento en la eficacia.

### B) Acetonitrilo



**Figura 13.** Composición de la fase móvil: agua/acetonitrilo.

Para el acetonitrilo en cambio se observa que a una proporción 1:1 agua/acetonitrilo los dos analitos en estudio coeluyen con el frente de la fase móvil, siendo necesario disminuir el porcentaje de disolvente orgánico para conseguir la resolución de ambos compuestos, a la vez que un adecuado tiempo de análisis. Se observa que una relación 70:30 permite separar los analitos y tener tiempos de análisis adecuados.

Se puede concluir por tanto que el acetonitrilo tiene mayor poder de elución que el metanol, permitiéndonos trabajar con un contenido bastante inferior en disolvente orgánico, lo que lo convierte en un método más respetuoso con el medio ambiente.

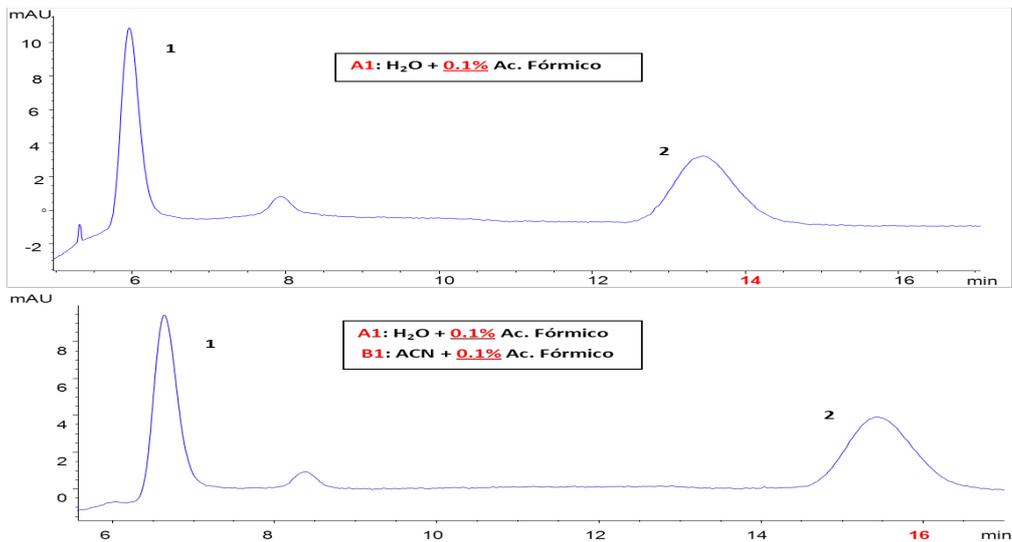
Hemos de tener en cuenta que ésta es la fase inicial de un estudio cuyo objetivo es, en un futuro, acoplar la espectrometría de masas como sistema de detección al cromatógrafo de líquidos. Este hecho nos ha condicionado la selección de los componentes a introducir en la fase móvil pues, todos ellos han de ser compatibles a posteriori con el espectrómetro de masas. Se evitó pues introducir sales o ácidos no volátiles.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

Una vez seleccionado el acetonitrilo como disolvente orgánico y manteniendo una relación agua: acetonitrilo 70:30, se ensayó la presencia de ácidos volátiles como ácido fórmico y ácido acético, tanto en la fase acuosa como en la fase orgánica.

### C) Ácido fórmico

a) Comparación del ácido fórmico en la fase acuosa y en las dos fases:

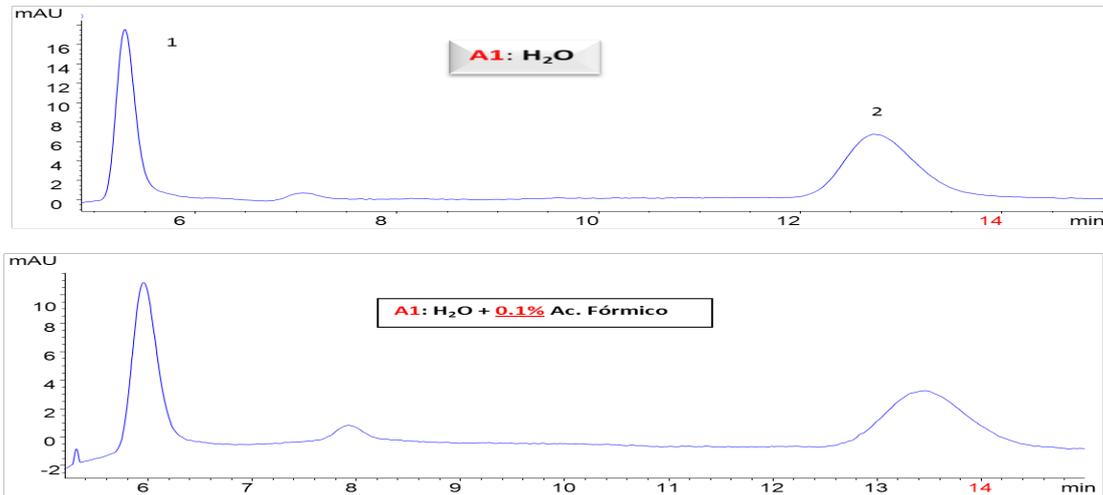


**Figura 14.** Comparación de diferentes cromatogramas con ácido fórmico en la fase móvil.

Según indica la figura no hace falta la adicción de ácido fórmico en la fase orgánica debido a que el cromatograma obtenido es parecido al cromatograma con ácido fórmico solo en la fase acuosa (A1), además de que se retrasan los picos.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

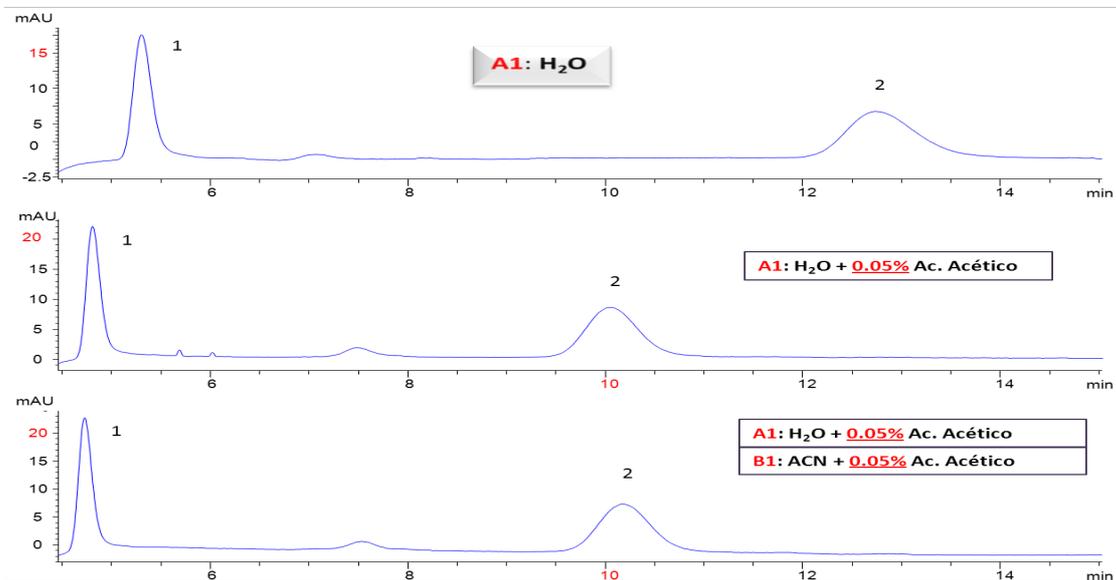
b) Comparación de ácido fórmico al 0.1 % y al 0.05% en la fase acuosa:



**Figura 15.** Cromatogramas a distintos porcentajes de ácido fórmico.

Según se observa en la figura la adición de ácido fórmico al 0,1% y al 0,05% no mejoran las señales cromatográficas en comparación con las obtenidas en ausencia de ácido, además de alargar los tiempos de análisis. Por lo tanto, no es necesario la adición de este ácido en la fase móvil acuosa.

