

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 197**

51 Int. Cl.:

A61K 36/02 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2007 E 07818001 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2032122**

54 Título: **Extractos de Aphanizomenon flos-aquae (AFA de Klamath), compuestos activos y sus usos**

30 Prioridad:

27.06.2006 US 816594 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.09.2016

73 Titular/es:

**NUTRATEC S.R.L. (100.0%)
VIA I MAGGETTI 14 LOCALITÀ SASSO
61029 URBINO, IT**

72 Inventor/es:

**SCOGGIO, STEFANO;
CANESTRARI, FRANCO;
BENEDETTI, SERENA y
ZOLLA, LELLO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 582 197 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extractos de *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA de Klamath), compuestos activos y sus usos

La presente invención proporciona extractos acuosos de la microalga *Aphanizomenon Flos Aquae Aquae* Ralfs ex Born. & Flah. Var. *flos aquae* (AFA de Klamath) y los componentes biológicamente activos de la misma, dotados de propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales. Además, la invención proporciona composiciones nutricionales, cosméticas y farmacéuticas que contienen cantidades eficaces del extracto o de los componentes activos del mismo, a saber, ficocianina de AFA con su complejo de C-ficocianina/ficoeritrocianina, y fitocromo de AFA, solo o en combinación con cofactores contenidos en las algas para su uso en la profilaxis o el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones que conllevan una inflamación aguda o crónica y la degeneración oxidativa de células o tejidos del cuerpo, o la proliferación celular no controlada.

Antecedentes de la invención

Aphanizomenon Flos Aquae (AFA), que es uno de los numerosos tipos de algas verdeazuladas, se encuentra en abundancia en la parte alta del lago Klamath, en el sur de Oregón (EE. UU.). Se trata de una de las pocas microalgas comestibles, y se diferencia de otras microalgas cultivadas en estanques, tales como la espirulina y la clorella, en que crece silvestre en un entorno óptimo que le permite desarrollar un perfil nutricional verdaderamente notable que incluye una amplia gama de vitaminas y minerales orgánicos, proteínas y aminoácidos, y ácidos grasos omega-3. También se sabe que contiene un cierto número de nutrientes dotados de propiedades antioxidantes como la clorofila y los carotenos. Varios estudios realizados en los últimos años han demostrado importantes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la ficocianina del microalga espirulina verde-azulada; más recientemente, se han notificado propiedades antioxidantes *in vitro* de un extracto crudo de AFA (Benedetti S., S. Scoglio, Canestrari F., y col., *Antioxidant properties of a novel phycoyanin extract from the blue-green alga Aphanizomenon Flos Aquae*, en *Life Sciences*, 75 (2004): 2353-2362).

Estado de la técnica

Pugh N. y col, *Planta Medica* Vol. 67, 737-742, 2001, desvelaron el aislamiento de tres preparaciones de polisacáridos de alto peso molecular con actividad inmunoestimuladora a partir de *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos aquae* y *Chlorella pyrenoidosa*.

Benedetti S. y col, *Progress in Nutrition* Vol. 6, n. 3, 186-189, 2004, informa sobre un estudio de las propiedades antioxidantes de un extracto de ficocianina (PC) del microalga *Aphanizomenon Flos-Aquae*. El método de extracción no se describe ni la PC está aislada del extracto. La ficocianina se identifica de forma general como la producida por cianobacterias.

Canestrari F. y col., *Progress in Nutrition* Vol. 8, N. 2, 99-103, 2006, informa de un estudio sobre las propiedades antiinflamatorias de un extracto de PC de AFA. El método de extracción no se describe ni la PC está aislada del extracto. Los resultados se corresponden con los notificados previamente para la ficocianina aislada de *Spirula platensis*.

Divulgación de la invención

La invención produce extractos acuosos de microalgas de Klamath (*Aphanizomenon Flos Aquae Aquae* Ralfs ex Born. & Flah. Var. *flos aquae*), que concentran los componentes activos del alga, a saber:

- a) un complejo de ficobiliproteína específico, único de las algas AFA, que contiene i) un ficobilisoma con C-ficocianina (C-PC) y ficoeritrocianina (PEC), en adelante indicado como «ficocianinas de AFA», y que incluye su ficoviolobilina cromófora específica; ii) un fitocromo de AFA específico (en adelante, «fitocromo de AFA»);
- b) MAA (aminoácidos de tipo micospolina), clorofila y carotenos.

El proceso de extracción emplea técnicas de centrifugación y separación por exclusión de tamaño que pueden modularse para modificar la concentración de los diferentes componentes. Para garantizar una concentración adecuada de los distintos componentes, en la primera fase se prepara un extracto acuoso (denominado en adelante extracto básico) de acuerdo con los pasos siguientes:

- a) congelar el alga AFA recién cosechada y descongelarla o, si el material de partida es polvo de AFA seco, sonicar el polvo de AFA diluido en agua para romper las células;
- b) centrifugar el producto de la etapa a) para separar el sobrenadante (que conserva la mayor parte de la fracción citoplasmática) del precipitado (que mantiene la mayor parte de la fracción de pared celular);
- c) recoger el sobrenadante que contiene los componentes hidrosolubles (extracto básico).

A continuación, las fracciones hidrosolubles se concentran de manera adicional d) haciendo pasar el sobrenadante a través de una membrana de ultrafiltración. En particular, para preparar extractos concentrados en componentes hidrosolubles, el extracto acuoso primario descrito anteriormente (extracto básico) se somete a una ultrafiltración de exclusión por tamaño con una membrana con un umbral peso molecular de 30 kDa, mediante la cual se obtiene un

material retenido (denominado extracto B) y un filtrado. El extracto B contiene una mayor concentración de ficocianinas de AFA (C-PC + PEC) y del fitocromo de AFA. Curiosamente, a pesar de que los MAA tienen un peso molecular muy por debajo del tamaño de corte empleado, el retenido también aumenta la concentración de MAA. El filtrado, por otra parte, tiene una mayor concentración de carotenos, clorofila y ácidos grasos esenciales.

- 5 Los componentes lipófilos del extracto están representados principalmente por carotenos, clorofila y ácido alfa-linolénico (18:3n-3), todos los cuales están presentes en cantidades relativamente altas en las algas AFA. Estos componentes son, en parte, retenidos en el sobrenadante (extracto básico), pero la mayor parte de ellos están presentes en el precipitado resultante de la centrifugación en la etapa b) anterior. Este precipitado puede someterse entonces a un proceso adicional de extracción dirigido a concentrar las sustancias liposolubles antes mencionadas.
- 10 La concentración de las sustancias liposolubles se obtiene preferiblemente a través de una extracción a base de etanol, de acuerdo con los pasos siguientes:
- a) suspender el precipitado secado en una solución de etanol al 100 %, homogeneizar y mantener el homogeneizado bajo agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad;
 - b) centrifugar la suspensión resultante a 3000 rpm durante 5' a 4 °C;
 - 15 c) recoger el sobrenadante;
 - d) opcionalmente, someter el precipitado a una segunda extracción con etanol siguiendo los pasos a) a c);
 - e) secar el sobrenadante para obtener un concentrado liposoluble (extracto C).

La fracción enriquecida con componentes liposolubles obtenida de esta manera se puede añadir al filtrado de la ultrafiltración para conseguir la concentración más alta posible de sustancias liposolubles que mejoran los efectos de las sustancias biológicamente activas ya presentes en los extractos.

20

Los extractos según la invención se pueden proporcionar en forma de suplementos nutricionales, farmacéuticos o productos cosméticos.

Los componentes que conservan o mejoran las propiedades antioxidantes del extracto se han aislado y caracterizado fisicoquímicamente. El tipo específico de ficocianina de AFA (C-PC/PEC), la ficoviolobilina cromófora (PVB), el fitocromo de AFA específico y los aminoácidos de tipo microsporina (MAA) porphyrina y shinorina resultaron ser los más activos, bien individualmente o en diversas combinaciones, y su actividad antioxidante aumentó aún más mediante otros componentes como la clorofila, el beta-caroteno, los carotenoides provitamina A y los carotenos xantófilos como cantaxantina, vitaminas y minerales. Además de su actividad antioxidante demostrada, se halló que tanto el extracto básico como las ficocianinas de AFA purificadas inhiben de forma significativa la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2); esta propiedad se confirmó luego para el extracto básico que, mediante la inclusión tanto de la PC de AFA como de otras moléculas antiinflamatorias, demostró ser capaz de prevenir y/o suprimir la inflamación en un modelo animal *en vivo*. Además, analizada en una línea celular tumoral, la ficocianina de AFA mostró poseer una alta actividad antiproliferativa.

25

30

Por consiguiente, la invención incluye además una composición nutritiva, cosmética o farmacéutica que contiene como principio activo un extracto de microalgas de Klamath o un componente activo aislado y purificado del mismo, esto es, el tipo específico de ficocianinas de AFA (C-PC/PEC), tan presente en AFA como en el fitocromo de AFA, combinado de forma opcional con cofactores o coadyuvantes seleccionados de clorofila, beta-caroteno, carotenoides provitamina a, carotenos xantófilos, cantaxantina, vitaminas y minerales, y combinado de forma opcional con vehículos o excipientes nutricional, cosmética o farmacéuticamente aceptables. Para preparar las composiciones de acuerdo con la invención, los diferentes extractos líquidos mencionados anteriormente se pueden utilizar tal cual o secarse mediante métodos como la liofilización, el secado por pulverización y otros.

35

40

En una realización preferida, las composiciones nutricionales adoptan la forma de suplementos dietéticos en forma de comprimidos, cápsulas y bebidas útiles para aumentar o respaldar las defensas naturales frente a patógenos y capturar las especies oxidantes producidas por los procesos metabólicos, inflamatorios y de envejecimiento. En otra realización preferida, las composiciones cosméticas adoptan la forma de preparaciones tópicas como emulsiones, geles, lociones, polvos, colirios, en concreto, pomadas o cremas, para el uso en la prevención o el tratamiento de condiciones dermatológicas o relacionadas con la edad, y como agentes fotoprotectores para prevenir el envejecimiento de la piel y la degeneración fotooxidativa de la piel y el cabello.

45

En otra realización preferida adicional, las composiciones farmacéuticas son en forma de comprimidos, cápsulas, bolsitas, jarabes, supositorios, viales y ungüentos, y se pueden utilizar para prevenir o tratar patologías mediadas por radicales libres, inflamaciones o neoplasias.

50

Descripción detallada de la invención

Determinación estructural y características específicas de los ficobilisomas del alga AFA (ficocianinas de AFA)

55 En las células cianobacterianas intactas, las ficocianinas (PC) están presentes en su forma funcional en el interior del ficobilisoma ($\alpha\beta$)₆ (1). Tras la desintegración de la célula, la proteína se puede encontrar en diferentes estados de agregación (monómeros, dímeros, trímeros, hexámeros) según el organismo analizado. En el caso de las algas AFA

de Klamath, el análisis electroforético de la PC, tanto contenida en los extractos de AFA como purificada a partir del propio extracto, ha demostrado que la proteína se encuentra en su mayor parte en su forma trimérica ($\alpha\beta$)₃, con un peso molecular total de 121000. Un monómero $\alpha\beta$ pesa aproximadamente 40000 (subunidad 18500 α + subunidad 21900 β). La mayoría de los estudios sobre la PC purificada a partir de espirulina indica, por el contrario, que en la espirulina la proteína se encuentra en la forma monomérica $\alpha\beta$ con un peso molecular de aproximadamente 37500, lo que muestra un estado de agregación distinto respecto a la PC purificada a partir de AFA.

El análisis cromatográfico de los ficobilisomas de la AFA también ha demostrado que, como en otras especies de cianobacterias, la subunidad α de PC se une a un grupo prostético, mientras que la subunidad β se une a dos. El grupo prostético o cromóforo recibe el nombre de ficocianobilina (PCB) y es responsable tanto del color azul de la proteína como de su poder antioxidante (2).

Una diferencia fundamental entre la AFA y la espirulina se basa en la diferente estructura del ficobilisoma. A diferencia de la espirulina, el ficobilisoma de AFA de Klamath no contiene el pigmento aloficocianina, sino únicamente el pigmento c-ficocianina unido a un componente estructural que falta en la espirulina, concretamente la ficoeritrocianina (PEC). La PEC es un pigmento fotosintético que hasta la fecha solo se ha identificado en un número limitado de especies de cianobacterias (3). PEC tiene una estructura química muy similar a la de la PC, que está compuesta por las dos subunidades α y β que se asocian para formar monómeros y trímeros. Sin embargo, mientras que cada monómero de PC une tres moléculas de PCB, PEC posee la característica única de unir dos moléculas de PCB a la subunidad β y una molécula de ficoviolobilina (PVB) a la subunidad α , que es responsable del color púrpura del pigmento.

El ficobilisoma de las algas de Klamath está constituido en particular por la unión de c-ficocianina y ficoeritrocianina, y esta estructura cualitativamente distinta del ficobilisoma de las algas AFA de Klamath añade un factor decisivo adicional que distingue la AFA de la espirulina y otras algas verde-azuladas.

La figura 1 compara los componentes del lisado celular de AFA con los de otra cianobacteria bien conocida, la *Synechocystis* PCC 6803. En ambas cianobacterias es posible ver la banda azul que representa el ficobilisoma, pero en las algas AFA el ficobilisoma presenta una masa molecular inferior, lo que confirma que, a diferencia de las microalgas comunes como la espirulina, en el ficobilisoma de AFA solo hay ficocianinas, pero no aloficocianinas. Por otra parte, la figura 1 muestra que en AFA también está presente una banda de color morado claro (señalada con la flecha) que es típica de las ficoeritrocianinas, lo que demuestra su presencia en el ficobilisoma de las algas de Klamath.

Cada banda azul se ha analizado adicionalmente mediante HPLC conectada al espectrómetro de masas (HPLC-RP-ESIMS). Gracias a los diferentes tiempos de retención, se han separado e identificado las proteínas del ficobilisoma en función de su masa molecular. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas. En primer lugar, se puede observar que mientras que en la *Synechocystis* (Tabla 1) están presentes tanto la ficocianina (cpcA a 28,2 minutos y cpcB a 28,9 minutos) como la aloficocianina (apcA a 30,7 minutos y apcB a 31,2 minutos), en AFA (Tabla 2) solo está presente la ficocianina (cpcA a 28,8 minutos y cpcB a 30,0 minutos). En segundo lugar, en AFA se ha identificado una proteína con una masa molecular de 19469 que no está presente en *Synechocystis* y que se corresponde con la subunidad beta de la ficoeritrocianina con dos bilinas adjuntas (PeCB a 25,0 minutos).

TABLA 1: proteínas presentes en el ficobilisoma de *Synechocystis*

Tiempo de retención (minutos)	Masa molecular medida	Masa molecular prevista	Proteína [organismo homólogo]	Número NCBI de acceso
14,5	9322	9322	cpcD	gi 16329820
22,6	32505	32520	cpcC	gi 16329821
	32388	30797	cpcC	gi 16329822
24,6	28770	27392	cpcG	gi 16329710
24,8	28885	28522	cpcG	gi 16332194
28,2	18173	17586	cpcA (sub α ficocianina)	gi 2493297
28,9	19313	18126	cpcB (sub β ficocianina)	gi 2493300
30,7	17866	17280	apcA (sub α aloficocianina)	gi 266765
31,2	17816	17215	apcB (sub β aloficocianina)	gi 266766

TABLA 2: proteínas presentes en el ficobilisoma de las algas AFA de Klamath

Tiempo de retención (minutos)	Masa molecular medida	Masa molecular prevista	Proteína [organismo homólogo]	Número NCBI de acceso
15,2	9031	8925	proteína hipotética Avar03000795 [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gi 45510540
		8895	cdpD [<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120]	gi 131740
25,0	19469 19308	18284	pecB: cadena beta ficoeritrocianina [<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120]	gi 548504
		18370	proteína hipotética Avar03000787 (pecB) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gi 45510532
26,4	31044	32078 32219	cpcC [<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120] proteína hipotética Avar03000794 (rod linker Mw 32000) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gi 20141670 gi 45510539
		31295 31304	pecC [<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120] proteína hipotética Avar03000789 (pecC) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gi 464511 gi 45510534
	30124	29333	proteína hipotética Avar03000801 (cpcG4) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gi 46135436
26,8	26119	28637	proteína hipotética Avar03000799 (cpcG2) [<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413]	gi 45510544
27,8	10994	10986	fdxH2: ferredoxina vegetativa [<i>Anabaena variabilis</i>]	gi 1169673
28,8	17714	17457	cpcA [<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120]	gi 9957319
30,0	19222	18332	cpcB [<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120]	gi 38894

Esta estructura única es un elemento importante para explicar la acción antioxidante y antiinflamatoria más potente del extracto del alga AFA a través de la concentración de sus ficocianinas y, sobre todo, es esencial para explicar por qué la ficocianina de AFA purificada resultó ser potente que otras PC como la de la espirulina (como se muestra mediante las pruebas antioxidantes y antiinflamatorias, ver más adelante). La unión entre C-PC y PEC en el ficobilisoma de AFA es tan fuerte que no se puede romper con los métodos de purificación conocidos (ver abajo). Por lo tanto, la PC de AFA purificada debería considerarse como el ficobilisoma de AFA purificado, constituido por el complejo de C-PC/PEC. Para mayor simplicidad, sin embargo, este complejo se consigna como «PC de AFA» o PC.

10 Métodos de purificación (figura 2)

La PC de AFA y su PCB cromóforo se han purificado a partir del extracto básico. La PC se purificó a partir del extracto seco de AFA como sigue:

- suspender 500 mg de extracto en 50 ml de tampón fosfato de sodio 100 mM con pH 7,4;
- centrifugar a 2500 rpm durante 10' a 4 °C;
- 15 - recoger el sobrenadante y añadir sulfato de amonio sólido a una saturación del 50 %;
- precipitar las proteínas durante 60 min a 4 °C mientras se mantiene la muestra en agitación;
- centrifugar a 10000 rpm durante 30 minutos a 4 °C;
- descartar el sobrenadante claro incoloro y volver a suspender el precipitado azul en un volumen pequeño de tampón de fosfato de sodio 5 mM con pH 7,4;
- 20 - dializar durante la noche a 4 °C frente al mismo tampón;
- colocar el PC dializado en una columna de hidroxapatita de 2,5 x 25 cm (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.) equilibrada con 5 mM de tampón de fosfato de sodio con pH 7,4;
- eluir la muestra con tampón de fosfato de sodio con pH 7,0 de fuerza iónica creciente (de 5 a 150 mM);
- recoger las fracciones y leer la absorbancia a 620 nm y 280 nm con el espectrofotómetro;
- 25 - aunar las fracciones en las que la Abs620/Abs280 > 4 (índice de PC pura);
- precipitar la PC con sulfato de amonio a una saturación del 50 % durante una hora a 4 °C;
- centrifugar a 10000 rpm durante 30' a 4 °C;
- descartar el sobrenadante y suspender de nuevo la PC en un tampón de fosfato de sodio 150 mM con pH 7,4;
- 30 - dializar contra el mismo tampón a 4 °C;
- transferir la PC purificada a un matraz y almacenar en la oscuridad a +4 °C o -20 °C.

La figura 2 muestra el gráfico espectrofotométrico del extracto resultante de la purificación. Se puede observar que la PC purificada es de hecho el ficobilisoma completo que contiene las dos subunidades C-PC y PEC. De hecho, se sabe que el máximo de absorción de C-PC es 620 nm, que en la espectrometría de la figura 2 representa la parte

superior del pico. También se sabe que el máximo de absorción de PEC es 566 nm para la subunidad α (ficoviolobilina) y, respectivamente, 593 nm y 639 nm para las dos PCB de la subunidad β . Los tres valores están de hecho incluidos en el pico en forma de campana que constituye el patrón espectrofotométrico de la PC purificada. Teniendo en cuenta el fuerte vínculo entre C-PC y PEC en las algas AFA, tanto i CPC como PEC están necesariamente presentes en el extracto de PC purificado. Esto significa que la PC de AFA es significativamente distinta, tanto desde el punto de vista estructural como funcional, de las PC de otras cianobacterias, incluida la de la espirulina, sobre la que se han realizado la mayoría de los estudios. En particular, esta diferencia consiste en que la PC de AFA tiene una parte, concretamente CPC, en común con las PC de otras fuentes y otra parte, el componente de PEC, distinta, de manera que sus propiedades, asociadas al complejo de C-PC/PEC, son nuevas y se pueden atribuir exclusivamente a la AFA (y complejos similares de C-PC/PEC de otras microalgas).

Cuantificación de la ficocianina de AFA

Para medir la concentración molar de la PC pura, se utilizó el coeficiente de extinción molar ϵ a 620 nm, que para la forma trimérica ($\alpha\beta$)₃ es igual a 770000 M⁻¹ cm⁻¹. Esto significa que una solución de 1 M de PC a 620 nm tiene un valor de absorción de 770000.

Para medir la concentración de PC en los extractos se utilizó el coeficiente de extinción específica E^{1%} a 620 nm de 70 l g⁻¹ cm⁻¹. Esto significa que una solución con 1 % de PC (es decir 1 g/100 ml) a 620 nm absorbe 70. Sobre la base de estos cálculos, el contenido medio de PC en el extracto básico es igual a 80-100 mg/g de peso seco (8-10 % de peso seco); mientras que el contenido promedio de PC en el extracto B es de aproximadamente 360 mg/g de peso seco (36 % de peso seco).

Purificación del cromóforo PCB (figura 3)

- Suspender 500 mg de extracto en 50 ml de H₂O destilada.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 10' a 4 °C.
- Decantar el sobrenadante azul oscuro y precipitar la PC con ácido tricloroacético al 1 %.
- Incubar durante una hora en la oscuridad a 4 °C mientras se agita.
- Centrifugar a 10 000 rpm durante 30' a 4 °C.
- Recoger el precipitado que contiene la PC y lavar tres veces con metanol.
- Volver a suspender el precipitado en 10 ml de metanol que contengan 1 mg/ml de HgCl₂.
- Incubar durante 20 horas a 42 °C en la oscuridad para liberar la PCB de la PC.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 10' para eliminar las proteínas.
- Añadir al sobrenadante que contiene PCB mercaptoetanol β (1 μ l/ml) para precipitar el HgCl₂.
- Incubar a -20 °C durante 24 horas.
- Centrifugar a 10000 rpm durante 30' a 4 °C para eliminar el precipitado blanco.
- Añadir al sobrenadante 10 ml de cloruro de metileno/butanol (2:1, v/v).
- Lavar con 20 ml de H₂O destilada y centrifugar a 3000 rpm durante 10'.
- Retirar la fase superior y recoger la parte inferior que contiene la PCB.
- Lavar la PCB en 15 ml de H₂O tres veces.
- Secar en atmósfera de nitrógeno y almacenar a -20 °C.

El barrido espectrofotométrico resultante muestra que la PCB presenta dos picos de absorción, a 370 y 690 nm.

Superioridad antioxidante de las ficocianinas de las algas de Klamath en comparación con otras ficocianinas.

Las ficocianinas (PC) son los pigmentos azules típicos de todas las microalgas verde-azuladas, pero con diferentes características estructurales y funcionales en cada microalga específica (22). En cuanto a las fuentes de PC utilizadas como suplementos nutricionales y potenciales fármacos naturales, la investigación se ha centrado hasta ahora en la espirulina. Las ficocianinas de la espirulina han demostrado poseer propiedades antioxidantes (23) y antiinflamatorias (24,25,26), con una actividad significativa en diferentes áreas fisiológicas tales como el hígado (27), el sistema respiratorio (28) y el cerebro (29,30). Dada la falta de investigación sobre otras ficocianinas como las de las algas de Klamath, los inventores han medido comparativamente la capacidad antioxidante del extracto acuoso de algas AFA (Klamath) en relación con el producto Serum Bleu™, un extracto líquido con concentrado de PC de la microalga *Spirulina platensis*.

La reducción de los niveles de MDA (malondialdehído) en las muestras de plasma oxidado por CuCl₂ y preincubadas con los dos extractos se muestra en la figura 8, donde es posible ver que el extracto a una concentración de PC de 100 nM es mucho más eficiente en la inhibición de la oxidación de los lípidos del plasma, con la inhibición de la formación de MDA que alcanza el nivel del 89 %, frente a la inhibición del 33 % producida por Serum Bleu™ a la concentración de PC idéntica de 100 nM. Esto demuestra que, a la misma concentración de PC, el extracto de AFA es significativamente más potente que el extracto de espirulina. Dicha diferencia se puede atribuir a dos factores distintos y complementarios: a) una diversidad estructural y por lo tanto funcional de los dos tipos de PC; b) la presencia en el extracto de otros factores antioxidantes que faltan, como en el caso del fitocromo, o son más escasos, como los MAA, en otras microalgas como la espirulina. El poder antioxidante más alto de la PC de

AFA en relación con C-PC (de la espirulina) también se muestra, no obstante, a través de una comparación con los datos disponibles en la bibliografía sobre la lipoperoxidación.

Peroxidación lipídica del plasma y los eritrocitos

5 Cuando se sometió a prueba por sus propiedades antiperoxidativas de lípidos en microsomas de hígado de rata oxidados con AAPH, la C-PC de espirulina inhibió la producción de TBARS (dienos conjugados, MDA) con una CI50 de 11,35 μM (23, Bhat y col.). La C-PC de espirulina también ha sido analizada por Romay y Gonzales (41) frente a la lisis de eritrocitos humanos inducida por AAPH: la CI50 en este caso fue 35 μM .

