

Tesis defendida por

Diego Isaac Leyva García

Y aprobada por el siguiente comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director del Comité

Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Miembro del Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Miembro del Comité

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Miembro del Comité

Dr. Fernando Díaz Herrera
Coordinador del Programa de
Posgrado en Ciencias de la Vida

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

29 de Noviembre de 2013

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA**



Programa de posgrado en ciencias de la vida

con orientación en microbiología

Evaluación del contenido de fenoles totales, lípidos y ensayos de evaluación de la actividad antioxidante en la microalga *Phaeodactylum tricornutum* mantenida en distintas condiciones de cultivo

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Vida

Presenta:

Diego Isaac Leyva García

Ensenada, Baja California, México

2013

Resumen de la tesis de Diego Isaac Leyva García presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Evaluación del contenido de fenoles totales, lípidos y ensayos de evaluación de la actividad antioxidante en la microalga *Phaeodactylum tricorutum* mantenida en distintas condiciones de cultivo

Resumen aprobado por

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Directora de la Tesis

En las últimas décadas se han utilizado los cultivos de microalgas como una fuente alterna en la nutrición, la biomedicina y la industria energética por su potencial valor económico. Este creciente interés en las microalgas es debido a que producen diversos metabolitos primarios y secundarios durante su ciclo de vida, entre ellos destacan los lípidos (de 20 a 80% de su peso) y antioxidantes. *Phaeodactylum tricorutum* es una diatomea de la cual se han hecho una gran variedad de investigaciones, sin embargo, el estudio como una potencial fuente de antioxidantes y lípidos es algo que aún se encuentra en desarrollo. En este trabajo se evaluó, en cultivos de *Phaeodactylum tricorutum*, el efecto de la temperatura, la irradiancia y la concentración de nitratos con respecto a la producción de biomasa seca, la actividad antioxidante, el contenido de lípidos y de fenoles totales.

Se mantuvieron cultivos no axénicos en sistemas estáticos en dos condiciones de irradiancia (50 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en tres temperaturas (20, 25 y 30 °C) y en medio de cultivo "f". Se encontró que para *Phaeodactylum tricorutum* la tasa de crecimiento, el peso seco y los lípidos se vieron modificados por efecto de la temperatura. En los cultivos mantenidos a 20 °C se obtuvieron los mayores valores de crecimiento, peso seco y contenido de lípidos para *Phaeodactylum tricorutum*.

Con base en los resultados obtenidos, se utilizó la temperatura de 20 °C para evaluar los parámetros fisicoquímicos, antes mencionados, modificando el efecto de la concentración de nitratos en el medio de cultivo "f". Las concentraciones de nitratos utilizadas fueron 37.5, 75.0 y 150.0 g L⁻¹. La tasa de crecimiento de *Phaeodactylum tricorutum* se modificó por efecto de la irradiancia (siendo mayor a 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pero no por efecto de la concentración de nitratos en el medio. El peso seco total y el peso de las cenizas no cambiaron por efecto de la irradiancia, ni por efecto de la concentración de nitratos. Sin embargo, el peso seco orgánico fue mayor a 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 75 g L⁻¹ de nitratos, y corresponden a las condiciones estándar de mantenimiento a las cuales se cultiva a *Phaeodactylum tricorutum*. La irradiancia y la concentración de nitratos causaron diferencias significativas en el contenido de lípidos, obteniendo los mayores valores en los cultivos mantenidos a la irradiancia más baja. El contenido de fenoles totales no presentó diferencias significativas por efecto de la irradiancia, pero sí por efecto de la concentración de nitratos. La mayor producción de fenoles en *Phaeodactylum tricorutum* correspondió a la menor concentración de nitratos (37.5 g L⁻¹) y con la menor irradiancia (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizada en los cultivos mantenidos a 20 °C.

La actividad antioxidante no pudo ser evaluada debido a interferencias entre los radicales libres (ABTS: ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico y DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y el sílice aportado a las frústulas de las diatomeas por el medio de cultivo "f".