### D) Ácido acético



**Figura 16.** Cromatogramas con ácido acético.

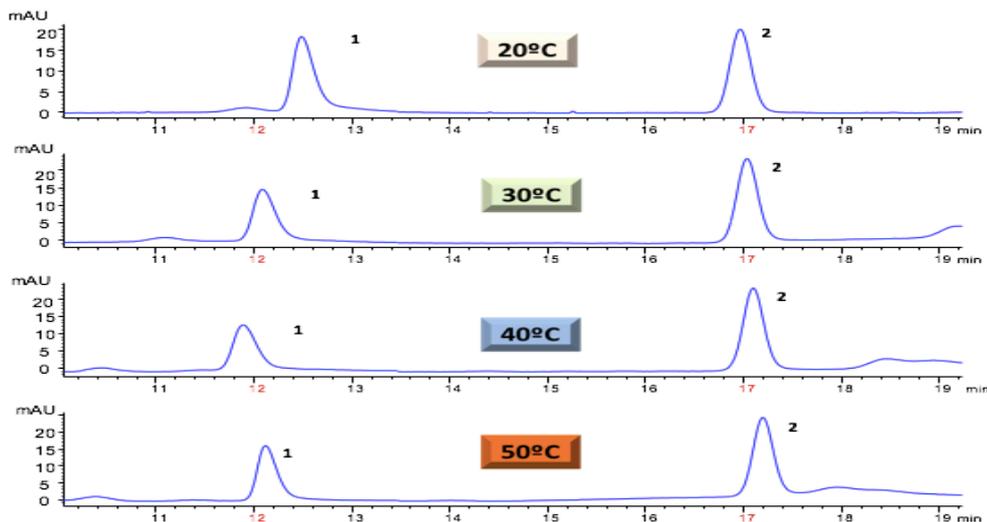
Conforme se observa en la figura se descartó el ácido acético de la fase orgánica (B1), porque daba una altura y unos tiempo de análisis parecidos al del cromatograma obtenido al añadir ácido acético solo en la fase acuosa (A1). También se observó que al introducir el ácido acético en la fase acuosa se acorta el tiempo de análisis del compuesto 2 (unos 3 minutos) y aumenta la eficacia fundamentalmente para el analito 1 como se indica a través del número de platos:

- analito 1: 5.297 y analito 2 : 1709 con agua + ácido. acético 0,05%
- analito 1 : 3.728 y analito 2 : 1.556 con agua

Por tanto se fija como fase móvil una mezcla ácido acético 0,05%/acetonitrilo en proporción 70:30.

### 5.3.1.2. Optimización de la temperatura

La temperatura de la columna puede afectar a los parámetros cromatográficos de la separación, como es el tiempo de retención y la eficacia de pico. Por ello, es un factor a evaluar en la optimización de un método. El estudio de la temperatura se realizó a 20, 30, 40 y 50°C utilizando como composición de la fase móvil la establecida en el epígrafe anterior y manteniendo el resto de parámetros: flujo de 9  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 8  $\mu\text{L}$  de volumen de inyección y una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{L}$  de cada una de las microcistinas.



**Figura 17.** Comparación de cromatogramas a diferentes temperaturas.

Como se puede observar en la Figura 17, al aumentar la temperatura se acorta ligeramente el tiempo de análisis del primer analito y también se observa una disminución en la altura de este compuesto. Para el compuesto que eluye en segundo lugar no se observa prácticamente cambio. Por lo tanto, mantenemos la temperatura de la columna a 20°C para análisis posteriores.

### 5.3.1.3 Estudio del gradiente de la fase móvil

Los cromatogramas obtenidos en las anteriores experiencias realizadas en modo isocrático nos indujeron a introducir la elución en gradiente puesto que la resolución entre los analitos era muy alta y se podía acortar el tiempo de análisis.

Se procedió a estudiar el gradiente de elución que permitía separar los analitos con una alta eficacia y en el menor tiempo posible utilizando como fase móvil una mezcla de agua conteniendo un 0.05% (v/v) de ácido acético y acetonitrilo (ACN).

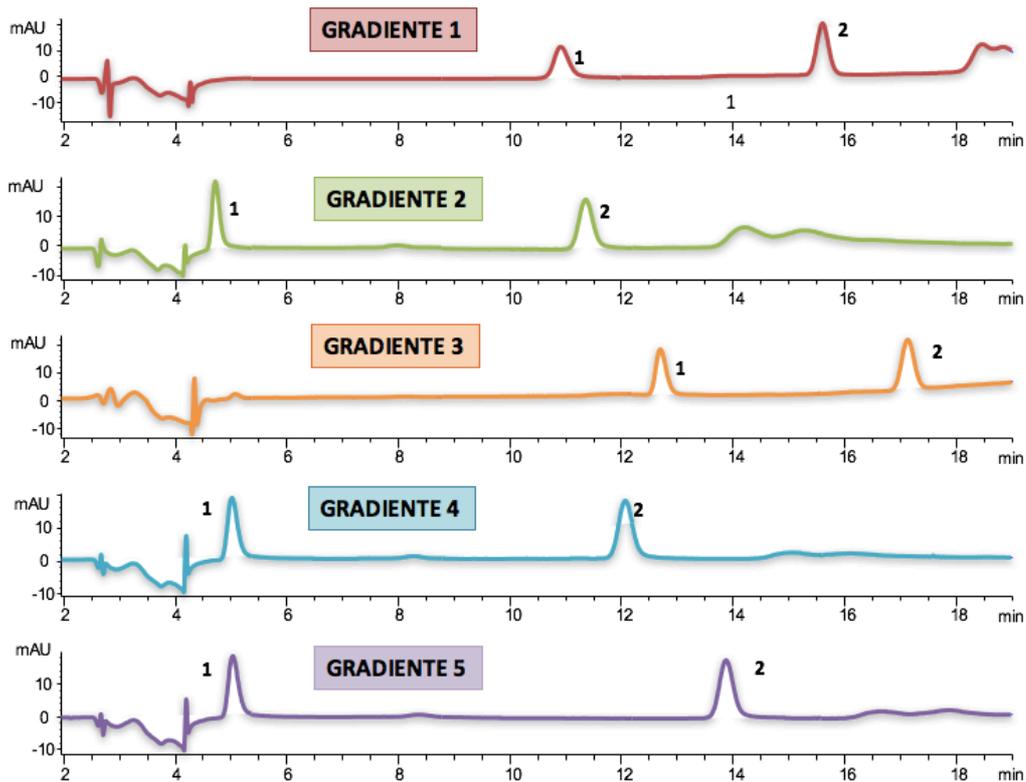
Las condiciones cromatografías empleadas para este estudio fueron: un flujo de 9  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 20°C y 8  $\mu\text{L}$  de volumen de inyección. La muestra inyectada era una mezcla de MC-LR y MC-RR a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{L}$ .