10 Se analizó la misma capacidad tanto de PC de AFA como de su PCB para inhibir la formación de MDA en: a) plasma humano oxidado por CuCl_2 ; b) RBC (glóbulos rojos o eritrocitos) oxidados por AAPH. También se analizó la capacidad de la PC de AFA y PCB para inhibir la lisis inducida por AAPH de los eritrocitos. En el primer caso, las muestras de plasma se obtuvieron después de centrifugar la sangre heparinizada de voluntarios sanos a 1500 g durante 10 minutos. El grado de oxidación de los lípidos en las muestras de plasma incubadas durante dos horas a 37 °C con PBS (control) o con CuCl_2 100 μM en presencia de concentraciones crecientes de PC o PCB (intervalo 0,1-1 μM) se analizó mediante la medición de sustancias reactivas a TBA a 535 nm (42). En cuanto a los eritrocitos, 15 las muestras de sangre heparinizada se obtuvieron de voluntarios sanos mediante venopunción después de obtener el consentimiento informado. Los glóbulos rojos (RBC) se aislaron por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos, se lavaron tres veces con PBS y finalmente se volvieron a suspender usando el mismo tampón a un nivel de hematocrito del 5 %. Los RBC se incubaron con PBS (control) o AAPH 50 μM durante cuatro horas a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de PC o PCB (intervalo 0,1-1 μM). Se analizaron como se ha descrito 20 previamente las sustancias reactivas a TBA, principalmente el malonildialdehído (MDA), como indicadores de la peroxidación lipídica (42). En resumen, se incubó una mezcla de reacción de 1 ml a 95 °C durante una hora con 250 μl de TBA (0,67 %) y 100 μl de H_3PO_4 (0,44 M); a continuación, se añadieron 150 μl de TCA (20 %). Tras la centrifugación, se determinó el contenido de peróxido en el sobrenadante usando el coeficiente de extinción molar (DO_{535}) de MDA.

25 Como se muestra en la figura 9A, PC y PCB inhibieron de forma dependiente de la dosis ($p < 0,05$ para cada concentración examinada) el grado de peroxidación lipídica en RBC (eritrocitos) incubados durante dos horas a 37 °C con el generador de radicales peróxido AAPH (panel A); al mismo tiempo, PC y PCB protegieron de forma dependiente de la dosis los lípidos del plasma de la oxidación inducida por metal ($p < 0,05$) en las muestras 30 incubadas durante dos horas a 37 °C con CuCl_2 (Panel B). En ambos experimentos de inhibición, los valores de CI50 fueron de aproximadamente 0,140 μM y 0,160 μM para PC y PCB (comparado con 11,35 μM de la C-PC de espirulina).

También se ha probado la capacidad de la PC de AFA para inhibir la lisis inducida por AAPH de los eritrocitos: como se muestra en la figura 9B, la PC de AFA fue capaz de inhibir de forma constante (es decir, de una a seis horas) la lisis de los eritrocitos en más del 50 % con solo 250 nM de PC de AFA (frente a la CI50 de 37 μM de la C-PC de 35 espirulina).

Incluso teniendo en cuenta alguna diferencia en el método de ensayo o de la concentración, en ambos casos la superioridad de la PC de AFA respecto a la C-PC de espirulina es verdaderamente notable, la diferencia en los valores de CI50 es de 75 a 150 veces a favor de la PC de AFA. Un indicador aún mayor de la diferencia de potencia puede entenderse por el hecho de que, como se informa en el mismo estudio por Bhat y col. (23), la peroxidación de 40 lípidos se inhibe un 95 % con una dosis de C-PC de espirulina de 200 μM . En la figura 9A, se puede ver que para obtener un grado similar de inhibición solamente se requiere 1 μM de PC de AFA, esto es, 200 veces menos. Esto confirma que la diferencia significativa entre la C-PC por sí misma y el complejo de C-PC/PEC que caracteriza a las algas AFA y sus extractos se debe precisamente a la PEC, el único elemento que difiere, lo que muestra que PEC es una molécula muy potente por sí misma.

45 Además, la CI50 de la PC es ligeramente menor que la de la PCB. Esto es algo sorprendente, dado que la PCB, que se considera su principio más activo, una vez purificada y, por tanto, más concentrada, debería ser significativamente más potente que la molécula completa de la que es el componente activo. El hecho de que en realidad sea ligeramente más débil, aunque todavía muy potente, significa que en la PC completa hay otros factores que pueden ser incluso más potentes que la propia PCB. Se sabe que la PC contiene PEC, además de C-PC y su cromóforo PCB, que incluye entre sus cromóforos tanto PCB como PVB (ficoviolobilina). Por lo tanto, los inventores creen que el factor responsable de una diferencia significativa en la potencia entre la PCB purificada y la PC en conjunto es precisamente el componente PEC, en particular su cromóforo PVB, que se considera un antioxidante 50 muy fuerte.

Evaluación de la capacidad antioxidante (ORAC) de la PC de AFA y su PCB

55 El método ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) se utiliza ampliamente para determinar la capacidad antioxidante total de las sustancias puras y compuestas, para lo cual mide su actividad en comparación con Trolox (un análogo hidrosoluble de la vitamina E) como molécula de referencia (31). Sin embargo, hasta ahora nunca se ha utilizado para determinar la capacidad antioxidante de moléculas naturales puras de cianobacterias

tales como PC y PCB.

El ensayo ORAC se llevó a cabo a 37 °C en un espectrofluorímetro FLUOstar OPTIMA (BGM LABTECH, Alemania) a 485 nm de excitación y 520 nm de emisión, utilizando el método de Ou y col. (32) con modificaciones menores. En pocas palabras, en la mezcla de ensayo final, se utilizó fluoresceína (FL) (0,05 µM) como blanco de ataque de los radicales libres, con AAPH (4 mM) como generador de radicales peroxilo. Trolox (1 µM) se utilizó como patrón de control y el tampón de fosfato, como blanco. Las concentraciones de los compuestos examinados en la mezcla de ensayo variaron de 0,025 µM a 2 µM. Todas las sustancias se disolvieron y se diluyeron con tampón de fosfato de sodio 75 mM con pH 7; la solución de PCB se preparó disolviendo el compuesto primero en etanol y luego llevando la solución a la concentración deseada con el tampón. Todas las muestras se realizaron por triplicado. La fluorescencia se registró cada cinco minutos tras la adición de AAPH. Los resultados finales (valores ORAC) se calcularon utilizando las diferencias en las áreas bajo las curvas de caída de fluorescencia (ABC) entre la muestra y el blanco y se expresaron como equivalentes de Trolox:

$$\text{Valor ORAC} = \left[\frac{(\text{ABC}_{\text{muestra}} - \text{ABC}_{\text{en blanco}})}{(\text{ABC}_{\text{trolox}} - \text{ABC}_{\text{en blanco}})} \right] \times$$

15 **(molaridad_{trolox}/molaridad_{muestra})**

Los análisis de regresión lineales de los valores de ORAC (y) frente a las concentraciones de AA, GSH, PC y PCB (x) describieron adecuadamente los datos según lo evaluado por el coeficiente de correlación.

PC es una proteína fluorescente soluble en agua que tras la excitación a 620 nm, emite a 647 nm esta fluorescencia propia que no interfirió con la emisión de FL a 520 nm y no se pusieron de manifiesto modificaciones de la intensidad de fluorescencia después de añadir PC a la mezcla de reacción. Los efectos de la PC en la cinética de la pérdida de fluorescencia FL tras la adición de AAPH se presentan en la figura 10, y muestran claramente una correlación lineal entre las concentraciones de PC (que van desde 0,025 a 0,150 µM) y la superficie neta bajo la curva de decaimiento de fluorescencia (ABC) ($r = 0,998$, $p < 0,0001$).

La PCB cromóforo es responsable del color azul brillante de la PC y después de la liberación de la proteína, presenta dos picos característicos de absorción a 370 y 690 nm que, como en el caso de la PC, no afectaron a la fluorescencia FL. La figura 11 muestra la cinética de FL inactivándose con diferentes concentraciones de bilina y la correlación positiva ($r = 0,995$, $p < 0,0005$) de la ABC en comparación con las concentraciones de PCB (intervalo 0,025-0,150 mM).

Por último, la capacidad de la PC pura y PCB para extinguir directamente los radicales peroxilo se ha comparado con la de moléculas antioxidantes puras bien conocidas. La figura 12 ofrece información sobre el análisis de regresión lineal de Trolox, GSH, AA, PC y PCB en lo tocante a su valor ORAC. Sobre la base de estos datos, se halló que PC y PCB tuvieron los valores más altos de ORAC (20,33 y 22,18 equivalente a Trolox, respectivamente), mientras que GSH y AA mostraron los más bajos (0,57 y 0,75). El hecho de que también en la prueba ORAC el valor de la PC de AFA y PCB es bastante similar confirma el papel muy importante desempeñado por PEC en la PC de AFA.

No hay referencias sobre los valores ORAC disponibles para los compuestos naturales citados; sin embargo, hasta donde conocen los inventores, el valor ORAC de PCB (ya sea expresado como µmol Trolox/µmol mPCB o como µmol Trolox/mg PCB) es el más alto encontrado en la bibliografía en lo que respecta a las moléculas antioxidantes puras para las que se ha evaluado la actividad ORAC, utilizando FL como sonda fluorescente (ORAC_{FL}). Como ejemplo, Ou y col. (Ou y col., 2001) determinaron la capacidad antioxidante de diferentes compuestos fenólicos mediante el método ORAC_{FL}, y los valores más altos hallados fueron 7,28 y 6,76 µmol de Trolox/µmol de compuesto, que, si se expresan valores de ORAC relativos como µmol Trolox/mg de muestra en lugar de µmol Trolox/µmol de muestra, se convierten en 24,0 y 23,3 µmol de Trolox/mg de compuesto para los flavonoides quercetina y (+)-catequina, respectivamente; mientras que la ORAC para la PCB pasa a ser 37,0 µmol Trolox/mg.

45 **Efecto protector de la ficocianina de AFA y su PCB en células cultivadas.**

A partir del extracto básico y siguiendo la metodología ya descrita, hemos purificado la ficocianina de AFA, con su complejo C-PC/PEC, para poner a prueba sus propiedades antioxidantes en células cultivadas en vivo. Las células Jurkat (línea inmortalizada de leucemia de linfocitos T) se sometieron a estrés oxidativo con 500 µM de H₂O₂, con o sin aumentar las dosis de PC de AFA y PCB. La fluorescencia emitida por la sonda intracelular (diclorofluoresceína) tras la oxidación de H₂O₂ se registró después de 30 minutos de incubación con H₂O₂ a través de un fluorímetro (exc. a 492 nm y emisión a 520 nm). Al incubar las células tanto con PC de AFA (intervalo 0,1-10 mM) como con H₂O₂ 500 mM durante 30 minutos se observa un efecto protector dependiente de la dosis con una reducción de la fluorescencia intracelular inducida por H₂O₂, con una CI₅₀ de 0,5 µM, y una inhibición del 100 % (células no oxidadas) a 10 µM (figura 13).

Las propiedades antioxidantes de la PC completa, compuesta por C-PC y PEC, residen en sus cromóforos, que son ficocianilina (PCB) para C-PC y tanto PCB como PVB (ficoviolobilina) para PEC. Hemos purificado el cromóforo PCB C-PC para analizarlo en células cultivadas oxidadas con H₂O₂ (intervalo de FCB 0,1-40 μ M). También en este caso se observa un efecto antioxidante dependiente de la dosis con una CI₅₀ de 0,5 μ M y una inhibición del 100 % (células no oxidadas) a 40 μ M (figura 13).

A las concentraciones analizadas, tanto la PC de AFA como la PCB incubadas durante 30 minutos con las células cultivadas y sin H₂O₂ no tienen ningún efecto oxidativo, como se muestra por el hecho de que no hay ningún aumento de la fluorescencia intracelular.

Más importante, para evaluar la absorción celular de la PC y PCB, se incubaron previamente ambos compuestos con las células durante dos horas; después, se lavó el medio para excluir cualquier PC y PCB no absorbidas, y se oxidaron las células con H₂O₂ durante 30 minutos. Como se muestra en la figura 14, hay una inhibición dependiente de la dosis de la fluorescencia intracelular. Esto significa que la célula es capaz de retener ambas moléculas antioxidantes, bien en la membrana o en el citoplasma.

Este es un hallazgo muy importante, ya que demuestra que la actividad antioxidante de las dos moléculas es probablemente muy eficaz in vivo para fines terapéuticos.

Mientras que los estudios realizados sobre la C-PC purificada de espirulina ya habían demostrado su capacidad para penetrar en el citosol celular (43), esta es la primera demostración de la capacidad de la PCB purificada para entrar y ser retenida en la célula. Además, es la primera vez que esa misma capacidad se demuestra para la PC específica de AFA (complejo C-PC/PEC). A las concentraciones examinadas, la PC y PCB incubadas con las células durante dos horas no produjeron ningún efecto oxidativo, como se muestra por la ausencia de un aumento en la fluorescencia intracelular.

Mientras que en la figura 13, donde se añadieron agentes oxidativos y antioxidantes al mismo tiempo, se ve que el grado de protección celular proporcionado por PC y PCB es igual; en la prueba de absorción, como se muestra en la figura 14, los resultados del efecto antioxidante de la PCB resulta ser ligeramente más rápido (CI₅₀ 1,9 μ M para PCB comparado con 4,2 μ M para PC); y también ligeramente más alto (más del 90 % de protección con PCB, menos del 90 % con PC). Esto significa que el grado de absorción de la PCB respecto a la PC es, de hecho, ligeramente superior (como era de esperar, dada la naturaleza más purificada de la PCB). Sin embargo, el grado de absorción es verdaderamente notable para ambos compuestos, dado que en ambos casos se encuentra muy cerca del grado de protección alcanzado con la adición simultánea de antioxidantes y el agente oxidante.

Por otra parte, esta prueba en células in vivo confirma una consideración anterior sobre la relevancia esencial del componente PEC para la propiedad antioxidante de toda la PC. Como se muestra tanto en la figura 13 como 14, el hecho de que la PC completa purificada tenga la misma potencia antioxidante muy alta que la PCB purificada, cuya concentración es mucho mayor después de la purificación con respecto a su concentración como parte de la PC completa, indica que la PCB no es el único agente activo de PC, y que, de hecho, es muy probable que cualquier otro agente o agentes (empezando por PVB) presente en PC sea significativamente más potente que la propia PCB.

Determinación innovadora de factores sinérgicos que hacen que el extracto sea más eficaz que las ficocianinas de AFA contenidas en el mismo.

Se ha visto que la PC de AFA, con su complejo de C-PC/PEC, es significativamente más potente que la C-PC pura de otras algas como la espirulina, pero en las algas de Klamath hay otros factores que explican también la superioridad de sus extractos, comenzando por el extracto básico, respecto a su principio antioxidante y antiinflamatorio primario, el complejo de ficocianinas/ficoeritrocianina.

El principal factor que explica esta diferencia es el segundo elemento que compone el complejo de ficobiliproteína más amplio que constituye el sistema de control de iluminación de las algas AFA, esto es, su fitocromo específico, que es en términos absolutos el principio antioxidante más poderoso encontrado hasta la fecha en las algas. En las moléculas específicas típicas de todas las algas se pueden identificar otros factores llamados «aminoácidos de tipo micosporina» o MAA, especialmente abundantes en las algas de Klamath, y una serie de moléculas nutricionales cuya acción antioxidante y antiinflamatoria ya se conoce, como la clorofila, el beta-caroteno y los carotenoides, además de diversas vitaminas y minerales.

A) Identificación del «fitocromo de AFA», un fitocromo único típico de las algas de Klamath

Los fitocromos son fotorreceptores, pigmentos que las plantas utilizan para detectar la luz, y que son sensibles a la luz en la región roja y roja lejana del espectro visible. Realizan muchas funciones diferentes en las plantas, incluida la regulación de la floración (a través de los ritmos circadianos), la germinación y la síntesis de la clorofila. Esto último es particularmente relevante en relación con las algas AFA porque la presencia de este tipo único del fitocromo en AFA puede explicarse por la ausencia de la otra ficobiliproteína comúnmente utilizada por otras cianobacterias para complementar a la C-ficocianina en el proceso de la fotosíntesis, esto es, la aloficocianina. Mientras que, como hemos visto, la PEC ocupa el lugar de la aloficocianina en las algas de Klamath, es probable que PEC por sí sola no sea suficiente, sobre todo teniendo en cuenta que las algas de Klamath viven en un

ambiente no tropical que requiere una alta eficacia de captación de la luz, así, parece que las algas AFA integran sus necesidades de orden superior con su propio fitocromo.

Mientras que el fitocromo de AFA, que se ha detectado y se describe aquí por primera vez, tiene su propia estructura particular, todavía es posible definirlo como un representante de la familia general de los fitocromos. A lo largo de los años se han hallado diferentes tipos de fitocromos en las plantas, que no solo tienen distintos genes de fitocromos (3 en el arroz, pero 6 en el maíz, por ejemplo), sino que la mayoría de los fitocromos específicos de cada planta, o al menos de cada familia de plantas, tiene componentes proteicos significativamente distintos y, con ello, estructuras distintas. Sin embargo, lo que hace que todos ellos sean fitocromos es que todos utilizan la misma biliproteína, llamada fitocromobilina, como cromóforo absorbente de la luz. Este cromóforo es similar al cromóforo de la ficocianina, la ficocianobilina, y se caracteriza por ser una molécula bilina única que consiste en una cadena abierta de cuatro anillos de pirrol (tetrapirroles). Puesto que el principio activo de todos los fitocromos, en su diferente estructura general, sigue siendo este cromóforo e incluso teniendo en cuenta algunas variaciones entre las diferentes especies, es posible atribuir las propiedades de cada fitocromo a otros fitocromos. (44) Más específicamente, en su estado P_r normal, esta biliproteína absorbe luz a un máximo de 650-670 nm; mientras que cuando es activada por la luz roja, se transforma en P_{fr} con un máximo de absorbancia de 730 nm.

Descripción y purificación del fitocromo de AFA

El fitocromo de AFA, aunque presenta una estructura relativamente única, tiene un biliproteína como cromóforo que absorbe la luz en el espectro rojo/rojo lejano. Para establecer su estructura y actividades los inventores han purificado el fitocromo con el siguiente protocolo:

- Suspender 1 g de extracto en 10 ml de tampón de fosfato de potasio 1, pH 7,0.
- Agitar en el vórtex dos veces durante un minuto con la mitad de su volumen.
- Incubar las células durante 35' con Triton X 100 al 2 %.
- Centrifugar a 28000 rpm durante 16-18 horas.
- Recoger el sobrenadante en un gradiente por etapas de densidad de sacarosa.
- Rotar el gradiente utilizando rotores batientes a 150000 g durante 12 horas.
- Almacenar a -20 °C.

El fitocromo se corresponde con la banda de lisado de color naranja intenso, que es visible a aproximadamente 1 M de sacarosa, mientras que el ficobilisoma se sitúa en aproximadamente 0,75 M. Esta relación de las dos bandas también da una indicación fiable sobre el peso molecular del fitocromo presente en las algas, que es aproximadamente cuatro veces el de la PC de AFA trimérica: siendo este último 121 Kd, se puede establecer de forma preliminar el peso molecular del fitocromo de AFA en aproximadamente 480 Kd (figura 15)

Examinadas sus propiedades absorbentes de la luz, el fitocromo muestra que absorbe la luz con dos picos a 672 nm y 694 nm, que se corresponden respectivamente con las formas de P_r (absorción de la luz roja) y P_{fr} (absorción de la luz roja lejano) en un estado de equilibrio (figura 16).

En cuanto a la cantidad de fitocromo contenido en AFA, la primera evaluación de los inventores arroja el siguiente resultado preliminar: 2 mg/g (o 0,2 % de peso seco). En cuanto a los extractos, la concentración aumenta a aproximadamente 0,5 % en el extracto básico y aproximadamente 1 % en el extracto B.

Actividad antioxidante

El fitocromo de AFA purificado ha demostrado ser un antioxidante muy potente. La incubación durante dos horas de muestras de plasma humano con el agente oxidante CuCl_2 a 100 μM genera un aumento de los niveles de malondialdehído (MDA), un subproducto tardío de la peroxidación de lípidos que se mide con un espectrofotómetro a 535 nm después de una reacción con ácido tiobarbitúrico (prueba de TBA). Cuando se incubaba plasma durante dos horas a 37 °C con CuCl_2 100 μM junto con cantidades crecientes de fitocromo de AFA (2-16 nM) extraído de algas AFA, es posible observar una reducción muy fuerte dependiente de la dosis de los niveles de MDA (figura 17). De hecho, se obtiene una inhibición casi completa de la lipoperoxidación, con los niveles de MDA cerca del control, con tan solo 16 nM de fitocromo de AFA. Cabe destacar que la CI_{50} de 3,6 nM es 45 veces menor que la CI_{50} obtenida para la PCB. No hay duda de que el fitocromo aquí descrito es responsable de la mayor actividad antioxidante observada con el extracto básico en comparación con la PC de AFA.

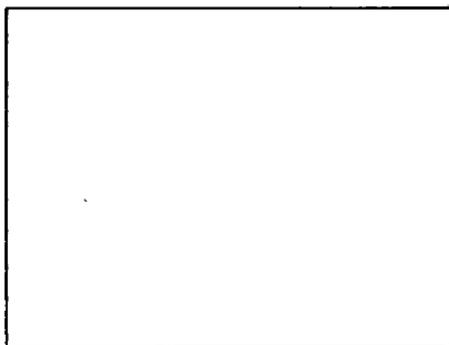
B) Identificación de los «aminoácidos de tipo micosporina» (MAA) de las algas de Klamath

Los MAA son compuestos hidrosolubles caracterizados por un cromóforo ciclohexenona o ciclohexenimina conjugado con un átomo de nitrógeno en sustitución de un aminoácido o su aminoalcohol (como se muestra en la figura 4).

Presentan un máximo de absorción que oscila entre 310 y 360 nm y un peso molecular medio de alrededor de 300 (4). Los MAA son protectores solares pasivos, y absorben preferentemente fotones UV, seguido por una disipación de la energía de la radiación absorbida en forma de calor inofensivo sin generar reacciones fotoquímicas, por lo que protegen, al menos parcialmente, la fotosíntesis y el crecimiento de los organismos fototrópicos. Además de tener

una función de pantalla de UV, se ha demostrado que varios MAA también presentan propiedades antioxidantes que actúan como eliminadores de especies reactivas de oxígeno generadas fotodinámicamente en los organismos (5).

- 5 Los inventores han analizado la presencia de MAA en la cianofita *Aphanizomenon flos-aquae* y su extracto. Mientras que la mayoría de las cianobacterias notificadas hasta la fecha contienen shinorina como sus MAA primarios; se encontró una presencia poco habitual de porphyra-334 como MAA primario en *Aphanizomenon flos-aquae*, además de una pequeña cantidad de shinorina.



Extracción, purificación y cuantificación de los MAA

- 10 Los MAA se extrajeron como se ha indicado anteriormente (6). En resumen, se extrajeron 20 mg de polvo de AFA o 20 mg de extracto en 2 ml de metanol acuoso (grado HPLC) al 20 % (v/v) mediante la incubación en un baño de agua a 45 °C durante dos horas y media. Después de la centrifugación (5000 g; GS-15R Centrifuge, Beckman, Palo Alto, EE. UU.), el sobrenadante se evaporó a sequedad y se volvió a disolver en 2 ml de metanol al 100 %, se agitó en vórtex durante 2-3 minutos y se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se evaporó y el extracto se volvió a disolver en el mismo volumen de ácido acético al 0,2 % para el análisis en HPLC o en 200 µl de tampón de fosfato (PBS) con objeto de evaluar las propiedades antioxidantes. Las muestras se filtraron a través de filtros de jeringa con tamaño de poro de 0,2 µm (VWR International, Milán, Italia) antes de ser sometidas a un análisis por HPLC o examinar las propiedades antioxidantes (ver más adelante).

- 20 Los MAA de la AFA y de sus extractos tienen un máximo de absorción de 334 nm. La purificación adicional de los MAA se realizó utilizando un sistema de HPLC (Jasco Corporation, Tokio, Japón) equipado con una columna y precolumna Alltima C18 (4,6 x 250 mm i.d., embalaje de 5 µm, Alltech, Milán, Italia), de acuerdo con la bibliografía (7). La longitud de onda de detección fue de 330 nm; la fase móvil fue ácido acético al 0,2 % a un caudal de 1,0 ml por minuto⁻¹. La identificación de los MAA se hizo comparando el tiempo de los espectros de absorción y las retenciones con los patrones como *Porphyra* y *Pterocladia sp.*, que contienen principalmente porphyra-334, shinorina y palitina, amablemente facilitados por el Dr. Manfred Klisch, Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen, Alemania. Los espectros de absorción de las muestras se midieron de 200 a 800 nm en un espectrofotómetro de haz único (DU 640, Beckman, Palo Alto, EE. UU.). Los espectros en bruto se transfirieron a un ordenador y se trataron matemáticamente para los análisis de pico de los MAA.

- 25 Los MAA se purificaron parcialmente a partir de la muestra de AFA y del extracto como se ha descrito anteriormente. La extracción de las muestras con metanol al 20 % a 45 °C durante dos horas y media dio como resultado un pico prominente a 334 nm (MAA); incluso si también se extrajeron pequeñas cantidades de pigmentos fotosintéticos (como ficocianina a 620 nm) con este procedimiento (ver siguiente figura, línea discontinua). Las muestras de MAA se trataron adicionalmente con metanol al 100 % con el fin de eliminar las proteínas y sales y, finalmente, con ácido acético al 0,2 % para eliminar los pigmentos fotosintéticos apolares. Los MAA resultantes parcialmente purificados tenían un máximo de absorción a 334 nm (figura 5, línea continua).

- 30 Se realizó un análisis y purificación más detallados de los MAA por HPLC con el fin de determinar si los compuestos con absorción a 334 nm constaban de un único MAA o de una mezcla de varios MAA. El cromatograma de la muestra (figura 6) muestra la presencia de dos MAA con tiempos de retención de 4,2 (pico 1) y 7,6 min (pico 2) que se identificaron como shinorina y porphyra-334, respectivamente. La porphyra-334 parece ser el principal MAA en AFA puesto que la shinorina solo estaba presente en pequeñas cantidades (proporción de área de pico 1:15).

Los espectros UV de los MAA purificados confirmaron su máximo de absorción a 334 nm (figura 7). Teniendo en cuenta que los coeficientes de extinción molar a 334 nm para shinorina y porphyra-334 son de 44700 y 42300 M⁻¹ cm⁻¹, respectivamente, los inventores calcularon:

- a) para las algas de Klamath, concentraciones de 0,49 mg g⁻¹ de peso seco para shinorina y 7,09 mg g⁻¹ de peso

seco para porphyra-334; por tanto, el contenido total de MAA es igual a 0,76 % de peso seco algal;
b) para el extracto, las concentraciones de 17-21 mg de MAA (es decir 1,7-2,1 % del peso seco).

5 Estos son datos significativos, ya que todo el alga AFA contiene alto nivel constitutivo de MAA (0,76 % del peso seco), cerca de la concentración máxima hallada bajo exposición a rayos UV, es decir, 0,84 % (8). Además, se ha descubierto que el extracto tiene una concentración mucho mayor que todo el alga y alcanza niveles que son mucho más altos que la concentración potencial máxima.

