

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**“CARACTERIZACIÓN Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
EXOPOLISACÁRIDOS (EPS) DE CIANOBACTERIAS EXTREMÓFILAS, PARA
SU USO COMO HUMECTANTES DÉRMICOS.”**

Tesis Presentada por la Bachiller:
Guzmán Ortiz, Gabriela Milagros

Para optar el Título Profesional de:
Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:
PhD Cárdenas García, Jaime

Arequipa – Perú

2022

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 08 de Noviembre del 2021

Dictamen: 002613-C-EPIB-2021

Visto el borrador del expediente 002613, presentado por:

2011801892 - GUZMAN ORTIZ GABRIELA MILAGROS

Titulado:

**CARACTERIZACIÓN Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS) DE
CIANOBACTERIAS EXTREMÓFILAS, PARA SU USO COMO HUMECTANTES DÉRMICOS.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**0858 - TORRES VELA FERNANDO ANTERO
DICTAMINADOR**



**1072 - BERNABE ORTIZ JULIO CESAR
DICTAMINADOR**

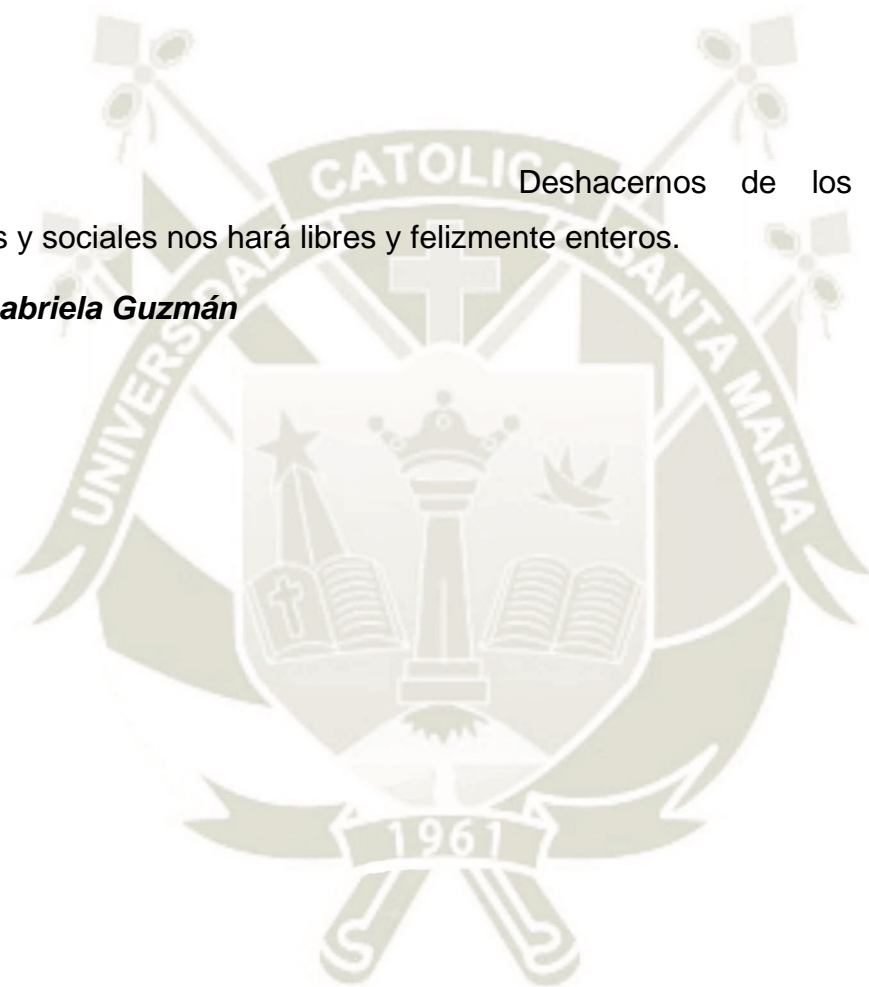


**3135 - LOPEZ ALVAREZ NATALIA PAOLA
DICTAMINADOR**



Deshacernos de los constructos mentales y sociales nos hará libres y felizmente enteros.

Gabriela Guzmán



DEDICATORIA

Quiero dedicar este logro a las personas que amo, mis padres, mis hermanos y aquellas personas que me ayudaron a creer en mí, en mis ideas y en que todo puede ser hecho si es con amor.

AGRADECIMIENTOS

Comienzo agradeciendo a mis docentes durante la carrera, pero en especial a mi asesor el PhD Jaime Cárdenas quien siempre tuvo buena disposición para escuchar mis ideas, darme buenos consejos y asesorarme.

A mi amada familia, quiénes siempre me apoyaron e impulsaron a ser mejor como profesional, como mujer, como hija y sobre todo como persona.

Gracias

RESUMEN

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de alto peso molecular que son secretados por las cianobacterias. Estos polímeros tienen una gran capacidad de absorción y retención de humedad por lo que tienen amplias aplicaciones en las industrias biotecnológica. En este estudio, se realizó la extracción y cuantificación de EPS de dos cianobacterias extremófilas aisladas de la laguna de San Camilo-La joya, Arequipa. Las especies aisladas fueron *Euhalothece* sp. y *Synechococcus* sp. La producción de EPS se estimó en 6.4g/L para *Euhalothece* sp. y 5.2 g/L para *Synechococcus* sp. durante 15 días de cultivo.

Los EPS producidos se evaluaron durante 72 horas con el fin de determinar su capacidad de absorción y retención de humedad usando como testigo al quitosano y urea. El mayor porcentaje de absorción de humedad se obtuvo con el EPS de *Euhalothece* sp. (79.6%) y *Synechococcus* sp. (69.2 %) frente a los controles quitosano (35.2 %) y urea (32%). La capacidad de retención de humedad fue de 79.2 % para el EPS de *Euhalothece* sp., 71.5 % para el EPS de *Synechococcus* sp., 62.4% para quitosano y de 45.0% para urea. Estos resultados muestran que los EPS de estas cianobacterias tienen gran potencial como humectante en la industria campo cosmética.

Palabras clave: Exopolisacáridos, EPS, *Euhalothece* sp., *Synechococcus* sp., humectante, absorción, retención, quitosano, urea.

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are high molecular weight polymers that are secreted by cyanobacteria. These polymers have a great capacity to absorb and retain moisture, which is why they have wide applications in the biotechnology industries. In this study, the extraction and quantification of EPS from two extremophilic cyanobacteria isolated from the San Camilo-La joya lagoon, Arequipa, was carried out. The isolated species were *Euhalothece* sp. and *Synechococcus* sp. EPS production was estimated at 6.4g / L for *Euhalothece* sp. and 5.2 g / L for *Synechococcus* sp. during 15 days of culture.

The EPS produced were evaluated for 72 hours in order to determine their moisture absorption and retention capacity using chitosan and urea as controls. The highest percentage of moisture absorption was obtained with EPS from *Euhalothece* sp. (79.6%) and *Synechococcus* sp. (69.2%) versus chitosan (35.2%) and urea (32%) controls. The moisture retention capacity was 79.2% for the EPS of *Euhalothece* sp., 71.5% for the EPS of *Synechococcus* sp., 62.4% for chitosan and 45.0% for urea. These results show that the EPS of these cyanobacteria have great potential as a humectant in the cosmetic industry.

Keywords: Exopolysaccharides, EPS, *Euhalothece* sp., *Synechococcus* sp. humectant, absorption, retention, chitosan, urea

INTRODUCCIÓN

La industria de productos cosméticos y para el cuidado de la piel es un negocio mundial enorme y en rápida expansión ⁽¹⁾. El agua es absolutamente crítica para la flexibilidad, el funcionamiento normal, la maduración y la descamación de la piel, especialmente sus capas externas. Las cremas humectantes son mezclas complejas de agentes químicos especialmente diseñadas para hacer que las capas externas de la piel se hidraten y sean más flexibles al atraer agua y reducir la evaporación del agua ⁽²⁾. Por lo tanto, estos productos cosméticos están formulados para evitar la pérdida de agua transepidérmica y retener o aumentar el contenido de agua en el estrato corneo ⁽³⁾. Se ha demostrado que el tratamiento a largo plazo de los humectantes químicos aumenta la susceptibilidad de la piel a los irritantes y también influye negativamente en la función de barrera de la piel normal ^(4,5). Los humectantes de uso común en la cosmética son; glicerina, propilenglicol, pirrolidona carboxilato de sodio (PCA de sodio) y urea ⁽²⁾. Estos productos a altas concentraciones, o cuando se usan en personas con dermatitis pueden desencadenar reacciones adversas en la piel ^(6,7,8,9). Dadas las posibles consecuencias negativas del uso de tales ingredientes, los científicos han comenzado a investigar compuestos naturales que ofrecen alternativas más seguras. Un enfoque alternativo implica la explotación de las cianobacterias fotosintéticas como fuente biológica de ingredientes cosméticos.

Las especies de cianobacterias sintetizan y secretan exopolisacáridos (EPS) que consisten en moléculas hidratadas de alta masa molecular. Estos están compuestos por una serie de residuos de ácido urónico (ácido glucurónico y galacturónico) y azúcar neutro (glucosa, galactosa, manosa, fructosa, ribosa, xilosa, arabinosa, fucosa y ramnosa) ⁽¹⁰⁾, así como constituyentes no carbohidratos como fosfato, lactato, acetato y glicerol ⁽¹¹⁾. Además, las EPS de cianobacterias contienen grupos sulfato, una característica única entre las bacterias ⁽¹²⁾. Sorprendentemente, muchos EPS de cianobacterias se caracterizan por un nivel significativo de hidrofobicidad debido a la presencia de algunos grupos hidrofóbicos, como grupos acetilo unidos a éster, restos peptídicos y desoxihexosas ⁽¹¹⁾. Otra característica que hace que los EPS de cianobacterias sean adecuados para la aplicación en cosmética, es su actividad antioxidante. Los EPS son capaces de eliminar aniones

superóxido y radicales hidroxilos in vitro (12,13). En el presente estudio se realizó la extracción de EPS a partir de dos cianobacterias extremófilas con el objetivo de evaluar y comparar su capacidad de absorción y retención de humedad a fin de explorar su potencial uso como ingrediente en la elaboración de humectantes.



OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar los exopolisacáridos de cianobacterias extremófilas para su uso potencial como humectantes dérmicos.

Objetivos Específicos

- Aislamiento e identificación microbiológica de cianobacterias halófilas de ambientes salobres de la región Arequipa.
- Extraer y cuantificar exopolisacáridos de cianobacterias halófilas mediante el protocolo modificado de Cristiane et al ⁽¹⁴⁾.
- Evaluar y comparar la capacidad de absorción y retención de humedad de los exopolisacáridos para su potencial aplicación como humectante mediante el proceso de absorción de humedad.

HIPÓTESIS

Se conoce que los EPS aislados de cianobacterias poseen gran capacidad de absorción y retención de agua, es posible que los EPS extraídos retengan mayor cantidad de humedad que los humectantes químicos que se utilizan en la industria cosmética actualmente y así se podría justificar su aplicación potencial como humectantes dérmicos orgánicos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DICTAMEN APROBATORIO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN.....	viii
OBJETIVOS	x
Objetivo General.....	x
Objetivos Específicos.....	x
HIPÓTESIS	xi
ÍNDICE DE CONTENIDO	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
GLOSARIO.....	xvii
CAPÍTULO I:	20
1. Consideraciones teóricas	20
1.1. La biología de las cianobacterias	20
1.2. Estructura celular	20
1.3. Los exopolisacáridos	23
1.4. Cianobacterias y la industria de cosmética	24
1.5. Los hidratantes	25
1.6. Composición de EPS	26
1.7. Sistemas de cultivos de cianobacterias	28
1.8. Procesamiento de biomasa de microalgas.....	30
CAPÍTULO II:	33
2. Materiales y métodos	33
2.1. Ubicación.....	33
2.2. Materiales.....	33

2.2.1. Material biológico	33
2.2.2. Material de laboratorio	33
2.2.3. Equipos, aparatos e instrumentos	34
2.2.4. Reactivos:	34
2.3. Metodología.....	35
2.3.1. Aislamiento y cultivo de cianobacterias	35
2.3.2. Protocolo para el aislamiento y cultivo	36
2.3.3. Cultivo de cianobacterias y obtención de biomasa de cianobacterias	37
2.3.4. Extracción de EPS	37
2.3.5 Capacidad de absorción y retención de humedad del EPS crudo	38
2.4 Flujiograma de procesos	40
CAPÍTULO III:	41
3. Resultados y discusiones	41
3.1. Aislamiento de cianobacterias halófilas de ambientes salobres de la región Arequipa.	41
3.2. Extracción y cuantificación de exopolisacáridos de cianobacterias.....	44
3.3. Evaluación y comparación de la capacidad de absorción y retención de humedad de los EPS.	46
CAPÍTULO IV:	56
4. Conclusiones y recomendaciones.....	56
4.1. Conclusiones.....	56
4.2. Recomendaciones.....	56
4.3. Referencias bibliográficas.....	57
4.4 Anexos	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Valores de los promedios y desviación estándar de los porcentajes de absorción de humedad en cámara de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	49
Tabla 3.2. Comparación de la capacidad de absorción máxima de agua de los EPS de Euhalothece sp. y Synechococcus sp., frente a quitosano y urea y urea al cabo de 72 h de evaluación.....	50
Tabla 3.3 Capacidad de retención de humedad en una cámara saturada de Na_2CO_3 (43% de HR).	51
Tabla 3.4 Comparación de la capacidad de retención de humedad de los EPS de Euhalothece sp. y Synechococcus sp. frente a quitosano y urea al cabo de 72 h de evaluación.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática de la célula vegetativa de una cianobacteria. 1, membrana celular; 2, tilacoide; 3, ficobilisomas; 4, gránulos de glucógeno; 5, gránulos de cianoficina; 6, gránulos de polifosfato; 7, ribosomas; 8, carboxisoma rodeado de nucleoplasma; 9, vesícula de gas (22).....	22
Figura 1.2. Estructura química de A: Digalatosilglicerol, B: Monogalctosil glicerol y C: Sulfoquinovosylglycerol generada en pubchem. Fuente (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).....	22
Figura 1.3. Estructura química de Exopolisacarido generada en pubchem. Fuente (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)	24
Figura 1.4. A. Estructura de un EPS. B, C y D imágenes SEM de la morfología de EPS producidas por costras de cianobacterias en suelos de arena de Kalahari (59). B. tipo capsula, C tipo granulo y D tipo vaina.	28
Figura 1.5. Sistemas de cultivos de cianobacterias. A) Estanques de canalización. B) Fotobiorreactores tubulares (67,68).....	30
Figura 1.6. Estructura química de A: Limoneno, B: Farneseno generada en pubchem. Fuente (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)	32
Figura 2.1. A) Zona de muestreo en las lagunas de San Camilo-La Joya Arequipa. (B y C) proceso de colecta de muestras donde se observa los depósitos de sal en la superficie del suelo.....	35
Figura 2.2 (A) Vista lateral del diseño e implementación de la cámara de humedad donde se muestra los 5 componentes. (B) Cámara de humedad vista desde arriba dónde se muestra las placas multipocillo donde se ubican las unidades experimentales (EPS1, EPS2 y los controles; quitosano y urea).	39
Figura 3.1. A y B placas con cultivos de cianobacterias antes de la purificación. C y D cultivos puros de las dos cianobacterias después de la purificación.	42
Figura 3.2. Fotografía de las especies puras de cianobacterias aisladas de San Camilo-La joya. A. Eualothece sp. B. Synechococcus sp. Se observa una gran diferencia en el tamaño de las células comparado a la especie Eualothece sp.	43
Figura 3.3. Curva de crecimiento de las cianobacterias durante 15 días de cultivo de Eualothece sp y Synechococcus sp.....	43
Figura 3.4. Capacidad de absorción de agua frente al tiempo de los EPS (EPS1 y EPS2) en comparación a las muestras control (quitosano y urea) llevados a cabo en cámara saturada de K ₂ CO ₃ (43% HR) a 25°C.	47

- Figura 3.5.** Capacidad de absorción de EPS (EPS1, EPS2) y muestras de control (quitosano y urea) realizado en cámara saturada de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (81% RH) a 25° . El gráfico muestra datos de experimentos por triplicado. 48
- Figura 3.6.** Capacidad de retención de humedad en una cámara saturada de Na_2CO_3 (43% de HR)..... 50
- Figura. 3.7.** Estructura química de A: N-acetil glucosamina, B: Acido glurónico, C: Manosa, D: Galactosa, E: Fucosa generada en pubchem. Fuente (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 55



GLOSARIO

Arabinosa: monosacárido de cinco carbonos con un grupo aldehído por lo que pertenece al grupo de las aldosas y dentro de este al de las aldopentosas.