El estudio del gradiente se realizó con cinco pruebas de gradiente diferentes que se ilustran en la siguiente tabla (Tabla 15):

**Tabla 15.** Diferentes gradientes estudiados.

Tiempo (min)	Gradiente 1 %B	Gradiente 2 %B	Gradiente 3 %B	Gradiente 4 %B	Gradiente 5 %B
0	20	25	20	25	20
20	60	75	55	65	65
25	20	25	20	25	20
30	20	25	20	25	20

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



**Figura 18.** Comparación de los cinco gradientes ensayados.

En la Imagen 18 se muestra como al utilizar el segundo, cuarto y quinto gradiente el primer compuesto eluye muy próximo al frente de la fase móvil. Entonces se eligió el primer gradiente (11,035 min/ 15,618 min) debido a que los analitos eluyen antes que en el tercero (12,693 min/ 17,143) obteniéndose tiempos de análisis más cortos.

De este estudio inicial del gradiente de la fase móvil durante la separación, se obtuvo que la mejor separación cromatográfica se alcanzaba empleando el gradiente mostrado en la Tabla 18. Por lo tanto, la separación comienza con un 20% de la fase orgánica (B) que se incrementa a lo largo del análisis hasta llegar al 60% de B a los veinte minutos para lograr la elución total de los analitos. Posteriormente el % B se disminuye a las condiciones iniciales, manteniéndose durante cinco minutos, el cuál es el tiempo requerido para el reequilibrado de la columna.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

### 5.3.1.4 Flujo de la fase móvil

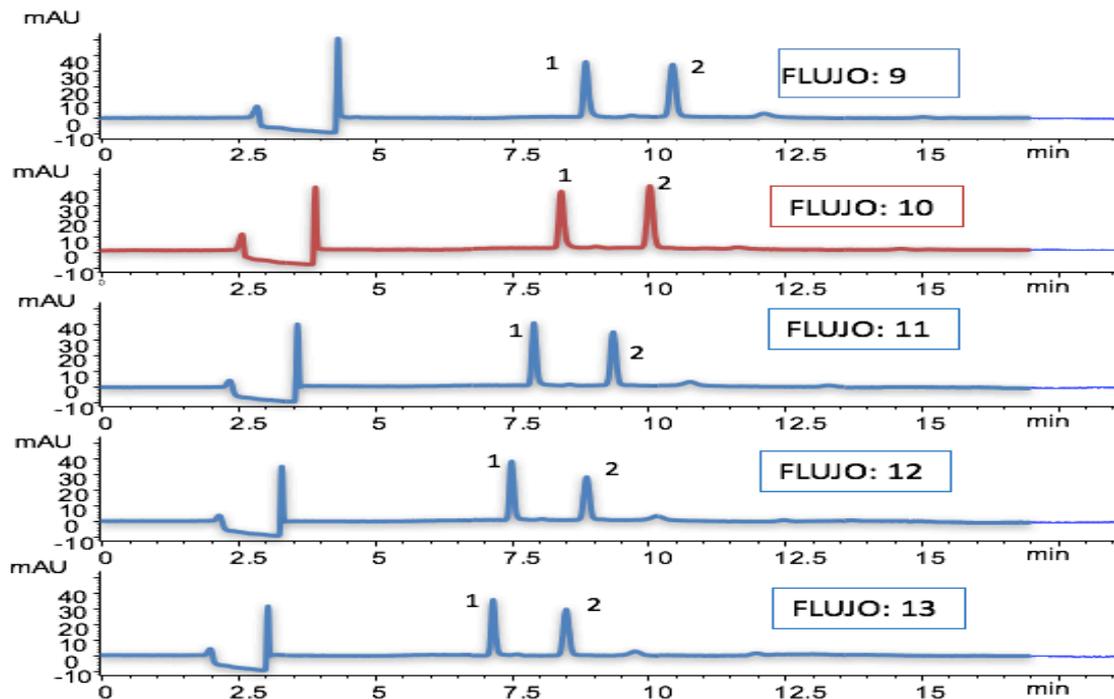
El objetivo del estudio era disminuir el tiempo de análisis mejorando o manteniendo eficacia (número de platos) y señal analítica (altura/área), puesto que la resolución es suficientemente alta en todos los casos.

Se estudió la influencia que ejercía el flujo de la fase móvil haciendo un barrido desde 9 $\mu$ l/min a 13 $\mu$ l/min con incrementos de 1 $\mu$ l/min. La Tabla 16 recoge los resultados obtenidos para los parámetros indicados y la Figura 18 muestra los cromatogramas correspondientes a cada flujo.

**Tabla 16.** Optimización del flujo de la fase móvil.

Flujo ( $\mu$ l/min)	Analitos	Tiempo (min)	Área (mau)	Altura (mau)	Nº platos
9	MC-RR	8.849	227.2	34.8	47.068
	MC-LR	10.44	263.1	33	40.790
10	MC-RR	8.398	239	36.5	47.235
	MC-LR	10.025	305.5	40.1	41.544
11	MC-RR	7.9	223.9	39.8	42.395
	MC-LR	9.353	238.3	34	41.378
12	MC-RR	7.491	205.3	37.6	47.292
	MC-LR	8.865	198	27.2	41.700
13	MC-RR	7.157	191.1	35.2	41.974
	MC-LR	8.496	213.9	28.8	29.716

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



**Figura 19.** Cromatogramas para la optimización del flujo de la fase móvil.

Como se puede observar el tiempo de análisis disminuye para ambos compuestos a medida que aumenta el flujo de la fase móvil. Así mismo se produce una cierta disminución en las áreas al aumentar el flujo por encima de  $10 \mu\text{L}/\text{min}$ ., observándose una tendencia similar en el número de platos calculados para cada compuesto. Se selecciona por tanto, como situación de compromiso, un flujo de  $10 \mu\text{L}/\text{min}$  para estudios posteriores.

### 5.3.1.5 Volumen de inyección

El volumen de inyección no se evaluó porque se quería conseguir la máxima sensibilidad para los analitos y se eligió el máximo que el equipo permitía que es  $8 \mu\text{L}$  dada la elevada resolución que existe entre ambos analitos.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

### 5.3.1.6 Reoptimización del gradiente

Una vez optimizadas las principales variables cromatográficas se llevó a cabo una reoptimización del gradiente de la fase móvil, empleando los valores previamente seleccionados para cada variable, con la intención de reducir el tiempo de análisis manteniendo la máxima eficacia y sensibilidad, puesto que la separación entre ambos compuestos es muy alta.

A continuación, se exponen tablas correspondientes a los diferentes gradientes ensayados y el gradiente óptimo elegido final.

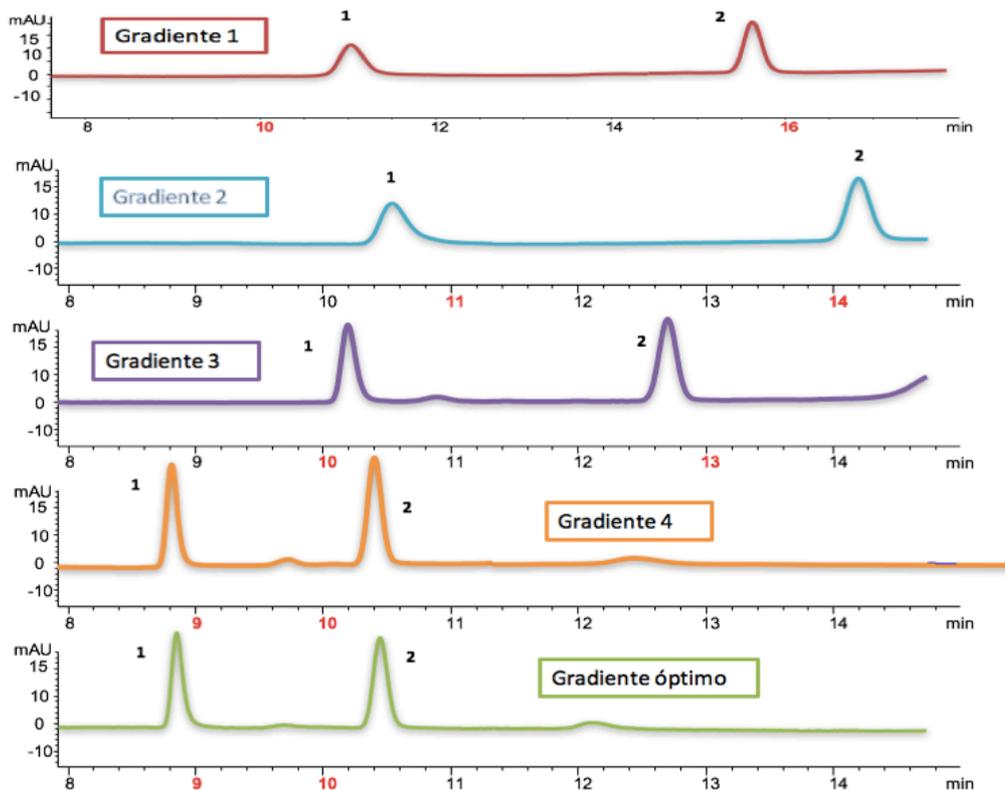
**Tabla 17.** Resumen de los gradientes ensayados