10 Los MAA (shinorina y porphyra-334 en el extracto) son moléculas estructuralmente simples, con un peso molecular de 300. Esto permite a estas moléculas hidrosolubles cruzar fácilmente las diversas barreras, desde la membrana intestinal a la barrera hematoencefálica, confirmando su capacidad para expresar su actividad antioxidante en cualquier lugar donde se necesite, desde el intestino al cerebro.

Evaluación del efecto antioxidante de los MAA

15 Para evaluar las propiedades antioxidantes de los MAA contenidos en el extracto, se incubaron las muestras de eritrocitos humanos durante tres horas a 37 °C con cantidades crecientes de MAA (5-80 µM) junto con AAPH 100 mM para inducir la formación de la cadena de radicales libres con la consiguiente oxidación de los fosfolípidos de la membrana con un incremento paralelo de la hemólisis de los eritrocitos, medida por la dosificación de la hemoglobina con la solución de Drabkin (33). Los resultados se muestran en la figura 18, donde es posible observar cómo los MAA causan una reducción dependiente de la dosis en la hemólisis de los eritrocitos inducida por AAPH, protegiendo así la célula del daño oxidativo.

20 De la misma manera, la incubación de las muestras de plasma con el agente oxidante (CuCl₂ 100 µM) genera un aumento de los niveles de malondialdehído (MDA), un subproducto tardío de la peroxidación de lípidos que se mide a través de un espectrofotómetro a 535 nm después de una reacción con ácido tiobarbitúrico (prueba de TBA). Cuando se incubaba plasma durante dos horas a 37 °C con CuCl₂ 100 µM junto con cantidades crecientes de MAA (5-80 µM) extraídos de AFA de Klamath, es posible observar una reducción dependiente de la dosis de los niveles de MDA, como se muestra en la figura 19. Con una concentración de MAA igual a 80 µM, se obtienen niveles de MDA muy similares a los del plasma no oxidado (control).

25 Ambas pruebas permiten afirmar que los MAA de AFA son verdaderas moléculas antioxidantes que confieren al extracto más potencia como captador de radicales libres, además de la derivada de sus ficocianinas.

C) Determinación de otros factores sinérgicos que hacen que el extracto sea más potente que las ficocianinas contenidas en el mismo.

30 Las algas AFA de Klamath contienen una amplia matriz de nutrientes dotados de diferentes actividades funcionales. En particular, las algas de Klamath y el extracto contienen importantes principios activos, tales como clorofila; beta-caroteno y otros carotenoides provitamina A; carotenos xantófilos como cantaxantina; vitaminas antioxidantes y minerales.

Clorofila

35 En los últimos años se ha desarrollado mucho la investigación de una molécula, la clorofilina (CHLN), que es un análogo semisintético de la clorofila (CHL). Diversos estudios han demostrado propiedades antioxidantes significativas de la CHLN, notablemente más altas que los antioxidantes más comunes (vitaminas C y E, GSH, etc.), en especial en relación con los órganos esenciales como el hígado y el cerebro (9). La propiedad antioxidante se asocia a una propiedad antiinflamatoria específica debido a la capacidad de CHLN de inhibir selectivamente la COX-2 (10). La capacidad de la clorofila para inhibir selectivamente la COX-2, junto con esa misma capacidad de las ficocianinas, hace que el extracto sea particularmente potente como un antiinflamatorio natural. Esto también ayuda a explicar el hecho de que el extracto resulte ser un inhibidor aún más potente de la COX-2 que las ficocianinas contenidas en él.

40 Más en general, la CHLN ha demostrado tener propiedades antimutágenas (11) y antiproliferativas en relación con varios tipos de tumor, tales como los de hígado (12), de mama (13) y de colon (14). Puesto que las ficocianinas también tienen propiedades antiproliferativas significativas, la presencia simultánea de ambas moléculas convierte el extracto en un producto antitumoral potencialmente relevante.

45 A pesar de que la mayoría de los estudios se han realizado sobre CHLN semisintética, dada la estrecha similitud de las dos moléculas, se pueden atribuir las mismas propiedades también a la clorofila natural. De hecho, cuando se ha comparado la capacidad antiproliferativa de las dos moléculas, la CHL natural ha demostrado ser significativamente más potente que la CHLN; y a concentraciones mucho más bajas (15).

50 La sinergia antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa de las ficocianinas y la clorofila contribuye a la superioridad significativa del extracto de AFA de Klamath, teniendo en cuenta que en las algas de Klamath, la concentración de la clorofila es una de las más altas en la naturaleza, con un mínimo del 1 % (comparado con una concentración máxima del 0,3 % para las verduras más ricas en clorofila como el agropiro y otras gramíneas).

55

El método para cuantificar la clorofila a en algas AFA se basa en la extracción del pigmento en un disolvente orgánico después de romper las células algales y la determinación espectrofotométrica posterior, como se ha debatido en la bibliografía (16). Después de usar diferentes tipos de disolventes orgánicos, se descubrió que el metanol posee la mejor capacidad de extracción. Se suspendió la muestra (100 mg de AFA *REFRACTANCE WINDOW 2 MESH 122/071005*) en 10 ml de metanol al 100 %, se homogeneizó con un homogeneizador mecánico durante 3' y se dejó en una placa giratoria durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad.

El extracto resultante se centrifugó luego a 3000 rpm durante 5' a 4 °C; se recogió y dosificó el sobrenadante, mientras que el precipitado se volvió a suspender en 10 ml de metanol al 100 % para un segundo tiempo de extracción. Después de 24 horas a temperatura ambiente, el extracto se centrifugó a 3000 rpm durante 5' a 4 °C, se recogió y dosificó el sobrenadante, mientras que el precipitado se volvió a suspender en 10 ml de metanol al 100 % para un tercer tiempo de extracción. La concentración de clorofila a en los tres extractos de metanol se ha calculado por medio de la siguiente ecuación de Porra (17); presentando el pigmento un pico de absorción característica a 664 nm.

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/ml}) = 16,29 \times \text{Abs}_{664}$$

Con la primera extracción, se obtuvo una concentración de clorofila a de 96,11 $\mu\text{g/ml}$; con la segunda y la tercera extracciones, las concentraciones fueron de 4,63 y 0,68 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, el contenido total de clorofila a en la muestra de AFA es de 101,42 $\mu\text{g/ml}$, o 10,14 mg/g de peso seco (1,014 % de peso seco).

Mediante el uso de la misma metodología descrita anteriormente, se halló que en el extracto básico hay una reducción aproximada del contenido de clorofila del 50 %, con una concentración por tanto de alrededor del 0,5 %.

Carotenos

Las algas de Klamath tienen un alto contenido de carotenos, expresados en forma de beta-caroteno. Además, contienen un amplio espectro de carotenos, tanto precursores como no precursores de la vitamina A. Entre los no precursores, las algas Klamath presentan un contenido particularmente significativo de cantaxantina:

Algas de Klamath	Carotenos totales como beta-carotenos = 1600 mg/kg de cantaxantina = 327 mg/kg,
Extracto básico	Carotenos totales como beta-carotenos = 420 mg/kg de cantaxantina = 41 mg/kg,
Extracto B	Carotenos totales como beta-carotenos = 2400 mg/kg.

Las cifras anteriores son un promedio de diferentes pruebas sobre distintos lotes de producto a través de los años. La concentración de carotenos en el extracto básico se reduce claramente, aunque sigue siendo significativa. Sobre todo, nuestro organismo asimila en gran medida los carotenos en las algas y su extracto porque provienen de una fuente de alimento natural sin ninguna membrana de celulosa ni otros factores que inhiben parcialmente la asimilación en las verduras comunes. El retinol de plasma es la forma activa de la vitamina A, y se ha demostrado que tiene importantes propiedades antioxidantes y es capaz de proteger los diversos sistemas de nuestro organismo, desde los ojos hasta el hígado, desde la boca hasta el sistema nervioso (18).

Particularmente interesante es el contenido en cantaxantina, un carotenoide dotado de una acción antioxidante más alta que el beta-caroteno en sí en relación a las ROS (19), e intermedio entre el beta-caroteno y el licopeno (efecto máximo) y la luteína y la zeaxantina (efecto mínimo) en relación con el singlete de oxígeno (20). La cantaxantina posee también fuertes propiedades antilipoperoxidativas (21), que actúan de forma sinérgica con las mismas propiedades de las ficocianinas y la clorofila contenida en las algas y su extracto. Esta sinergia ayuda a explicar el hecho de que el extracto, en términos de actividad antiinflamatoria y anti-oxidante, sea más poderoso que las ficocianinas purificadas contenidas en el mismo.

Análisis del extracto básico en comparación con las ficocianinas de AFA y PCB.

Inhibición del extracto básico de la formación de TBARS a partir del daño oxidativo por CuCl_2

El poder antioxidante del extracto, con un contenido normalizado de PC de AFA, se ha comparado también con el de la propia PC purificada, así como con el del cromóforo purificado ficocianobilina (PCB), el grupo prostético activo de la PC. Las pruebas sobre la formación de malonildialdehído (MDA) generado por la oxidación de plasma con CuCl_2 demuestran que el extracto tiene un poder antioxidante más alto que la PC pura y su cromóforo PCB debido a la presencia en el extracto de otras moléculas antioxidantes activas; mientras que PC y PCB tienen una capacidad antioxidante similar, con un grado de inhibición de la formación de MDA del 30 al 40 % a una concentración de 100 nM, el extracto básico, con una concentración similar de 100 nM de PC, genera un grado de inhibición de hasta el 89 % (figura 20).

5 El extracto básico a una concentración de 100 nM PC también tiene una capacidad antioxidante significativamente mayor en la formación de dienos conjugados después de la oxidación de plasma con CuCl₂ que la PC pura a la misma concentración de 100 nM. La figura 21 muestra en efecto que, contrariamente a la PC pura, con el extracto se inhibe prácticamente por completo la formación de dienos conjugados. De nuevo, esto muestra cómo el extracto básico es significativamente más potente que la PC pura, claramente debido a la presencia en ella de otras moléculas activas, en particular, el fitocromo de AFA.

Inhibición del extracto básico incubado previamente de la formación de TBARS a partir del daño oxidativo causado por CuCl₂

10 Cuando se incubó previamente el extracto de AFA con las muestras de plasma humano, la posterior incubación de las mismas muestras con el agente oxidante CuCl₂ a 100 μM, la oxidación de las lipoproteínas, medida por la producción temprana de subproductos de dienos conjugados a través de un espectrofotómetro a 245 nm), se redujo fuertemente de una manera dependiente de la dosis. La disminución progresiva de la oxidación, que además se desarrolla después de una primera fase de retraso en la que el extracto inhibe la formación de dienos, alcanza un nivel de inhibición casi completo con una concentración de PC de tan solo 150 nM en el extracto (figura 22).

15 La oxidación de los lípidos plasmáticos con CuCl₂ da lugar también, en una etapa posterior, a la formación de malonildialdehído o MDA. La incubación previa del plasma con el extracto de AFA genera asimismo una reducción dependiente de la dosis de los niveles de MDA, tan fuerte que con una concentración de PC de tan solo 100 nM se obtuvieron valores de MDA totalmente comparables a los del plasma no oxidado o de control (n.º p <0,05) (figura 23).

20 Evaluación de ORAC del extracto básico

Para evaluar la capacidad antioxidante del extracto en términos de la prueba de ORAC, se utilizó la misma metodología que la empleada para analizar la ORAC de PC y PCB. Con el fin de examinar los componentes tanto hidrosolubles como liposolubles del extracto de AFA, los inventores prepararon primero los dos extractos hidrosolubles y liposolubles de la siguiente manera.

25 Preparación del extracto hidrosoluble

- Pesar 10 mg de extracto en 1 ml de agua destilada y homogeneizar durante un minuto con un homogeneizador mecánico.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 10' a 4 °C para eliminar los desechos celulares.
- Recoger el sobrenadante y volver a suspender el precipitado en 1 ml de agua.
- 30 • Homogeneizar durante un minuto con un homogeneizador mecánico.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 10' a 4 °C.
- Recoger el sobrenadante y mezclarlo con el obtenido de la primera extracción de agua.
- Conservar el extracto de agua (de color azul debido a la presencia de la PC) a +4 o -20 °C.

Preparación del extracto liposoluble

- 35 • Volver a suspender el precipitado obtenido de la extracción anterior en 1 ml de acetona.
- Homogeneizar durante un minuto con un homogeneizador mecánico.
- Centrifugar a 2500 rpm durante 10' a 4 °C.
- Recoger el sobrenadante y volver a suspender el precipitado en 1 ml de acetona.
- Homogeneizar durante un minuto con un homogeneizador mecánico.
- 40 • Centrifugar a 2500 rpm durante 10' a 4 °C.
- Recoger el sobrenadante y mezclarlo con el obtenido de la primera extracción de acetona.
- Conservar el extracto lipofílico (de color naranja por la presencia de carotenos) a +4 o -20 °C.

45 La figura 24 muestra el decaimiento de la fluorescencia causada por AAPH en ausencia (blanco) y presencia de los dos extractos en relación con el patrón de referencia Trolox. Sobre la base de la medición de las áreas bajo la curva, se obtuvo una ORAC para el extracto hidrosoluble de 828 mol de Trolox equiv./g de peso seco y de 468 μmol de Trolox equiv./g de peso seco para el extracto soluble en lípidos. Esto significa que la capacidad de ORAC total es de 1296 μmol de Trolox equiv./g de peso seco.

ESTUDIOS IN VIVO

50 Efecto de la suplementación con algas AFA y extracto de AFA en los niveles plasmáticos de MDA, GSH y retinol en sujetos sanos.

El siguiente estudio se realizó con una fórmula basada en su mayor parte en algas AFA y un extracto de alga AFA. A pesar de que también contenía factores gastrointestinales tales como *Lactobacillus acidophilus* y enzimas proteolíticas, la actividad antioxidante debe atribuirse principalmente a las algas.

Ocho sujetos relativamente sanos se presentaron libremente como voluntarios para participar en el estudio: cuatro

hombres y cuatro mujeres, con una edad de 23 a 63 años, cuyo historial clínico no mostró ninguna patología gastrointestinal, glucémica o de cualquier otro tipo grave previa. Ninguno de los sujetos estaba siguiendo ninguna restricción dietética o calórica especial, ninguno era vegetariano y, durante la administración de los suplementos, se aconsejó no introducir ninguna modificación en el estilo de vida o alimentación.

5 Antes de que comenzara el estudio, los participantes se sometieron a análisis médico objetivo y la evaluación de su historial médico, que en su mayor parte solo mostró la presencia de algunas de las dolencias, presumiblemente de carácter neurovegetativo, que se encuentran comúnmente en la población, tales como episodios de dispepsia, irregularidades gastrointestinales, dolores de cabeza ocasionales genéricos, sensación de pesadez después de las comidas, eventos ocasionales de dolor en las articulaciones, algunos casos de síndrome premenstrual.

10 La fórmula nutricional utilizada en el estudio se administró en «0» cápsulas vegetales con 500 mg de polvo con la composición siguiente: 200 mg de algas AFA del lago Klamath; 100 mg de extracto de AFA; 100 mg de *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 (10 bill. UFC/g); 100 mg de maltodextrinas fermentadas con actividad proteolítica. Cada participante, comenzando en el día 0, tomó nueve cápsulas al día, tres cápsulas con cada comida.

15 Las muestras de sangre se tomaron en vacutainer heparinizados en el tiempo 0, después de un mes y después de tres meses, y cada muestra se dividió en dos partes. Una parte fue analizada por el laboratorio analítico del Hospital de Urbino para los parámetros más comunes: examen hemocromocitométrico con sistema automático y principio de Coulter (impedanciométrico), análisis proteico y lipídico con sistema automático y química seca, análisis enzimático del funcionamiento del hígado, el corazón y el riñón, perfil tiroideo a través de instrumentos automatizados basado en los principios inmunofelométrico y de quimioluminiscencia, e inmunofenotipación de linfocitos mediante citometría de flujo.

20 La otra parte de la muestra de sangre se utilizó para analizar los niveles de lipoperoxidación a través de la medición de MDA y de los antioxidantes glutatión reducido (GSH), vitamina E (α -tocoferol) y vitamina A (retinol). Las muestras de sangre se procesaron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el plasma obtenido de este modo se conservó a -20 °C para ser utilizado de la siguiente manera. El MDA plasmático se midió a través de un espectrofotómetro a 535 nm de acuerdo con la metodología TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) (28). La dosificación de GSH se basó en la capacidad de GSH para reducir el disulfuro de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2 nitrobenzoico) (29). En su forma reducida, el DTNB (c.e.m. $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) desarrolla un color amarillo intenso, que se mide a 412 nm. Los niveles plasmáticos de α -tocoferol y retinol se han determinado a través de HPLC (Jasco Corporation, Tokio, Japón) como se describe en (30) mediante la utilización de una columna Alltima C18 (5 μm , 250 mm x 4,6 mm i.d.; Alltech, Italia) precedido por una precolumna Alltech (7,5 x 4,6 mm i.d.). Los perfiles cromatográficos se analizaron con el software Borwin 1,5 (Jasco Corporation, Tokio, Japón).

Los resultados obtenidos en los tres parámetros de la prueba relativos al estado oxidativo/antioxidante de los sujetos se muestran en la figura 25.

35 Es importante el hecho de que los resultados muy positivos en el estado antioxidante y en la lipoperoxidación generada por la suplementación con el producto se han obtenido sin introducir modificaciones en la dieta o el estilo de vida. Las ficocianinas AFA, el fitocromo y los MAA presentes en el alga AFA, concentrados aún más en el extracto de AFA, desempeñan también un fuerte control positivo como un captador de radicales libres y, gracias al alto nivel de clorofila, carotenoides y otras vitaminas y minerales antioxidantes presentes en las algas AFA y su extracto, el producto se postula como potente potenciador de la actividad antioxidante general en el cuerpo humano.

40 Los resultados se pueden resumir como sigue:

- a) hay un aumento promedio muy alto del retinol de plasma, concretamente +60 % después de tres meses de suplementación;
- b) hay una disminución impresionante de los niveles plasmáticos de MDA (-35,5 %), uno de los marcadores más significativos de lipoperoxidación. Este resultado confirma *in vivo* los impresionantes resultados *in vitro* mostrados anteriormente;
- 45 c) la protección antioxidante global ofrecida por el producto también ayudó al cuerpo a generar un aumento significativo de GSH endógeno (+16,8 %).

Efectos de la suplementación con AFA y un producto a base del extracto de AFA en pacientes sometidos a tratamiento hiperbárico.

50 La terapia de oxígeno hiperbárico se utiliza con éxito para el tratamiento de varias condiciones clínicas, tales como enfermedades de descompresión, intoxicaciones con monóxido de carbono, embolismos gaseosos e infecciones de tejidos. La exposición al oxígeno hiperbárico genera, de hecho, un aumento favorable del oxígeno disuelto en la sangre. Sin embargo, junto con una acción beneficiosa, también puede haber un aumento de las ROS (especies reactivas de oxígeno) en circulación, que pueden dañar las células y los tejidos si no están protegidos por suficientes defensas antioxidantes (34). Por esta razón, los pacientes sometidos a terapia hiperbárica reciben por lo general complementos de vitaminas antioxidantes.

Para evaluar los efectos de la fórmula a base de extracto de AFA y la AFA de Klamath en la tensión oxidativa

inducida por la terapia hiperbárica, se incluyeron nueve pacientes del «Centro di Terapia Iperbarica» de Fano (Italia) en el estudio. Entre los nueve pacientes había cinco hombres y cuatro mujeres, de entre 16 y 73 años de edad, y afectados por diferentes patologías como osteonecrosis aséptica del fémur (n=5), polimialgia reumática (n=1) y osteomielitis tibial y femoral (n=3).

- 5 Estos pacientes recibieron un suplemento con el mismo producto descrito anteriormente. A partir de la primera sesión hiperbárica, los pacientes comenzaron a tomar seis cápsulas al día, divididas entre las tres comidas principales.

La recogida de las muestras de sangre de cada paciente se realizó inmediatamente antes y después de la 1ª y la 15ª sesión hiperbárica. A continuación se evaluó el contenido de algunos marcadores de oxidación, tales como MDA, carbonilos, AOPP, así como tioles plasmáticos, vitaminas liposolubles y el nivel antioxidante total del plasma en sí de las muestras.

Los resultados muestran que, en los pacientes suplementados con la fórmula, el tratamiento hiperbárico no genera ningún incremento en los marcadores oxidativos incluso después de 15 sesiones (figura 26). De hecho, teniendo en cuenta que por lo general hay un aumento significativo en los marcadores con la progresión de la terapia, aquí vemos realmente una disminución del 7,8 % de los niveles de MDA (lipoperoxidación) desde la 1ª a la 15ª sesión, con valores que pasaron de $1,54 \pm 0,17 \mu\text{mol/l}$ (1ª sesión) a $1,42 \pm 0,16 \mu\text{mol/l}$ (15ª sesión) ($p < 0,05$); una disminución del 20,5 % de la AOPP (subproductos finales de la oxidación de las proteínas), cuyos valores pasaron de $105,7 \pm 18,8 \mu\text{mol/l}$ (1ª sesión) a $84,0 \pm 15,5 \mu\text{mol/l}$ (15ª sesión) ($p < 0,05$); mientras que los carbonilos de proteínas (subproductos tempranos de la oxidación de proteínas) se mantuvieron sin cambios (figura 26).

El perfil antioxidante general también se mantuvo durante el tratamiento hiperbárico. Los niveles plasmáticos de los tioles totales (grupos SH de glutatión y proteínas) aumentaron un 8,3 % ($p = \text{NS}$), con valores que variaron de $254 \pm 18 \mu\text{mol/l}$ (1ª sesión) a $275 \pm 30 \mu\text{mol/l}$ (15ª sesión). Al mismo tiempo, vimos un aumento significativo ($p < 0,05$) del estado antioxidante total del plasma, con valores que pasaron de $1,19 \pm 0,03 \text{ mmol/l}$ equivalentes de Trolox (1ª sesión) a $2,04 \pm 0,03 \text{ mmol/l}$ equivalentes de Trolox (15ª sesión), como se muestra en las figuras 27 y 28.

Dado que los niveles plasmáticos de los antioxidantes más comunes (tocoferoles, carotenoides, retinol) permanecen sin cambios, podemos suponer que el aumento en el estado antioxidante total se debe en parte a la reposición del antioxidante consumido, como los carotenoides y el retinol, por los mismos nutrientes proporcionados por la fórmula y por la acumulación paralela en el sistema circulatorio de los antioxidantes específicos de las algas como las ficocianinas, el fitocromo, los MAA y la clorofila. En total, la fórmula a base de AFA y extracto de AFA aumenta en gran medida las defensas antioxidantes, protegiendo eficazmente a los pacientes sometidos a terapia hiperbárica del aumento de los radicales libres producidos por el oxígeno hiperbárico.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Estudios in vitro.

Las enzimas ciclooxigenasa (COX) catalizan la primera etapa en la síntesis de eicosanoides como las prostaglandinas (PG), los tromboxanos y las prostaciclina. Existen dos isoformas distintas de esta enzima: COX-1 está implicada en la regulación normal de la homeostasis; mientras que COX-2 es responsable de la producción de PG, que a su vez promueven la inflamación aguda.

Las ficocianinas de las algas verde-azuladas tienen una potente actividad antiinflamatoria. Se ha demostrado que las ficocianinas de la microalga *Spirulina platensis* son eficientes inhibidores selectivos de COX-2 (35), y que inhiben de una manera fisiológica y parcial la cascada que, a partir de los ácidos grasos, conduce a la formación de eicosanoides inflamatorios (36).

Dado que las ficocianinas de las algas AFA de Klamath son diferentes de las de la espirulina y a que nunca se ha examinado su efecto sobre las enzimas COX, los inventores decidieron realizar tal prueba a través del kit inmunoenzimático «Ensayo de selección de inhibidor de COX» de la compañía Cayman. Así, se evaluó la inhibición de COX-1 y COX-2 por parte del extracto de AFA (tanto la parte hidrosoluble en agua, como la liposoluble en acetona; intervalo 25-200 $\mu\text{g/ml}$), PC pura (0,03-3 μM) y PCB (0-15 μM). Los resultados se muestran en la figura 29, que presenta la gráfica de la actividad porcentual de COX-1 y COX-2 a las diferentes concentraciones de extracto de AFA, PC y PCB.

La fracción liposoluble del extracto básico de AFA inhibe selectivamente la COX-2 con una CI_{50} de 134 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la COX-1 aumenta. La fracción hidrosoluble también inhibe selectivamente COX-2 con una CI_{50} de 84,5 $\mu\text{g/ml}$; mientras que la COX-1 solamente experimenta una inhibición moderada (inhibición del 30 % para 200 $\mu\text{g/ml}$ de extracto de AFA).

La PC pura actúa sobre ambas enzimas, pero incluso en este caso, la inhibición es preferencial para la COX-2 comparado con la COX-1, y la actividad sobre la COX-2 es casi 10 veces mayor que sobre la COX-1 (CI_{50} 0,15 frente a 1,1 μM). Por último, la PCB cromófora aumenta la actividad de COX-1 y apenas inhibe la COX-2.

Por tanto, confirmamos que las ficocianinas de las algas AFA de Klamath son potentes moléculas antiinflamatorias, capaces de una inhibición selectiva significativa de la COX-2. También es interesante señalar que la inhibición de la COX no solo se produce por el extracto hidrosoluble, que contiene ficocianinas, sino también por el extracto liposoluble, lo que indica la presencia de otras moléculas en el extracto de AFA.

5 Aquí también podemos proponer algunas consideraciones comparativas con los estudios que se han realizado en las ficocianinas de la espirulina. En el estudio de Reddy y col., se notificó que la CI_{50} para las ficocianinas de *Spirulina platensis* era de 0,18 μM , en comparación con 0,15 μM de las ficocianinas de Klamath. Aparte de esta ligera diferencia a favor de la PC de Klamath, hay otra diferencia más relevante que debe destacarse. A 1 μM , las ficocianinas de la espirulina generan una inhibición de la COX-2 en torno al 60 %; mientras que las ficocianinas de Klamath, a la misma concentración de 1 μM , dan lugar a una inhibición de alrededor del 75 %. Esta es una diferencia sustancial que muestra que las ficocianinas de AFA pueden generar efectos antiinflamatorios más profundos y rápidos.