Carbonato de sodio: Es un compuesto inorgánico blanco con fórmula Na_2CO_3 que, inodoro y soluble en agua y que producen soluciones moderadamente alcalinas en agua.

Catalizador: Es una sustancia o molécula que tiene la capacidad de acelerar las reacciones químicas.

Cianobacterias: Son mejor conocidas como algas verdiazules, representa un grupo grande y heterogéneo de organismos procarióticos fotosintéticos.

EPS: Son polímeros de carbohidratos de alto peso molecular que son secretados fuera de la célula.

Estrato córneo: Es la capa más externa de la epidermis y marca la etapa final de la maduración y el desarrollo de los queratinocitos

Extremófilos: Son organismos que habitan en condiciones extremas.

Fructosa: La fructosa es un monosacárido. La fructosa unida a la glucosa, forma la sacarosa.

Fucosa: Es un desoxiazúcar y un derivado de l-galactosa, con fórmula química $C_6H_{12}O_5$, carece de oxígeno en el carbono 6.

Galactosa: Es un monosacárido que tiene la fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ y masa molar 180,156 g / mol.

Humectante: Sustancia química que promueve la retención de humedad, actúan extrayendo agua de la dermis.

Manosa: Es una aldohexosa natural que se diferencia de la glucosa por la inversión de uno de los cuatro centros quirales de la molécula.

Medio de cultivo BG-11: Medio nutritivo recomendado para el cultivo de cianobacterias, debido a su alta concentración de Nitrato de Sodio, además presenta sales de Calcio, Magnesio, Cobre, Manganeso, Zinc, Molibdeno, Borato y EDT A.

PCA: Es una sustancia natural en la piel que tiene una fuerte higroscopicidad y puede absorber agua del aire.

Polímeros: Son macromoléculas que están formadas por cadenas de una unidad básica, cada unidad se llama monómero.

Quitosano: Es un polisacárido que se extra de la quitina del exoesqueleto de crustáceos e insectos.

Ramnosa: Es una metil pentosa, de formula $C_6H_{12}O_5$, que se encuentra en muchas plantas como glucósido.

Ribosa: Es un azúcar natural, un monosacárido que contiene 5 átomos de carbono (pentosa), sirve de bloque de construcción para fabricar nucleótidos.

Sacran: polisacárido natural de alto peso molecular extraído de las algas, *Aphanothece sacrum*, que vive en agua clara de manantial en forma de agua de reflujo.

Urea: Es un compuesto químico útil y natural, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, también conocido como carbamida, que se encuentra en la orina de los mamíferos, entre otros lugares.

Xilosa: Es un monosacárido con cinco átomos de carbono con grupo funcional aldehído.

Densidad celular: Es Número de células por unidad de volumen.

DCW: Peso seco

CAPÍTULO I:

1. Consideraciones teóricas

1.1. La biología de las cianobacterias

Las cianobacterias son los organismos más antiguos en la tierra (más de 2.500 millones de años). Estos organismos se encuentran en diferentes ambientes océanos, lagos, estuarios, ríos, pantanos, postres, selvas tropicales, aguas termales y valles secos antárticos (15,16). Las cianobacterias desarrollaron la fijación de carbono cuando la concentración atmosférica de CO₂ fue de 10 a 100 veces superior (17,18). Debido a esto, las cianobacterias participaron indirectamente en la formación de la capa de ozono (19). Las cianobacterias son principalmente fotoautótrofos aeróbicos, pero también pueden realizar fotosíntesis anaeróbica. Algunos de estas cianobacterias también pueden crecer como fotoheterótrofos o quimioheterótrofos (20). La enzima fijadora de carbono en estos microorganismos es la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (RuBisCO)₍₁₆₎. Muchas especies de cianobacterias también son diazotrofos que juegan un papel notable en la fijación de nitrógeno molecular (N₂), donde la nitrogenasa cataliza la reducción de N₂ a amonio (21). Debido a que esta enzima es inhibida por el oxígeno molecular, la fijación de N₂ debe separarse de la fotosíntesis oxigenada. Para la separación espacial, las cianobacterias tienen células diferenciadas (22).

1.2. Estructura celular

Las cianobacterias son organismos microscópicos procariotas, sin embargo, su configuración celular es diferente de las bacterias y arqueas más simples (23). La representación de la célula vegetativa de una cianobacteria se presenta en la Figura 1.1. La pared celular está formada por una membrana rica en lipopolisacárido (LPS) y una capa interna de peptidoglucano. A diferencia de otras bacterias Gram negativas, la capa de peptidoglucano cianobacteriano es al menos cinco veces más gruesa y su LPS carece de fosfato, heptosas y ceto- desoxioctonato unidos (24,25). Otros componentes de la membrana son los carotenoides, los ácidos grasos hidroxilados y las porinas Toc75 responsables de la translocación de proteínas en organismos fotosintéticos (26,27). Las cianobacterias también están rodeadas de vainas, cápsulas y limos. Estas biopelículas se forman por la liberación de

polisacáridos extracelulares (EPS) a través del complejo de poros de unión (JPC) que conecta el citoplasma con el exterior.

Las cápsulas y las vainas juegan un papel protector en condiciones ambientales extremas y la modificación del limo es necesario para el movimiento por deslizamiento (28).

La pared celular se separa de la membrana mediante el espacio periplásmico interno. Los tilacoides son membranas intracelulares que abarcan la mayor parte del citoplasma y están dispuestas en una serie de cilindros concéntricos alineados con el eje largo de la célula (29). Los tilacoides se organizan como bicapas lipídicas hechas de monogalactosilglicerol (MGDG) (~40%), digalactosildiacylglycerol (DGDG) (~32%), sulfoquinovosildiacylglycerol (SQDG) (~15%) y fosfatidilglicerol~ (%) (30). El espacio dentro de los tilacoides es la luz y el espacio fuera de ellos es una prolongación del citoplasma (31). Los tilacoides son los centros para las reacciones de luz en la fotosíntesis, pero no están presentes en algunas cianobacterias (por ejemplo, *Gloeobacter violaceus*). En esos casos, las reacciones a la luz están directamente asociadas a la membrana citoplasmática (21,27). Una de las principales diferencias morfológicas entre los tilacoides cianobacterianos y los tilacoides cloroplásticos de las plantas superiores es la falta de apilamiento de membrana o formación de grana (19).

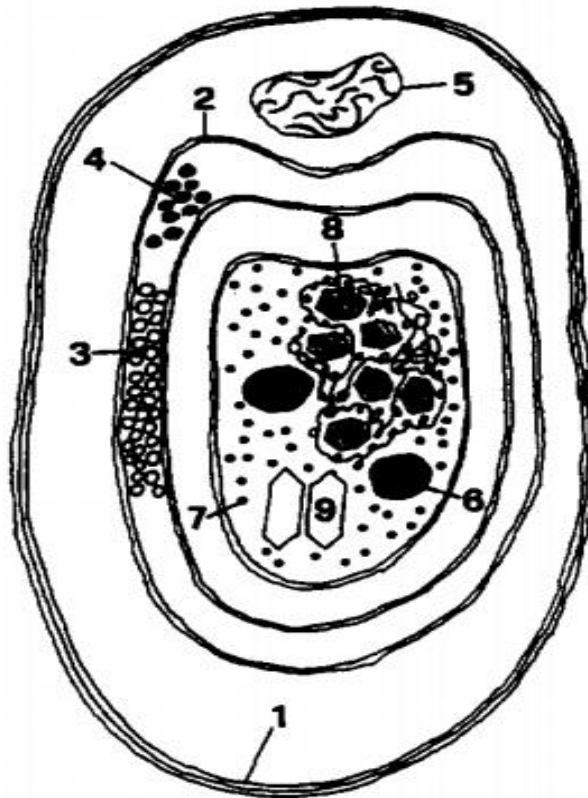


Figura. 1.1. Representación de la célula vegetativa de una cianobacteria. 1, membrana celular; 2, tilacoide; 3, ficobilisomas; 4, gránulos de glucógeno; 5, gránulos de cianoficina; 6, gránulos de polifosfato; 7, ribosomas; 8, carboxisoma rodeado de nucleoplasma; 9, vesícula de gas (31).

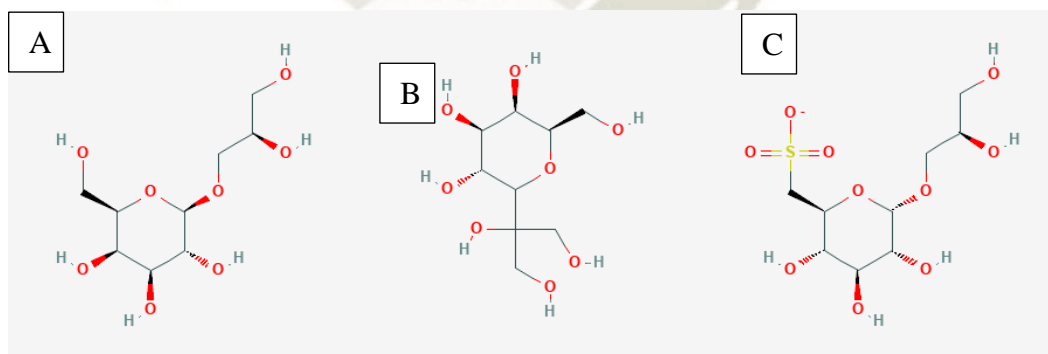


Figura. 1.2. Estructura química de A: Digalatosilglicerol, B: Monogalctosil glicerol y C: Sulfoquinovosylglycerol generada en pubchem. Fuente (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

El ADN de la mayoría de las cianobacterias está organizado en cromosomas circulares con una amplia gama de niveles de ploidía. Como ejemplo *Synechocystis* sp. PCC 6803 puede tener hasta 218 copias de cromosomas por célula. Por otro lado, los plásmidos de cianobacterias pueden estar completamente ausentes (en *Prochlorococcus* y *Synechococcus*) o presentarse como copias múltiples con tamaños que alcanzan cientos de kilobases (29). El citoplasma de las cianobacterias también contiene gránulos de polímero y vesículas de gas. Los gránulos se usan como reservas de polímeros de almacenamiento (es decir, cianofina y polihidroxicanoatos) y las vesículas de gas se usan para movimientos flotantes (19,30,31).

1.3. Los exopolisacáridos

Los exopolisacáridos son polímeros de alto peso molecular que están compuestos de residuos de carbohidratos azúcar y son secretados por microorganismos al ambiente circundante. Exopolisacárido es un término utilizado por primera vez por Sutherland (1972) para describir polímeros de carbohidratos de alto peso molecular producidos por bacterias marinas. Los exopolisacáridos se pueden encontrar como en el material capsular o como limo disperso en el ambiente circundante sin asociación obvia a ninguna célula en particular (32,33). Generalmente están compuestos de monosacáridos y otros componentes que no son carbohidratos (como succinato, acetato, piruvato y fosfato). Debido su diversa composición, tienen muchas aplicaciones en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria. Muchos EPS de microorganismos están siendo investigados para reemplazar las gomas de plantas (como la goma xantana). Actualmente se han logrado nuevos descubrimientos de EPS de microorganismos de importancia industrial (34).

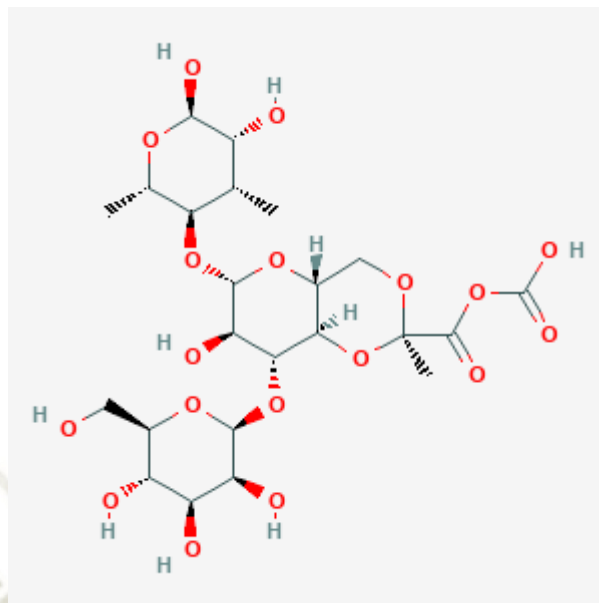


Figura. 1.3. Estructura química de Exopolisacárido generada en pubchem.
Fuente (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

1.4. Cianobacterias y la industria de cosmética

Las cianobacterias o algas verdeazuladas son procariontes fotosintéticas con una larga historia evolutiva ⁽³⁵⁾, lo que resulta en una amplia variedad de especies que ocupan hábitats diferentes ⁽³⁶⁾. De hecho, las cianobacterias son ubicuas tanto en ambientes terrestres como acuáticos, incluso en extremos, como valles secos antárticos, lagos termofílicos y cuevas de lava ^(37,38). En el curso de su evolución, las cianobacterias también han fortalecido simbiosis únicas con otros organismos ⁽³⁹⁾. Aunque los invertebrados albergan una infinidad de metabolitos secundarios con potentes propiedades biológicas, la microbiota asociada parece ser la verdadera fuente de los compuestos ⁽⁴⁰⁾.

Esto es particularmente interesante en el caso de los organismos marinos, donde el potencial de los invertebrados marinos para proporcionar metabolitos secundarios beneficiosos depende de su increíble microbiota, es decir, en las cianobacterias ⁽⁴¹⁾. En los últimos años, las cianobacterias se han considerado un enfoque alternativo a los compuestos naturales con aplicaciones en la industria cosmética ^(42,43). Al presentar sistemas fotosintéticos, de adaptación y de defensa complejos, las cianobacterias son capaces de producir diversos metabolitos, como

flavonoides, pigmentos (p. Ej., β -caroteno, c-ficoeritrina, ficobiliproteínas), fenoles, saponinas, esteroides, taninos, terpenos y vitaminas (44,45). Muchas especies de cianobacterias viven en ambientes extremos, incluida una alta exposición a la radiación solar y largos períodos de desecación. Para sobrevivir en condiciones tan extremas, las cianobacterias producen compuestos que permiten la protección contra la radiación ultravioleta (UV) y compuestos capaces de reducir la deshidratación extrema y el estrés oxidativo (46, 47). También se descubrió que varios géneros de cianobacterias, como la Spirulina, son ricos en nutrientes, como proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas y minerales (48), los cuales son componentes en formulaciones cosméticas.

1.5. Los hidratantes

Las rutinas diarias de hidratación son comúnmente utilizadas por todas las clases sociales y demuestran la gran preocupación por una piel sana (49,50). Las cremas hidratantes contienen una variedad de combinaciones de agentes químicos, como emolientes, oclusivos y humectantes, dirigidos a atraer, retener y aumentar el contenido de agua y reducir la evaporación del agua para prevenir la Pérdida de Agua Transepidérmica (42). Sin embargo, pueden producirse reacciones cutáneas incómodas por formulaciones tópicas, como sensaciones sensoriales o subjetivas sin signos de inflamación (50,51) y algunas lesiones subclínicas (52). Los agentes oclusivos, por ejemplo, tienen limitaciones en términos de olores, reacciones alérgicas y textura oleosa. Sin embargo, dado que los humectantes pueden mejorar la absorción de agua desde la dermis hacia la epidermis, donde luego puede perderse en el medio ambiente, casi siempre se combinan con un agente oclusivo para formar una barrera hidrófoba sobre la piel. El uso potencial de las cianobacterias como agentes hidratantes en cosméticos proviene del hecho de que estos organismos tienen mecanismos protectores como la excreción de exopolisacáridos (EPS). Las cianobacterias EPS están compuestas por varios azúcares y ácido urónico que pueden representar más del 60% del peso seco (47). En las células, el EPS puede aparecer covalentemente unido o unido a la superficie celular, formando vainas, cápsulas y mucílago (11). La tolerancia de las cianobacterias a la salinidad en ambientes salinos extremos parece deberse a una gruesa capa de EPS que rodea las células (53). Se descubrió que las células de

Nostoc commune cuando ingresan a un estrés por nutrientes secretan EPS, que los hace resistente a la desecación, lo que sugiere que la cantidad de EPS tiene un papel crucial en la tolerancia a la desecación en *Nostoc commune* (53). Dado que el EPS está compuesto por moléculas con capacidad de absorción y retención de agua, como el ácido urónico (10), se han estudiado para este propósito en cosmética en comparación con otros ingredientes. Se demostró una mayor capacidad de absorción de agua por EPS para una especie de *Nostoc commune* (10,1%) en comparación con la urea (5,8%) (53). En el mismo estudio, también se logró una mayor capacidad de retención de agua con EPS (28%), en comparación con la urea (15.9%) y el quitosano (7.3%), lo que sugiere que el EPS de cianobacterias tiene un mayor potencial para ser utilizado como un producto natural. humectante en la industria cosmeceútica con el beneficio de no tener que combinarse con un agente oclusivo. Okajima *et al.* extrajeron un EPS denominado sacran de la matriz extracelular de la cianobacteria *Aphanothece sacrum* y descubrieron que estaba compuesto de residuos de azúcar, como el ácido urónico, el ácido murámico y la manosa (54, 55, 56). En una comparación de retención de humedad entre el sacran y ácido hialurónico, se encontró que el sacran tiene mayor viscosidad y eficiencia de absorción de agua, así como gran capacidad de absorber soluciones salinas como el Ca^{2+} y Mg^{2+} . Estos hallazgos fueron particularmente interesantes ya que el ácido hialurónico es uno de los ingredientes más utilizados en productos cosméticos y tiene alto costo y producción limitada (57). El Sacran es, por lo tanto, un gel de cianobacterias que tiene el potencial de ser utilizado como un agente altamente hidratante.