%B	Tiempo (min) Gradiente 1	Tiempo (min) Gradiente 2	Tiempo (min) Gradiente 3	Tiempo (min) Gradiente 4
20	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
60	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>5</b>
20		<b>20</b>	<b>15</b>	<b>10</b>
20		<b>25</b>	<b>20</b>	<b>15</b>

**Tabla 18.** Gradiente óptimo

Tiempo (min)	%B
<b>0</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	60
<b>12</b>	60
<b>17</b>	<b>20</b>
<b>22</b>	<b>20</b>

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



**Figura 20.** Comparación de los gradientes ensayados.

Según se observa, al incrementar el porcentaje de acetonitrilo de 20% a 60% en 5 minutos, ambos compuestos presentan tiempos de elución menores, ahora bien salen cuando ya se está bajando el porcentaje de fase orgánica para recuperar las condiciones iniciales. Este hecho puede ser perjudicial cuando se analizan muestras reales, donde es necesario eliminar posibles restos antes de bajar el porcentaje de disolvente orgánico. Es por ello que decidimos introducir una nueva etapa en la que mantenemos durante 7 minutos un 60% de acetonitrilo para posteriormente recuperar las condiciones iniciales en 5 minutos y reequilibrar la columna durante otros 5 min.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

### 5.3.1.7 Identificación de las señales cromatográficas

Finalmente se llevó a cabo la identificación de cada una de las microcistinas estudiadas. Para ello se preparó una disolución de cada una de ellas por separado y se inyectaron en las condiciones establecidas. Se concluyó de esta forma que el compuesto 1 correspondía a MC-RR y el compuesto 2 a MC-LR.

El detector de diodos en fila utilizado nos permite obtener el espectro de absorbancia de cada uno de los analitos. En las Figura 20 y 21 se recogen los espectros correspondientes a ambas microcistinas.

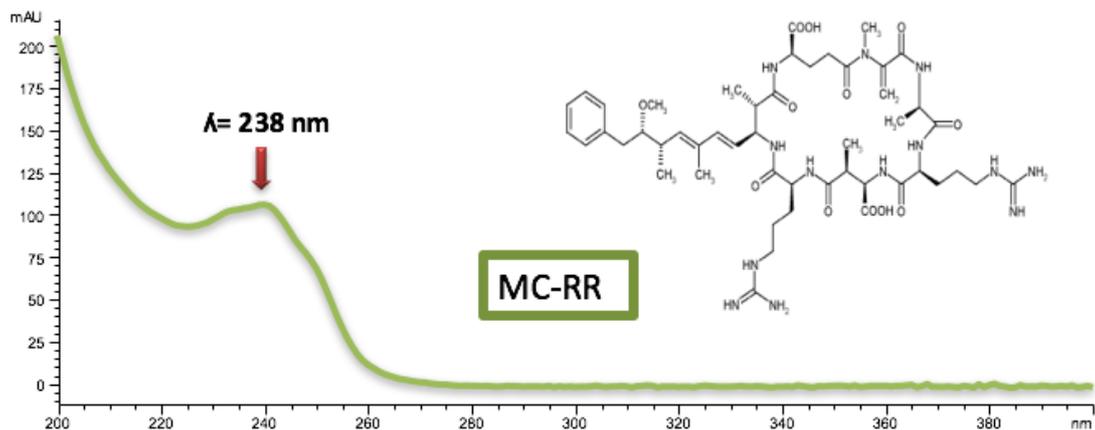


Figura 20. Espectro de absorción de la microcistina RR.

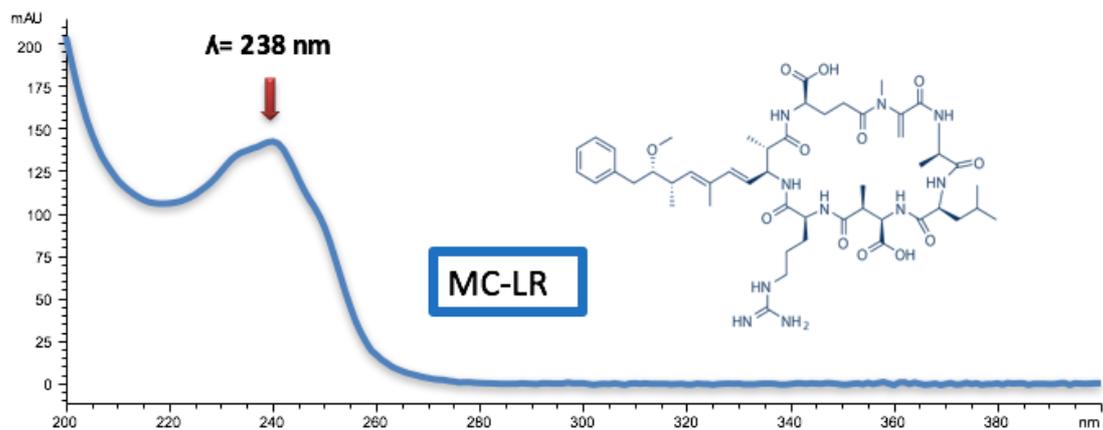


Figura 21. Espectro de absorción de la microcistina LR.

## **Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas**

Según se observa ambas presentan un máximo de absorbancia a 238 nm coincidiendo con el valor encontrado en bibliografía y que ha sido el utilizado para realizar todos los estudios de optimización.

### **5.3.2 Validación**

Una vez optimizado el método CLC-UV-Vis se ha abordado la validación para su aplicación a muestras de agua hipersalina.