Palabras clave: *Phaeodactylum tricorutum*, condiciones de cultivo, antioxidantes, lípidos.

Abstract of the thesis presented by Diego Isaac Leyva García as a partial requirement to obtain the Master of Science degree of Life Sciences with an orientation in Microbiology

Evaluation of the total phenols content, lipids and antioxidant activity assays in the microalgae *Phaeodactylum tricornerutum* maintained under different culture conditions

Abstract approved by:

Dr. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Thesis Director

In the last decades have used cultures of microalgae as an alternative source in areas such as nutrition, biomedicine and the energetic industry for their potential economic and nutritional value. Such growing interest in microalgae is due to the production of primary and secondary metabolites that these microorganisms produce during their life cycle, among them the lipids (20 to 80% by weight) and antioxidants. *Phaeodactylum tricornerutum* is a diatom which has been a variety of research, however, the study of this diatom as a potential source of lipids and antioxidants is something that is still in development. In this study we evaluated the effect of the temperature, the irradiance and the nitrate concentration regarding the production of the dry biomass, the antioxidant activity, the lipid content and the total phenolic content.

We maintained non-axenic cultures at two irradiance conditions (50 and 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), three temperatures (20, 25 and 30 °C) in the culture media "f". It was found that *Phaeodactylum tricornerutum* growth rate, dry weight and lipids were modified by the effect of temperature. Cultures maintained at 20 °C yielded the highest values of growth, dry weight and lipid content for *Phaeodactylum tricornerutum*. Based on the results obtained, we used a temperature of 20 °C to evaluate the effect of the nitrate concentration in the culture media "f". The nitrate concentrations used were 37.5, 75.0 and 150.0 g L^{-1} . The growth rate of *Phaeodactylum tricornerutum* was modified due to the irradiance (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), but not for effect of the nitrates concentration. Total dry weight and ashes weight did not changed due to the irradiance, nor due to effect of the nitrates concentration. However, the organic weight was highest at 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 75 g L^{-1} of nitrates, corresponding to the standard conditions in which *Phaeodactylum tricornerutum* is grown. Irradiance and nitrate concentration caused significant differences in the lipid content, obtaining the highest values in cultures maintained at low irradiance. The total phenolic content did not present significant differences due to the irradiance, but it has by effect of the nitrates concentration. Increased production of phenols in *Phaeodactylum tricornerutum* corresponded to the lowest nitrates concentration (37.5 g L^{-1}) and the lower irradiance (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) used in cultures maintained at 20 °C. Antioxidant activity could not be evaluated due to interferences between free radicals (ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) and silica supplied to the diatom frustules by the growing medium "f".

Keywords: *Phaeodactylum tricornerutum*, culture conditions, antioxidants, lipid.

DEDICATORIA

A mis padres por el enorme esfuerzo que han logrado reunir a lo largo de todo el tiempo que hemos pasado juntos, por ayudar a convertirme en el hombre que siempre he querido ser y por la gran paciencia que han tenido con todos y cada uno de nosotros.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y en particular al Departamentos de Microbiología por haberme aceptado en su programa y haberme brindado el apoyo necesario para la realización de mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante estos dos años de estudios.

Al apoyo económico para la realización de esta tesis a través del proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT proyecto 623108 y 130074).

A la Dirección de Estudios de Posgrado del CICESE y al Departamento de Microbiología, por otorgarme un mes de beca para la terminación de la tesis de maestría.

A la Dra. Pilar Sánchez Saavedra, por el arduo trabajo y el tiempo invertido en mi proyecto de tesis y por brindarme la oportunidad de trabajar junto a ella y sobre todas las cosas su valiosa amistad.

A los miembros de mi comité de tesis, la Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes, Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez, Dra. Ernestina Castro Longoria por su apoyo y dedicación en el transcurso del desarrollo y elaboración de mi tesis.