1.6. Composición de EPS

Los polisacáridos son polímeros que constan de cadenas de unidades de monosacárido o disacárido unidas por enlaces glucosídicos con diferente número de C (por ejemplo, seis para una hexosa como la glucosa) (figura 1.2). Numerosos estudios han caracterizado el EPS en cepas individuales de cianobacterias, solo un estudio ha intentado caracterizar el EPS cianobacteriano de las costras del suelo (58). La capa de EPS puede presentar diferentes formas morfológicas, ya sea cápsulas que rodean las células, granular y una vaina que rodea la colonia (59) (Figura 1.3). Aunque estas formas morfológicas se han caracterizado en el

laboratorio para especies aisladas de cianobacterias, también se han observado en muestras de corteza de suelo seco ⁽⁶⁰⁾. Las características de EPS producidas por las mismas especies de cianobacterias pueden ser significativamente diferentes dependiendo de la configuración de crecimiento. En condiciones de laboratorio sin limitaciones de nutrientes, se pueden formar productos más complejos, inducidos por diferentes medios de crecimiento, que en condiciones limitadas de nutrientes que a menudo se encuentran en suelos de tierras secas. Por lo tanto, es más probable que la síntesis de EPS *in situ* conduzca a la producción de solo productos esenciales, como glucosa y galactosa, requeridos por las cianobacterias ⁽⁶¹⁾. Algunas de las funciones de EPS no son específicas y son compartidas por toda la gama de polisacáridos, mientras que otras funciones son específicas de la estructura de EPS ⁽⁵⁹⁾. Por ejemplo, estructuras similares pueden compartir roles específicos (por ejemplo, formando gel) mientras que tienen diferentes propiedades físicas (por ejemplo, reología) ⁽⁶⁰⁾. Por lo tanto, es esencial comprender las complejidades de los procesos microbianos y los controles ambientales sobre la dinámica de la producción de EPS dentro de una comunidad de corteza terrestre antes de que se pueda avanzar en la predicción de la cantidad o forma de EPS producida en los suelos de tierras secas. Por ejemplo, en las tierras secas existe un vínculo estrecho entre los aportes de C y N por las costras de cianobacterias del suelo y la naturaleza y magnitud de los pulsos de lluvia ^(61,62). Por lo que es posible que el EPS en las costas del suelo se vea perjudicado por la humedad y los niveles de N. Las siguientes secciones evalúan los estudios publicados existentes sobre el efecto de las condiciones ambientales en la síntesis de EPS.

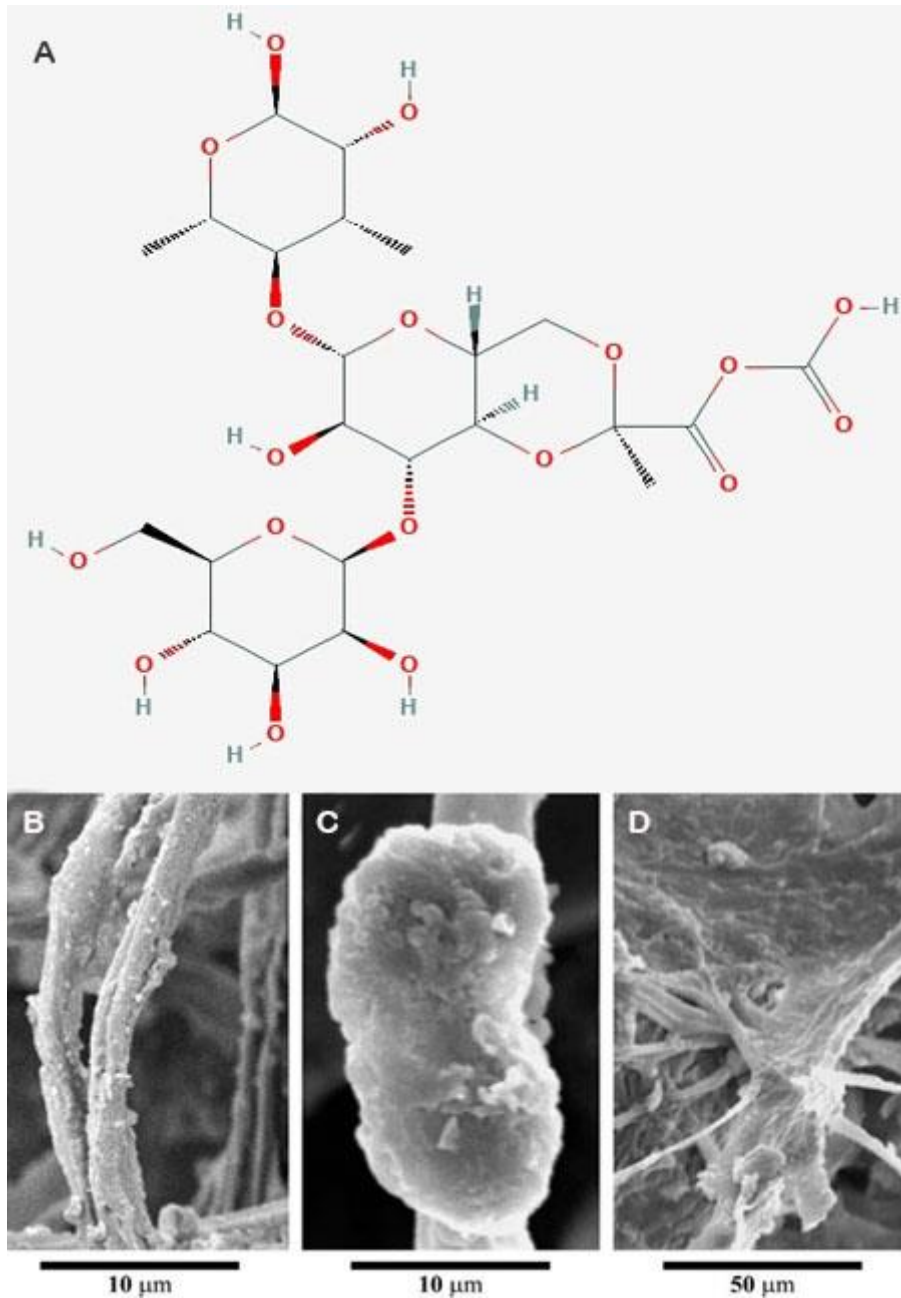


Figura. 1.4. A. Estructura de un EPS. B, C y D imágenes SEM de la morfología de EPS producidas por costras de cianobacterias en suelos de arena de Kalahari ⁽⁵⁹⁾. B. tipo capsula, C tipo granulo y D tipo vaina.

1.7. Sistemas de cultivos de cianobacterias

El cultivo de cianobacterias puede tener lugar en sistemas de estanques abiertos rentables o en fotobiorreactores cerrados más caros y elaborados. La elección de un sistema de cultivo adecuado está influenciada principalmente por

las especies de cianobacterias y el valor comercial del producto ⁽⁶²⁾. Los estanques de canalización con ruedas de paletas y superficies de 300 a 5000 m² son los sistemas abiertos más comunes para el cultivo industrial de Spirulina (figura 1.4). Aunque el riesgo de contaminación en los estanques de las pistas de rodadura es mayor que en los fotobiorreactores cerrados, es posible el cultivo masivo de espirulina en sistemas abiertos porque prosperan a altos niveles de bicarbonato (pH 9.5– 11.0), que no son tolerados por contaminantes potenciales ^(60,63). Otros tipos de sistemas abiertos, utilizados para la producción en masa de biomasa cianobacteriana, son los estanques y lagos naturales, los sistemas inclinados de capa delgada y los estanques circulares con brazos giratorios ⁽⁶⁴⁾. Los fotobiorreactores cerrados con capacidades entre 100 y 1000 L se utilizan para mejorar el control de las condiciones de procesamiento (por ejemplo, penetración de luz, intercambio de gases, pH y temperatura) y para mantener condiciones axénicas (puras). Como son más caros, los sistemas cerrados solo se utilizan para cultivar especies de cianobacterias especializadas capaces de producir metabolitos de alto valor. Se han diseñado diferentes tipos de sistemas cerrados para maximizar la utilización de la luz y el espacio, pero los más populares son los fotorreactores tubulares (figura 3). Estos sistemas se pueden organizar como circuitos tubulares planos que se sientan en el suelo, estructuras verticales con tubos paralelos horizontales o bucles helicoidales con soporte de bastidor. Otros sistemas cerrados incluyen foto-biorreactores cilíndricos y de panel plano ^(59,60,65). Independientemente del sistema de cultivo, el cultivo masivo de cianobacterias está limitado por el efecto de sombreado propio que surge a medida que los cultivos se vuelven más densos. Mientras que los microorganismos heterotróficos que crecen en sistemas de fermentación alcanzan densidades celulares de 50 g / L o más, la densidad celular máxima de las cianobacterias fotoautotróficas es de solo 5 a 10 g / L DCW, incluso en condiciones óptimas de crecimiento ⁽⁶⁶⁾. Considerando esta diferencia en la concentración de biomasa, la producción en masa económicamente factible de derivados de cianobacterias depende en gran medida de las operaciones de procesamiento aguas abajo.



Figura 1.5. Sistemas de cultivos de cianobacterias. A) Estanques de canalización. B) Fotobiorreactores tubulares (67).

1.8. Procesamiento de biomasa de microalgas

Una vez que se alcanza la densidad celular óptima, la biomasa de cianobacterias de estanques y fotobiorreactores necesitan ser transformadas. El propósito de las operaciones de recolección es separar las células del medio líquido, elevando el porcentaje de biomasa de alrededor del 1% al 8-15% p / p (68). La selección adecuada de las técnicas de cosecha es esencial porque la operación de estos dispositivos representa el 20-30% del costo total de producción. Las operaciones de cosecha adecuadas dependen del tamaño celular, la morfología y la densidad. El cribado, la filtración y la sedimentación por gravedad son operaciones rentables para concentrar cianobacterias filamentosas más grandes ($> 70 \mu\text{m}$), pero se prefiere la centrifugación y la flotación por aire disuelto para separar especies unicelulares más pequeñas ($< 30 \mu\text{m}$). Aunque la microfiltración y la ultrafiltración se pueden usar para concentrar especies unicelulares con un tamaño de partícula inferior a $10 \mu\text{m}$, estas técnicas de recolección pueden ser más caras (69). La eficiencia de las operaciones de cosecha puede mejorarse mediante la floculación con sulfato de aluminio, sulfato férrico, polímeros catiónicos o quitosano (70), pero la adición de ayudas químicas debe evaluarse cuidadosamente para evitar la contaminación o el aumento de los costos de purificación. Idealmente, la producción de productos químicos por cianobacterias debería tener lugar en especies de rápido crecimiento y formadoras de filamentos (71).

Después de la recolección de biomasa, es necesario eliminar el exceso de contenido de agua, ya sea para mejorar las operaciones de extracción adicionales o para evitar la degradación. Las operaciones de secado son procesos intensivos en energía necesarios para llevar la concentración de biomasa a 90-95% p / p (~7% p/p de humedad). Nuevamente, la selección de sistemas de deshidratación adecuados es crítica para el procesamiento a gran escala porque su operación representa hasta el 30% del costo total de producción ⁽⁶⁶⁾. Además del uso eficiente de la energía, también se requiere un secado rápido de la biomasa para evitar la degradación de los compuestos sensibles al calor ⁽⁶⁹⁾. Entre las diferentes tecnologías, el secado por pulverización, el secado en tambor, el secado de flujo cruzado y la liofilización se pueden usar para el procesamiento a gran escala de cianobacterias. Si bien se prefiere el secado por pulverización en la producción a nivel industrial de derivados de cianobacterias (por ejemplo, suplementos de Spirulina, biocombustibles o biopolímeros), la liofilización puede ser una mejor opción para productos químicos de alto valor como los pigmentos y productos farmacéuticos ^(69,70).

Los últimos pasos en el procesamiento posterior de los productos de cianobacterias son la extracción y la purificación. Para extraer los metabolitos intracelulares, se pueden usar tratamientos mecánicos y químicos para romper la pared celular de las cianobacterias. Si bien las operaciones mecánicas incluyen la rotura mediante ultrasonido, homogeneización a alta presión y trituración por perlas, los tratamientos químicos incluyen tratamientos enzimáticos y extracción de líquido y líquido supercrítico. Además, la desintegración del campo eléctrico por pulsos es un método prometedor para alterar la permeabilidad de la membrana celular ⁽⁷⁰⁾. La integración de los métodos de disrupción celular en el procesamiento a gran escala es una tarea difícil porque algunos de estos métodos son caros y su eficiencia está influenciada por las propiedades biológicas y morfológicas de las cianobacterias ^(70,72). La extracción líquida es la operación más común para recuperar metabolitos de cianobacterias y el tipo de solvente depende del producto de interés. Si bien la extracción de biopolímeros y biocombustibles se realiza con solventes orgánicos, los pigmentos se pueden extraer con tampones acuosos. Una vez que se ha obtenido el extracto crudo, la cromatografía industrial puede usarse para purificar

compuestos químicos. Dado que la recuperación de solventes y la cromatografía son operaciones costosas, los costos de extracción y purificación deben aprovecharse con la producción de metabolitos valiosos (73,70).

Pueden ser necesarias diferentes secuencias de operación y tecnologías adicionales para la explotación de metabolitos específicos. Dado que las cianobacterias pueden liberar valiosos exopolisacáridos con aplicaciones potenciales en las industrias cosméticas, los filtrados o sobrenadantes de las operaciones de cosecha pueden procesarse aún más mediante precipitación alcohólica o nanofiltración (74). Siempre que las cianobacterias modificadas genéticamente también puedan liberar terpenoides en fase gaseosa (por ejemplo, isopreno, limoneno o farneseno) (75) el acoplamiento de columnas de absorción de gas a los sistemas de cultivo podría ser otra alternativa para obtener productos químicos valiosos de las bio-fábricas de cianobacterias.

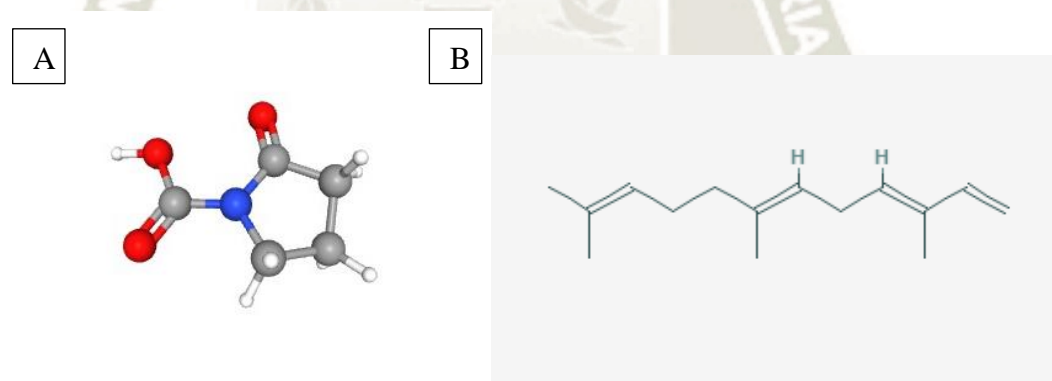


Figura. 1.6. Estructura química de A: Limoneno, B: Farneseno generada en pubchem. Fuente (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

CAPÍTULO II:

2. Materiales y métodos

2.1. Ubicación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, en un laboratorio privado en Espinar - Cusco y en un laboratorio privado de una empresa Arequipeña.