#### **5.3.2.1 Validación con agua ultrapura**

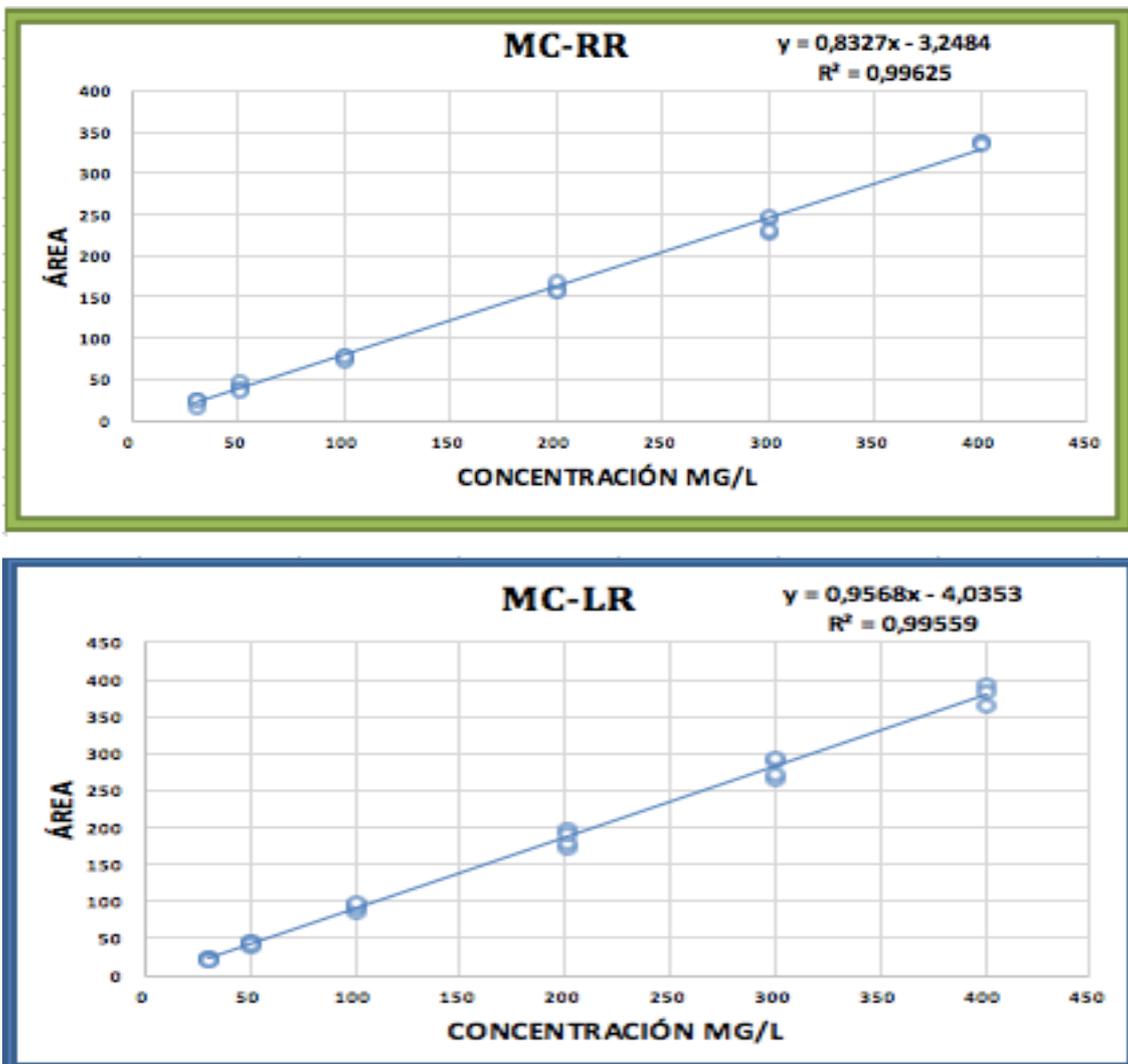
En primer lugar se llevó a cabo la validación del método empleando agua ultrapura para poder estudiar a posteriori la posible existencia de efecto matriz.

Para la realización de las funciones de calibrado se prepararon disoluciones acuosas a diferentes concentraciones a partir de la disolución intermedia de 1 mg/L. La linealidad de la respuesta se comprobó a partir de seis niveles de concentración correspondientes a 30, 50, 100, 200, 300, 400 µg/L. Cada nivel de concentración se preparó por duplicado y cada disolución se inyectó dos veces, tenemos por tanto cuatro réplicas para cada concentración.

Las rectas de calibrado se establecieron considerando las áreas de pico relativas en función de la concentración de cada analito. La representación gráfica de las rectas de calibrado se muestra en la Figura 22 para el agua ultrapura.

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

- a) Funciones de calibrado calculadas para las dos microcistinas analizadas en agua ultrapura.



**Figura 22.** Rectas de calibrado para los dos analitos MC-RR y MC-LR en agua ultrapura.

Los parámetros estadísticos calculados por medio de la regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad del método, se muestran en la Tabla 19. Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos confirman que las respuestas para MC- RR y MC- LR se ajustan a un modelo lineal en el rango estudiado.

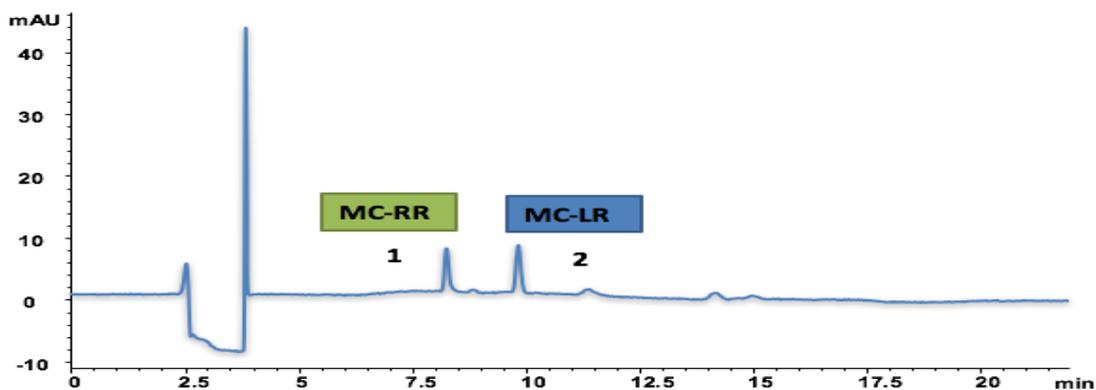
## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de la relación señal/ruido como recomienda la IUPAC [41]. Para el cálculo de los límites, se estableció como criterio una relación señal/ruido de 3 para el límite de detección (S/N=3) y una relación de 10 para el límite de cuantificación (S/N=10). Para ello se utilizaron los datos de la altura de pico de cada analito a la concentración más baja, en este caso de 30 µg/L.

**Tabla 19.** Parámetros de calidad de la MC-RR y MC-LR en agua ultrapura.

Analito	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LDR (µg/L)	R <sup>2</sup>
MC-RR	6,2	20,5	20,5-400	0,9962
MC-LR	5,1	16,8	16,8-400	0,9956

Límite de detección (LOD); Límite de cuantificación (LOQ); Rango dinámico lineal (LDR).



**Figura 23.** Cromatograma en agua ultrapura con una concentración de 100 µg/L.

[41] Analytical Methods Committee. (1987). Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst*, 112(2), 199-204.

### 5.3.2.2 Validación con agua hipersalina

Seguidamente se establecieron las funciones de calibrado a los mismos niveles de concentración, empleando agua hipersalina tomada de la balsa NTO con fecha 20 de mayo de 2017, empleando ésta como matriz representativa en la que previamente se confirmó la ausencia de señal correspondiente a los compuestos en estudio.