15 Además, el porcentaje de inhibición producida por las ficocianinas de AFA se encuentra a medio camino entre el nivel inferior de la PC de la espirulina y el nivel superior de fármacos tales como celecoxib y rofecoxib (37). Esto significa que el grado de inhibición de la COX-2 producido por la PC de las algas de Klamath es ideal: lo suficientemente alto para producir una actividad antiinflamatoria rápida y eficaz sin dejar de ser parcial y, por lo tanto, fisiológico para evitar los efectos secundarios cardiovasculares típicos de los fármacos.

20 La actividad de inhibición de COX-2 del extracto de AFA es asimismo muy relevante. Como se muestra en las figuras, el componente liposoluble tiene un grado significativo de inhibición (CI_{50} 134 $\mu g/ml$), aunque menor que el del componente hidrosoluble, junto con una actividad de promoción de la COX-1. Esto da lugar a un resultado interesante, ya que si la inhibición de la COX-2 reduce la producción de eicosanoides inflamatorios, la estimulación de la COX-1 aumenta la producción endógena de los eicosanoides antiinflamatorios, duplicando así el efecto antiinflamatorio total. Esto convierte a la fracción liposoluble del extracto básico de AFA en un agente antiinflamatorio único, dotado de importantes propiedades farmacológicas. La presente patente protege también el uso nutricional y farmacológico de cualquier extracto liposoluble a partir de algas de Klamath.

25 Si, a continuación, nos fijamos en el extracto básico de AFA en su conjunto, la actividad combinada de los componentes hidrosolubles y liposolubles origina una inhibición significativa de la COX-2, dado que ambos actúan como poderosos inhibidores de COX-2; y un mantenimiento sustancial del mismo nivel de COX-1, resultante de la reducción de la COX-1 producida por el componente hidrosoluble por un lado (-30 %), y la estimulación de la COX-1 producida por el componente liposoluble (+45 %). El CI_{50} para el extracto de AFA en su conjunto es de alrededor de 100 $\mu g/ml$ (el promedio de los dos componentes), mientras que a la dosis de 200 $\mu g/ml$ hay una inhibición de la COX-2 de aproximadamente el 75 %. Este es el nivel de inhibición porcentual analizado anteriormente en relación con la PC pura, y la consideración presentada entonces adquiere un significado particular a la luz del hecho de que 200 $\mu g/ml$ *in vitro* pueden equivaler de una forma plausible a una dosis *en vivo* de tan solo 600 a 800 mg (38).
35 Incluso a la espera de confirmaciones experimentales, se puede afirmar de forma plausible que el extracto de AFA, en dosis que se pueden alcanzar fácilmente con solo 1-2 cápsulas/comprimidos al día, constituye un agente antiinflamatorio potente dotado de propiedades terapéuticas, dietéticas y farmacológicas realmente únicas. Estas propiedades se han confirmado mediante un estudio en animales *in vivo*.

Estudio in vivo

40 En este estudio se investigaron las propiedades antiinflamatorias de un extracto de algas que contiene PC (extracto de AFA) en ratones albinos suizos machos sometidos a un estímulo proinflamatorio con 0,25 $\mu mol/kg$ de capsaicina (el principio activo de la guindilla) o con la sustancia P 2 $nmol/kg$ (que actúa con los receptores responsables de la respuesta inflamatoria neurogénica). Los niveles de inflamación en los tejidos se han medido a través de una dosificación espectrofotométrica del colorante azul de Evan acumulado en los puntos de inflamación como consecuencia de la salida de las proteínas del plasma en los tejidos. Como se muestra en la figura 30, la inyección intravenosa de capsaicina (0,25 $\mu mol/kg$) o SP (2 $nmol/kg$) induce y aumenta el flujo de salida del plasma en los tejidos examinados en comparación con el observado en los ratones de control no sometidos al estímulo inflamatorio. El tratamiento previo de los ratones con el extracto de AFA (1600 mg/kg u 800 mg/kg) inhibe de forma significativa el flujo de salida del plasma y lo reduce a los mismos valores que en el grupo de control.

50 De hecho, la inyección de capsaicina induce un aumento tanto del flujo de salida del plasma en el estómago ($23,2 \pm 0,2$ frente a $29,9 \pm 0,5$ ng EB/g de tejido, $p < 0,05$) y en la vejiga urinaria ($33,2 \pm 5,2$ frente a $39,9 \pm 1,8$ ng EB/g de tejido, $p < 0,05$). El tratamiento previo de los ratones con 1600 mg/kg de extracto de AFA induce una disminución significativa del flujo de salida de las proteínas del plasma en ambos tejidos, con valores de $23,6 \pm 0,2$ ng EB/g en el estómago y $30,6 \pm 2,3$ ng EB/g en la vejiga urinaria.

55 De manera similar, la inyección de SP induce un aumento significativo del flujo de salida de plasma en el estómago ($13,5 \pm 1,1$ frente a $22,1 \pm 1,8$ ng EB/g de tejido, $p < 0,05$) y en el duodeno ($17,2 \pm 1,2$ frente a $24,0 \pm 1,8$ ng EB/g de tejido $p < 0,05$). El tratamiento previo de los ratones con 800 mg/kg de extracto de AFA disminuye el flujo de salida de proteínas plasmáticas, con valores de $20,1 \pm 1,3$ ng EB/g en el estómago ($p = ns$) y $16,7 \pm 1,9$ ng EB/g en la vejiga urinaria ($p < 0,05$) (figura 31).

ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA

En la bibliografía se ha informado de que la PC pura a partir del alga espirulina posee *in vitro* una propiedad significativa de inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales como las líneas celulares de leucemia (39) y las líneas celulares macrófágicas (40) por medio de un mecanismo apoptótico.

5 Se analizaron a continuación la actividad antiproliferativa de la PC pura de AFA, con su complejo de C-PC/PEC, en la línea celular tumoral RAW 264.7 monocitomacrofágica mediante la incubación de las células con dosis crecientes de PC (intervalo 0-25 µM). El análisis de la vitalidad de las células después de 24, 48 y 72 horas de incubación ha demostrado que la PC de AFA tiene un efecto antiproliferativo muy significativo dependiente de la dosis y el tiempo, como muestran los resultados de la figura 32.

10 **PROPIEDADES DERMATOLÓGICAS Y COSMÉTICAS DEL EXTRACTO DE AFA**

Teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de las ficocianinas y otras moléculas sinérgicas en las algas AFA de Klamath y sus extractos, es evidente que, además de la administración oral con fines nutricionales y farmacológicos, también pueden aplicarse por vía tópica sobre la piel tanto para usos terapéuticos dermatológicos como para fines cosméticos.

15 **Prueba de parche oclusivo (ensayo de irritación)**

Como estudio preliminar, se analizaron las algas AFA de Klamath desde el punto de vista toxicológico para demostrar que su uso en dermatología no causa ninguna reacción tóxica o inflamatoria. La prueba se realizó en el «Centro de Cosmetología» de la Universidad de Ferrara (Italia). La «prueba de parche oclusivo» se llevó a cabo con el fin de evaluar el efecto irritante del producto cosmético cuando se aplica en una sola dosis sobre la piel humana intacta. La prueba se realizó en 20 voluntarios sanos de ambos sexos que habían dado un consentimiento por escrito para la experimentación. Se excluyó a los siguientes sujetos del ensayo:

- todos los sujetos que habían participado en pruebas similares en los últimos dos meses;
- todos los sujetos afectados por dermatitis;
- todos los sujetos con un historial de reacción alérgica en la piel;
- 25 - todos los sujetos en tratamiento antiinflamatorio (bien esteroideo o no esteroideo).

La prueba se realizó sobre el polvo de algas AFA de Klamath. Para preparar el producto para la aplicación, el polvo se mezcló con agua destilada y se aplicó directamente en una cámara de Finn (Bracco) mediante una jeringuilla; a continuación, se aplicó a la piel del antebrazo o la espalda de los participantes protegida con una cinta autoadhesiva. El producto cosmético se dejó en contacto con la superficie de la piel durante 48 horas y se pidió a los participantes que no se lavaran el área en la se había aplicado el producto en las 48 horas siguientes. El experimentador se encargó de retirar la cámara de Finn y limpiar el producto cosmético residual de la piel. La evaluación de las reacciones de la piel se realizó 15 minutos y 24 horas después de la retirada de las cámaras de Finn de acuerdo con la siguiente escala:

35 Eritema: 0- Ausente 1- Leve 2- Claramente visible 3- Moderado 4- Grave Edema: 0- Ausente 1- Leve 2- Claramente visible 3- Moderado 4- Grave

La suma de la puntuación para el eritema y el edema se define como «índice de irritación». Los valores del índice de irritación tras 15 minutos y 24 horas se registraron en el informe final. Se calculó el índice medio de la irritación de las 20 pruebas. El producto se clasificó a continuación de acuerdo con los siguientes parámetros:

Irritación media	
ÍNDICE	CLASE
<0,5	no irritante
0,5-2,0	ligeramente irritante
2,0-5,0	moderadamente irritante
5,0-8,0	altamente irritante

40 Los resultados de la prueba en algas AFA de Klamath, de acuerdo con la metodología y los parámetros descritos anteriormente, son:

«El producto probado, aplicado diluido con agua destilada (1:10) en condiciones oclusivas sobre la piel sana de 20 voluntarios se tradujo en un índice medio de irritación de:

45 0,25 (cero, veinticinco) 15 minutos después de retirar la cámara de Finn

0,15 (cero, quince) 24 horas después de retirar la cámara de Finn.

De acuerdo con la escala de evaluación utilizada, el producto de algas de Klamath (*Aphanizomenon Flos Aquae*) pueden clasificarse como: no irritante.

Estudio de eficacia

5 Una vez comprobada la naturaleza no tóxica y no irritante de las algas como ingredientes cosméticos y dermatológicos, se procedió a preparar una crema con un 8 % de extracto básico de algas de Klamath para probar su eficacia en parámetros estéticos como la elasticidad de la piel, la hidratación y las arrugas. La prueba se llevó a cabo al azar en 15 individuos de entre 30 y 65 años. Estos sujetos no fueron elegidos por problemas dermatológicos o cutáneos específicos y, de hecho, en parámetros tales como el volumen de las arrugas, el hecho de que la mayoría de los participantes no tuviera arrugas importantes hizo que el resultado fuera estadísticamente insignificante. Sin embargo, los resultados sobre la reducción de arrugas, cuando estaban presentes, fueron bastante claros. El estudio, aunque no definitivo sobre algunos parámetros por la falta de significación estadística, es un informe preliminar que confirma firmemente las propiedades dermatológicas y cosméticas del extracto de AFA y que, por tanto, merece estudios adicionales más claramente orientados a los problemas cutáneos y dermatológicos específicos. A continuación se presenta la metodología y los principales resultados del estudio.

La prueba se realizó mediante la comparación de un producto con 8 % de extracto de AFA con un producto placebo constituido por la misma base vegetal, pero sin el extracto de algas. Denominación de los dos productos:

- a) emulsión vegetal con extracto de AFA
- b) emulsión vegetal básica

20 Para el ensayo, se seleccionaron 15 voluntarios de sexo femenino, con una edad comprendida entre 30 y 65 años de acuerdo con los criterios de inclusión que se mencionan a continuación:

- buen estado de salud general;
- ausencia de dermatopatías;
- ningún tratamiento farmacológico en curso;
- 25 • promesa de no cambiar la rutina diaria habitual;
- ausencia de atopia en la anamnesis médica.

Los propios participantes se aplicaron los dos productos cada día, uno en cada lado de la cara, como sigue:

- en el lado derecho de la cara (DX): emulsión vegetal con extracto de AFA;
- en el lado izquierdo de la cara (SX): emulsión vegetal básica.

30 Los parámetros analizados para este estudio fueron:

- elasticidad de la piel
- índice de hidratación
- perfilometría de la piel

Las mediciones de los parámetros se realizaron de acuerdo con el siguiente esquema:

- 35 antes de la aplicación del producto (T0)
- después de 15 (T15) y 30 (T30) días de aplicación de los productos.

Elasticidad de la piel

40 La elasticidad de la piel se midió por medio de un CUTOMETER® SEM 575 (COURAGE + KHAZAKA electronic GmbH). La medición de la elasticidad se llevó a cabo sobre una escala de 0 a 1, donde 1 representa la máxima elasticidad posible.

Índice de hidratación de la piel

45 La medición de la hidratación de la piel se basó en el CORNEOMETER®, reconocido internacionalmente. Una piel sana en condiciones ambientales normales (20 °C y 40-60 % de humedad del aire) en la región de prueba debería presentar un índice de hidratación > 50. Un índice de hidratación en el intervalo de 35-50 revela una piel seca, mientras que un resultado inferior a 35 significa una piel muy seca. Estos valores son solo indicativos para la interpretación de los resultados.

Perfilometría de la piel

Se utilizó VISIOSCAN VC 98 para el análisis *en vivo* de la superficie de la piel y examinar la reducción de las arrugas (figura 33). Los parámetros son:

- 50 SEr: rugosidad;

- SEsc: descamación;
- SEsm: suavidad, es proporcional a la anchura y la forma de las arrugas;
- Sew: arrugas, es proporcional al número y la anchura de las arrugas;
- Volumen: es proporcional a la profundidad de las arrugas, cuanto más profundas las arrugas, mayor es el parámetro de volumen.

5 Cuando se analizaron estadísticamente los resultados de los diferentes parámetros mediante un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) realizado con el software específico Statgraphic plus (versión 5.1), solo se obtuvieron resultados significativos para dos parámetros, concretamente la elasticidad de la piel y la hidratación de la piel. La conclusión a la que llegaron los investigadores de la Universidad de Pavía, que realizaron el análisis bajo las instrucciones de los inventores, fue la siguiente: «El uso del producto activo, aplicado en el lado derecho de la cara, dio lugar a un aumento estadísticamente significativo de la hidratación y la elasticidad respecto a los valores de referencia, mientras que el tratamiento con placebo (lado izquierdo) no dio lugar a variaciones significativas durante todo el periodo de tratamiento».

10 En cuanto a la conclusión anterior, no hubo ningún resultado estadísticamente significativo para la perfilometría de la piel. Sin embargo, esto no se debió a un fallo del producto, sino al hecho de que la mayoría de los participantes presentaba condiciones iniciales, en el tiempo 0, que imposibilitaron cualquier mejora importante, dado que su piel estaba ya cerca de una condición óptima. Este ha sido el punto débil del estudio. Sin embargo, cuando se seleccionaron a participantes con una condición cutánea que realmente necesitaba una mejora (sin caer en una condición de la patología dermatológica), y se interpretaron los resultados en consecuencia, se obtuvieron los siguientes resultados.

15 **Elasticidad de la piel**

De los 15 participantes, solamente 12 presentaban unas condiciones de elasticidad no óptimas. De hecho, dado un índice de elasticidad de 0 a 1 (siendo 1 el máximo posible), se tuvo un intervalo de valores entre los participantes de 0,57 a 0,98. Sobre este intervalo, se establecieron tres categorías posibles:

- 25 De 0,9 a 1 = condición de elasticidad óptima
- De 0,75 a 0,9 = condición de elasticidad media
- < 0,75 = condición de elasticidad baja.

Teniendo en cuenta un periodo de 30 días de tratamiento, el gráfico de la figura 34 informa sobre el nivel de mejora como el paso de los participantes de un nivel inferior a uno superior:

30 De los 12 participantes analizados, cuatro tenían al principio una elasticidad baja y ocho una elasticidad de la piel moderada o media. Después de 30 días de tratamiento, no hubo más participantes con elasticidad baja; solo dos con elasticidad media, y los diez restantes habían cambiado hasta tener una elasticidad alta, con un impresionante cambio de 0 a 10 en esta última categoría.

35 **Hidratación de la piel**

Una piel sana en condiciones ambientales normales (20 °C y 40-60 % de humedad del aire) en la región de prueba debería presentar un índice de hidratación > 50. Los valores de hidratación en el intervalo de 35-50 revelan una piel moderadamente seca, mientras que un valor <35 indica una piel muy seca. A partir de estos valores como el patrón de interpretación de los inventores, el gráfico de la figura 35 informa de la mejora realizada en el periodo de 30 días como el paso de los participantes de un nivel inferior a otro superior:

40 De los 15 participantes, solo uno (color azul) tenía una piel muy seca, siete tenían una piel moderadamente seca, y siete tenían una piel normalmente hidratada. A pesar de que solo ocho de los 15 necesitaban una mejora real, el resultado final muestra que al final del periodo de tratamiento no había participantes con una piel muy seca; los participantes con la piel moderadamente seca se redujeron de siete a cinco, mientras que los participantes con una piel con una hidratación saludable pasaron de siete a diez.

45 **Perfilometría de la piel**

En cuanto a la perfilometría de la piel, algunos de los parámetros analizados no eran utilizables porque muchos de los participantes tenían valores iniciales o T0 cercanos a nada. Es decir, cuando se observó el Ser o parámetro de aspereza de la piel, se vio que 12 de los 15 participantes tenían un valor inicial de 0,0 o ninguna aspereza de la piel en absoluto; y en relación con el parámetro SEsc o descamación de la piel, 10 de los 15 participantes presentaban un valor de 0,0 o ninguna descamación en absoluto. Por lo tanto, los inventores limitaron su evaluación a los dos parámetros Sew, o número y anchura de las arrugas, y VOL, en referencia al volumen de las arrugas medido en términos de profundidad de las arrugas. Incluso en este caso, puesto que siete de los participantes para Sew y nueve para VOL tenían valores iniciales que requerían corrección, el resto tenía valores cercanos a cero, no fue posible alcanzar una significación estadística. No obstante, los participantes que tenían valores ligeramente alterados experimentaron mejoras significativas, como se muestra en la figura 36.

Por tanto, en términos de reducción del volumen o la profundidad de las arrugas, tenemos un intervalo de disminución en el periodo de 30 días de tratamiento del -18 % al -65 %, un nivel de logro muy significativo en términos de mejora del volumen de las arrugas.

5 En la figura 37, hay una reducción del número y la anchura de las arrugas en el periodo de 30 días de tratamiento que va del -5 % al -48 %, de nuevo un resultado significativo que justifica la afirmación de la potencial eficacia de la crema cosmética a base de extracto de AFA en las arrugas y, sobre todo, que justifica la realización de estudios más específicos sobre la reducción de las arrugas mediante la selección de participantes afectados más específicamente por este problema.

Bibliografía

- 10 1. Glazer A.N., Phycobilisomes, en *Methods Enzymol* 1988, 167;304-312.
2. Hirata T., y col., Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*, en *J Appl Phycol* 2000, 12:435-439.
3. Fuglistaller P., y col., Isolation and characterization of phycoerythrocyanin and chromatic adaptation of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*, en *Arch Microbiol* 1981, 129:268-274.
- 15 5. Suh HJ y col., Mycosporine glycine protects biological systems against photodynamic damage by quenching singlet oxygen with a high efficiency, en *Photochem Photobiol.* Ago 2003;78(2):109-13.
6. Groniger A y col., Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae--a database, en *J Photochem Photobiol B.* Nov 2000;58(2-3): 115-22.
- 20 7. Sinha RP y col., Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation, en *J Photochem Photobiol B.* Jul 2001; 60(2-3):129-35.
8. Garcia-Pichel F y col., Occurrence of UV-Absorbing, Mycosporine-Like Compounds among Cyanobacterial Isolates and an Estimate of Their Screening Capacity, in *Appl Environ Microbiol.* Ene 1993;59(1):163-169.
9. Kumar SS. y col., Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: an ESR study, in *Free Radic Res.* Nov 2001; 35(5):563-74; Kamat JP. y col., Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo, in *Biochim Biophys Acta* 27 Sep 2000;1487(2-3):113-27.
- 25 10. Ding XW. y col., CHL prevent colon neoplasm in mice and its selective inhibition on COX-2, en *Ai Zheng.* Nov 2004; 23(11 Supl):1409-13.
11. Fahey JW, Chlorophyll, chlorophyllin and related tetrapyrroles are significant inducers of mammalian phase 2 cytoprotective genes. en *Carcinogenesis.* 2005 Jul;26(7):1247-55; Negishi T. y col., Antigenotoxic activity of natural chlorophylls, en *Mutat Res.* 12 May 1997;376(1-2):97-100.
- 30 12. Kensler TW, Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas, in *Gastroenterology.* Nov 2004;127(5 Supl 1):S310-8.
13. Chiu LC. y col., The chlorophyllin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells is associated with ERK deactivation and Cyclin D1 depletion, en *Int J Mol Med.* Oct 2005;16(4):735-40; Chiu LC., Antiproliferative effect of chlorophyllin derived from a traditional Chinese medicine *Bombyx mori* excreta on human breast cancer MCF-7 cells, en *Int J Oncol.* Sep 2003;23(3):729-35.
- 35 14. G. Darío Díaz y col., Caspase-8 and Apoptosis-inducing Factor Mediate a Cytochrome c-independent Pathway of Apoptosis in Human Colon Cancer Cells Induced by the Dietary Phytochemical Chlorophyllin, en *Cancer Research* 63, 1254-1261, 15 de Marzo de 2003.
- 40 15. Blum CA. y col., Promotion versus suppression of rat colon carcinogenesis by chlorophyllin and chlorophyll: modulation of apoptosis, cell proliferation, and beta-catenin/Tcf signaling, en *Mutat Res.* Feb-Mar 2003;523-524:217-231.
- 45 16. Simon D., Helliwell S., Extraction and quantification of Chlorophyll A from freshwater green algae, en *Water Research*, Vol. 32, Nº 7, pp. 2220-2223, 1998.
17. Porra R., The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b., en *Photosynthesis Research* 73: 149-156, 2002.
18. Seddon y col., Dietary carotenoids, vitamins A, C and E, and Advanced Age-Related Macular Degeneration, en *JAMA*, 1994; 272: 1413-20; Sobeck U. y col., Determination of vitamin A palmitate in buccal mucosal cells: a pilot study, en *Eur J Med Res.* 28 Jun 2002;7(6):287-9; Rinaldi P. y col., Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease, en *Neurobiol Aging.* Nov 2003;24(7):915-9; Lovett-Racke AE, Racke MK., Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells, en *Cell Immunol.* Ene 2002;215(1):54-60.
- 50 19. Zhao W, Han Y., Suppressive effect of carotenoids on the luminol dependent chemiluminescence of the stimulated rat macrophages, en *Chin Med Sci J.* Jun 1999;14(2):121-4.
20. Cantrell A. y col., Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment, en *Arch Biochem Biophys.* 1 Abr 2003;412(1):47-54.
21. Surai AP. y col., Effect of canthaxanthin content of the maternal diet on the antioxidant system of the developing chick, en *Br Poult Sci.* Sep 2003;44(4):612-9.
- 60 22. Glazer A.N., Phycobiliproteins, en *Methods Enzymol*, 1988, 167: 291-303.
23. Bhat V.B., y col., C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*, en *Biochem Biophys Res Commun.*, 2000; 275(1):20-25; Romy, C. y col., Antioxidant and antiinflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae, en *Inflamm Res*, Ene 1998; 47(1): 36-41.