2.2. Materiales

2.2.1. Material biológico

- Muestras de cianobacterias

2.2.2. Material de laboratorio

- Tubos de Ensayo de 16 x 150 mm.
- Probeta de 10 ml
- Matraces
- Vaso de Precipitación de 1000 ml
- Vaso de Precipitación de 250 ml
- Puntas para micropipeta de 0-20 uL.
- Puntas para micropipeta de 100-200 uL.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Pipeta Pasteur
- Pipeta de 10 ml
- Pizeta
- Papel Filtro
- Espátula
- Hojas de bisturí
- Guantes
- Tubos de ensayo

- Placas Petri
- Frascos de 100ml

2.2.3. Equipos, aparatos e instrumentos

- Autoclave
- Micropipetas 0.5-10 μ L, 100-1000 μ l,
- Centrífuga
- Espectrofotómetro UV visible
- Luxómetro
- Cámara de flujo laminar horizontal
- Cámara de cultivo
- Microscopio óptico
- Potenciómetro

2.2.4. Reactivos:

- Medio BG-11
- (NH₄)₂SO₄
- K₂CO₃
- P₂O₅
- Quitosano
- Urea
- Etanol
- Ácido tricloroacético
- Quitosano

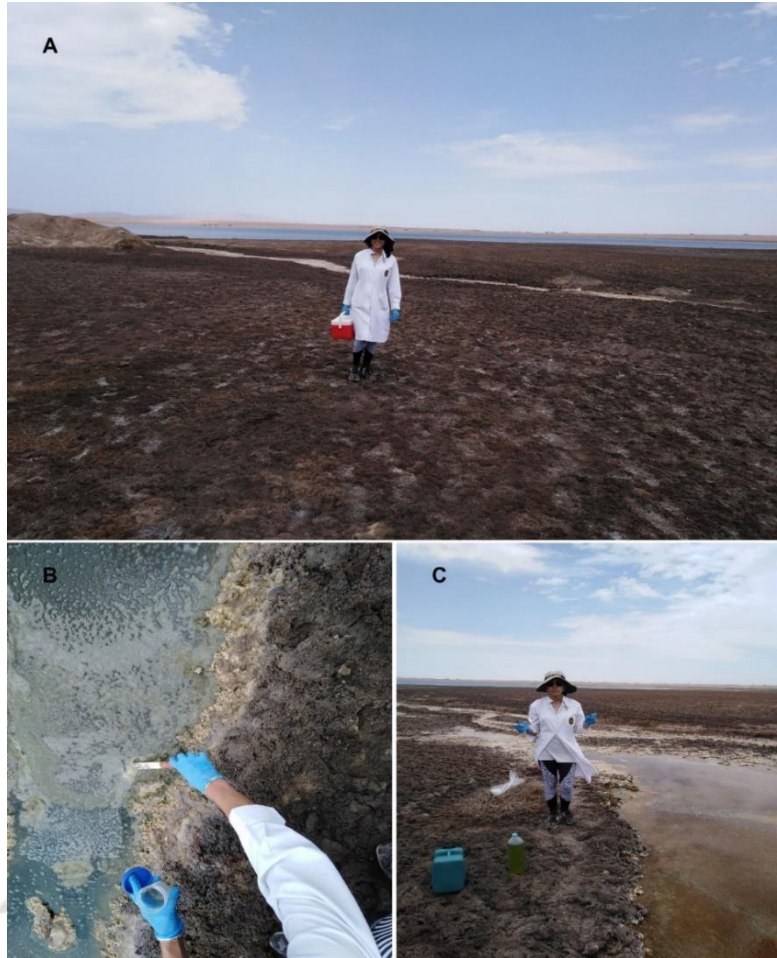


Figura 2.1. A) Zona de muestreo en las lagunas de San Camilo-La Joya Arequipa. (B y C) proceso de colecta de muestras donde se observa los depósitos de sal en la superficie del suelo.

2.3. Metodología

2.3.1. Aislamiento y cultivo de cianobacterias

Se realizó una salida de campo a la Laguna de San Camilo en la Joya-Arequipa con el fin de coleccionar cianobacterias extremófilas (Figura 2.2). La colecta de cianobacterias presentes en las rocas halíticas se realizó mediante raspado con hojas de bisturí y cuchillos estériles. Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf y frascos de boca ancha estériles. En la zona de muestreo se registraron

datos de temperatura, pH, iluminación (LUX), tipo de colonia y sustrato. Los frascos fueron rotulados indicando la descripción del punto de muestreo, fecha y código de muestra, finalmente las muestras fueron transportadas en recipientes estériles para su aislamiento y cultivo en laboratorio.

2.3.2. Protocolo para el aislamiento y cultivo

a) Método de aislamiento por diluciones

Se preparó una serie de 5 tubos de ensayo con tapa rosca, al que se agregó 9ml de medio BG-11. La composición del medio de cultivo BG-11 tubo la siguiente composición (g/l) (1) 75 g, NaNO_3 ; (2) 2g K_2HPO_4 , (3) 3.75 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (4) 1.8 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (5) 0.3 g ácido cítrico, (6) 0.3 g citrato férrico de amonio, (7) 0.05 g EDTANa_2 , (8) 1 g Na_2CO_3 , (9) solución de metales traza 1.43 g H_3BO_3 , 0.905 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.11 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.195 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 0.025 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Debido a que estas cianobacterias son halófilas al medio de cultivo se le adiciono 70g/L de NaCl . Usando una pipeta estéril, se tomó 1 ml de la muestra con cianobacterias y se colocó al tubo N°1, se agitó y luego, usando otra pipeta estéril, se repitió el paso anterior tomando 1ml de inóculo del tubo N°1 hacia el tubo N°2. Se repitió el mismo procedimiento con los tubos restantes hasta culminar con el tubo N°5, finalmente se obtuvo concentraciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Cada tubo se rotuló colocando su respectiva concentración. Los tubos inoculados con cianobacterias fueron colocados y se dejaron crecer en cámara de cultivo a temperatura de 25°C , 2000 lux y fotoperiodo de 12/12. Todo el aislamiento fue en condiciones asépticas mediante el uso de cámara de flujo laminar.

b) Método de aislamiento en placa

También se realizó el método de aislamiento en placa. Se prepararon 12 placas Petri con agar al 1.5% (placas de 9 x 15 mm) que contenían 20 ml de medio agarizado con medio de cultivo BG-11 conteniendo 70g/L de NaCl . De las diluciones del procedimiento anterior se transfirió 10 μL a cada una de las placas con medio agarizado (BG-11) y mediante un asa de siembra se extendió uniformemente por toda la superficie mediante la técnica de estriado por agotamiento. Las placas inoculadas se colocaron en una cámara de cultivo a 25°C , 2000 lux y fotoperiodo de 12/12. Las placas fueron monitoreadas semanalmente para verificar el

crecimiento y posible contaminación. Al cabo de dos semanas de crecimiento se logró observar el crecimiento de colonias verde azuladas en las placas. Cada colonia fue transferida a nuevas placas de agar mediante un asa de siembra estéril. Este procedimiento se realizó para purificar y seleccionar una especie única, obteniendo monocultivos en cada placa Petri.

2.3.3. Cultivo de cianobacterias y obtención de biomasa de cianobacterias

Luego de la purificación, cada colonia verdeazulada pura fue transferida a frascos de 100ml conteniendo 20 ml de medio BG-11 y 70g/L de NaCl. La transferencia de colonias se hizo con asa de siembra estéril. Los frascos inoculados con las cianobacterias se colocaron en una cámara de cultivo a temperatura ambiente de 24-25 °C, aproximadamente a 2000 LUX durante 9 días. Las células en crecimiento se verificaron tomando una muestra y observándolas mediante un microscopio de luz con un aumento de 40 y 100X. Después de cada semana de crecimiento se fue escalando a cultivos de 250mL, 1000mL 5000mL, y finalmente se escaló a 20L de cultivo de cada una de las especies de cianobacterias. El cultivo de 20L se llevó a cabo durante 15 días a condiciones de laboratorio para lo cual realizo la curva de crecimiento. Después de este periodo, los cultivos fueron expuestos a condiciones ambientales durante una semana con el fin de inducir la producción de EPS.

2.3.4. Extracción de EPS

Una vez que se realizó la inducción de la producción de EPS en condiciones de estrés por radiación solar, la biomasa producida se retiró y se separó por filtración al vacío mediante equipo de filtración usando papel de filtro Whatman, grado 1. Los EPS se precipitaron mediante la adición de etanol al 95%, en una proporción de 2: 1 (v/v) y se mantuvo a 4°C durante 24 horas. El material precipitado se filtró y el disolvente se evaporó en un horno a 35°C. El EPS se resuspendió varias veces en agua destilada para eliminar los iones y la sal. La solución concentrada de EPS se secó en un horno a 70°C durante seis horas hasta la completa evaporación del agua, luego fue pulverizado y almacenado hasta realizar los ensayos de absorción y retención de humedad. La producción de EPS, obtenida después de la extracción,

se calculó mediante un método gravimétrico y se expresó como g/L. El contenido de EPS se calculó a partir de los datos obtenidos por triplicado ($n = 3$).

2.3.5 Capacidad de absorción y retención de humedad del EPS crudo

La capacidad de absorción y retención de humedad de los EPS de cada de las cianobacterias y las muestras de control se estudiaron utilizando el método informado por (76). Antes de la prueba de absorción de humedad, los EPSs de cada cianobacteria junto con las muestras control el quitosano y urea se pulverizaron en un molino. Después de la pulverización, cada muestra fue secada usando un horno a 80°C durante 24 h. Los EPS, el quitosano y la urea fueron pesados, luego se colocaron 500mg de cada muestra en una cámara saturada de K_2CO_3 (43% de humedad relativa (HR)) y una cámara saturada $(NH_4)_2SO_4$ (81% de HR) a 25 °C, respectivamente. Cada ensayo se realizó por triplicado. La cámara de humedad fue construida de material acrílico de 18 cm de alto, 34 cm de ancho y de 10 cm de profundidad (figura 5). Esta cámara fue implementada con una tapa, un higrómetro digital, un multipocillo, un portamuestras y un recipiente para K_2CO_3 y $(NH_4)_2SO_4$ (figura 5).

El porcentaje de absorción de agua (R_a) se midió mediante la ecuación:

$$R_a = \frac{(W_n - W_0)}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

W_0 , peso inicial de la muestra y W_n peso final.

Las muestras se procesaron cada 6 horas durante 72 h.

Para la prueba de retención de humedad, el EPS seco y las muestras de control se mantuvieron a 43% de HR y se pesaron en diferentes puntos de tiempo durante 72 h. La capacidad de retención de Humedad (R_h) se basó en el porcentaje de agua residual en la muestra húmeda.

$$R_h(\%) = \left(\frac{H_n}{H_0}\right) - 9 \times 100 \quad (2)$$

Donde H_0 y H_n son el peso del agua antes y después de colocarse en el desecador con gel de sílice, respectivamente.

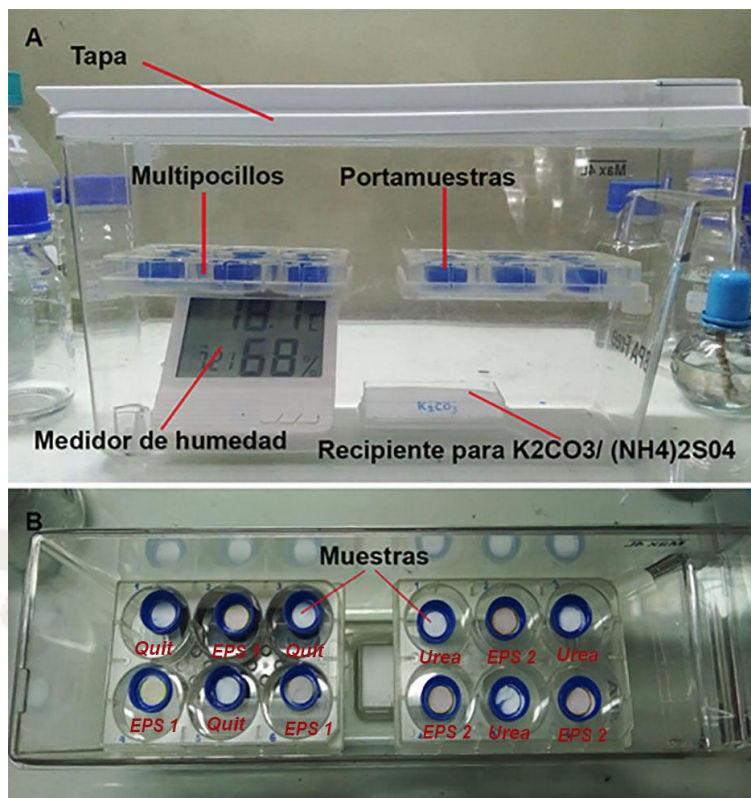


Figura 2.2 (A) Vista lateral del diseño e implementación de la cámara de humedad donde se muestra los 5 componentes. (B) Cámara de humedad vista desde arriba dónde se muestra las placas multipocillo donde se ubican las unidades experimentales (EPS1, EPS2 y los controles; quitosano y urea).

2.4 Flujo de procesos



CAPÍTULO III:

3. Resultados y discusiones

3.1. Aislamiento de cianobacterias halófilas de ambientes salobres de la región Arequipa.

A partir de cultivos en placas Petri se aislaron y purificaron dos especies de cianobacterias halotolerantes *Euhalothece* sp. y *Synechococcus* sp. (Figura 3.1), colectadas de la laguna hipersalina en San Camilo, La Joya- Arequipa. Los parámetros fisicoquímicos del agua salobre fueron; temperatura (30 °C), pH (a 8.5), salinidad 70 g/L y 2500 Lux.

La identificación de las especies se realizó en el Herbarium arequipensis de la Escuela de Biología, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

Euhalothece sp. presento células ovaladas de color azul verdoso en forma de bastón con un tamaño de 18-25 μm . La pared celular exterior es gruesa y su reproducción es por fisión binaria, donde la división celular siempre fue perpendicular al eje más largo de las células ovaladas (figura 3.2).

La especie *Synechococcus* sp. presento células de aproximadamente 30 a 47 μm , con células de forma esférica o elipsoidal en forma de varilla sin vaina mucilaginosas y las células son más largas que anchas. Esta especie se encuentran como células solitarias o en pequeños grupos o pares. Su reproducción es por fisión binaria, después de la división las células se separan o quedan dispuestas en filas cortas (pseudofilamentos) de varias células conectadas libremente con sus extremos (Figura 3.2).



Figura 3.1. Aislamiento y cultivo de *Euzhalotheca* sp. y *Synechococcus* sp. A. Aislamiento en placas con agar. B. Inóculos con cultivo líquido. C. Cultivo en fotobiorreactor. D. Cultivos después del escalamiento a condiciones de laboratorio.

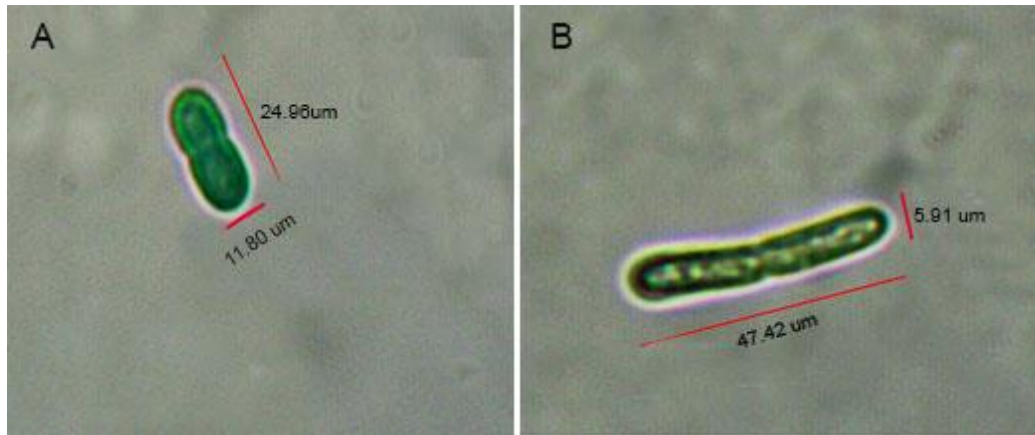


Figura 3.2. Fotografía de las especies puras de cianobacterias aisladas de San Camilo-La joya. A. *Euhalotheca* sp. B. *Synechococcus* sp. Existe una gran diferencia en el tamaño de las células de ambas cianobacterias.

Se encontró que las dos especies crecen en condiciones óptimas en medio BG-11 y toleran una concentración de 70 g/L. Por tanto, estas dos especies se caracterizan como extremófilas halófilas con las condiciones óptimas para el crecimiento a 30 °C y pH 8-9.