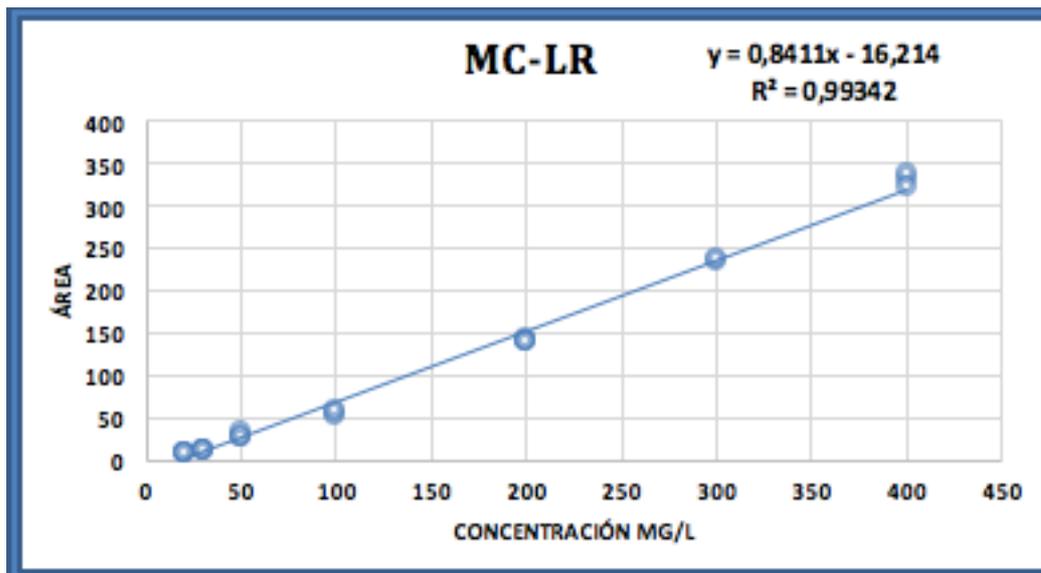
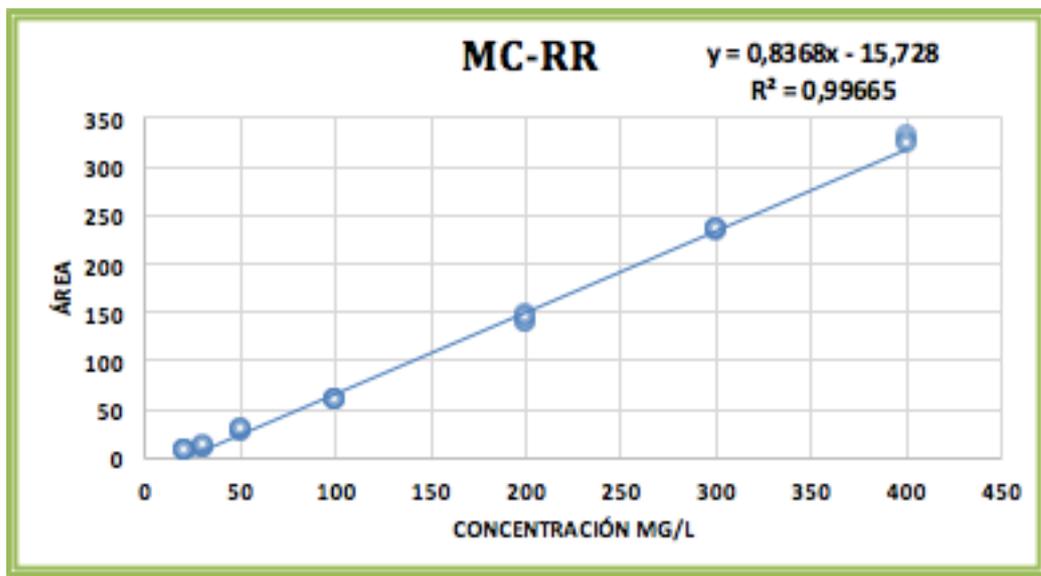


Figura 24. Rectas de calibrado para los dos analitos MC-RR y MC-LR en aguas hipersalinas.

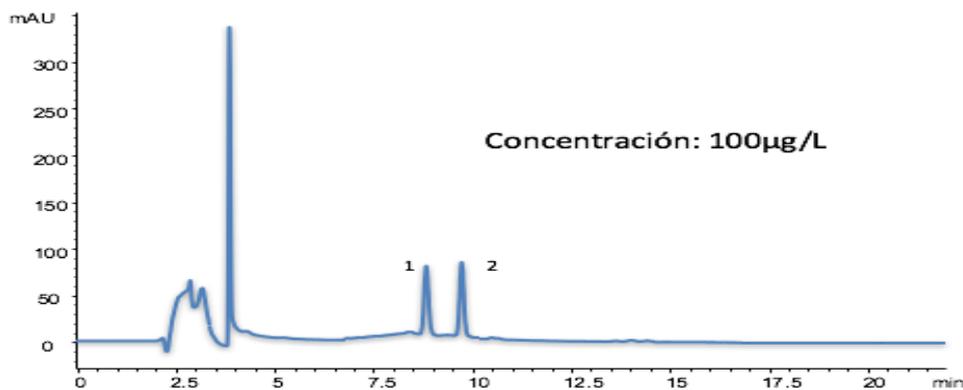
## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

**Tabla 20.** Parámetros de calidad de MC-RR y MC-LR en agua hipersalina.

Analito	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	LDR ( $\mu\text{g/L}$ )	$R^2$
MC-RR	8,8	29,6	29,6-400	0,9966
MC-LR	8,8	29,3	29,3-400	0,9934

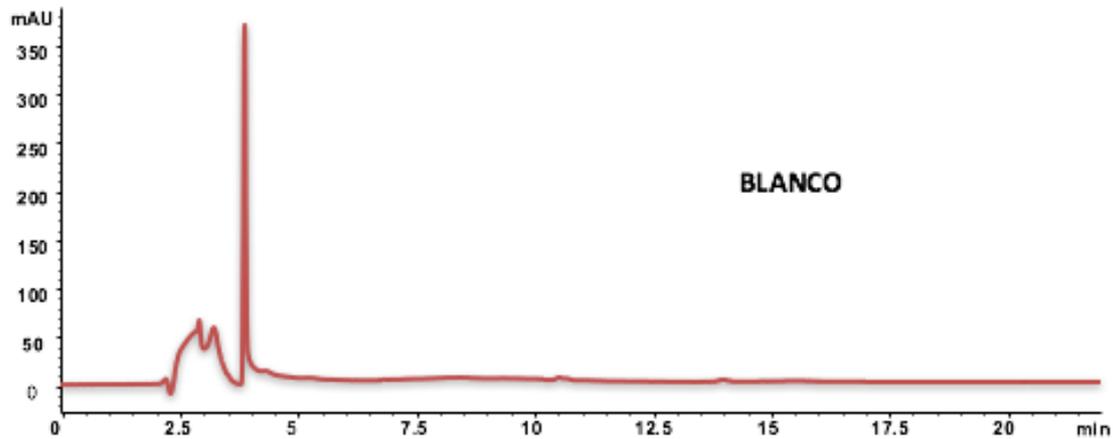
Los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación son superiores en agua hipersalina. Se observa además una disminución de la pendiente, y por tanto de la sensibilidad, en la función de calibrado obtenida para MC-LR en agua hipersalina lo que indica la existencia de efecto matriz para este compuesto, no siendo así para MC-RR. Se concluye pues que para MC-LR es necesario llevar a cabo el calibrado en presencia de matriz, mientras que para MC-RR se puede emplear agua ultrapura.

La Figura 25 recoge el cromatograma obtenido para una disolución de 100  $\mu\text{g/L}$  en agua hipersalina.



**Figura 25.** Cromatograma con agua de la balsa de nacimiento sembrada a una concentración de 100  $\mu\text{g/L}$ .

## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



**Figura 26.** Cromatograma de un blanco de la balsa de nacimiento en condiciones reales.

### 5.3.3 Análisis de muestras

En todos los casos se registraron los cromatogramas correspondientes por duplicado, empleando las condiciones optimizadas y no se obtuvo señal alguna de las microcistinas en estudio. Se puede concluir por tanto que su concentración está por debajo del límite de detección establecido para agua hipersalina que era de 8,8  $\mu\text{g/L}$ .