24. Reddy C.M., y col., Selective Inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, en *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 277(3): 599-603.
25. Gonzales R., y col., Anti-inflammatory activity of phycoyanin extract in acetic acid induced colitis in rats, in *Pharmacol Res.* 1999; 39(1): 55-9.
- 5 26. Gonzales R., y col., Anti-inflammatory activity of phycoyanin extract in acetic acid induced colitis in rats, in *Pharmacol Res.* 1999; 39(1): 55-9.
27. Vadiraja BB, y col., Hepatoprotective effect of C-phycoyanin protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats, en *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 249(2): 428-31.
28. Romay C., y col., Phycoyanin extract reduces leukotriene B4 levels in arachidonic induced mouse-ear inflammation test, en *J Pharm Pharmacol.* 1999,51(5):641-42.
- 10 29. Rimbau V., y col., Protective effects of C-phycoyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus, en *Neurosci Lett* 1999, 276(2):75-8.
- 30 Rimbau V. y col., C-phycoyanin protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis, en *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364(2): 96-104.
- 15 31. Prior R.L., y col., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, en *J Agric Food Chem.* 2005;53(10):4290-302.
32. Ou B., y col., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, en *J Agric Food Chem.* 2001;49(10):4619-26.
- 20 33. Hsew, Y.C., y col., Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes, en *Life Sciences* 71 (4), 469-482.
34. Benedetti S., y col., Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen, en *Clin Biochem.* 2004;37(4):312-7.
35. Reddy C.M. y col., Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*, en *Biochem Biophys Res Commun* 277(3):599-603, 2000.
- 25 36. Romay C. y col., Effects of phycoyanin extract on prostaglandin E2 levels in mouse ear inflammation test, en *Drug Res* 50 (2): 1106-1109, 2000.
37. Para la comparación de la inhibición de COX-2 producida por las ficocianinas de spirulina y por los fármacos celecoxib y rofecoxib, véase Reddy C.M. y col., *Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from Spirulina platensis*, en *Biochem Biophys Res Commun* 277(3):599-603, 2000.
- 30 38. Ya que un ser humano tiene aproximadamente 3,5 litros de sangre, 200 µg/ml multiplicado por 3,5 da una cantidad total de 600-800 mg. Claramente es un cálculo teórico que requiere confirmaciones experimentales, pero es una hipótesis plausible.
39. Subhashini J. y col., Molecular mechanisms in C-Phycoyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562, en *Biochem Pharmacol.* 2004;68(3):453-62.
- 35 40. Reddy M.C., y col., C-Phycoyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, en *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 304(2):385-92.
41. Romay Ch., Gonzales R., Phycoyanin is an Antioxidant Protector of Human Erythrocytes Against Lysis by Peroxyl Radicals, en *J.Pharm.Pharmacol.* (2000) 52: 367-8.
- 40 42. Benedetti S., y col., Antioxydant properties of a novel phycoyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon Flos Aquae*, en *Life Sciences*, 75 (2004): 2353-2362.
43. Subhashini J, y col., Molecular mechanisms in C-Phycoyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562., en *Biochem Pharmacol.* 1 Ago 2004;68(3):453-62.
- 45 44. Hughes J, Lamparter T., Prokaryotes and Phytochrome. The Connection to Chromophores and Signaling, in *Plant Physiology*, Diciembre 1999, Vol. 121, pp. 1059-1068.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto acuoso de la microalga de Klamath *Aphanizomenon Flos Aquae Aquae Ralfs ex Born. & Flah. Var. flos aquae* (AFA de Klamath), obtenido a través de los siguientes pasos:
 - 5 a) congelar el alga AFA recién cosechada y descongelarla o, si el material de partida es polvo de alga AFA seco, sonicar el polvo de AFA diluido en agua para romper las células;
 - b) centrifugar el producto de la etapa a) para separar el sobrenadante del precipitado;
 - c) recoger el sobrenadante que contiene los componentes hidrosolubles y concentrar los componentes hidrosolubles
 - 10 d) sometiendo el extracto obtenido en el paso c) a una ultrafiltración de exclusión por tamaño con una membrana con un umbral de exclusión de peso molecular de 30 kDa;
 - e) recoger el retenido.
2. El extracto de microalgas de Klamath según la reivindicación 1, al cual se le añade una fracción enriquecida con componentes lipófilos obtenida a través de los siguientes pasos:
 - 15 f) suspender el precipitado seco obtenido en el paso b) de la reivindicación 1 en etanol puro, homogeneizar y mantener el homogeneizado bajo agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad;
 - g) centrifugar la suspensión resultante a 3000 rpm durante 5' a 4 °C;
 - h) recoger el sobrenadante;
 - i) opcionalmente, someter el precipitado a una segunda extracción con etanol de acuerdo con los pasos f) a h);
 - 20 j) secar de manera opcional el sobrenadante para obtener un concentrado soluble en lípidos.
3. Un componente biológicamente activo aislado del extracto de microalga AFA de Klamath según las reivindicaciones 1-2, que es el complejo de ficocianina/ficoeritrocianina (C-PC/PEC).
4. Un componente biológicamente activo aislado del extracto de microalga AFA de Klamath según las reivindicaciones 1-2, que es el fitocromo de AFA.
- 25 5. Una composición de materia que contiene un extracto de algas de Klamath según las reivindicaciones 1-2, o un componente aislado según las reivindicaciones 3-4 o una mezcla de los mismos.
6. Una composición según la reivindicación 5, que además contiene clorofila, beta-caroteno, carotenoides provitamina A, carotenos xantófilos, cantaxantina, vitaminas o minerales.
7. Una composición según las reivindicaciones 5-6, que es adecuada para uso nutricional, cosmético o farmacéutico.
- 30 8. El uso de un extracto de algas de Klamath según las reivindicaciones 1-2 o de un componente aislado del mismo según las reivindicaciones 3-4 para la preparación de una composición para prevenir, controlar o tratar el daño oxidativo de las células o los tejidos en un sujeto.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el daño oxidativo es causado por un tratamiento hiperbárico.
10. El uso de un extracto de algas de Klamath según las reivindicaciones 1-2 o de un componente aislado del mismo según las reivindicaciones 3-4 para la preparación de una composición para prevenir, controlar o tratar la inflamación en un sujeto.
- 35 11. El uso de un extracto de algas de Klamath según las reivindicaciones 1-2 o de un componente aislado del mismo según las reivindicaciones 3-4 para la preparación de una composición para prevenir, controlar o tratar la proliferación de células tumorales en un sujeto.
- 40 12. El uso de un extracto de algas de Klamath según las reivindicaciones 1-2 o de un componente aislado del mismo según las reivindicaciones 3-4 para la preparación de una composición para prevenir, controlar o tratar afecciones dermatológicas en un sujeto.
13. El uso de un extracto de algas de Klamath según las reivindicaciones 1-2 o de un componente aislado del mismo según las reivindicaciones 3-4 para la preparación de una composición para prevenir, controlar o tratar patologías oftálmicas en un sujeto.
- 45 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la composición tiene la forma de un colirio líquido.
15. El uso según las reivindicaciones 8-14, en el que el sujeto es un sujeto humano.

FIGURA 1

SYNECHOCYSTIS
sp. 6803

APHANIZOMENON
FLOS AQUA



FIGURA 2

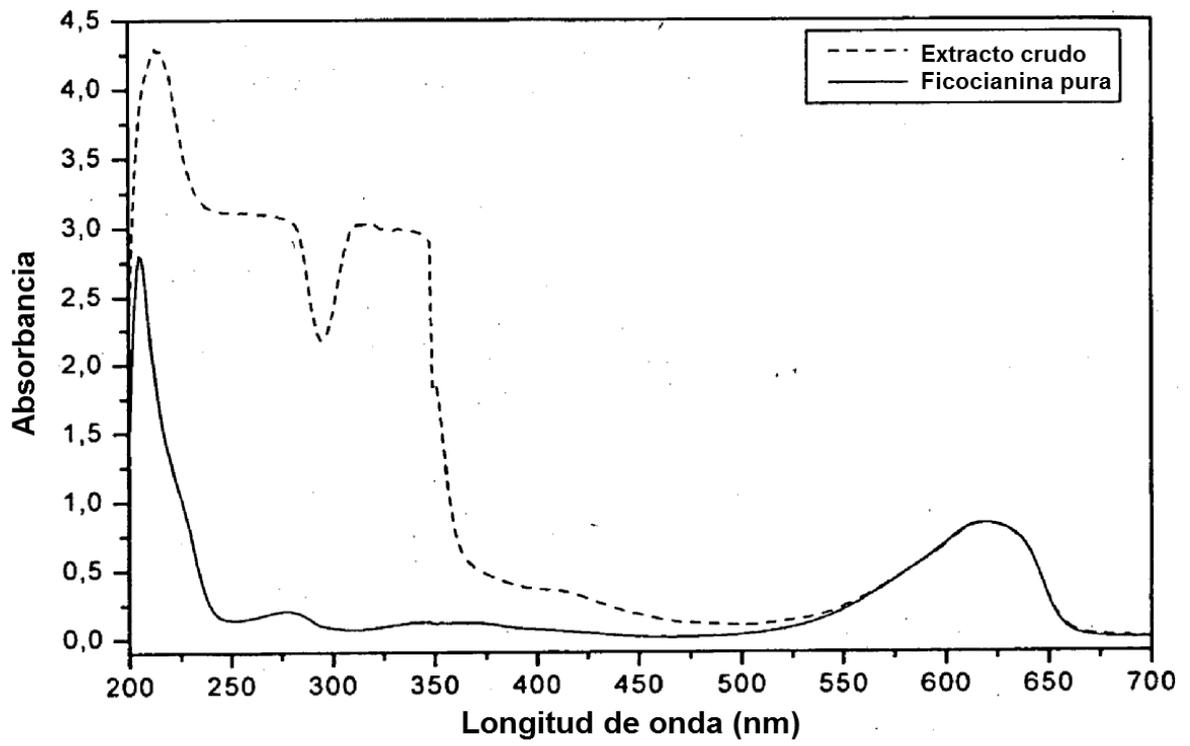


FIGURA 3

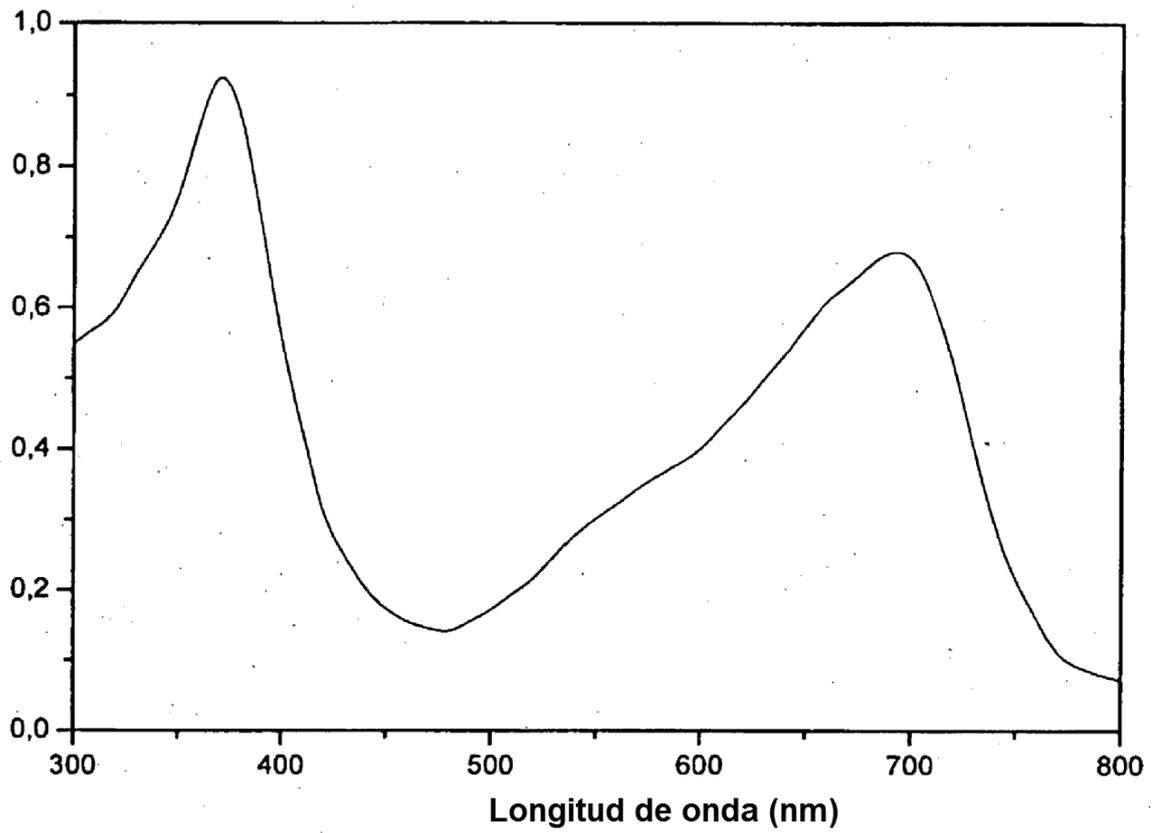


FIGURA 4

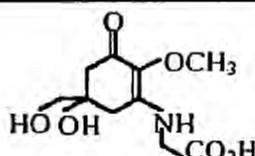
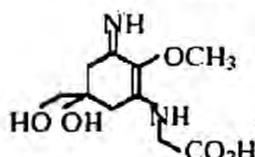
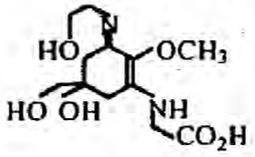
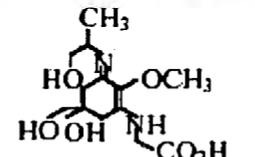
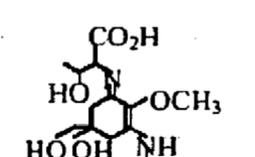
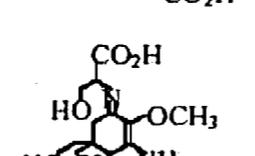
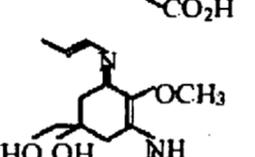
Compuestos fotoprotectores	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	Estructura molecular	Coefficiente de extinción (ϵ)
Micosporina-glicina	310		28100
Palitina	320		36200
Asterina-330	330		43500
Palitinol	332		43500
Porphyra-334	334		42300
Shinorina	334		44700
Paliteno	360		50000