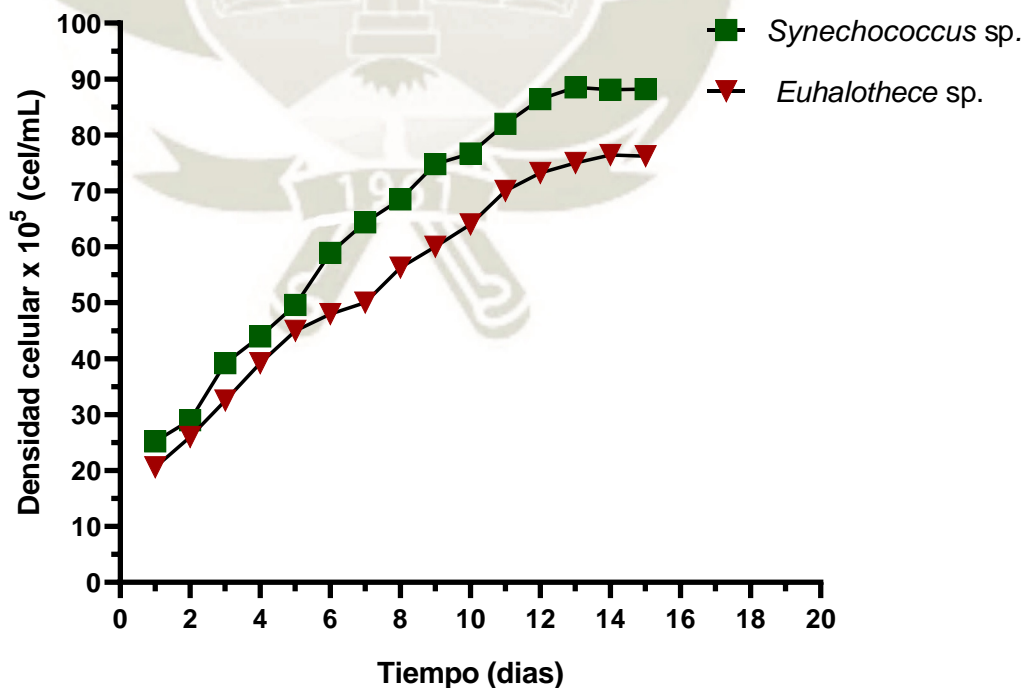


Figura 3.3. Curva de crecimiento de las cianobacterias durante 15 días de cultivo de *Euhalotheca* sp y *Synechococcus* sp.

La figura 3.3 muestra la curva de crecimiento realizada mediante los promedios y desviaciones estándar de la densidad celular de *Euhalothece* sp y *Synechococcus* sp. durante el cultivo de 15 días en condiciones ambientales (medio BG-11, 30 °C). La densidad máxima de células de *Euhalothece* sp. fue de 73.2 cel/mL frente a 88.5×10^{-5} cel/mL en *Synechococcus* sp. (Figura 3.3).

3.2. Extracción y cuantificación de exopolisacáridos de cianobacterias

La producción de EPS en 15 días fue de 6.4g/L para *Euhalothece* sp y 5.2 g/L para *Synechococcus* sp. En un estudio realizado por Cristiane et al (14), la producción a escala piloto de *Spirulina* sp., produjo solo 9.5 g L en 30 días de cultivo en condiciones exteriores (14). Esta variación en la producción de EPS podría estar influenciada por las condiciones de cultivo, salinidad y luz solar. La diferencia en cuanto a la producción de EPS de *Euhalothece* sp y *Synechococcus* sp., con *Arthrospira platensis* puede deberse a que las dos primeras cianobacterias fueron aisladas de un ambiente extremo con alto contenido de sal y alta luz solar (desierto). Este ambiente extremo provoca que estas especies posean mecanismos eficientes para producir EPS como medida para contrarrestar la desecación de las células y, por lo tanto, de la muerte (77). Varios estudios demostraron que la mejora en la producción de EPS en cianobacterias se obtuvo a altas intensidades de luz (78), mientras que otro estudio reportado por Trabelsi (79) especificó que la luz no era el factor determinante para la maximización de EPS en cultivos por lotes, pero interactuaba significativamente con la temperatura. Las mayores cantidades de EPS obtenidas bajo estas altas intensidades de luz podrían reflejar solo una mayor producción de biomasa que conduce a una mayor producción de EPS (80,81,82). De acuerdo a Lee et al, (2012) (80), la producción de EPS en cianobacterias aumenta a mayor concentración de NaCl.

Las cianobacterias se dividen en dos grupos principales, eurihalina y estenohalina, según sus niveles de tolerancia a la sal (81,82). *Synechocystis* es una cianobacteria eurihalina capaz de adaptarse a una amplia gama de salinidad, desde agua dulce hasta 1,2 M de NaCl (83,84).

Las cepas estenohalinas viables incluyen a *Euhalothece* de ambientes hipersalinos (85,86). *Euhalothece* es una cianobacteria unicelular que requiere un 7% de NaCl para un crecimiento óptimo. Presenta una considerable variabilidad del pH y de las concentraciones de NaCl y carbonato (87). Sin embargo, se desconocen muchos de sus rasgos fisicoquímicos y mecanismos de protección que operan bajo estrés bajo en sal. Muchas veces el estrés salino afecta la tasa de crecimiento en cianobacterias (88,89). Para hacer frente al estrés salino, las cianobacterias evitan la entrada de iones Na^+ en la célula utilizando antiportadores de Na^+/H^+ y transportadores de K^+ , o acumulando varios solutos compatibles como sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol, prolina y glicina betaína (15). Además, los exopolisacáridos (EPS) protegen a las cianobacterias contra el estrés osmótico/salino (90). También se dispone de evidencia experimental directa que respalda el papel protector de los EPS contra varios metales pesados (91, 92) para la cianobacteria unicelular *Synechocystis*.

Los EPS son aniónicos debido a la presencia de grupos uronato y sulfato, que quelan cationes como Na^+ e iones de metales pesados en diversas bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas 87. Se han identificado más de 500 genes putativos asociados con la estructura de la superficie celular en *Synechocystis* basándose en su homología con genes de *E. coli* y *Salmonella* (93).

Se identificaron 118 genes potencialmente implicados en la síntesis de polisacáridos en *Euhalothece* (87). Estos 118 genes se expresaron a diferentes niveles en presencia de NaCl al 3%, pero solo seis respondieron a la privación de sal (87). Por lo tanto, es posible que *Euhalothece* produzca EPS para aclimatarse en hábitats hipersalinos.

El contenido total de EPS de las células podría variar con la concentración de la sal. Por lo que sería interesante investigar la producción de EPS bajo concentraciones variables de sal externa.

Se han observado el mismo caso para varias cepas de cianobacterias halófilas como *Aphanocapsa halophyta* (94), *Microcoleus vaginatus* (95), *Cyanothece* (96) y *Synechocystis* sp. (97). El aumento de la cantidad de EPS podría sugerirse como una forma de evitar el estrés oxidativo en las células (53). La presencia de una

capa de EPS alrededor de la célula puede reducir la difusión de iones desde el medio a través de la superficie celular y, por lo tanto, prevenir la muerte celular (98).

De Philippis et al (86) revelaron que la salinidad promueve la producción de carbohidratos en cianobacterias y microalgas por tanto las especies extremófilas halófilas tiene gran potencial para la producción de EPS. En particular, muchas cianobacterias unicelulares que viven en ambientes hipersalinos (salinas, lagos, estanques, cuencas, etc.) se caracterizan por tener células rodeadas por una envoltura mucilaginosa (99), la cual es capaz de liberar grandes cantidades de exopolisacárido en el medio de cultivo. Por otro lado, la utilización de cepas de cianobacterias productoras de EPS capaces de crecer en medios hipersalinos sugiere la posibilidad de que sean cultivadas en tierras marginales, permitiendo así la utilización de recursos subexplotados para la producción de químicos de alto valor como sugiere Aller (100).

3.3. Evaluación y comparación de la capacidad de absorción y retención de humedad de los EPS.

Se estudió la capacidad de absorción y retención de humedad de los EPS de *Euhalothece* sp (EPS1) y *Synechococcus* sp. (EPS-2). Esta evaluación realizó durante 72 horas y los registros de peso se realizó a intervalos de 6 horas. Los resultados se compararon con la capacidad de absorción y retención de humedad del quitosano y urea como controles positivos. Los valores de los promedios y desviación estándar de los porcentajes de absorción de humedad del ensayo se muestran en el anexo 2.

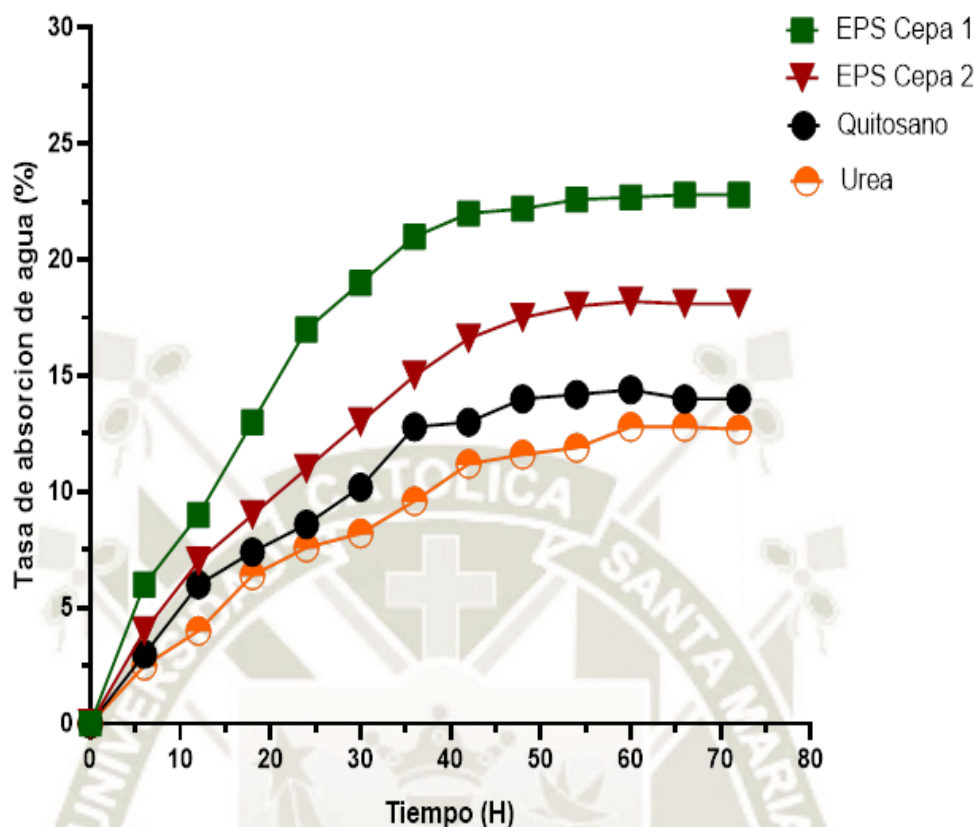


Figura 3.4. Capacidad de absorción de agua frente al tiempo de los EPS (EPS1 y EPS2) en comparación a las muestras control (quitosano y urea) llevados a cabo en cámara saturada de K_2CO_3 (43% HR) a $25^\circ C$.

Los resultados de la capacidad de absorción en cámara saturada de K_2CO_3 (43% de HR) se muestra en la figura 3.4.

En peso de todas las muestras aumentó rápidamente en los primeros 24 h, luego aumentó lentamente hasta alcanzar valores constantes (saturación) (figura 3.4). La capacidad de absorción del EPS de *Euhalotheca sp.* y *Synechococcus sp.* Durante 72h fue de 22.8% y 18.1 respectivamente. Los EPS de las cianobacterias fue mayor con respecto a quitosano (14%) y urea (12.70%) (figura 3.4). La absorción de humedad comparativa entre las muestras analizadas fue la siguiente: EPS1 > EPS 2 > quitosano 2 > urea.

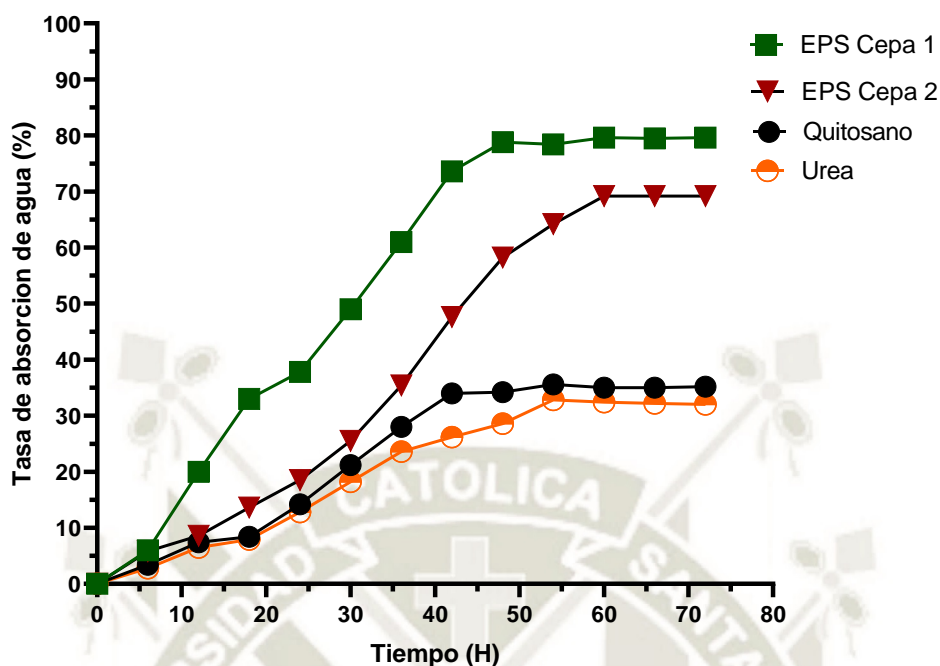


Figura 3.5. Capacidad de absorción de EPS (EPS1, EPS2) y muestras de control (quitosano y urea) realizado en cámara saturada de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (81% RH) a 25°. El gráfico muestra datos de experimentos por triplicado.

Los resultados de capacidad de absorción en la cámara saturada de Na_2CO_3 (43% de HR) se muestran en la figura 3.5. La capacidad de absorción EPS -1 aumentó rápidamente a las 5 h hasta alcanzar valores constantes a las 50h (figura 3.5). La capacidad de absorción EPS -2 aumentó rápidamente en las primeras 12 h y alcanzó su máximo a las 60 h (figura 3.5).

El quitosano y la urea se usaron como controles positivos en el análisis de retención de humedad del EPS de las dos cianobacterias. Los valores de los promedios y desviación estándar de los porcentajes de humedad de cada muestra (anexo 2).

Tabla 3.1 Valores de los promedios y desviación estándar de los porcentajes de absorción de humedad en cámara de (NH₄)₂SO₄

Tiempo de evaluación (horas)	Porcentaje de absorción de humedad			
	EPS		Quitosano	Urea
	EPS <i>Euhalothece sp.</i>	EPS <i>Synechococcus sp.</i>		
6	6.0 ±1.30	5.8 ±2.70	3.4 ±3.60	2.8±1.22
12	20.0 ±2.25	8.63±2.45	7.4±5.40	6.5 ±2.34
18	33.0 ±1.43	13.6±2.70	8.4±4.60	7.9±2.60
24	37.8 ±2.45	18.5±4.10	14.2±3.20	12.8±2.45
30	49.0 ±2.23	25.5 ±1.80	21.2±5.42	18.2±2.80
36	61.0 ±1.2	35.4±2.80	28± 4.2	23.6±2.40
42	73.6±2.35	47.6±2.32	34±3.20	26.2±3.45
48	78.8 ±2.35	58.2±3.30	34.2±2.10	28.6±4.60
54	78.4 ±5.40	64.2 ±2.22	35.6±3.40	32.8±3.90
60	79.6±4.20	69.2±1.90	35±5.23	32.4±2.90
66	79.5±4.02	69.2±3.72	35±4.10	32.2±3.42
72	79.6±5.30	69.2±3.72	35.2±3.70	32±3.10

F: 8542.14; P<0.01

La tabla 3.1, muestra los promedios y desviaciones estándar de los valores de los porcentajes de absorción de humedad a las 72 horas de evaluación después de ser sometido en la cámara de (NH₄)₂SO₄. Se detalla también el valor del estadístico de Fisher F= 8542.14 (P<0.01) de la prueba estadística de comparación de ANOVA, el cual muestra que existe diferencias altamente significativas en el promedio de los porcentajes de absorción de humedad.

Tabla 3.2. Comparación de la capacidad de absorción máxima de agua de los EPS de *Euhalothece* sp. y *Synechococcus* sp., frente a quitosano y urea y urea al cabo de 72 h de evaluación.

Muestras	Peso seco inicial (mg)	Peso con agua (mg)	% de absorción agua
EPS de <i>Euhalothece</i> sp.	500	898	79.60
EPS <i>Synechococcus</i> sp.	500	846	69.20
Quitosano	500	676	35.20
Urea	500	660	32.00

La capacidad de absorción del EPS de *Euhalothece* sp. y *Synechococcus* sp. durante 72 h fue de 79.6% y 69.2 %, respectivamente. Los EPS de las cianobacterias fue mayor con respecto a quitosano (35.2 %) y urea (32%) (Figura 3.2 y tabla 3.2). La absorción de humedad entre las muestras es como sigue: EPS1 > EPS 2 > quitosano 2 > urea.