A los integrantes del equipo de trabajo del laboratorio 206, Estrella Zarco, Socorro Jiménez, Ceres Molina, Diana Cuesta, Anely Fernández, por su valiosa asesoría y toda la paciencia brindada a lo largo de este año.

Al Departamento de Microbiología y de Biotecnología Marina por facilitarme el uso de equipos de laboratorio e infraestructura y por asesorarme en el buen manejo de estos.

Al personal administrativo de CICESE Cecilia Loera, Bibiana Medina, Melisa Corrales, Ivonne Best, Citlali Romero, Dolores Sarracino, Norma Fuentes y en especial a Adriana Mejia por siempre recibirme con una sonrisa y un trato personalizado en cada ocasión.

A mis compañeros y amigos de CICESE Cecilia, Sergio, Karina, Paola, Lluvia, Alejandro, Oscar, Gerardo, Daniela, Marión, Marisol, Christian, Roberto, Martín, Candelario, Rachel, Sara, Ana Paola, Vivi, Constanza e Itzel, por todo el apoyo y cariño que me han hecho llegar a lo largo de estos dos años, de verdad que ha sido una excelente generación tanto académicamente como en lo que se refiere a calidad de personas.

Un agradecimiento sumamente especial a Cecilia Rangel Martínez por la enorme paciencia que me ha tenido a lo largo de poco más de dos años, por siempre tener las palabras perfectas para motivarme y hacerme sonreír, por jamás dejarme solo cuando más la necesite en mis momentos de debilidad y amargura, por ser una mujer increíble que me ha dado la oportunidad de entrar en su vida y permanecer en ella como alguien muy especial...“Wings”.

CONTENIDO

Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	4
1.1.1. Microalgas.....	4
1.2. Compuestos fenólicos.....	5
1.3. Estrés oxidativo.....	7
1.4. Producción de microalgas como potencial materia prima en la producción de lípidos.....	7
1.5. Justificación.....	9
Capítulo 2. Hipótesis.....	10
Capítulo 3. Objetivos.....	11
3.1. Objetivo general.....	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
Capítulo 4. Materiales y métodos.....	12
4.1. Mantenimiento rutinario de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	12
4.2. Curva de calibración para cuantificación de biomasa celular.....	12
4.3. Efecto de la temperatura y la irradiancia.....	13
4.3.1. Curvas de crecimiento.....	13
4.3.2. Parámetros de crecimiento.....	14
4.3.3. Peso seco, contenido de cenizas y peso seco orgánico.....	14
4.3.4. Lípidos.....	15
4.4. Efecto de la concentración de nitratos y de la irradiancia.....	15

Contenido

4.4.1. Biomasa de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> para la obtención de extractos.	16
4.4.2. Extracción de componentes antioxidantes con solventes orgánicos.....	16
4.5. Fenoles totales.....	16
4.6. Evaluación de actividad antioxidante por el método de TEAC (por sus siglas en inglés Trolox Equivalent Antioxidant Activity).....	17
4.7. Evaluación de actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	17
4.8. Análisis estadístico de los datos.....	20
Capítulo 5. Resultados	21
5.1. Curva de calibración para cuantificación de biomasa celular.....	21
5.2. Efecto de la temperatura y de la irradiancia.....	21
5.2.1. Crecimiento.....	21
5.2.2. Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico.....	23
5.2.3. Lípidos.....	24
5.3. Efecto de la concentración de nitratos y de la irradiancia.....	25
5.3.1. Crecimiento.....	25
5.3.2. Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico.....	28
5.3.3. Lípidos.....	29
5.4. Fenoles totales.....	30
5.5. Evaluación de la actividad antioxidante por el método TEAC (por sus siglas en inglés Trolox Equivalent Antioxidant Activity).....	31
5.6. Evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazilo).....	31
Capítulo 6. Discusión	35
6.1. Efecto de la temperatura y de la irradiancia.....	35
6.1.1. Crecimiento.....	35
6.1.2. Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico.....	36
6.1.3. Lípidos.....	37
6.2. Efecto de la concentración de nitratos y de la irradiancia.....	37
6.2.1. Crecimiento.....	37