FIGURA 5

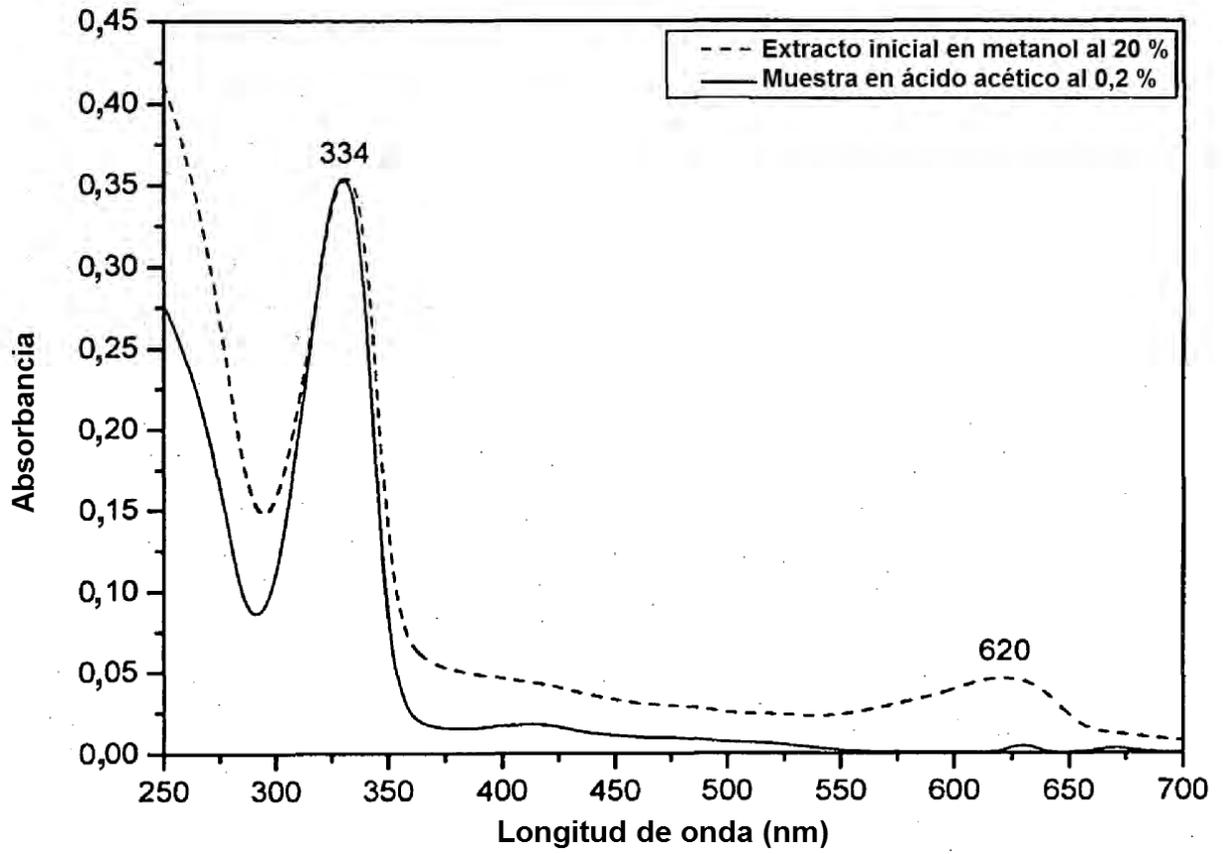


FIGURA 6

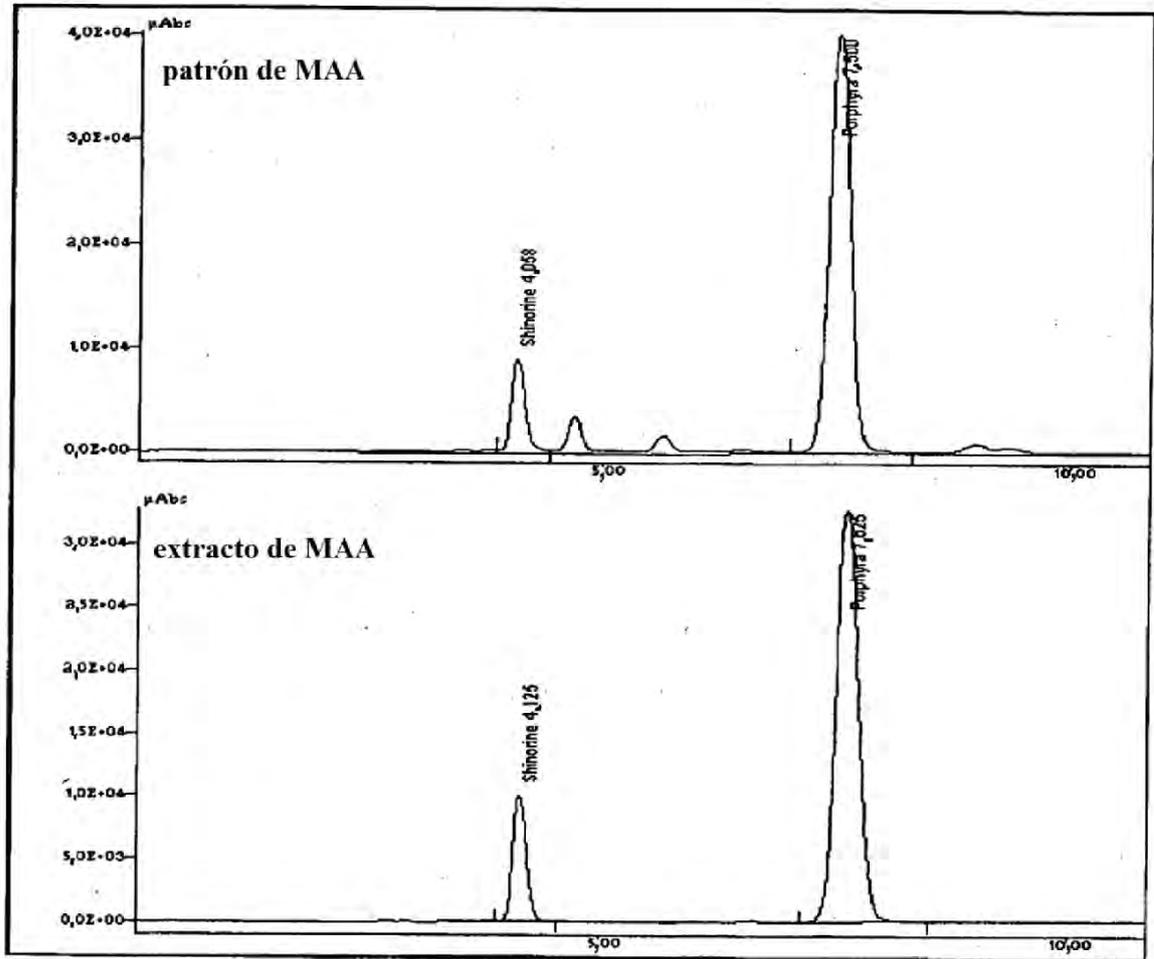


FIGURA 7

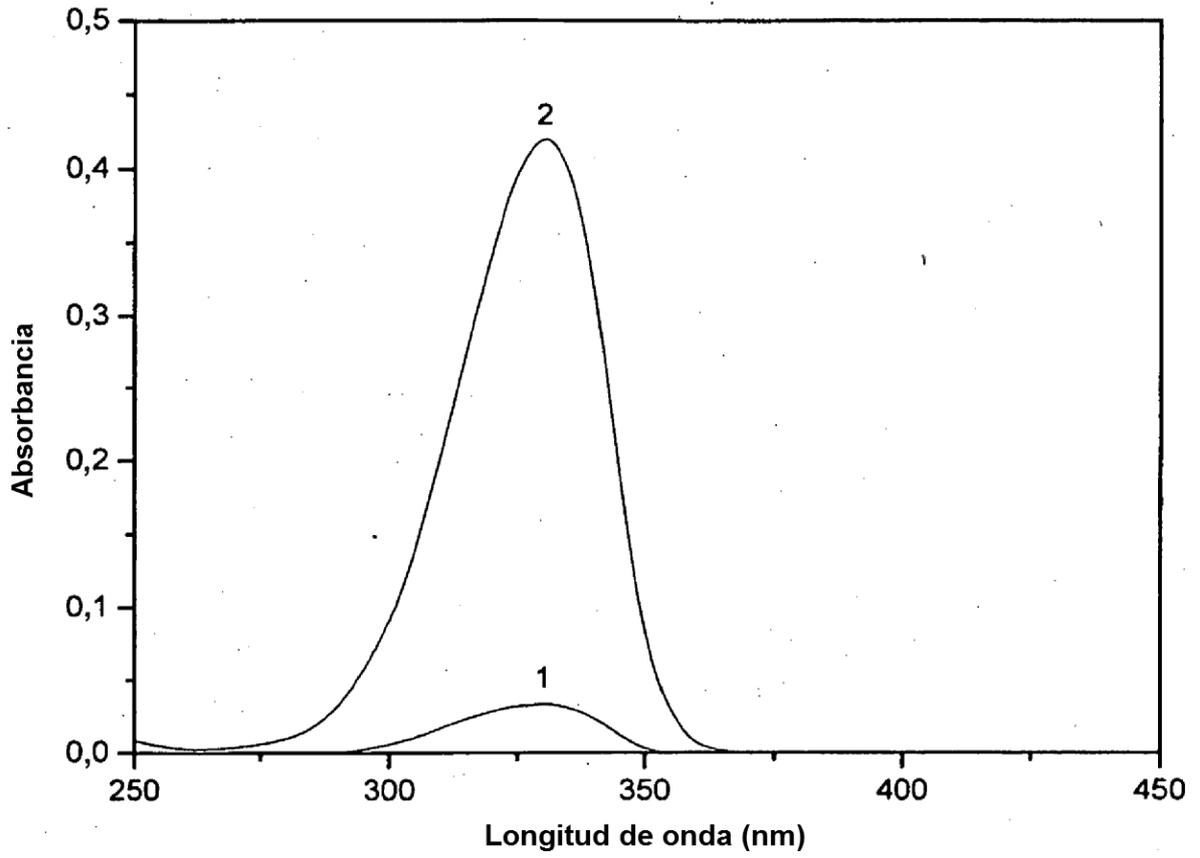


FIGURA 8

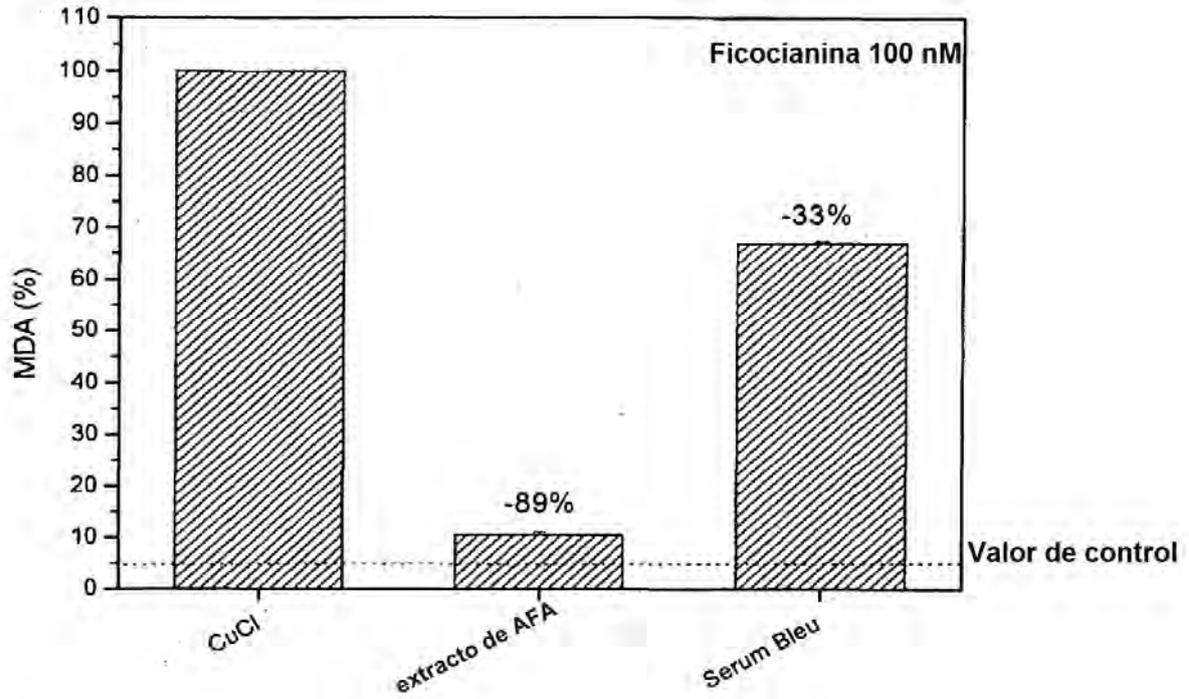


FIGURA 9A

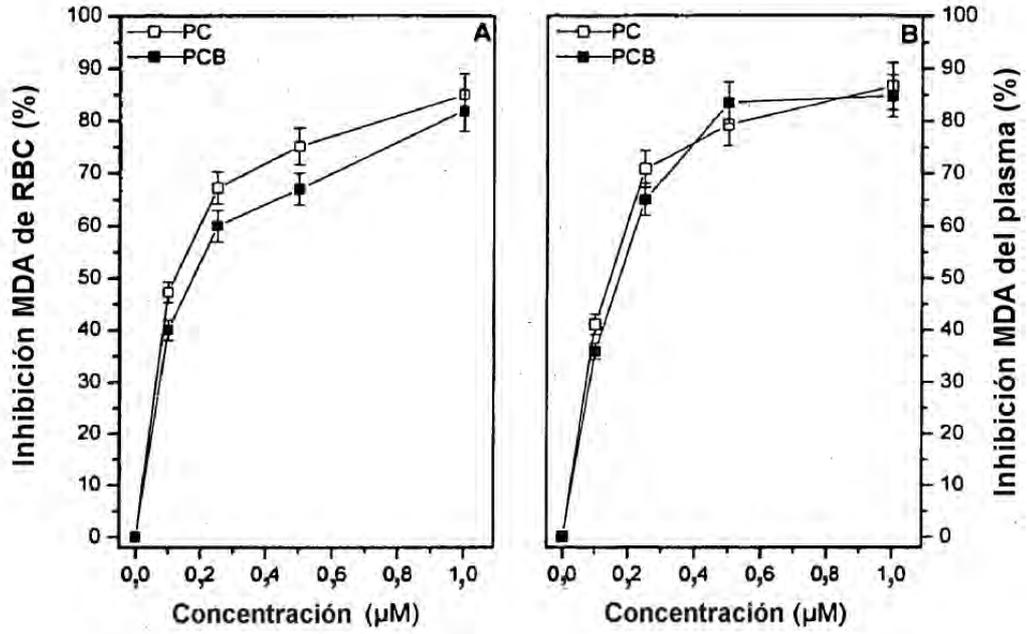


FIGURA 9B

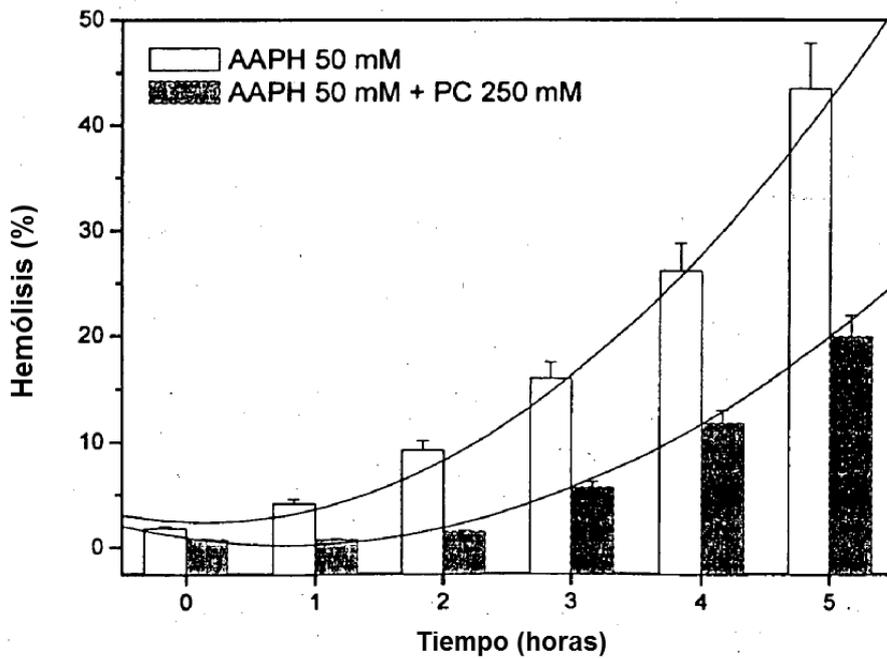


FIGURA 10

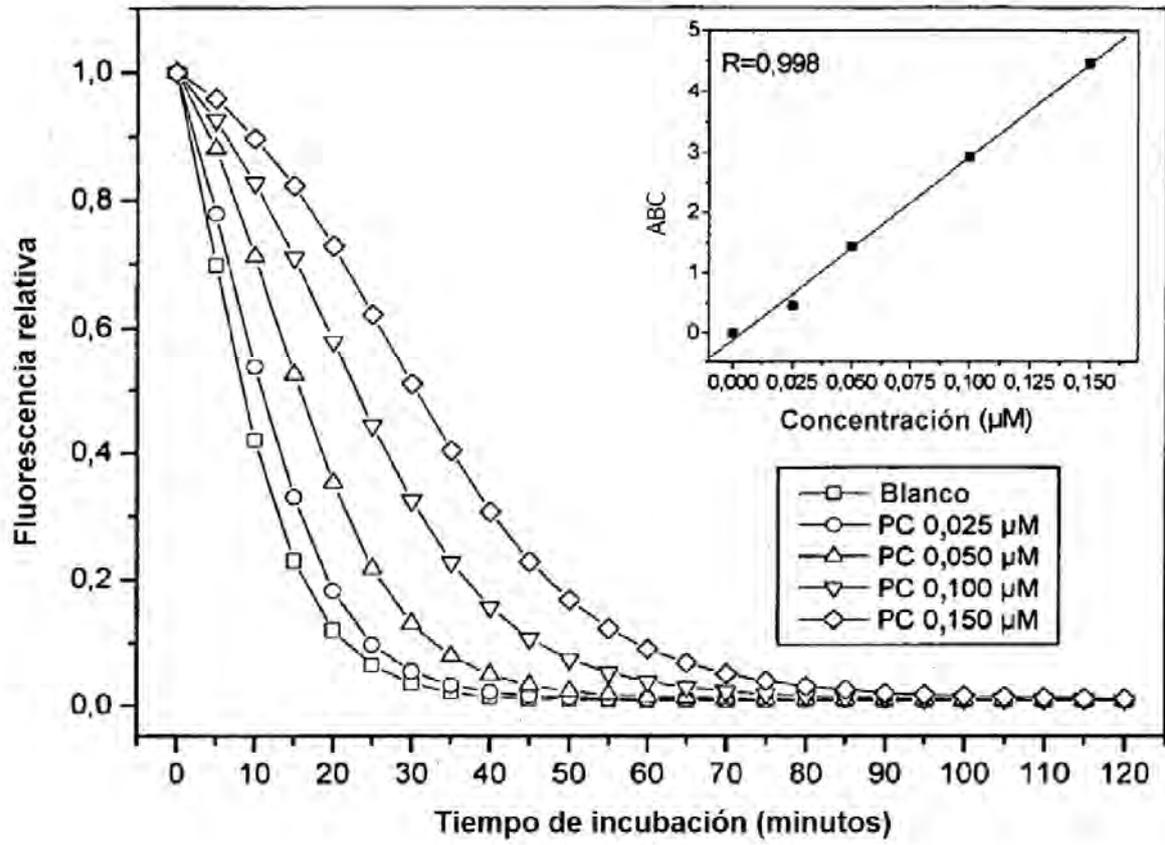


FIGURA 11

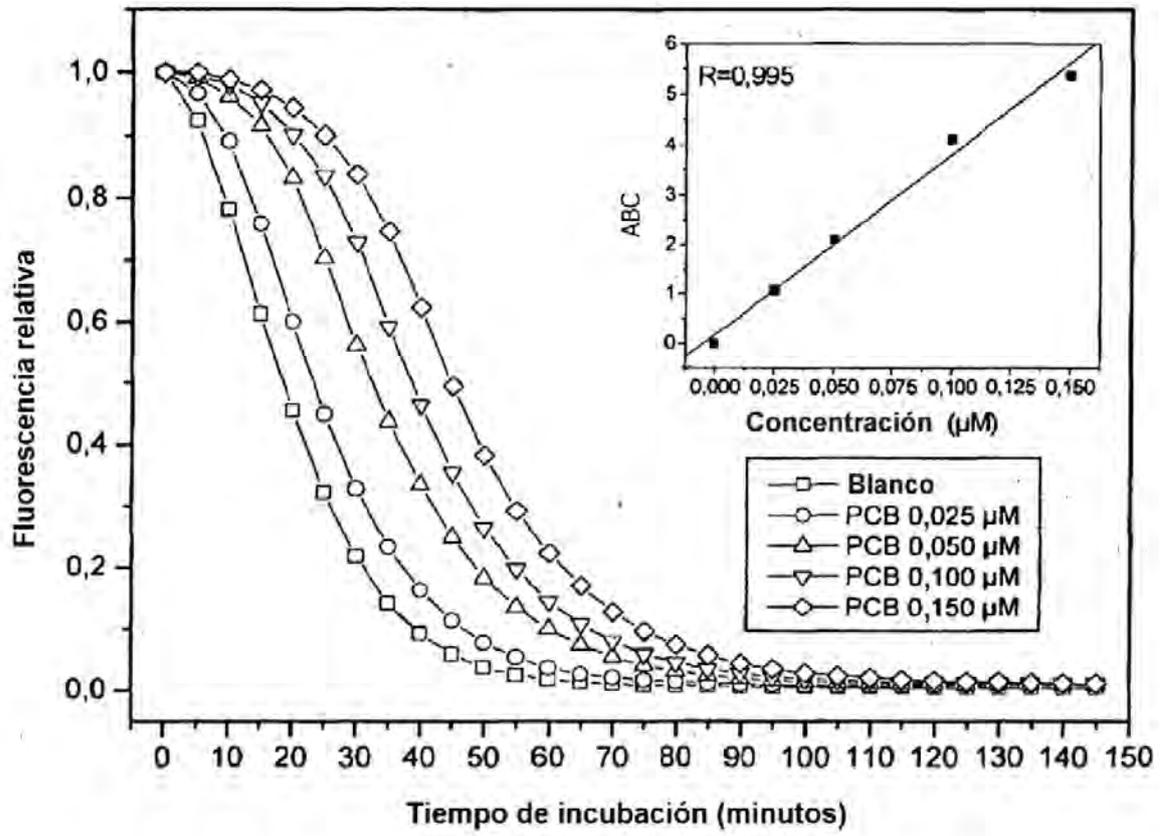


FIGURA 12

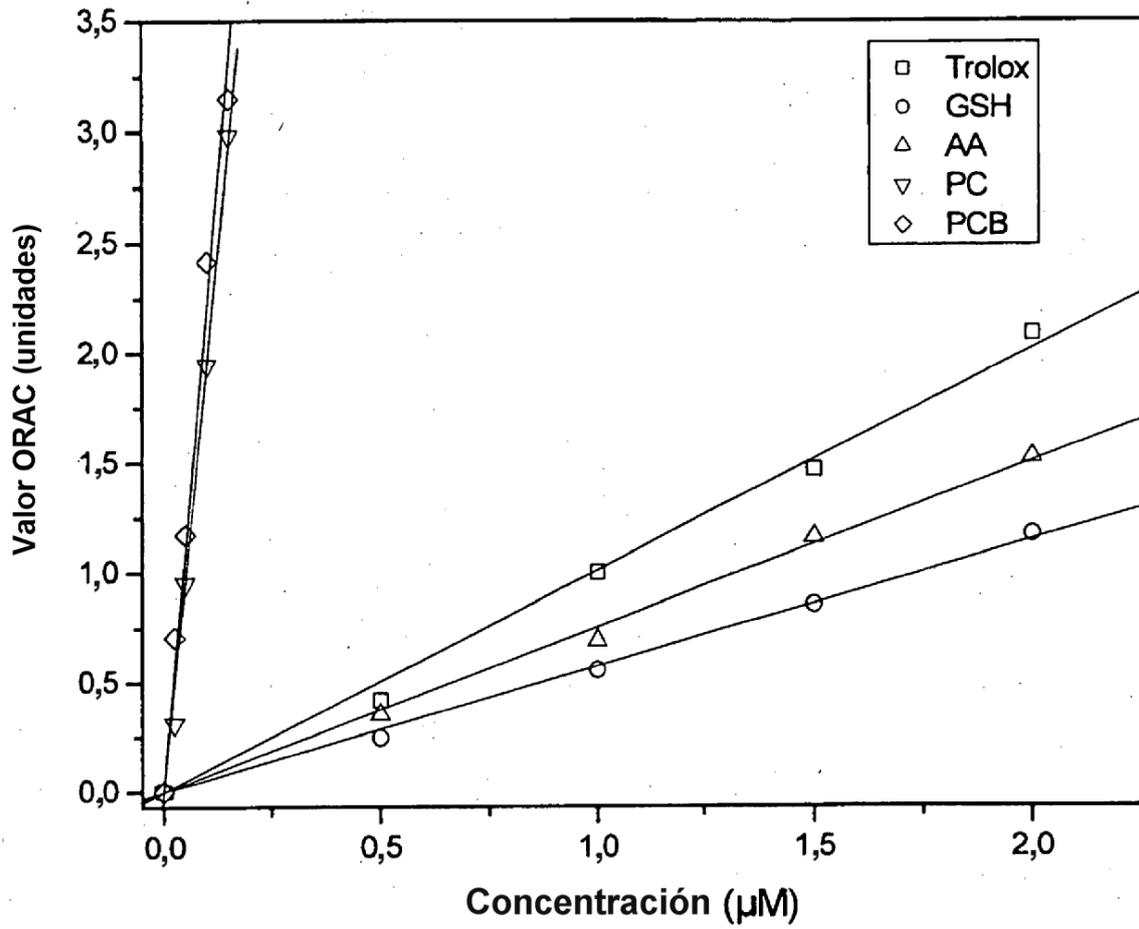


FIGURA 13

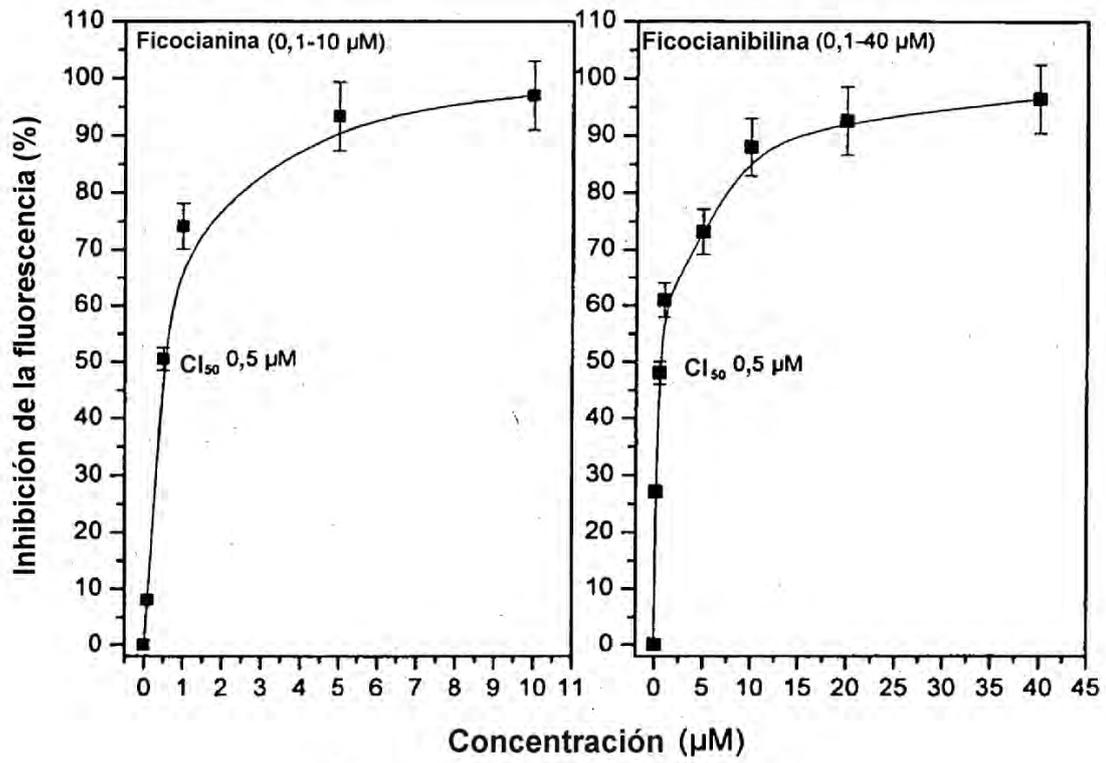


FIGURA 14

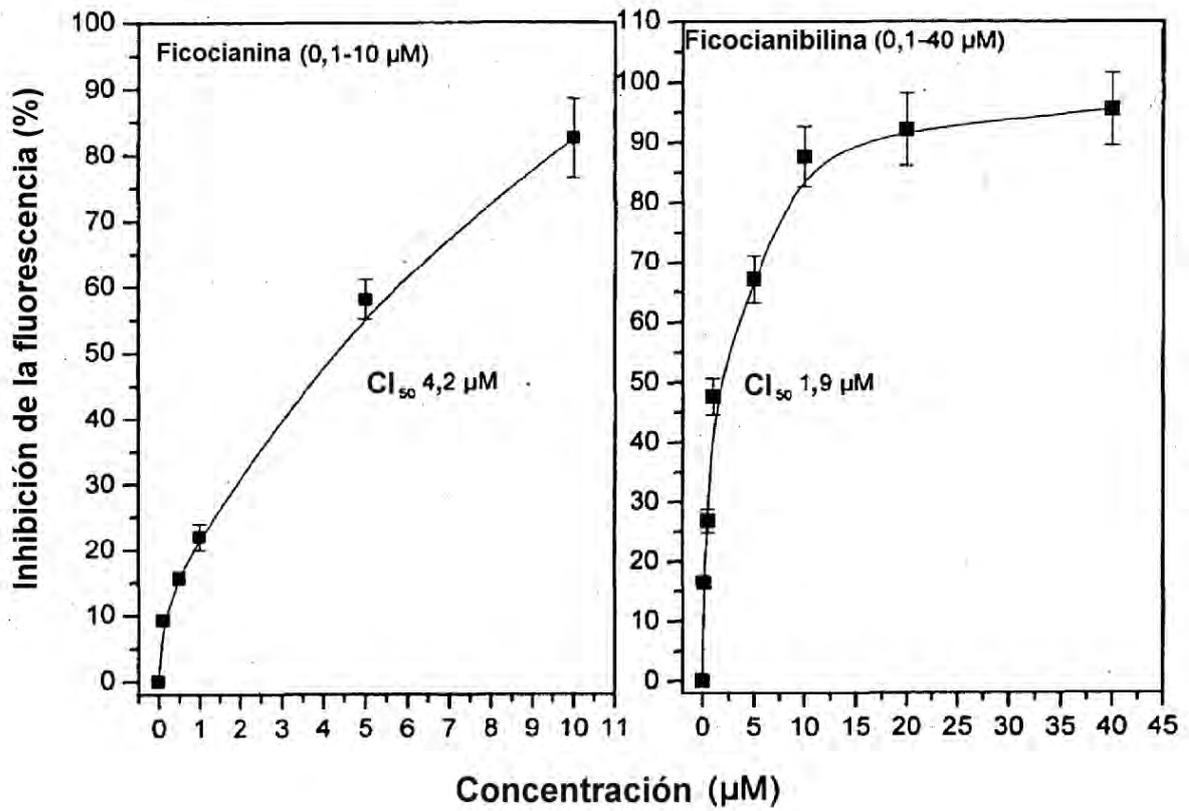


FIGURA 15