Figura 3.6. Capacidad de retención de humedad en una cámara saturada de Na₂CO₃ (43% de HR).

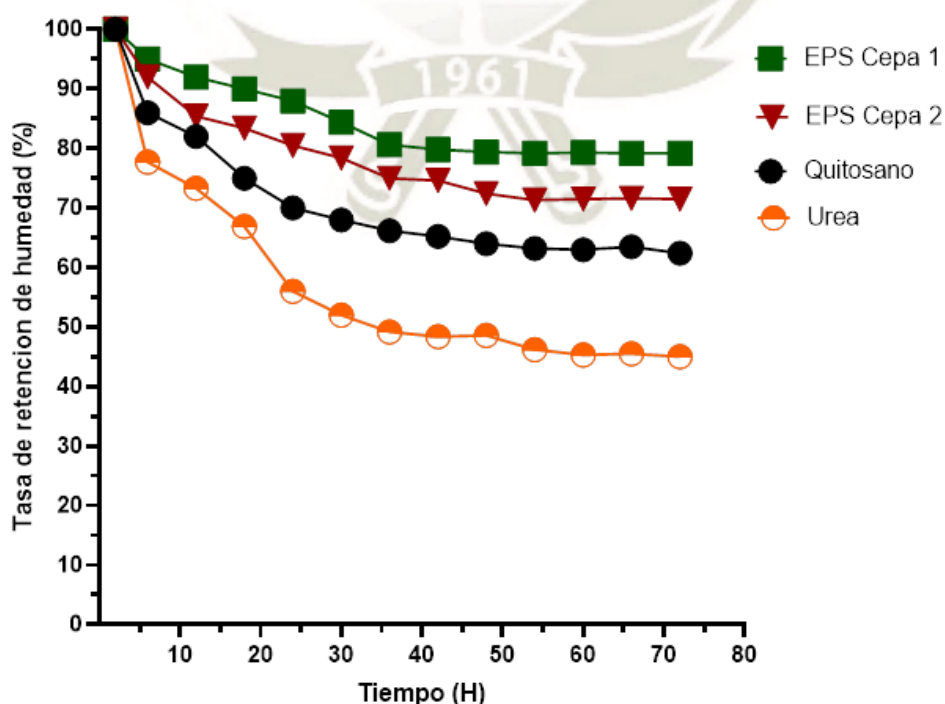


Tabla 3.3 Capacidad de retención de humedad en una cámara saturada de Na₂CO₃ (43% de HR).

CAPACIDAD RETENCION DE HUMEDAD (%)				
Tiempo de evaluación (horas)	EPS <i>Euhalothece</i> sp.	EPS <i>Synechococcus</i> sp.	Quitosano	Urea
2	100	100	100	100
6	95 ±20.40	92.0 ±2.25	86.0±2.40	77.7±2.40
12	92.0 ±3.20	85±3.40	82±2.40	73.3±3.2
18	90.0 ±2.42	83.4 ±3.70	75±2.60	66.9±2.20
24	88±2.24	80.5±2.4	70±3.60	56±3.40
30	84.4±3.24	78.4 ±2.20	68±3.20	52±3.70
36	80.6±3.90	75.0 ±3.70	66.2±4.20	49.2±3.20
42	79.8±2.45	74.6 ±2.40	65.2±2.60	48.4 ±2.45
48	79.4±4.25	72.4±4.24	64±4.26	48.6 ±2.80
54	79.2±3.48	71.3±3.20	63.2±3.30	46.2±2.44
60	79.3±4.25	71.5±2.40	63±4.70	45.3±3.2
66	79.2 ±3.60	71.6±4.20	63.5±5.60	45.5±2.50
72	79.2 ±2.48	71.5±4.50	62.4±2.40	45±3.40

F: 2490.16; P<0.01

Los valores de los porcentajes de retención de humedad a las 72 horas de evaluación después de ser sometido en la cámara de Na₂CO₃ (43% de HR). se muestran en la tabla 3.3. Se muestran también el valor del estadístico de Fisher F= 2490.16 (P<0.01) de la prueba estadística de comparación de ANOVA, el cual muestra que existe diferencias significativas en el promedio de los porcentajes de absorción de humedad.

Se evidencia que el peso de las muestras se reduce con el tiempo. Después de la deshidratación durante 72 h a 43% de HR, las capacidades de retención de humedad de EPS-1, EPS-2, quitosano y urea fueron 79.2%, 71.5%, 62.4% y 45.0%, respectivamente (figura 3.6 y tabla 3.4). El agua se perdió gradualmente en todas las muestras, pero mucho más lentamente en EPS1 y EPS2 que en quitosano y urea.

Tabla 3.4 Comparación de la capacidad de retención de humedad de los EPS de *Euhalothece* sp. y *Synechococcus* sp. frente a quitosano y urea al cabo de 72 h de evaluación.

Muestras	Porcentaje de humedad en cámara saturada de Na ₂ CO ₃	Retención de humedad total
EPS de <i>Euhalothece</i> sp.	100	79
EPS de <i>Synechococcus</i> sp.	100	71
Quitosano	100	62
Urea	100	45

Estos resultados demuestran que el EPS muestra fuertes propiedades de absorción y retención de humedad, que es ligeramente superior a los controles (quitosano y urea) en términos de factores hidratantes naturales. La alta capacidad de retención de humedad de los EPS puede deberse a su estructura química y red tridimensional (101). por tanto, estos EP'S tienen un gran potencial para la aplicación en la industria cosmética.

Los exopolisacáridos en los cosméticos funcionan como agentes gelificantes, ajustadores de la viscosidad, propiedad espesante y como retenedores de agua por medio de su capacidad de hinchamiento (89). Estos se deben a que los polisacáridos pueden solubilizarse en agua y también pueden reaccionar con la fibrina de la piel para formar una matriz de gel extracelular, lo que resulta en hidratación. La hidratación eficaz facilita la absorción y retención activa de la humedad por parte de la piel (102).

Por lo tanto, las propiedades de absorción y retención de humedad deben evaluarse compararse con varios cosméticos en el mercado.

Los EPS microbianos han atraído un gran interés entre los científicos debido a sus amplias aplicaciones potenciales que abarcan áreas como la salud (productos farmacéuticos y medicinas), la industria (cosméticos, textiles, lácteos, etc.) y el medio ambiente (103). También en la industria alimentaria como agentes emulsionantes y gelificantes, como agentes floculantes e hidratantes, emulsionantes, estabilizadores, agentes espesantes (104). Los EPS de microalgas y cianobacterias podrían utilizarse como nutracéuticos debido a su contenido en fibras, la capacidad de unión de ácidos y de intercambio catiónico, siendo también

buenos candidatos como prebióticos ⁽¹⁰⁵⁾. Los EPS solos o en combinación con otros compuestos tienen un gran potencial para ser utilizados en películas comestibles y revestimientos de alimentos, mientras que son portadores de aromas, colorantes, especias y nutraceuticos ⁽¹⁰⁶⁾. Estos polímeros también tienen el potencial de ser utilizados en productos alimenticios bajos en grasa o sin grasa, como sustitutos de grasas en mayonesas ^(107,108), aderezos para ensaladas y otras emulsiones alimenticias ⁽¹⁰⁹⁾. Los EPS de *Porphyridium* ya ha mostrado una buena capacidad de lubricación ⁽¹¹⁰⁾, siendo un excelente candidato para sustituir el ácido hialurónico como biolubricante. Otra aplicación prometedora podría ser como componente de una solución lubricante para las articulaciones, como se demostró inyectando el EPS de *Porphyridium* en las articulaciones de las rodillas de conejos ⁽¹¹¹⁾, reduciendo los trastornos causados por la artritis. Los alginatos de microalgas y cianobacterias se han utilizado con mayor frecuencia en varias aplicaciones: liberación controlada de fármacos ⁽¹¹²⁾, encapsulación celular, andamiaje en ligamentos, ingeniería de tejidos y regeneración de casi todos los tejidos del organismo humano, o incluso preparación de moldes en odontología ^(113, 114, 115). Los EPS se han aplicado ampliamente como hidrogeles, eventualmente combinados con otras sustancias, para ingeniería de tejidos neurales ⁽¹¹⁶⁾, ingeniería de tejidos cutáneos ⁽¹¹⁷⁾, ingeniería de tejidos óseos ⁽¹¹⁸⁾ y regeneración del músculo esquelético ⁽¹¹⁹⁾; regenerar la interfaz osteocondral ⁽¹²⁰⁾; obtención de células progenitoras endoteliales humanas ⁽¹²¹⁾. Kaltostat es un apósito de alginato disponible comercialmente que promueve la hemostasia y promueve el exudado en heridas con exudación baja a moderada. Los alginatos también se han utilizado para crear un lecho capilar para la reconstrucción de tejidos ⁽¹²²⁾ y en forma de soportes nanofibrosos para construir reemplazos vasculares que contienen células endoteliales y células de músculo liso (SMC) ⁽¹²³⁾. Otra aplicación del alginato es como componente para la ingeniería de válvulas cardíacas ⁽¹²⁴⁾. De manera similar al alginato y el quitosano se puede utilizar para la encapsulación celular en aplicaciones de ingeniería de tejidos debido a su potencial condrogénico ⁽¹²⁵⁾. Las membranas compuestas con quitosano demostraron ser apósitos para heridas prometedoros para la curación de quemaduras o úlceras ⁽¹²⁶⁾. También el gel de agar y quitosano apoyó la formación de tejidos protésicos vasculares autólogos in vivo, llamados “biotubos”

(127). En formulaciones cosméticas, la carragenina se usa ahora para mascarillas faciales y en cremas tópicas (128). El mercado de polisacáridos formadores de hidrogel a partir de cianobacterias tiene el potencial de crecer y desarrollarse aún más.

Hay dos polisacáridos de interés cosmético disponibles en la actualidad que son elaborados por intervención humana, la goma de celulosa (carboximetilcelulosa) y la carboximetilquitina (128), y entre los polisacáridos utilizados en productos cosméticos, se pueden mencionar los alginatos, pectinas, gomas y quitosano por sus propiedades. gran aplicación como aditivos reológicos (128). Sin embargo, solo se han utilizado comercialmente unos pocos EPS microbianos y menos aún de ambientes extremófilos. En este estudio los EPS mostraron una buena capacidad de absorción y retención de humedad. La capacidad de absorción de humedad del EPS-1 y EPS-2 fue mayor al quitosano y la urea. Del mismo modo, Sun et al, (127) que la capacidad de absorción de humedad del polisacárido extracelular producido por una bacteria marina del Ártico era mayor que la del quitosano, pero menor que la del hialuronato de sodio. Hasta ahora hay escasos estudios sobre absorción y retención de humedad que pueden aclarar este mecanismo de polisacáridos extracelulares. Un estudio de Chen et al, (101) informaron que la capacidad de absorción y retención de humedad depende del grupo 6-carboximetilo de la quitina y el quitosano. Los polisacáridos extracelulares de las bacterias marinas y salobres tienen gran capacidad de absorción y retención ya que se componen principalmente de N-acetilglucosamina, ácido glucurónico, manosa, galactosa y fucosa, así como una pequeña cantidad de ramnosa y glucosa (119). Por tanto, la composición de monosacáridos y el peso molecular de los EPS tienen una gran relación con la capacidad de absorción, mientras más peso molecular hay mayor capacidad de retención de humedad (119). Falta aún más estudios sobre los mecanismos y composición que influyen en la capacidad de absorción y retención de humedad de los EPS. Por tanto, la capacidad de retención de humedad de *Euhalothece* sp. y *Synechococcus* sp. tiene gran potencial como humectante.

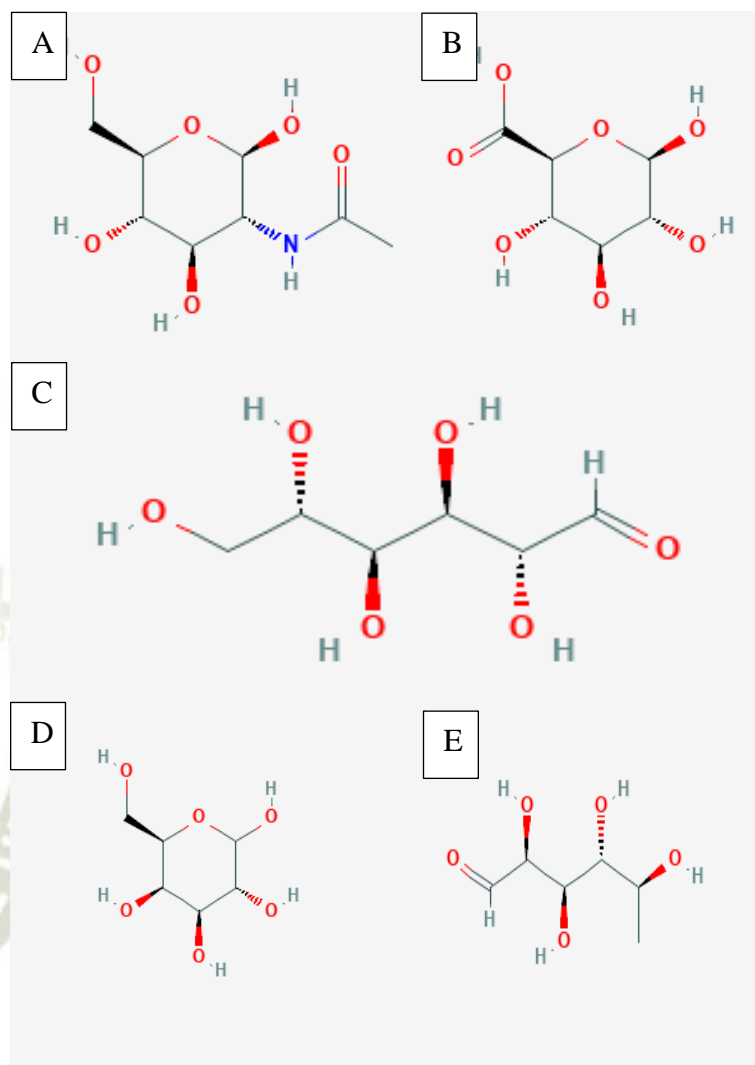


Figura. 3.7. Estructura química de A: N-acetil glusamina, B: Acido glurónico, C: Manosa, D: Galactosa, E: Fucosa generada en pubchem. Fuente (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Debido a la enorme variedad de especies de algas, muchos tipos de fracciones de polisacáridos con composiciones y propiedades aún desconocidas todavía están disponibles con un potencial no desarrollado. Estas propiedades pueden investigarse más con el apoyo del conocimiento actual en química y ciencia de materiales de los polisacáridos formadores de hidrogel de algas, se espera que esta industria en crecimiento avance más y conduzca al desarrollo de nuevas aplicaciones biomédicas. La investigación sobre nuevas especies de algas y el desarrollo de nuevos procesos de extracción podrían respaldar aún más el

crecimiento de esta industria al abrir nuevas oportunidades más allá de las bien establecidas de alginato y agarosa.

CAPÍTULO IV:

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

Se aisló y cultivo 2 especies de cianobacterias halófilas de la región Arequipa, las especies corresponden a *Euhalothece* sp y *Synechococcus* sp.

Se realizó la extracción y cuantificación de EPS de las cianobacterias *Euhalothece* sp y *Synechococcus* sp mediante el protocolo modificado de Cristiane et al ⁽¹⁴⁾.

La producción de EPS se estimó en 6.4g/L para *Euhalothece* sp y 5,2 g/L para *Synechococcus* sp. durante 15 días de cultivo.

La capacidad de absorción del EPS de *Euhalothece* sp. y *Synechococcus* sp. durante 72h fue mayor que el grupo control quitosano y urea.

4.2. Recomendaciones

- Optimizar la producción de EPS mediante variación la concentración de sal, luz, temperatura y pH.
- Caracterizar la composición de los EPS de las cianobacterias estudiadas.
- Realizar la aplicación de los EPS en la formulación de humectantes dérmicos.
- Comparar la capacidad de absorción y retención de humedad de los EPS con otros humectantes: ácido hialurónico y alginato de sodio.