En estudios posteriores nos planteamos desarrollar un tratamiento de muestra que nos permita alcanzar el límite recomendado por la OMS de 1,0  $\mu\text{g/L}$  para MC-LR en agua de bebida y recreativa y que está siendo adoptado por muchos países.

### **6. CONCLUSIONES**

El empleo de la cromatografía líquida capilar nos ha permitido proponer un método de análisis rápido, selectivo y respetuoso con el medio ambiente por el reducido volumen de fase móvil consumida.

El método desarrollado se ha aplicado al análisis de muestras acuosas hipersalinas tomadas de las tres balsas localizadas en las salinas de la Malahá, en tres momentos diferentes: 20 de mayo, 26 de junio y 20 de julio coincidiendo con la época de mayor proliferación.

En todos los casos la concentración de ambas microcistinas está por debajo del límite de detección establecido.

Se confirma la hipótesis inicial de la no existencia de microcistinas en el agua de los cultivos y se está desarrollando un método para evaluar su presencia en las microalgas.

### **ABREVIATURAS**

### **ANEXO**

### ABREVIATURAS

En la mayoría de los casos se ha empleado la abreviatura o acrónimo anglosajón debido a su empleo más generalizado.

A1: Fase acuosa

A2: Fase orgánica

ACN: Acetonitrilo

ASP: Amnesic Shellfish Poison

CL: Cromatografía de Líquidos

CLC: Cromatografía de líquidos capilar

CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Ácido fórmico

C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: Ácido acético

DHA: Ácido docosahexaenoico

DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva

EPA: Ácido eicosapentaenoico

ETAP: Estación de tratamiento de agua potable

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

MC-RR: Microcistina RR

MC-LR: Microcistina LR

MCs: Microcistinas

MeOH: Metanol

MINECO: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad

PSP: Paralytic Shellfish Poison

UPLC: Cromatografía líquida de ultra alta eficacia

UV: Ultravioleta

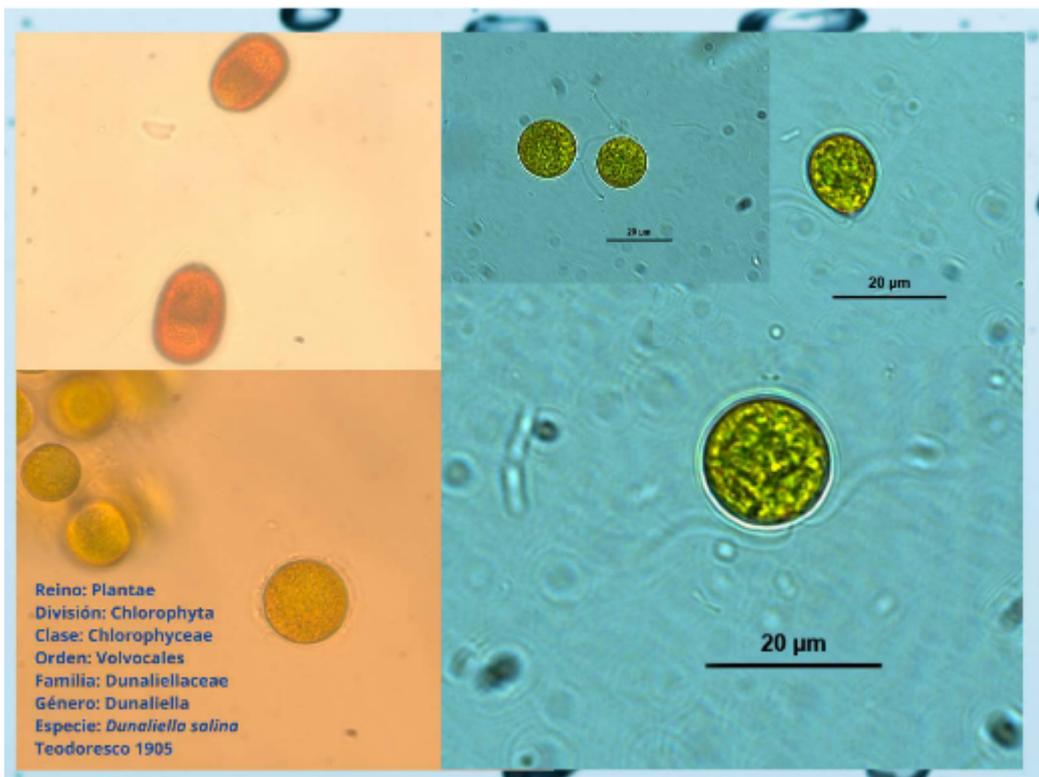
SPE: Extracción en fase sólida

# ANEXO I

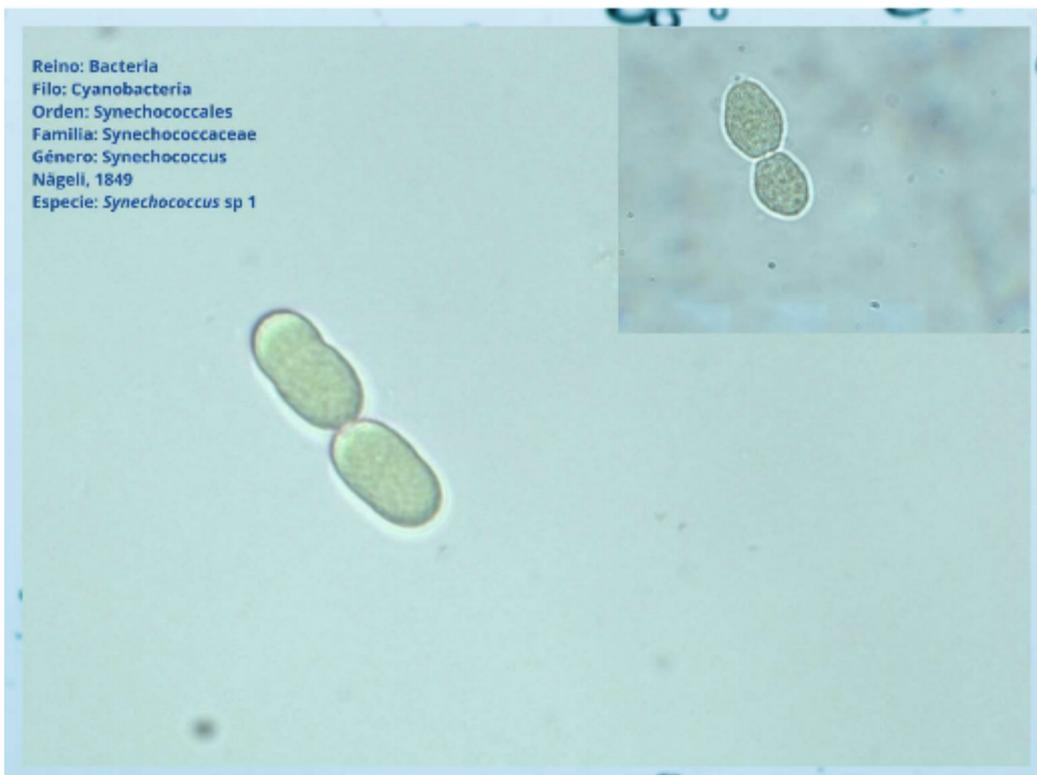
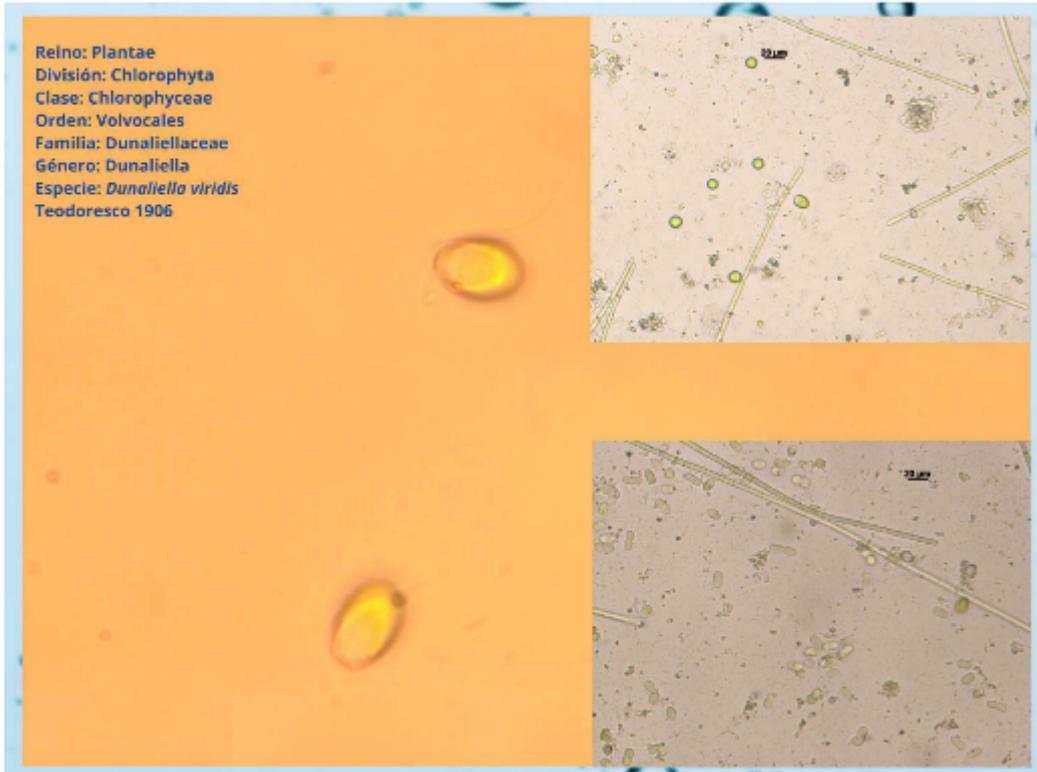
## FOTOS DE LAS ESPECIES DESDE EL MICROSCOPIO QUE SE ENCUENTRA EN LAS INSTALACIONES DE LA MALAHÁ (GRANADA)