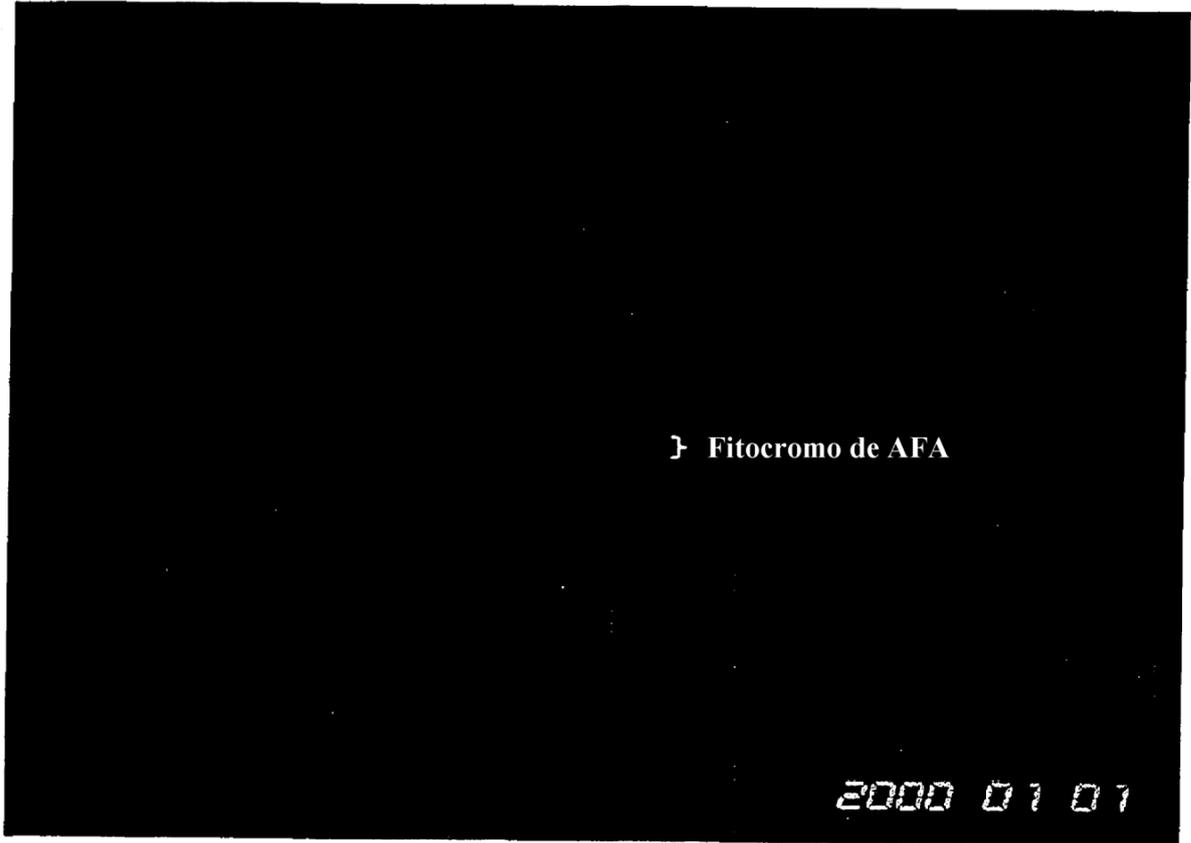


FIGURA 16

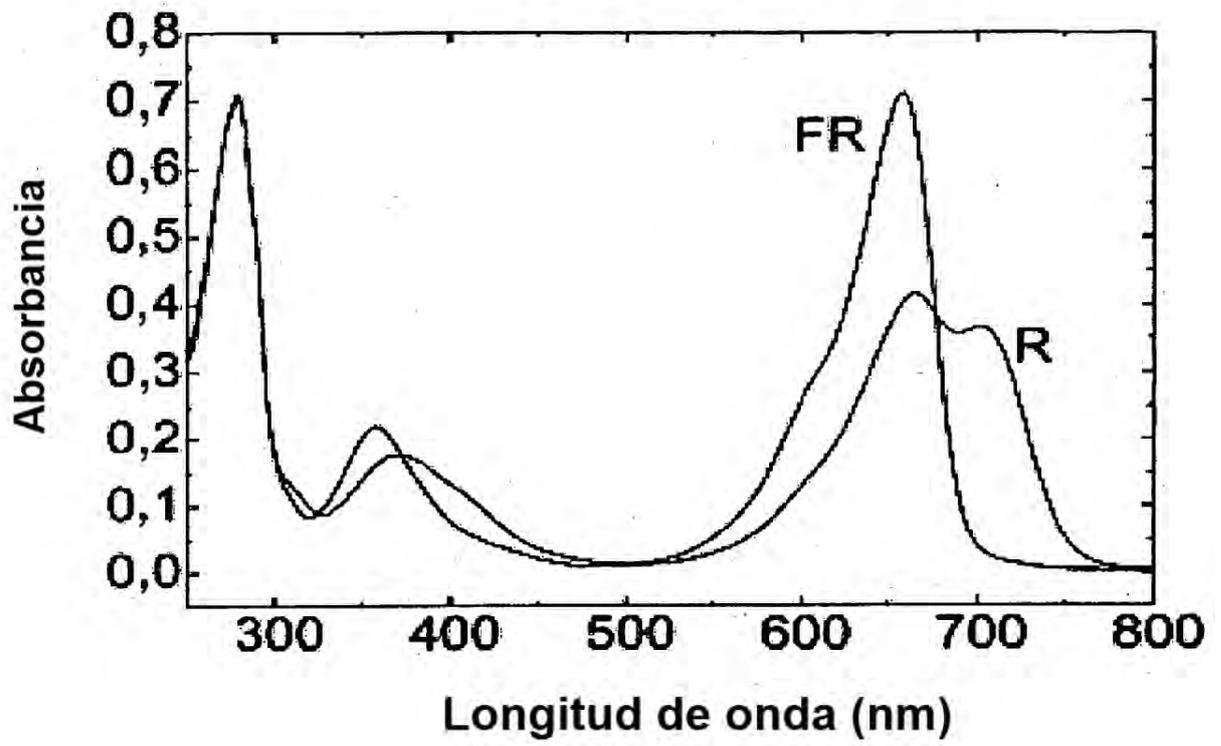


FIGURA 17

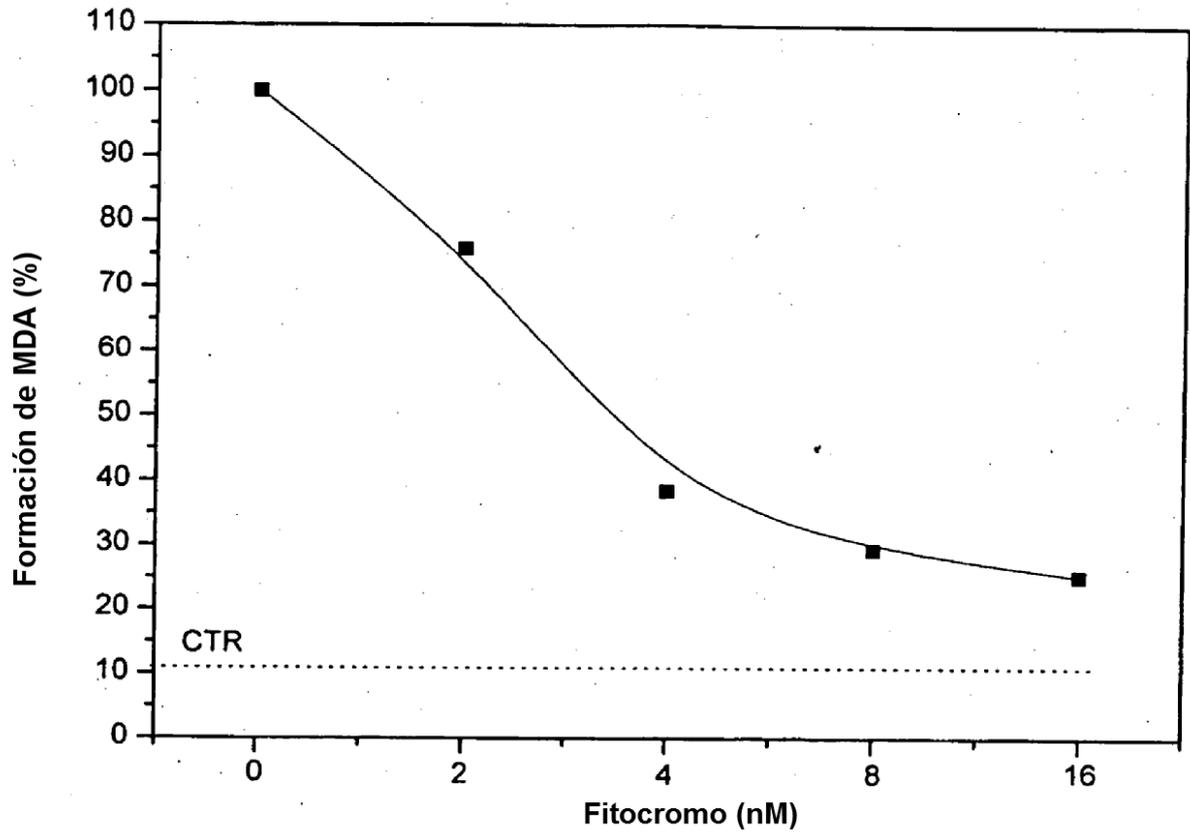


FIGURA 18

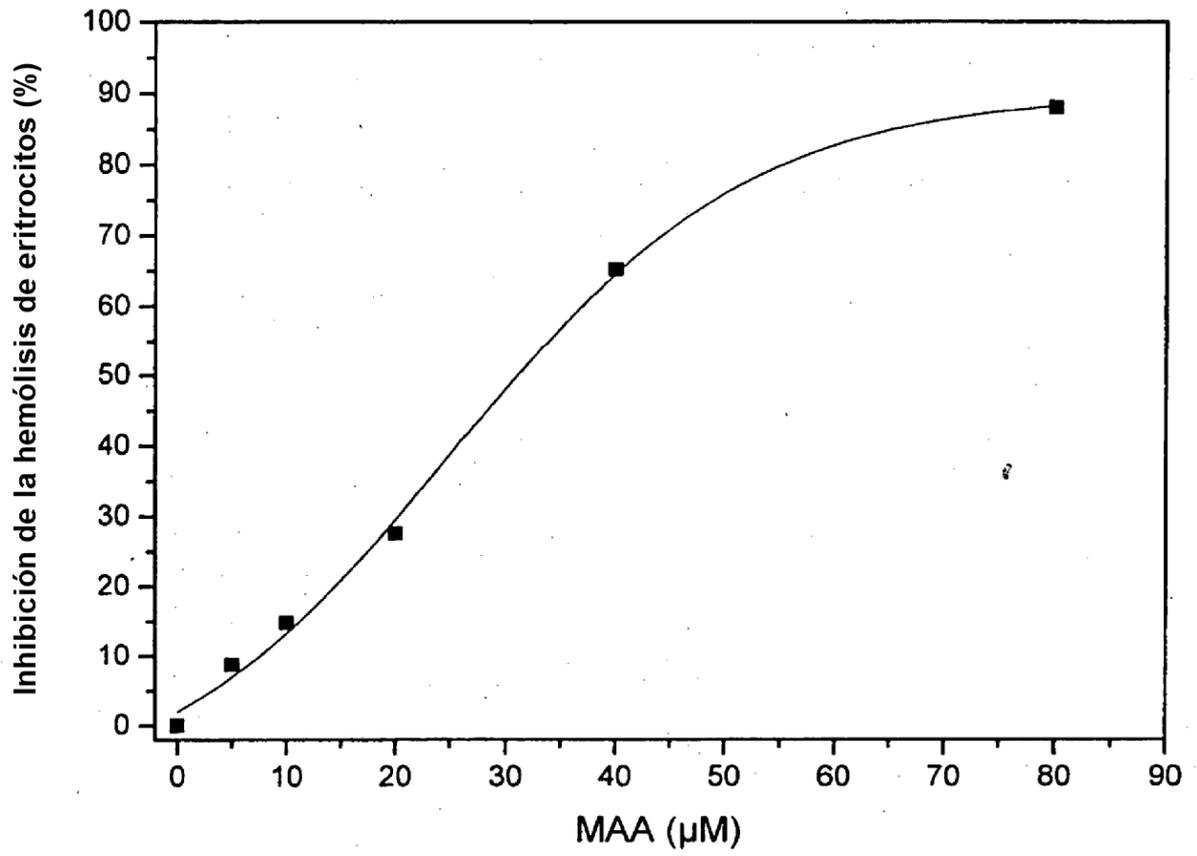


FIGURA 19

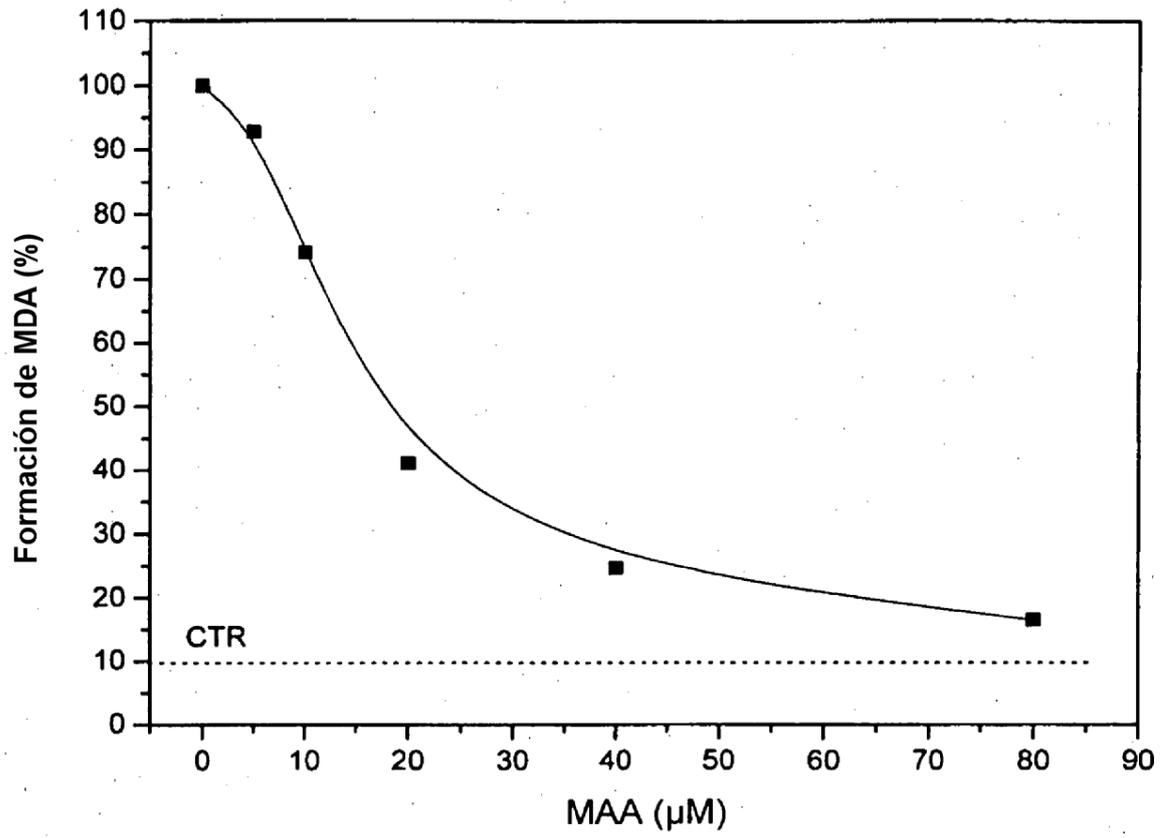


FIGURA 20

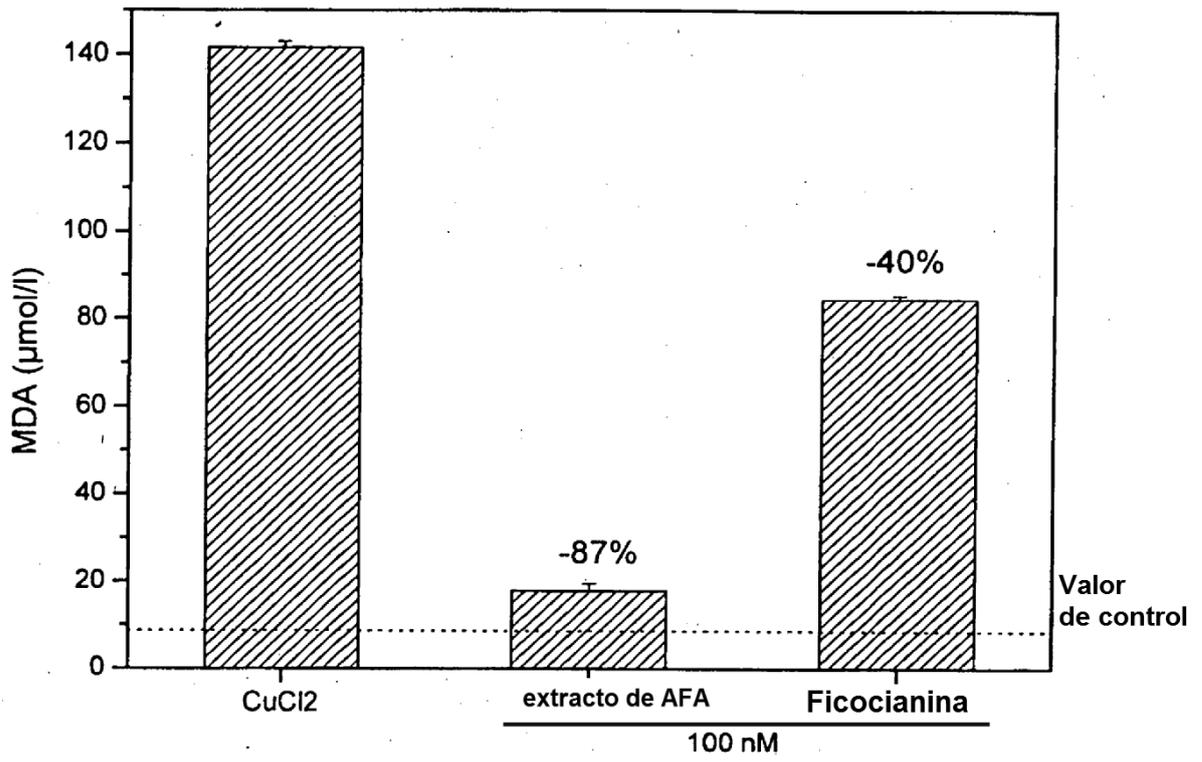


FIGURA 21

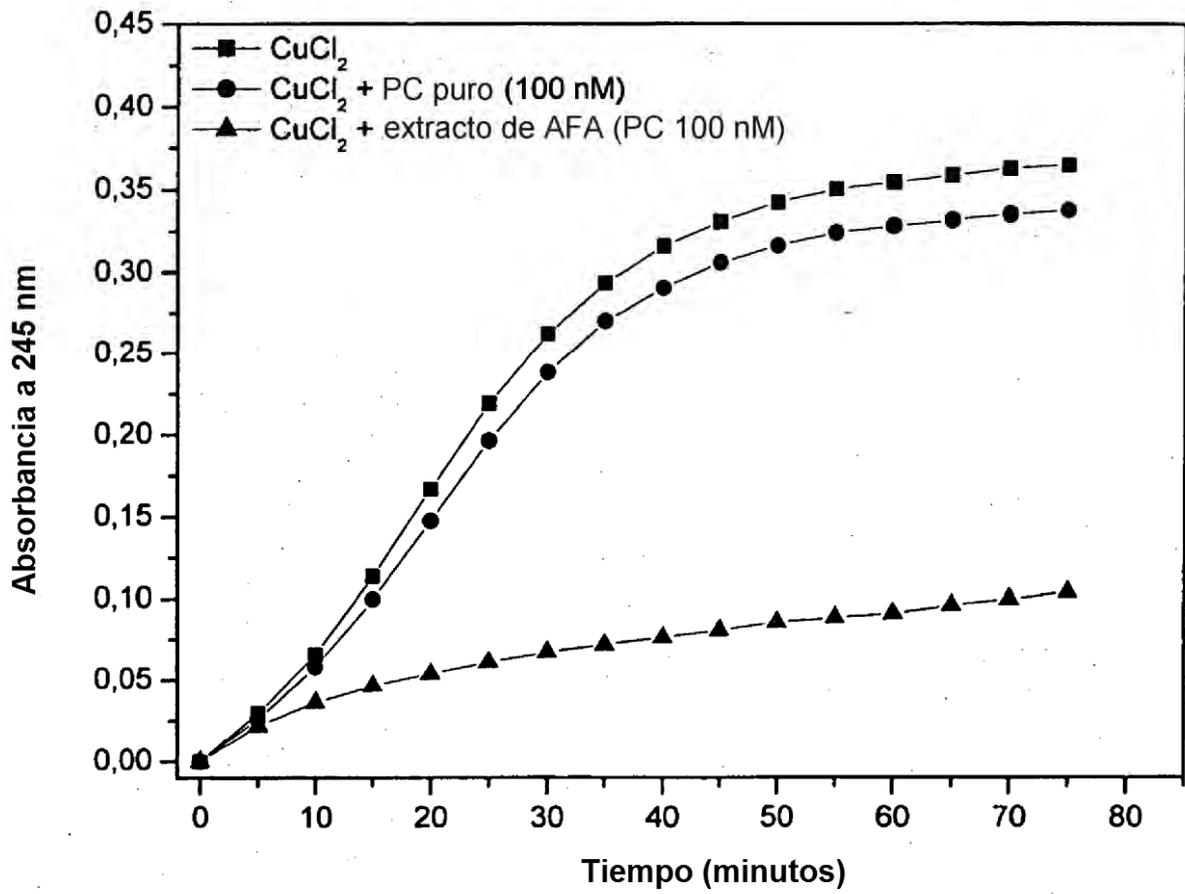


FIGURA 22

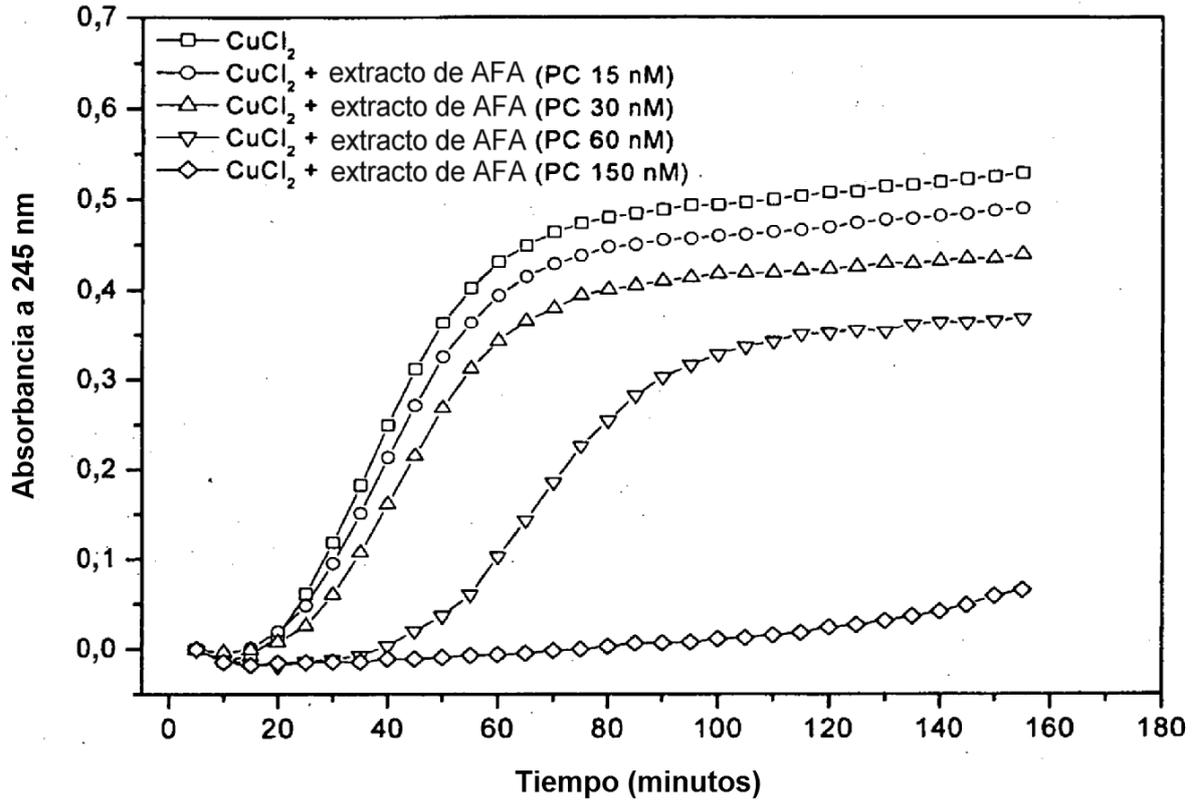


FIGURA 23

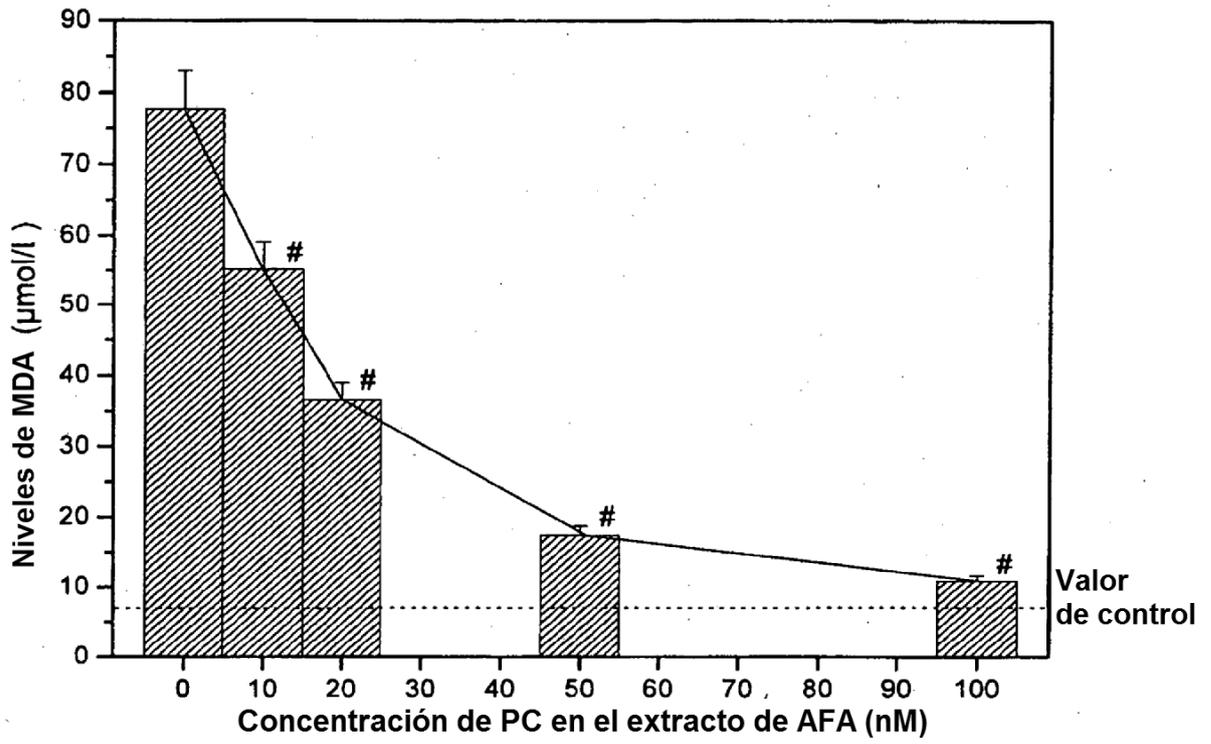


FIGURA 24

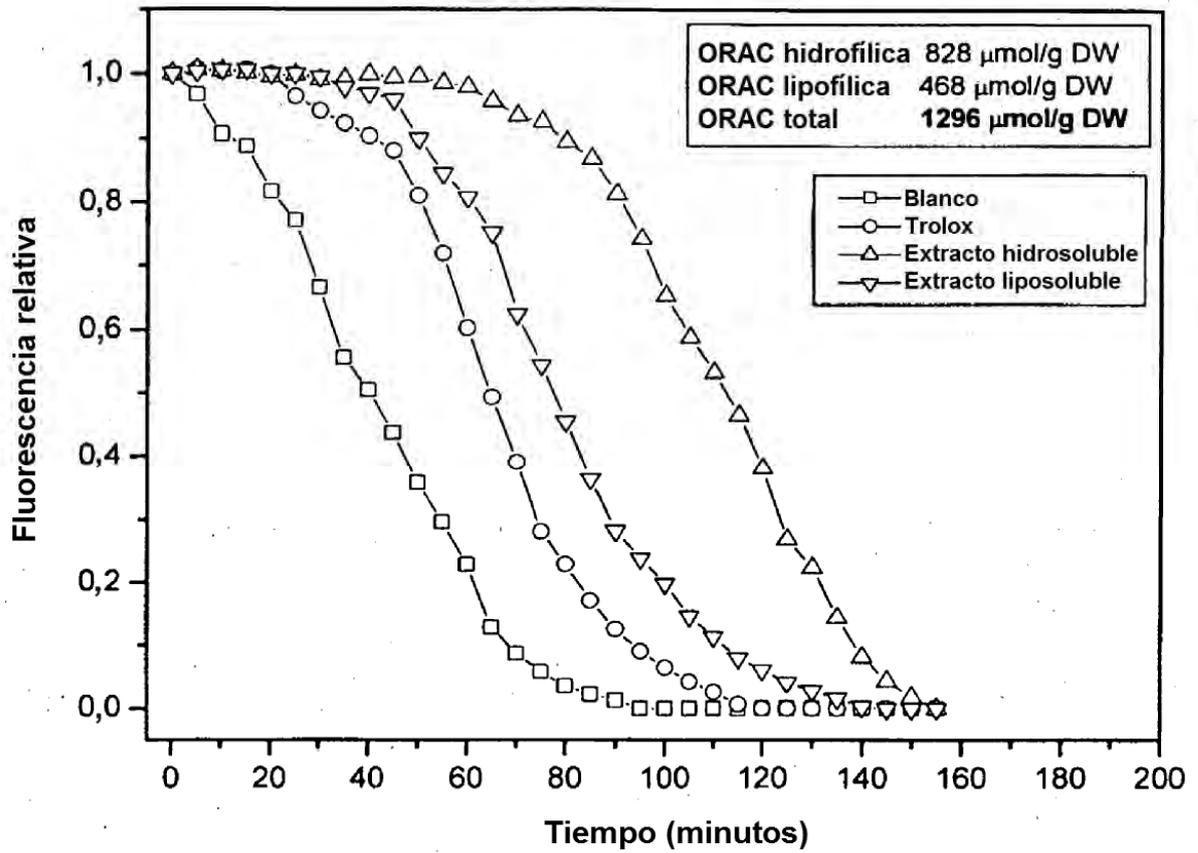


FIGURA 25

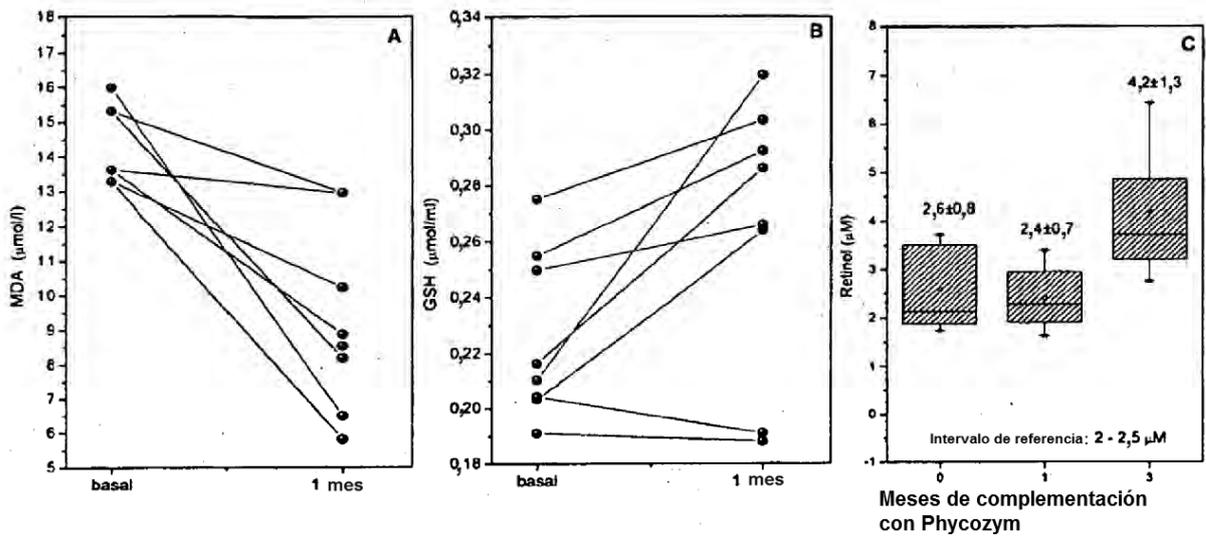


FIGURA 26