4.3. Referencias bibliográficas

1. Kligman A.M. Cosmetics: a dermatologist looks to the future: promises and problems. *Derm. Clin.* 2000; 18: 699–709.
2. Harding C.R., Watkinson A., Rawlings A.V., Scott I.R. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci.* 2000; 22: 21-52.
3. Rawlings A.V., Canestrari D.A., Dobkowski B. Moisturizer technology versus clinical performance. *Dermatol Ther.* 2004; 17(1): 49–56.
4. Held E., Sveinsdóttir S., Agner T. Effect of long-term use of moisturizer on skin hydration, barrier function and susceptibility to irritants. *Acta Derm Venereol.* 1999; 79: 49–51.
5. Buraczewska I, Berne B, Lindberg M, Törmä H, Lodén M. Changes in skin barrier function following long-term treatment with moisturizers, a randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2007;156(3):492-8. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07685.x.
6. Zesch A. Skin irritation by topical drugs. *Dermatosen in Beruf und Umwelt. Occupation and Environment.* 1982; 31:74–78.
7. Lodén M, Andersson AC, Anderson C, Bergbrant IM, Frödin T, Ohman H, Sandström MH, Särnhult T, Voog E, Stenberg B, Pawlik E, Preisler-Häggqvist A, Svensson A, Lindberg M. A double-blind study comparing the effect of glycerin and urea on dry, eczematous skin in atopic patients. *Acta Derm Venereol.* 2002;82(1):45-7. doi: 10.1080/000155502753600885.
8. Andersson AC, Lindberg M, Loden M. The effect of two urea-containing creams on dry, eczematous skin in atopic patients. I. Expert, patient and instrumental evaluation. *J Dermatol Treat.* 1999;10:165-9.
9. Lessmann H, Schnuch A, Geier J, Uter W. Skin-sensitizing and irritant properties of propylene glycol. *Contact Dermatitis.* 2005 Nov;53(5):247-59. doi: 10.1111/j.0105-1873.2005.00693.x.

10. De Philippis R., Vincenzini M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microb Reviews*. 1998; 22:151–175.
11. Chakraborty T., Pal R. An overview of cyanobacterial exopolysaccharides: features, composition and effects of stress exposure. *International Journal of Life Sciences*. 2014; 8:1–9.
12. Whitton B.A. *Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*. 1st.ed. Springer, 2012.
13. Li P., Harding S.E., Liu Z. Cyanobacterial exopolysaccharides: their nature and potential biotechnological applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2011; 18: 375–404.
14. Cristiane Santos de Jesus CS, de Jesus Assis D, Rodriguez MB, Menezes Filho JA, Costa JAV, de Souza Ferreira E, Druzian JI. Pilot-scale isolation and characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from cell-free medium of *Spirulina* sp. LEB-18 cultures under outdoor conditions. *Int J Biol Macromol*. 2019 Mar 1;124:1106-1114. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.016.
15. Heidorn T, Camsund D, Huang HH, Lindberg P, Oliveira P, Stensjö K, Lindblad P. Synthetic biology in cyanobacteria engineering and analyzing novel functions. *Methods Enzymol*. 2011;497:539-79. doi: 10.1016/B978-0-12-385075-1.00024-X.
16. Durall C, Lindblad P. Mechanisms of carbon fixation and engineering for increased carbon fixation in cyanobacteria. *Algal Res*. 2015; 11:263–270, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.002>.
17. Raven JA, Giordano M, Beardall J, Maberly SC. Algal evolution in relation to atmospheric CO₂: carboxylases, carbon-concentrating mechanisms and carbon oxidation cycles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Feb 19;367(1588):493-507. doi: 10.1098/rstb.2011.0212.
18. Vats S., Kumar P., Ahuja S. CO₂ sequestration in plants: lesson from divergent strategies. *Photosynthetica*. 2011; 49(4):481–496. <https://doi.org/10.1007/s11099-011-0078-z>

19. Sciuto K, Moro I. Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group. *Biodivers. Conserv.* 2015; 24(4):711–738, <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0898-4>.
20. Cohen, Yehuda, Gurevitz, Michael. Las cianobacterias: ecología, fisiología y genética molecular. *Los procariontes*. 2006; 4:1074-1098.
21. Oren A. Cyanobacteria: biology, ecology and evolution, in: N.K. Sharma, A.K. Rai, L.J. Stal (Eds.), *Cyanobacteria*. 2014;(pp. 1–20) <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118402238.ch1/summary>.
22. Waterbury. *The Prokaryotes - Chapter 2.1. The Cyanobacteria - Isolation, Purification and Identification*, Vol. 4, Springer. 2006. <http://link.springer.com/10.1007/0-387-30744-3>.
23. Durai P, Batool M, Choi S. Structure and Effects of Cyanobacterial Lipopolysaccharides. *Mar Drugs*. 2015 Jul 7;13(7):4217-30. doi: 10.3390/md13074217.
24. Hoiczuk E, Hansel A. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J Bacteriol*. 2000 Mar;182(5):1191-9. doi: 10.1128/JB.182.5.1191-1199.2000.
25. Nicolaisen K, Mariscal V, Bredemeier R, Pernil R, Moslavac S, López-Igual R, Maldener I, Herrero A, Schleiff E, Flores E. The outer membrane of a heterocyst-forming cyanobacterium is a permeability barrier for uptake of metabolites that are exchanged between cells. *Mol Microbiol*. 2009 Oct;74(1):58-70. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06850.x.
26. Sciuto K., Moro I. Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group. *Biodivers Conserv.* 2015; 24:711–738. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0898-4>
27. Shevela R., Pishchalnikov L., Eichacker, Givindjee. *Stress Biology of Cyanobacteria - Chapter 1. Oxygenic Photosynthesis in Cyanobacteria*. 2013. URL <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/b13853-3>.
28. van Eerden FJ, de Jong DH, de Vries AH, Wassenaar TA, Marrink SJ. Characterization of thylakoid lipid membranes from cyanobacteria and higher

- plants by molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1848(6):1319-30. doi: 10.1016/j.bbamem.2015.02.025.
29. Hess W. Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Curr Opin Microbiol*. 2011;14(5):608–614. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.024>.
30. Khlystov W.Y., Chan A.M., Kunjapur W., Shi K.L.J., Prather B., Olsen D. Material properties of the cyanobacterial reserve polymer multi-l-arginyl-poly-laspartate (cyanophycin). *Polymer*. 2016; 109:238–245. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.11.058>.
31. Singh, A.K., Sharma, L., Mallick, N. et al. Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. *J Appl Phycol*. 2017; 29:1213–1232. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1006-1>
32. Sutherland I.W. Bacterial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol*. 1972; 8:143–213.
33. Sutherland I.W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Adv. Microb. Physiol*. 1982; 23:79–150.
34. Schiraldi C, Valli V, Molinaro A, Cartenì M, De Rosa M. Exopolysaccharides production in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* exploiting microfiltration. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2006 May;33(5):384-90. doi: 10.1007/s10295-005-0068-x.
35. Tomitani A, Knoll AH, Cavanaugh CM, Ohno T. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 4;103(14):5442-7. doi: 10.1073/pnas.0600999103.
36. Whitton B. A. P. Introduction to the cyanobacteria, in: *The Ecology of Cyanobacteria - Their Diversity in Time and Space*. 1st Ed. Kluwer Academic Publishers. 2002.
37. Comte K, Sabacká M, Carré-Mlouka A, Elster J, Komárek J. Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three Phormidium-like

- strains evaluated by a polyphasic approach. *FEMS Microbiol Ecol.* 2007 Feb;59(2):366-76. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00257.x.
38. Steunou D., Bhaya M.M., Bateson M.C., Melendrez D.M., Ward E., Brecht A.R., Grossman R.. In situ analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. *Proc. Natl. Acad.* 2006; 103(7):2398–2403. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507513103>.
39. Freeman R., Thacker W. Complex interactions between marine sponges and their symbiotic microbial communities. *Limnol. Oceanogr.* 2011;56(5):1577-1586, <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.5.1577>.
40. Titlyanov I.M. Yakovleva T.V., Titlyanova T. Interaction between benthic algae (*Lyngbya bouillonii*, *Dictyota dichotoma*) and scleractinian coral *Porites lutea* in direct contact. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2007; 342(2):282–291. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.11.007>.
41. Gerwick R.C., Coates N., Engene L., Gerwick R.V. Grindberg A.C., Jones C.M., Sorrel C. Giant marine cyanobacteria produce exciting potential pharmaceuticals. *Microbe.* 2008; 3(6):277–284.
42. Derikvand C.A., Llewellyn S., Purton S. Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: a comparison with current synthetic compounds. *Eur. J. Phycol.* 2016; 52(1):43–56, <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1214882>.
43. Rastogi RP, Sonani RR, Madamwar D. Cyanobacterial Sunscreen Scytonemin: Role in Photoprotection and Biomedical Research. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015 Jul;176(6):1551-63. doi: 10.1007/s12010-015-1676-1.
44. Gangl J.A., Zedler P.D., Rajakumar E.M., Martinez A., Riseley A., Włodarczyk C. y Robinson C. Biotechnological exploitation of microalgae. *J. Exp. Bot.* 2015; 66(22):6975–6990. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv426>.
45. Stengel DB, Connan S, Popper ZA. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application.

- Biotechnol Adv. 2011 Sep-Oct;29(5):483-501. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.016.
46. Sinha D.P., Häder P. UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Sci.* 2008;174(3):278–289. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.12.004>.
47. Tamaru Y, Takani Y, Yoshida T, Sakamoto T. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Nov;71(11):7327-33. doi: 10.1128/AEM.71.11.7327-7333.2005.
48. Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Curr Pharm Biotechnol.* 2005 Oct;6(5):373-9. doi: 10.2174/138920105774370607.
49. Lodén M. Interactions between the stratum corneum and topically applied products: regulatory, instrumental and formulation issues with focus on moisturizers. *Br J Dermatol.* 2014 Sep;171 Suppl 3:38-44. doi: 10.1111/bjd.13240.
50. Lodén M. Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am J Clin Dermatol.* 2003;4(11):771-88. doi: 10.2165/00128071-200304110-00005.
51. Lodén M, Buraczewska I, Edlund F. Irritation potential of bath and shower oils before and after use: a double-blind randomized study. *Br J Dermatol.* 2004 Jun;150(6):1142-7. doi: 10.1111/j.0007-0963.2004.05923.x.
52. Chen D.H., Li L.R., Song C.X., Hu G.H., Wang Y.D., Liu Y. Effects of salt stress on carbohydrate metabolism in desert soil alga *Microcoleus vaginatus* Gom. *J. Integr. Plant Biol.* 2006;48(8):914–919.
53. Okajima M.K., Bamba T., Kaneso Y., Hirata K., Fukusaki E., Kajiyama S.I., Kaneko T. Supergiant ampholytic sugar chains with imbalanced charge ratio form saline ultra-absorbent hydrogels. *Macromolecules.* 2008;41:4061–4064.

54. Okajima MK, Miyazato S, Kaneko T. Cyanobacterial megamolecule sacran efficiently forms LC gels with very heavy metal ions. *Langmuir*. 2009 Aug 4;25(15):8526-31. doi: 10.1021/la8036956.
55. Zhao L, Fan F, Wang P, Jiang X. Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Apr;97(7):2841-50. doi: 10.1007/s00253-012-4515-0.
56. Mazor G., Kidron G.J., Vonshak A., Abeliovich A. The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. *FEMS Microbiology Ecology*. 1996; 21:121-130.
57. De Philippis R., Vincenzini M. Outermost polysaccharidic investments of cyanobacteria: nature, significance and possible applications. *Recent Research Developments in Microbiology*. 2013; 7:13-22.
58. Mager D.M. *Extracellular Polysaccharides from Cyanobacterial Soil Crusts and Their Role in Dryland Surface Processes*. Manchester Metropolitan University, Manchester. 2009.
59. Brüll L.P., Huang Z., Thomas-Oates J.E., Paulsen B.S., Cohen E.H., Michaelsen T.E. Studies of polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: structural characterization and effect on the complement system of polysaccharides from *Nostoc commune*. *Journal of Phycology*. 2000; 36:871-881.
60. Huang Z., Liu Y., Paulsen B.S., Klaveness D. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc* (cyanobacteria) with different colony morphologies: comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *Journal of Phycology*. 1998; 34:962-968.
61. Nicolaus B., Panico A., Lama L., Romano I., Manca M.C., Giulio A.D., Gambacorta A. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non- heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry*. 1999; 52:639-647.

62. Mozzi F., Rollan G., Giori G.S., Valdez G.F. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91:160-167.
63. Austin A.T., Yahdjian L., Stark J.M., Belnap J., Porporato A., Norton U., Ravetta D.A., Schaeffer S.M. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*. 2004; 141:221-235
64. Becker. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, 1. google-Books-ID: KAKx4I7NWEYC. 1994
65. Saha P., Murray. Exploitation of Microalgae Species for Nutraceutical Purposes: Cultivation Aspects. *Fermentation*. 2018; 4(2):46. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020046>.
66. Richmond. Mass Culture of Cyanobacteria, in: N.H. Mann, N.G. Carr (Eds.), *Photosynthetic Prokaryotes*. Springer US. 1992. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1332-9_6.
67. Takenaka Y., Yamaguchi. Commercial-scale culturing of cyanobacteria: an industrial experience, in: N.K. Sharma, A.K. Rai, L.J. Stal (Eds.), *Cyanobacteria*. Chichester. 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch18>
68. Jacob-Lopes E., Mérida L. G. R., Queiroz M. I., Zepka L. Q.. *Microalgal Biorefineries, Biomass Production and Uses*. 2015; 5:81-106. doi:10.5772/59969.
69. Andersen (Ed.). *Algal culturing techniques*. Elsevier/Academic Press, Burlington, Mass. 2015.
70. Huisman. *Membrane Separations: Microfiltration*. I.D. Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press. 2000. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/05251-0>.
71. Raja S., Hemaiswarya I.S., Carvalho V., Ganesan. Therapeutic applications of cyanobacteria with emphasis on their economics, in: N.K. Sharma, A.K. Rai,

- L.J. Stal (Eds.), Cyanobacteria. 2013.
<https://doi.org/10.1002/9781118402238.ch6>.
72. Abed S., Dobretsov K., Sudesh. Applications of cyanobacteria in biotechnology. J. Appl. Microbiol. 2009;106(1):1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>
73. Delattre C., Pierre G., Laroche C., Michaud P.H. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. Biotechnol. 2016. Adv <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.001>
74. Johnson, Tylor J. "Mejora del potencial industrial de las cianobacterias filamentosas". Tesis electrónicas y disertaciones. 2016. <https://openprairie.sdstate.edu/etd/1019>
75. Kiyota Y., Okuda M., Ito M.Y., Hirai M., Ikeuchi. Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO₂. J. Biotechnol. 2014; 185:1–7, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.025>.
76. Gao F., Gao D., Liu H., Zhang X., Nie C., Yang C. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO₂. Energy Environ. Sci. 2016; 9(4):1400–1411, <https://doi.org/10.1039/C5EE03102H>.
77. Zhao L., Fan F., Wang P., Jiang X. Culture medium optimization of a new bacterial extracellular polysaccharide with excellent moisture retention activity. Applied microbiology and biotechnology. 2013; 97:2841–2850.
78. Imene C., Marwa H., Amel D., Abdelkadder H.S., Hatem B.O., Moncef N., Mourad J. Enhancement of extracellular polymeric substances (EPS) production in Spirulina (Arthrospira sp.) by two-step cultivation process and partial characterization of their polysaccharidic moiety. International Journal of Biological Macromolecules. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.009>
79. Trabelsi H.B., Ouada H., Bacha, Ghoul M. Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium Arthrospira platensis. J. Appl. Phycol. 2009; 21:405–412.

80. Lee M.C., Chen Y.C., Peng T.C. Two-stage culture method for optimized polysaccharide production in *Spirulina platensis*. *J. Sc. Food. Agric.* 2012; 92:1562–1569.
81. Sudo H., Burgess J.G., Takemasa H., Nakamura N., Matsunaga T. Sulfated exopolysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia*. *Curr. Microbiol.* 1995;30:219–222.
82. Hu C.Y., Liu B.S., Paulsen D., Petersen D., Klaveness. Extracellular carbohydrate polymers from five desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carbohydr. Polym.* 2003; 54:33–42.
83. Vreeland, RH & Martin, EL Características de crecimiento, efectos de la temperatura y especificidad iónica de la bacteria halotolerante *Halomonas elongata*. *Poder. J. Microbiol.* 26 , 746-752 (1980).
84. Mikkat, S., Effmert, U. & Hagemann, M. Captación y uso de los compuestos osmoprotectores trehalosa, glucosilglicerol y sacarosa por la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803. *Arco. Microbiol.* 167 , 112-118 (1997).
85. Garcia-Pichel, F., Nübel, U. & Muyzer, G. La filogenia de las cianobacterias unicelulares, extremadamente halotolerantes. *Arco. Microbiol.* 169 , 469-482 (1998).
86. Yang, HW, Song, JY, Cho, SM y *col.* Estudio genómico de genes relacionados con la aclimatación a la sal en la cianobacteria halófila *Euhalothece* sp. Z-M001. *Sci Rep* 10, 676 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57546->.
87. Pade, N. & Hagemann, M. Aclimatación de cianobacterias a la sal y su aplicación en biotecnología. *Life* 5 , 25–49 (2015).
88. Ozturk, S., Aslim, B. & Suludere, Z. Características de secuestro de cadmio (II) por dos aislamientos de *Synechocystis* sp. en términos de producción de exopolisacáridos (EPS) y composición de monómeros. *Bioresour. Technol.* 101 , 9742–9748 (2010).
89. Mikhodiuk, OS, Gerasimenko, LM & Akimov, VN Ivanovskiĭ, RN & Zavarzin, GA Ecofisiología y polimorfismo de la cianobacteria unicelular extremadamente *natronofílica* *Euhalothece* sp. Z-M001 del lago Magadi. *Mikrobiologiya* 77 , 717–725 (2008).
90. Fisher, ML, Allen, R., Luo, Y. & Curtiss, R. La exportación de polisacáridos extracelulares modula la adherencia de la cianobacteria *Synechocystis* . *PLoS One* 8 , e74514 (2013).