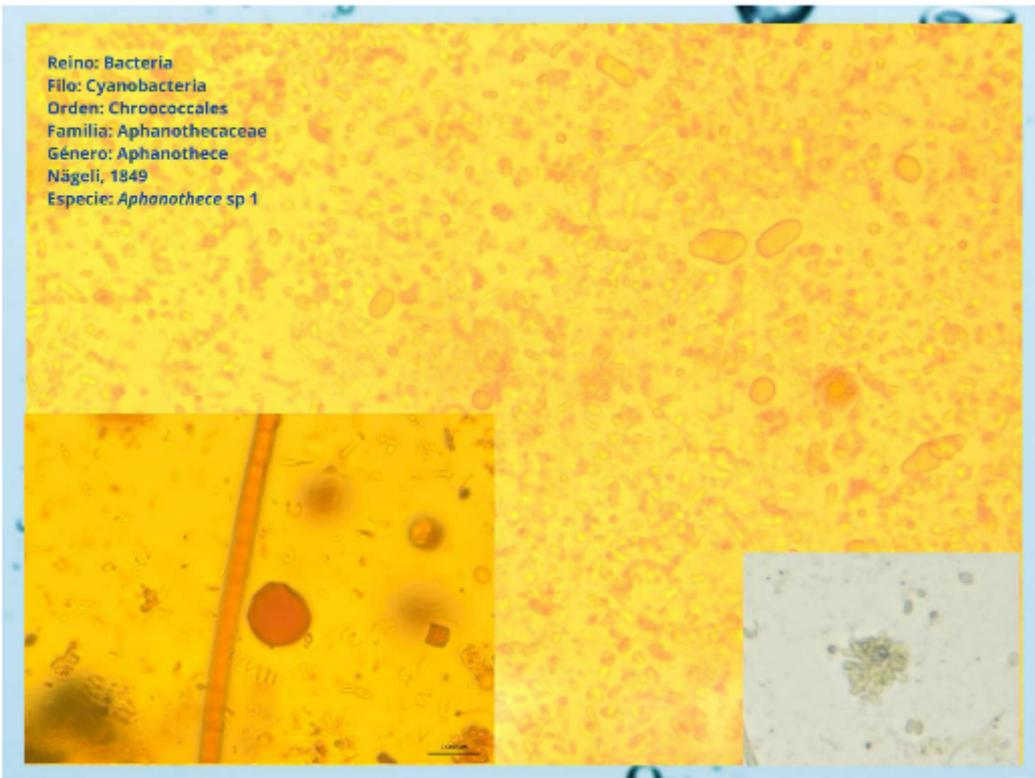
## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



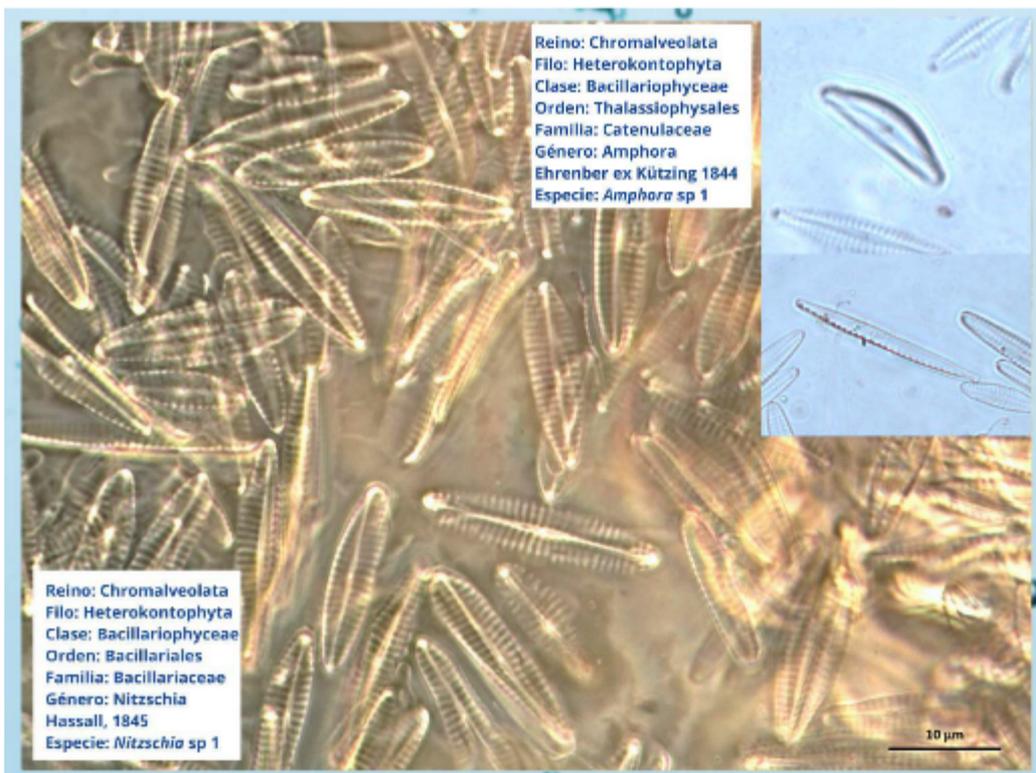
## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas



## Análisis de microcistinas en cultivos de microalgas hipersalinas