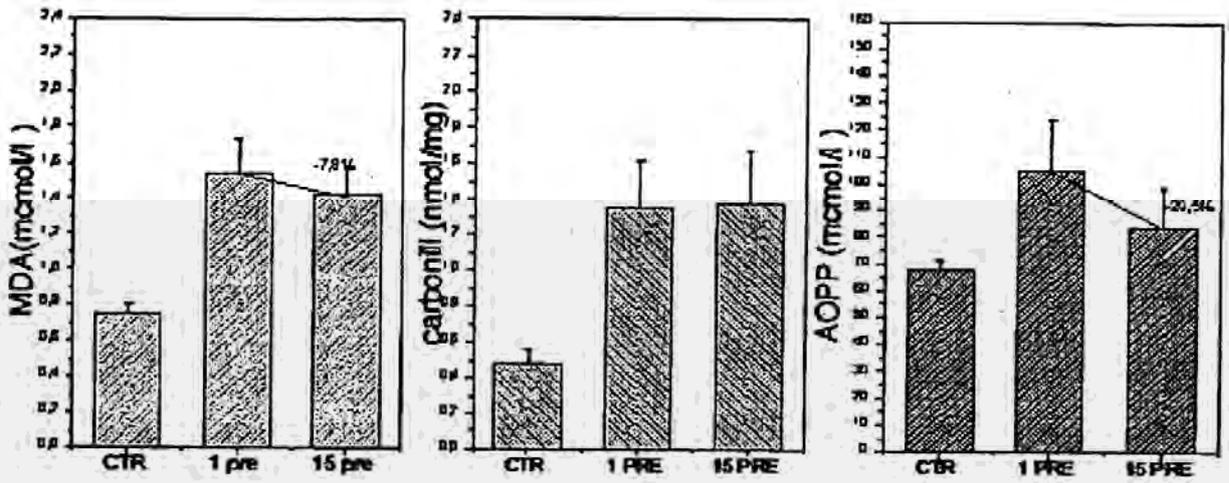


FIGURA 27

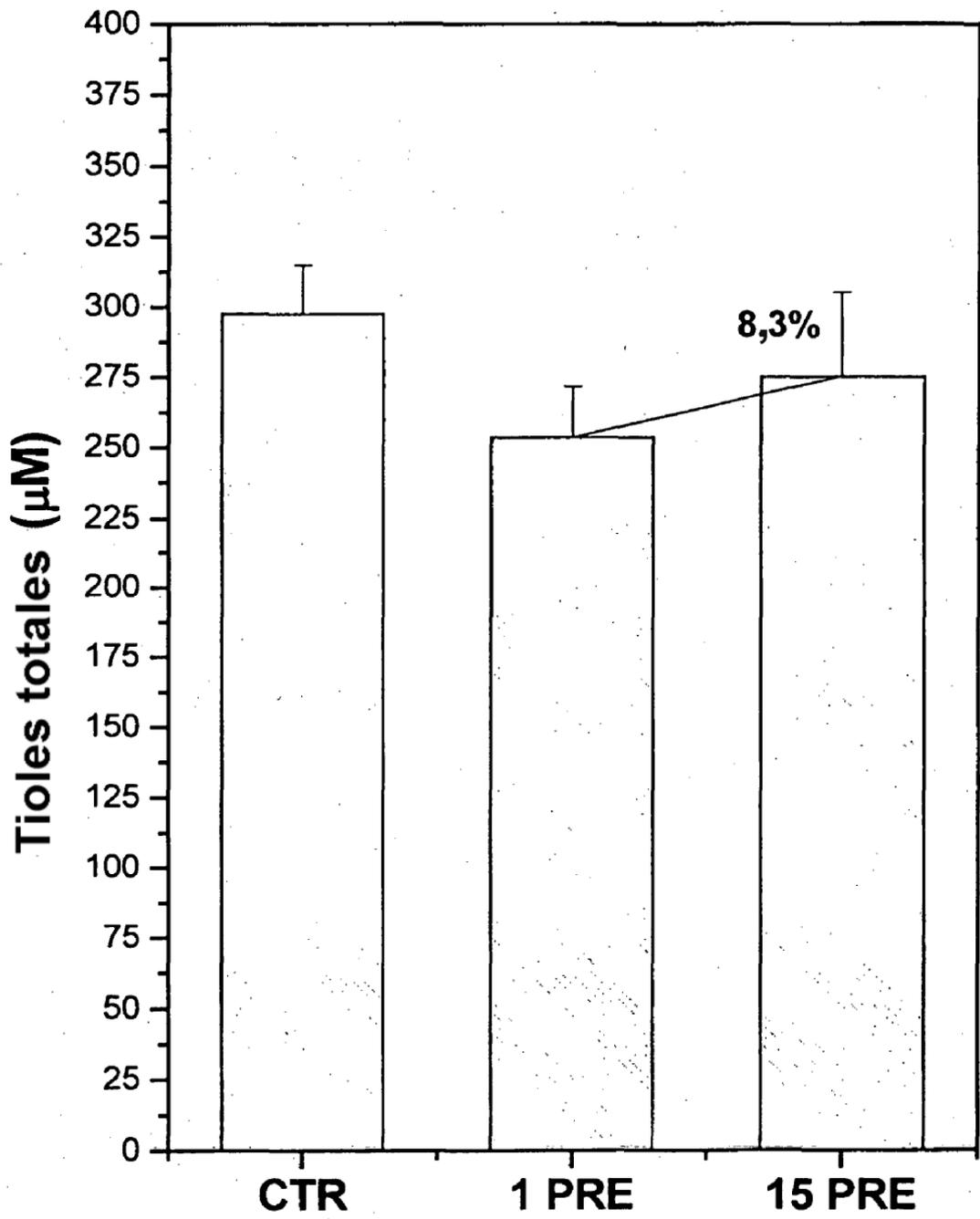


FIGURA 28

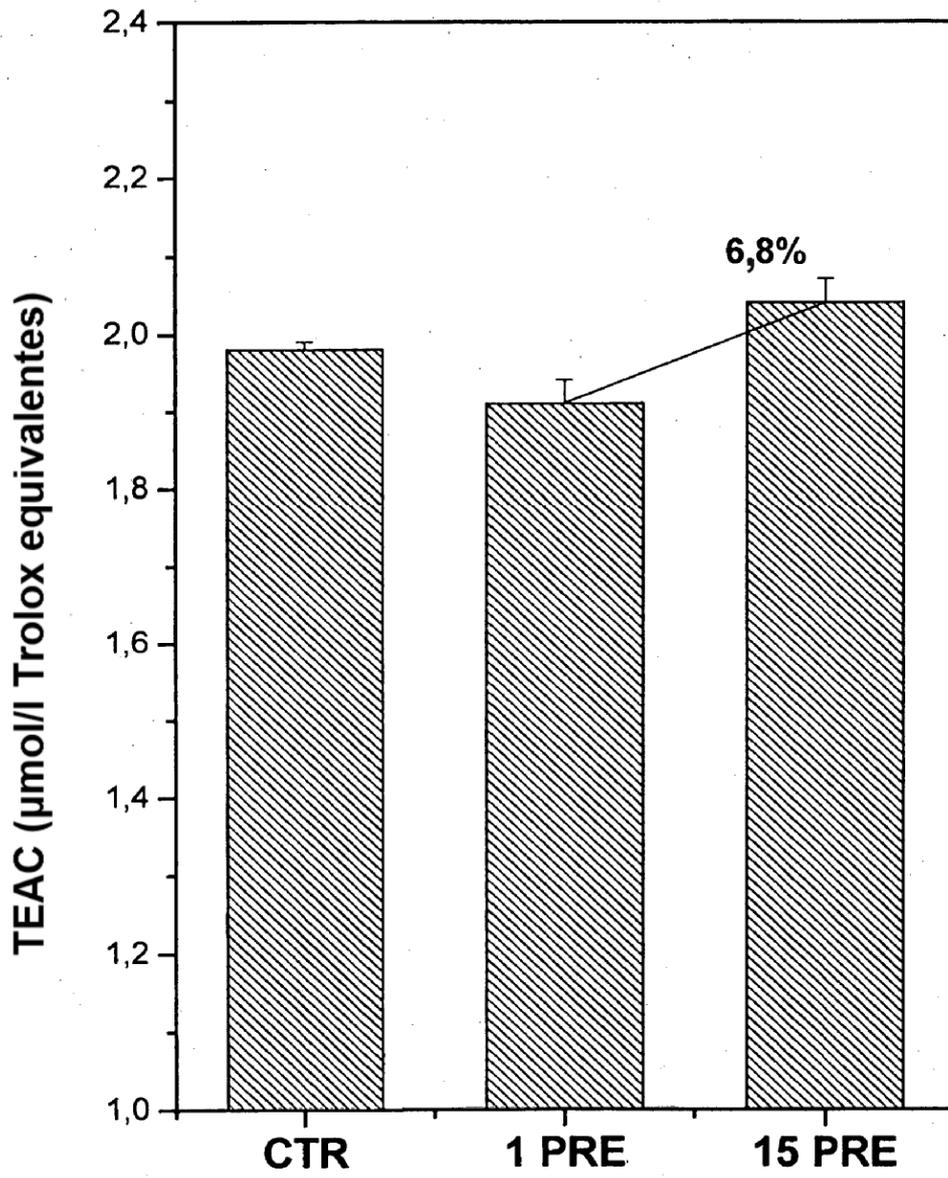


FIGURA 29

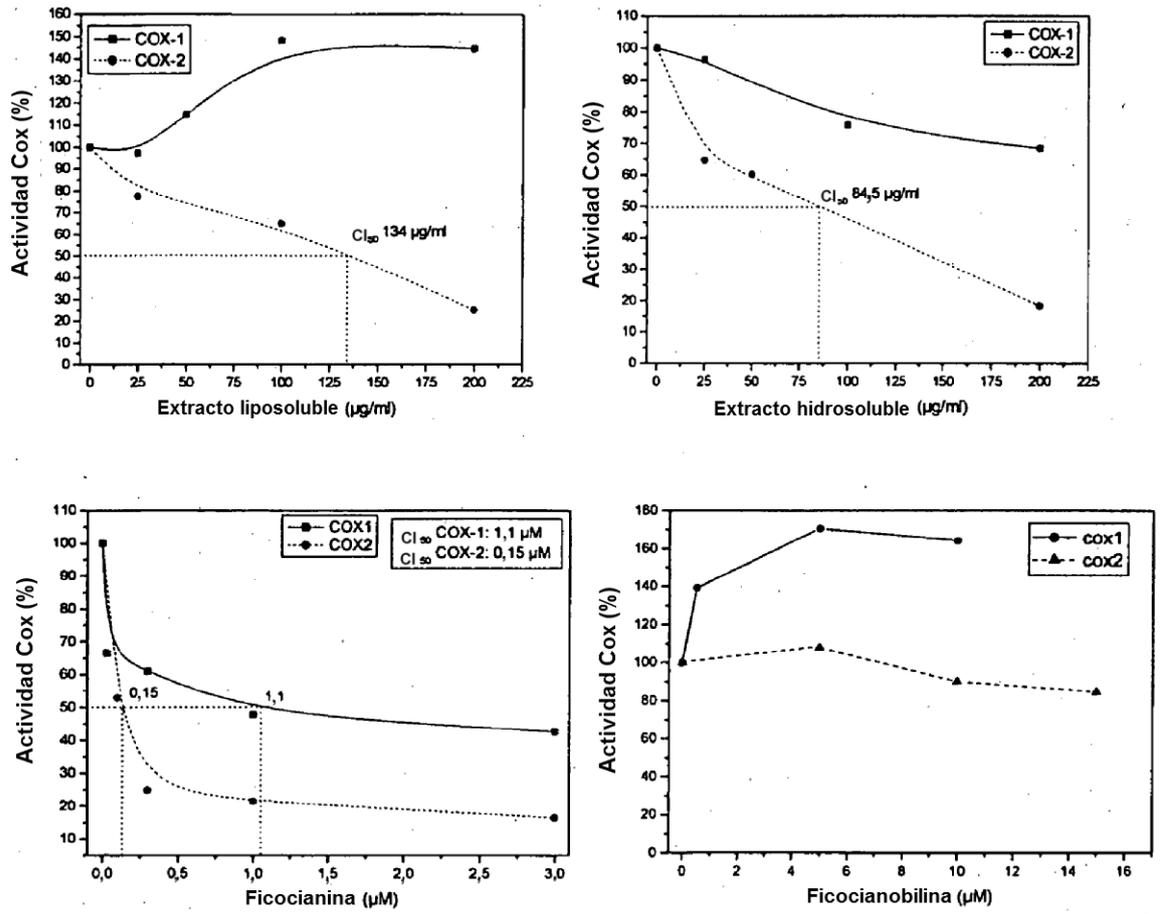


FIGURA 30

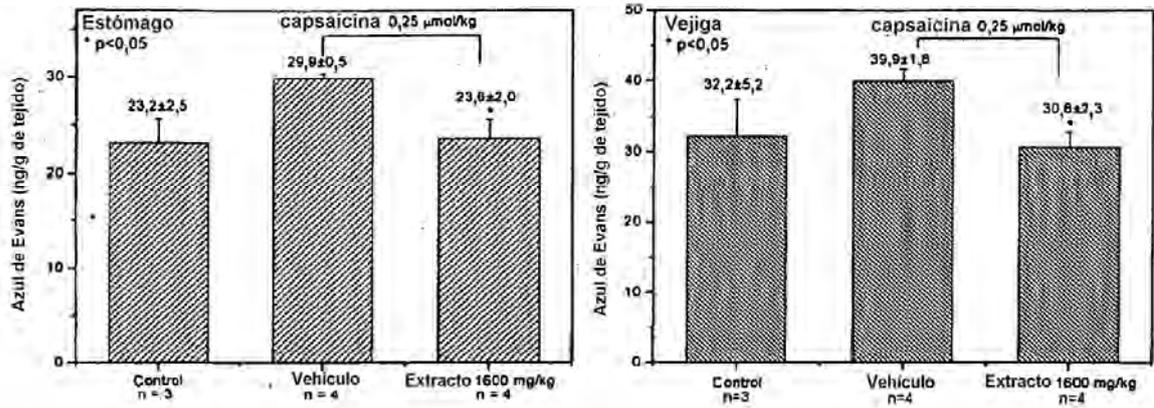


FIGURA 31

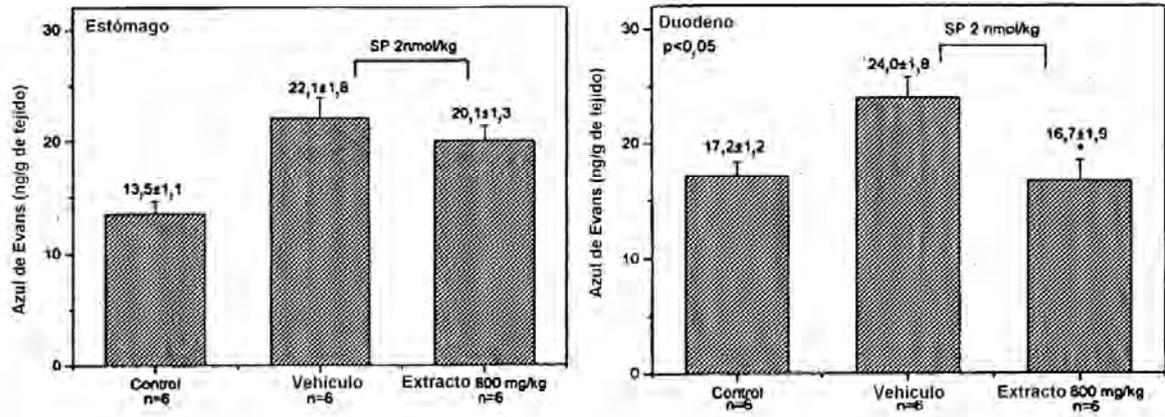


FIGURA 32

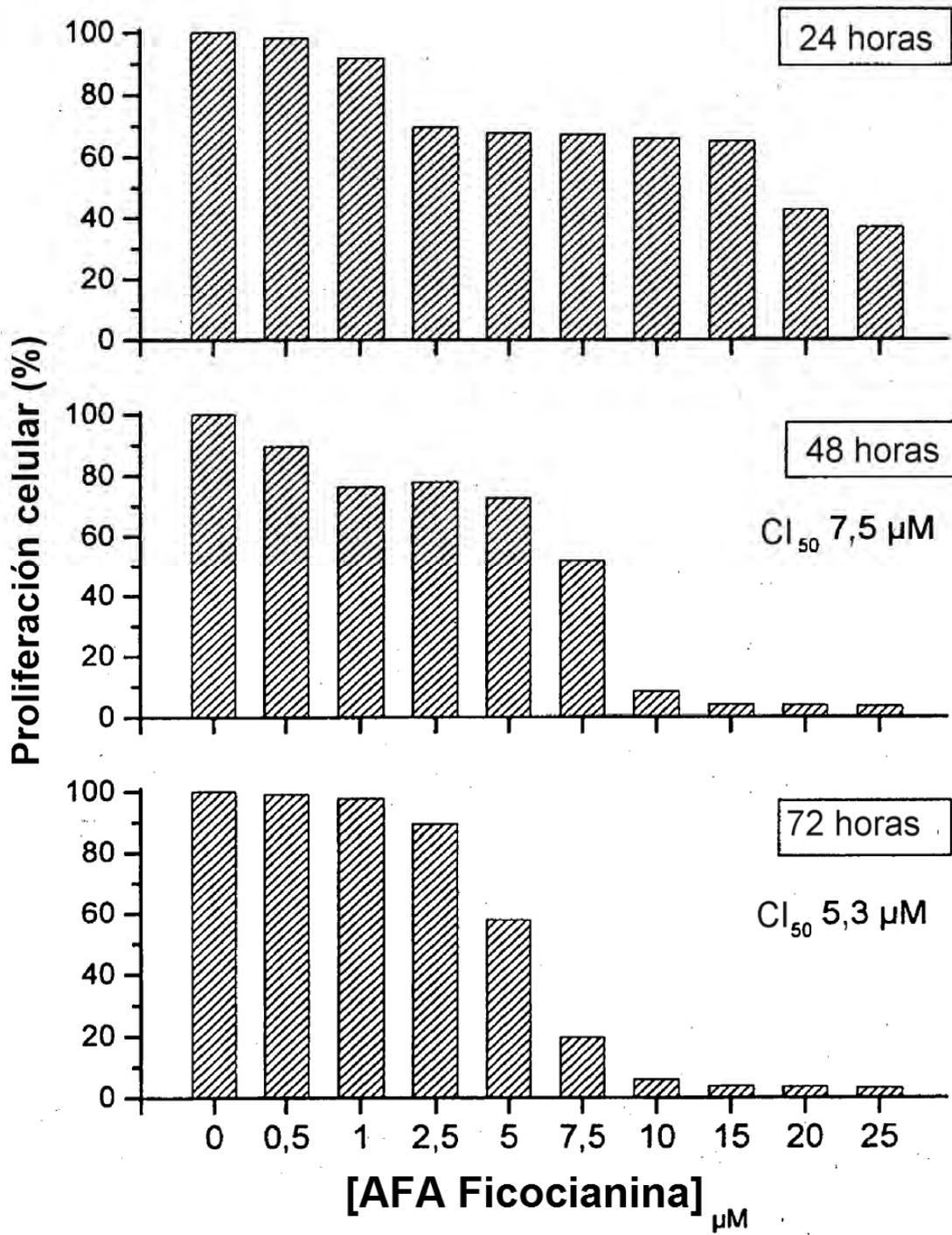


FIGURA 33

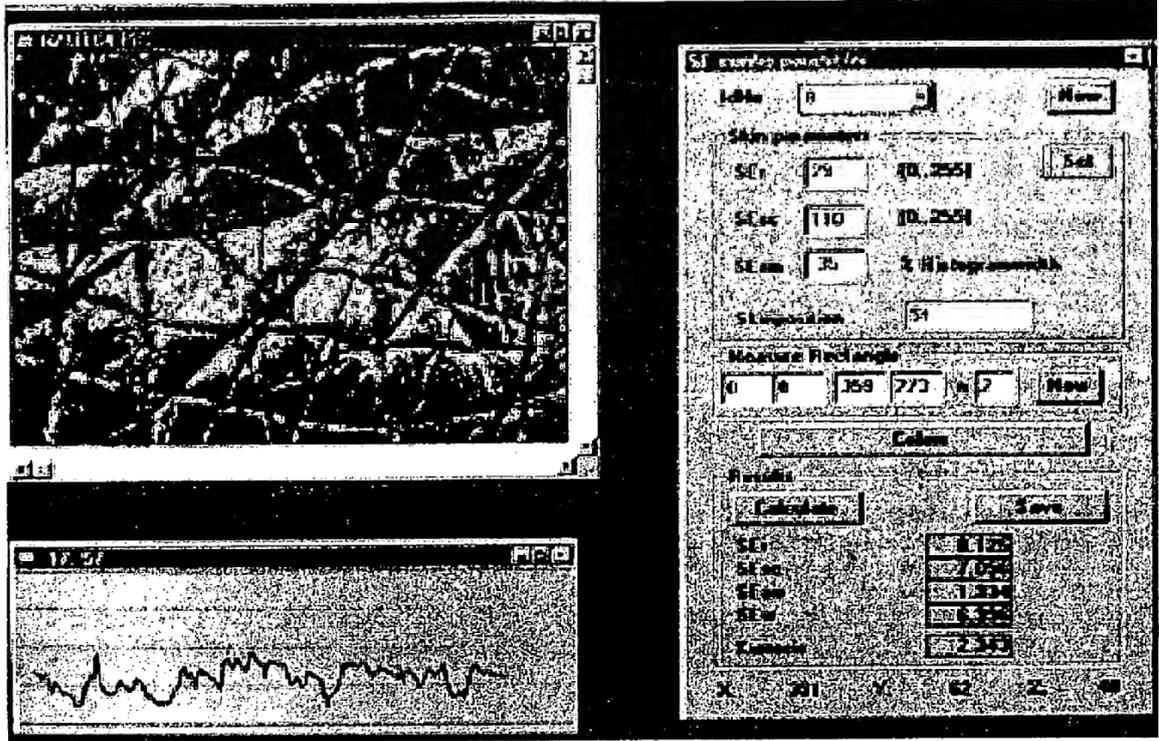


FIGURA 34

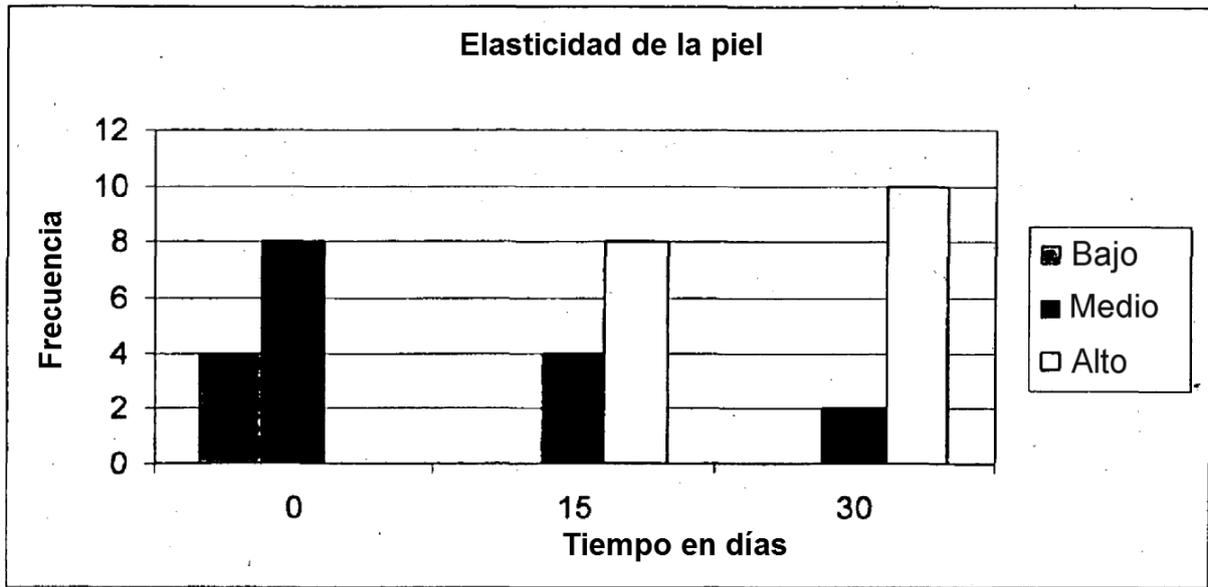


FIGURA 35

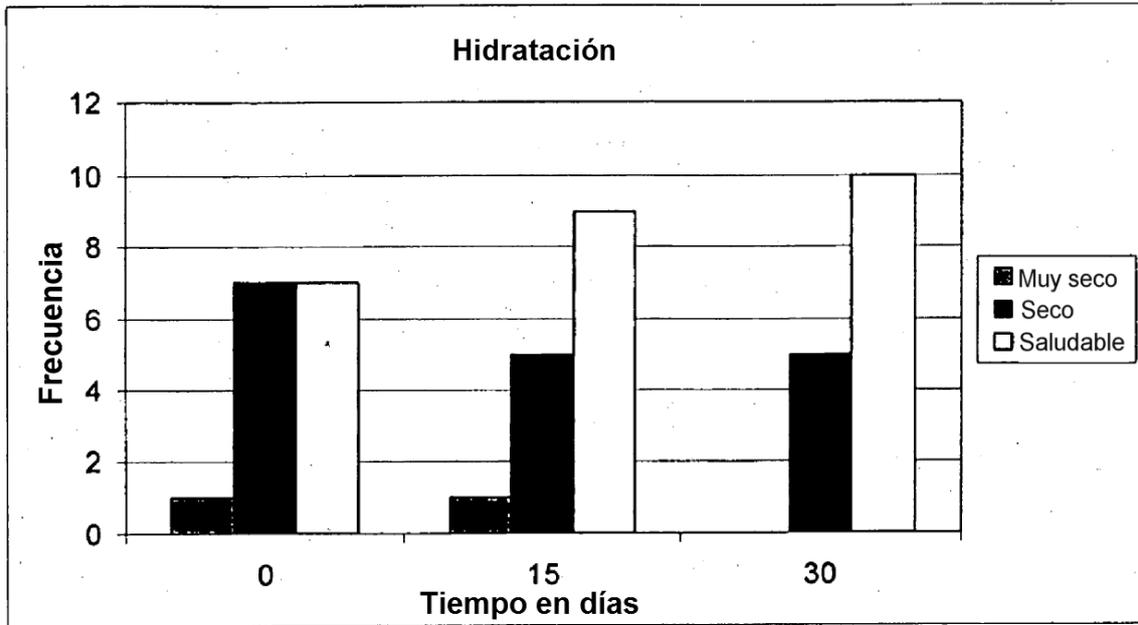


FIGURA 36

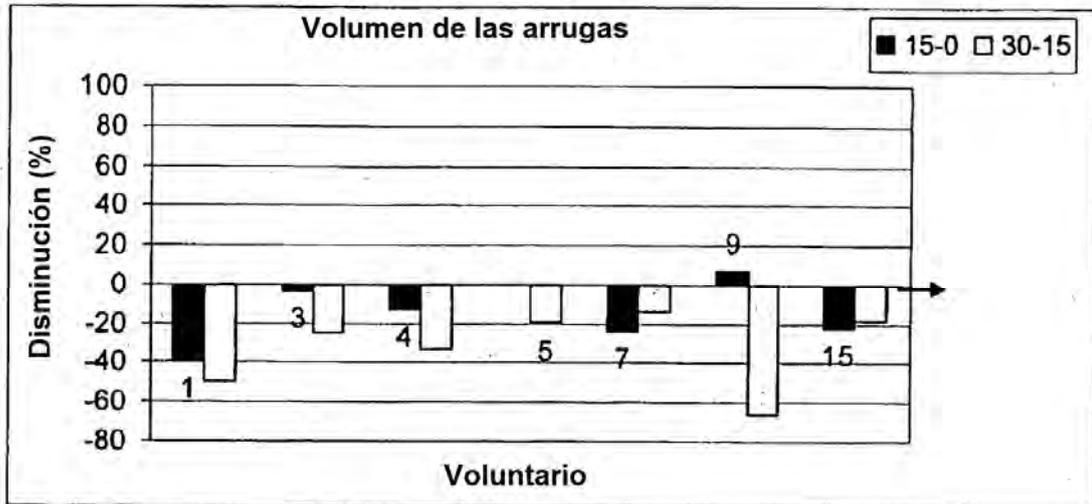


FIGURA 37