91. Su C., Zhenming C., Weidong L. Optimization of medium and cultivation condition for enhanced exopolysaccharide yield by marine *Cyanothece sp.* 113, Chin. J. Oceanol. Limnol. 2007; 25:411–417.
92. Ozturk S., Aslim, B. Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. Environ. Sci. Pollut. Res. 2010; 17:595–602.
93. Kumar A.S., Mody K., Jha B. Bacterial exopolysaccharides – a perception. J. Basic Microbiol. 2007; 47:103–117.
94. De Philippis R., Sili C., Tassinato G., Vincenzini M., Materassi R. (1991). Effects of growth conditions on exopolysaccharide production by *Cyanospira capsulata*. Biores. Technol. 1991; 38:101-104.
95. Campbell S., Golubic S.T. Benthic cyanophytes (cyanobacteria) of Solar Lake (Sinai). Arch. Hydrobiol. 1985; 38(39):311-329.
96. Aller J.C. Biosaline research in the United States and Canada. In San Pietro A (ed.), Biosaline Research, a Look to the Future. Plenum Press, 1982; 9-18.
97. Chen L.Y., Du Y.M., Wu H.Q., Xiao L. Relationship Between Molecular Structure and Moisture-Retention Ability of Carboxymethyl Chitin and Chitosan. J. Appl. Polym. Sci. 2002; 83: 1233–1241.
98. Wang L, Jayawardena T, Yang H-W, Lee H-G, Jeon Y-J. The Potential of Sulfated Polysaccharides Isolated from the Brown Seaweed *Ecklonia maxima* in Cosmetics: Antioxidant, Anti-melanogenesis, and Photoprotective Activities. Antioxidants. 2020, 9: 724.
99. Becker A., Katzen F., Pühler A., Ielpi L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. Applied microbiology and biotechnology. 1998; 50:145–152.
100. Bernal P, Llamas M.A. Promising biotechnological applications of antibiofilm exopolysaccharides. Microb. Biotechnol. 2012, 5:670–673.
101. Ciferri O. Spirulina, the edible microorganism (algae, single-cell protein) Microbiol. Rev. 1983, 47:551–578.
102. Marceliano M.B. Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. In: Embuscado M.E., Huber K.C., editors. Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer; London, UK: 2009.

103. Franco J.M., Raymundo A., Sousa I., Gallegos C. Influence of Processing Variables on the Rheological and Textural Properties of Lupin Protein-Stabilized Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46:3109–3115.
104. Raymundo A., Franco J., Gallegos C., Empis J., Sousa I. Effect of thermal denaturation of lupin protein on its emulsifying properties. *Nahrung.* 1998, 42:220–224.
105. Raymundo A., Gouveia L., Batista A.P., Empis J., Sousa I. Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. *Food Res. Int.* 2005, 38:961–965.
106. Ribeiro R.A., Vale M.L., Thomazzi S.M., Paschoalato A.B., Poole S., Ferreira S.H., Cunha F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 387:111–118.
107. Arad S.M., Atar D. Viscosupplementation with Algal Polysaccharides in the Treatment of Arthritis. WO/2007/066340. Patent. 2007.
108. Fundueanu G., Esposito E., Mihai D., Carpov A., Desbrieres J., Rinaudo M., Nastruzzi C. Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification. *Int. J. Pharm.* 1998, 170:
109. Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2012, 7:106–126.
110. Draget K.I., Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloid.* 2011, 25:251–256.
111. Kong H., Mooney D. Polysaccharide- based hydrogels in tissue engineering. In: Dumitriu S., editor. *Polysaccharides. Structural Diversity and Functional Versatility.* 2nd ed. Marcel Dekker; New York, NY, USA: 2005. pp. 817–837.
112. Banerjee A., Arha M., Choudhary S., Ashton R.S., Bhatia S.R., Schaffer D.V., Kane R.S. The Influence of Hydrogel Modulus on the Proliferation and Differentiation of Encapsulated Neural Stem Cells. *Biomaterials.* 2009, 30:4695–4699.
113. Jeong S.I., Jeon O., Krebs M.D., Hill M.C., Alsberg E. Biodegradable photo-crosslinked alginate nanofibre scaffolds with tuneable physical

- properties, cell adhesivity and growth factor release. *Eur. Cells Mater.* 2012, 24:331–343.
114. Zhou H., Xu H.H.K. The fast release of stem cells from alginate-fibrin microbeads in injectable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2011, 32:7503–7513.
115. Liu J., Xu H.H.K., Zhou H., Weir M.D., Chen Q., Trotman C.A. Human umbilical cord stem cell encapsulation in novel macroporous and injectable fibrin for muscle tissue engineering. *Acta Biomater.* 2013, 9:4688–4697.
116. Khanarian N.T., Jiang J., Wan L.Q., Mow V.C., Lu H.H. A hydrogel-mineral composite scaffold for osteochondral interface tissue engineering. *Tissue Eng. Part A.* 2012, 18:533–545.
117. Hatch A., Hansmann G., Murthy S.K. Engineered alginate hydrogels for effective microfluidic capture and release of endothelial progenitor cells from whole blood. *Langmuir.* 2011, 27:4257–4264.
118. Yamamoto M., James D., Li H., Butler J., Rafii S., Rabbany S. Generation of stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold. *Tissue Eng. Part A.* 2010, 16:299–308
119. Hajjali H., Shahgasempour S., Naimi-Jamal M.R., Petrovi H. Electrospun PGA/gelatin nanofibrous scaffolds and their potential application in vascular tissue engineering. *Int. J. Nanomed.* 2011, 6:2133–2141.
120. Hockaday L.A., Kang K.H., Colangelo N.W., Cheung P.Y., Duan B., Malone E., Wu J., Girardi L.N., Bonassar L.J., Lipson H., et al. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication.* 2012, 4.
121. Gong Y., He L., Li J., Zhou Q., Ma Z., Gao C., Shen J. Hydrogel-filled polylactide porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2007, 82:192–204.
122. Bao L., Yang W., Mao X., Mou S., Tang S. Agar/collagen membrane as skin dressing for wounds. *Biomed. Mater.* 2008, 3:1–7.
123. Nakayama Y., Tsujinaka T. Acceleration of robust “biotube” vascular graft fabrication by in-body tissue architecture technology using a novel eosin Y-releasing mold. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2014, 102:231–238.

124. Kim J. H.; Lee J. E.; Kim K. H.; Kang N. J. Beneficial Effects of Marine Algae-Derived Carbohydrates for Skin Health. *Mar. Drugs* 2018, 16 (11), 1–20.
125. Gruber JV. Polysaccharide-based polymers in cosmetics. In: Goddard ED, Gruber JV (eds) *Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care*. Marcel Dekker 1999, 339–403
126. Stelzer GI, Klug ED (1980) Chapter 4, Carboxymethylcellulose. In: Davidson RL (ed) *Handbook of water-soluble gums and resins*. McGraw-Hill 1980, 1–28.
127. Sun M.L., Zhao F., Shi M., Zhang X.Y., Zhou B.C., Zhang Y.Z., Chen X.L. Characterization and biotechnological potential analysis of a new exopolysaccharide from the arctic marine bacterium *Polaribacter* sp. SM1127. *Sci. Rep.* 2015; 5:18-35.
128. Melrose J. Glycosaminoglycans in Wound Healing. *Bone Tissue Regen. Insights.* 2016; 7: BTRI.S38670.

4.4 Anexos

Anexo 1. Certificados de identificación de especies



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE BIOLOGIA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)

CONSTANCIA N°021 -2021-HUSA

El director del *Herbarium Areqvipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra del espécimen presentado por Gabriela Milagros Guzmán Ortiz, Bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, para la ejecución de su tesis: “**Caracterización y potencial biotecnológico de exopolisacáridos (EPS) de cianobacterias extremófilas, para su uso como humectantes dérmicos.**”. La muestra fue recibida en el Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el *Herbarium Areqvipense*(HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

Imperio: *Prokaryota*
Reino: *Eubacteria*
Subreino: *Negibacteria*
Phylum: *Cyanobacteria*
Clase: *Cyanophyceae*
Subclase: *Oscillatoriophyycidae*
Orden: *Chroococcales*
Familia: *Aphanothecaceae*
Género: *Euhalothece*
Especie: *Euhalothece* sp. (*García-Pichel, 2000,*

Se expide la presente solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.


Mg. Leoncio Marino Herrera
DIRECTOR
Herbarium Areqvipense (HUSA)



Arequipa 3 de mayo del 2021.

Avenida Daniel Alcides Carrion s/n cercado.
Teléfono: (054) 237755
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA — PERU



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADEMICO DE BIOLOGIA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)

CONSTANCIA N°022 -2021-HUSA

El director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra del espécimen presentado por Gabriela Milagros Guzmán Ortiz, Bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, para la ejecución de su tesis: “**Caracterización y potencial biotecnológico de exopolisacáridos (EPS) de cianobacterias extremófilas, para su uso como humectantes dérmicos.**”. La muestra fue recibida en el Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el *Herbarium Arequipense*(HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

Imperio: *Prokaryota*

Reino: Eubacteria

Subreino: Negibacterias

Filo: Cianobacterias

Clase: Cyanophyceae

Subclase: Synechococcophycidae

Orden: Synechococcales

Familia: Synechococcaceae

Género: *Synechococcus*

Especie: *Synechococcus* sp. (C.Nägeli, 1849)

Se expide la presente solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.


Mg. Leoncio Marino Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Arequipa 3 de mayo del 2021.

Avenida Daniel Alcides Carrion s/n cercado.
Teléfono: (054) 237755
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA — PERU



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
AGUSTÍN FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO ACADEMICO DE
BIOLOGIA HERBARIUM AREQVIPENSE
(HUSA)



CONSTANCIA N°051-2021-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

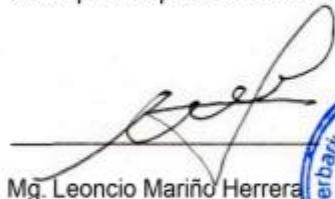
HACE CONSTAR:

Que las muestras de las cianobacterias *Euhalothece* sp. y *Synechococcus* sp. presentado por Gabriela Milagros Guzmán Ortiz, Bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, fue recibida en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) para verificación de su ubicación taxonómica.

Para la determinación del género de las cianobacterias, además de un análisis morfológico, se realizó un análisis de hábitad, distribución, características de su cultivo, tipo de crecimiento y capacidad poliextremofila (halófila, osmófila y termófila).

Las cianobacterias del género *Euhalothece* y *Synechococcus* tienen características únicas tanto en su morfología hábitad y su carácter extremófilo, ya que estas solo crecen en lagos con alta concentración de sal (halófilos), alta concentración de sulfatos, carbonatos y sales de calcio (osmófilos) como son las Lagunas de San Camilo en Arequipa. En base a estos análisis y ensayos se determinó que estas características son únicas de los géneros *Euhalothece* y *Synechococcus*. Por lo tanto, se ratifica que estas cianobacterias corresponden a ***Euhalothece* sp. y *Synechococcus* sp.**

Se expide la presente CONSTANCIA para los fines que se estimen convenientes.



Mg. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense
(HUSA)



Arequipa 14 de septiembre del 2021.

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado.
Teléfono: (054) 237755
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA — PERU

Anexo 2. Registro de datos

Capacidad de absorción de humedad frente al tiempo de los EPS (EPS1 y EPS2) en cámara saturada de K₂CO₃ (43% HR)

ABSORCION DE HUMEDAD (%)	TIEMPO DE EVALUACION (HORAS)											
	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S
	6.0 ±1.2 0	9.0 ±1.5 0	13.0 ±1.3 2	17.0 ±2.3 0	19.0 ±4.2 0	21.0 ±2.6 0	22.0 ±1.5 0	22.2 ±4.3 0	22.6 ±3.5 0	22.7 ±2.8 0	22.8 ±5.3 0	22.8 ±2.8 0
	4.0 ±1.3 0	7.0 ±1.2 8	9.0 ±2.7 0	11.0 ±3.3 3	13.0 ±4.2 0	15.0 ±2.4 0	16.6 ±1.3 0	17.5 ±1.2 0	18.0 ±3.4 2	18.2 ±2.3 2	18.1 ±4.5 3	18.1 ±3.1 0
	3.0 ±1.3 2	6.0 ±2.1 0	7.4 ±2.2 1	8.6 ±1.3 4	10.2 ±3.4 2	12.8 ±4.2 0	13.0 ±2.1 0	14.0 ±2.3 0	14.2 ±1.4 0	14.4 ±3.2 4	14.0 ±4.6 0	14.0 ±1.2 4
	2.5 ±1.2 0	4.0 ±1.3 0	6.4 ±2.1 0	7.6 ±2.4 2	8.2 ±1.2 0	9.6 ±2.2 2	11.2 ±4.5 2	11.6 ±3.2 2	11.9 ±1.6 0	12.8 ±2.4 0	12.8 ±2.2 5	12.7 ±2.2 4

Capacidad de absorción de humedad frente al tiempo de los EPS (EPS1 y EPS2) en cámara saturada de (NH₄)₂SO₄ (81% RH)

		TIEMPO DE EVALUACION (HORAS)										
		6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66
ABSORCION DE HUMEDAD (%)	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S
	6.0 ±1.30	20.0 ±2.25	33.0 ±1.43	37.8 ±2.45	49.0 ±2.23	61.0 ±1.2	73.6 ±2.35	78.8 ±2.35	78.4 ±5.40	79.6 ±4.20	79.5 ±4.02	79.6 ±5.30
	5.8 ±2.70	8.6 ±3.45	13.6 ±2.70	18.5 ±4.10	25.5 ±1.80	35.4 ±2.80	47.6 ±2.32	58.2 ±3.30	64.2 ±2.22	69.2 ±1.90	69.2 ±3.72	69.2 ±3.72
	3.4 ±3.60	7.4 ±5.40	8.4 ±4.60	14.2 ±3.20	21.2 ±5.42	28.0 ±4.2	34.0 ±3.20	34.2 ±2.10	35.6 ±3.40	35.0 ±5.23	35.0 ±4.10	35.2 ±3.70
	2.8 ±1.22	6.5 ±2.34	7.9 ±2.60	12.8 ±2.45	18.2 ±2.80	23.6 ±2.40	26.2 ±3.45	28.6 ±4.60	32.8 ±3.90	32.4 ±2.90	32.2 ±3.42	32.0 ±3.10

Capacidad de retención de humedad en una cámara saturada de Na₂CO₃ (43% de HR).

		TIEMPO DE EVALUACION (HORAS)											
		2	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66
RETENCION DE HUMEDAD (%)	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S	X ± S
	100	95 ±20.40	92.0 ±3.20	90.0 ±2.42	88.0 ±2.24	84.4 ±3.24	80.6 ±3.90	79.8 ±2.45	79.4 ±4.25	79.2 ±3.48	79.3 ±4.25	79.2 ±3.60	79.2 ±2.48
	100	92.0 ±2.25	85 ±3.40	83.4 ±3.70	80.5 ±2.40	78.4 ±2.20	75.0 ±3.70	74.6 ±2.40	72.4 ±4.24	71.3 ±3.20	71.5 ±2.40	71.6 ±4.20	71.5 ±4.50
	100	86.0 ±2.40	82.0 ±2.40	75.0 ±2.60	70.0 ±3.60	68.0 ±3.20	66.2 ±4.20	65.2 ±2.60	64.0 ±4.26	63.2 ±3.30	63.0 ±4.70	63.5 ±5.60	62.4 ±2.40
	100	77.7 ±2.40	73.3 ±3.2	66.9 ±2.20	56.0 ±3.40	52.0 ±3.70	49.2 ±3.20	48.4 ±2.45	48.6 ±2.80	46.2 ±2.44	45.3 ±3.20	45.5 ±2.50	45.0 ±3.40