Contenido

6.2.2. Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico.....	38
6.2.3. Lípidos.....	38
6.3. Fenoles totales.....	39
6.4. Evaluación de actividad antioxidante por el método TEAC (por sus siglas en inglés Trolox Equivalent Antioxidant Activity).....	40
6.5. Evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazilo).....	40
Conclusiones	42
Recomendaciones	43
Referencias bibliográficas	44
Anexos	

Figura	Lista de Figuras	Página
1	Mecanismo de neutralización de radicales libres por transferencia de hidrógeno (HAT). Tomado de Zapata (2012).	2
2	Imagen de microscopía electrónica de barrido de los morfotipos fusiforme (A), tri-radial (B) y ovoide de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (Francius <i>et al.</i> , 2008).	6
3	Diagrama general del estrés oxidativo. Tomado de Bourassa (2006).	8
4	Estructura de la molécula de ABTS y del radical catiónico ABTS. Tomado de Liangli (2008).	18
5	(A) Reacción del DPPH con el método del 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (B) Esquema de reacción entre 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y Trolox. Tomado de Santacruz (2011).	19
6	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células para <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos en distintas temperaturas en cultivos (20 °C (●), 25 °C (o) y 30 °C (▼)) y con dos irradiancias (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a) y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b)).	22
7	Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células para <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos en distintas concentraciones de nitratos en cultivos (37.5 g L ⁻¹ (●), 75 g L ⁻¹ (o) y 150 g L ⁻¹ (▼)) y con dos irradiancias (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (a) y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b)).	27
8	Resultado de absorbancias para los distintos extractos etanólicos en la reacción con radical DPPH. Tratamiento control de DPPH + dilución de etanol (◆). Muestras de los tratamientos a irradiancias de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y concentraciones de nitratos de 37.5 (●), 75 (o) y 150 g L ⁻¹ (▼), tratamientos a irradiancia de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y concentraciones de nitratos de 37.5 (□), 75 (■) y 150 g L ⁻¹ (Δ).	32

9	Resultados de coloración del radical DPPH + extractos etanólicos de <i>Phaeodactylum tircornutum</i> . Muestra seleccionada al azar de pruebas de la reacción de DPPH + extractos etanólicos (tubo izquierdo) y el tratamiento control de reactivo (DPPH+ solución etanólica) (tubo derecho).	33
10	Evaluación de actividad antioxidante por el método de DPPH. (A) Coloraciones esperadas en un análisis de DPPH usando ácido gálico como control positivo de la reacción a concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (B) Prueba de actividad antioxidante utilizando los nutrientes del medio “f” con el radical DPPH. Cada nutriente (o agua en caso del blanco) se agregó a un volumen de 50 μL según lo indicado en el método de DPPH. La mezcla de nutrientes de medio “f” (últimos tres tubos a la derecha) se preparó según lo establecido por Guillard y Ryther (1962).	34
A1	Curva de calibración con los valores de absorbancia y densidad celular para cultivos de <i>Phaeodactylum tircornutum</i> .	51

Tabla	Lista de tablas	Página
1	Condiciones experimentales utilizadas para los cultivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos en sistemas estáticos con dos irradiancias y tres temperaturas y medio de cultivo “f” de Guillard y Ryther (1962).	13
2	Condiciones experimentales utilizadas para los cultivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos en sistemas estáticos con dos irradiancias y tres distintas concentraciones de nitratos.	15
3	Valores promedio (n=3) y desviación estándar de la tasa de crecimiento exponencial (μ en divisiones por día), el tiempo de generación (Tg en días), días en la fase exponencial (FE en días) y densidad celular máxima en la fase exponencial (DCM en cél. mL ⁻¹ x 10 ⁶) para <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenido en distintas condiciones de temperatura e irradiancia.	23
4	Valores promedio (n=3) y desviación estándar de peso seco total (PST), peso de cenizas (PC) y peso seco orgánico (PSO) nomalizado por mL de cultivo para <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenido en distintas condiciones de temperatura e irradiancia.	24
5	Valores promedio (n=2) y desviación estándar del porcentaje de lípidos para <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenido en distintas condiciones de temperatura e irradiancia.	25
6	Valores promedio (n=3) y desviación estándar de la tasa de crecimiento exponencial (μ en divisiones por día), el tiempo de generación (Tg en días), días en la fase exponencial (FE en días) y densidad celular máxima en la fase exponencial (DCM en cél. mL ⁻¹ x 10 ⁶) para <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenido en distintas condiciones de concentración de nitratos (CN: g L ⁻¹) y de irradiancia.	28

7	Valores promedio (n=3) y desviación estándar de peso seco total (PST), peso de cenizas (PC) y peso seco orgánico (PSO) normalizado por mL de cultivo para <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenido en distintas condiciones de concentración de nitratos (CN: g L ⁻¹) y de irradiancia.	29
8	Valores promedio (n=2) y desviación estándar del porcentaje de lípidos para <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenido en distintas condiciones de concentración de nitratos (CN: g L ⁻¹) y de irradiancia.	30
9	Valores promedio (n=3) y desviación estándar del contenido de fenoles totales (μgEAG g ⁻¹) para <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenido en distintas condiciones de concentración de nitratos (CN: g L ⁻¹) y de irradiancia.	31
A1	Valores promedios de la absorbancia (680 nm) y de densidad celular tomados en consideración para calcular una curva de calibración para cultivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .	51
A2	Valores promedio y desviación estándar del número de células (x10 ⁶) por día obtenidas en cultivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos en distintas condiciones de cultivo.	52

Capítulo 1

Introducción

Las microalgas ocupan la base de la cadena alimentaria de los ecosistemas acuáticos; estos microorganismos son capaces de convertir H₂O y CO₂ (con ayuda de la luz solar) en compuestos orgánicos complejos, los cuales pueden ser mantenidos dentro de la célula o pueden liberarse fuera de ella. La distribución de las microalgas puede extenderse a un gran número de ambientes debido a que están adaptadas a sobrevivir a un amplio espectro de condiciones ambientales de estrés, incluyendo climas cálidos y fríos, climas secos, ambientes anaeróbicos, de foto-oxidación, en diferencia de salinidad, en climas con estrés de presión osmótica y exposiciones prolongadas a rayos ultravioleta (UV) (Andersen, 2005; Guedes *et al.*, 2011).

Las microalgas poseen características que las convierten en un modelo útil para la biotecnológica, *e.g.* rápidas tasas de crecimiento y habilidad de acumular o segregarse metabolitos primarios y secundarios. Además, las microalgas poseen características fisiológicas intrínsecas como fotosíntesis oxigénica eficiente y requerimientos nutricionales simples, las cuales son típicas de las plantas superiores, ventajas que han despertado el interés en la selección de estos organismos para su uso en procesos de aplicación en diversas áreas y representan el fundamento básico para su utilización en la biotecnología de microalgas (Guedes *et al.*, 2011).

El gran número de especies de microalgas constituye un reservorio único de biodiversidad. Esta gran biodiversidad se ve reflejada también en distintos mecanismos fisiológicos que pueden ser utilizados para la producción de compuestos útiles para una explotación comercial de nuevos productos como son: vitaminas, pigmentos y ácidos grasos poliinsaturados, entre otros. El factor clave de la factibilidad económica de esta aplicación radica en la posibilidad de operación de un gran número de fotobioreactores, capaces de producir gran cantidad de biomasa y metabolitos en cantidades suficientes que permitan la rentabilidad de la producción (Guedes *et al.*, 2011).

Las microalgas además de ser usadas como alimento para organismos acuáticos y terrestres, su valor biotecnológico incluye también su uso como colorantes de alimentos, como suplementos de proteínas y ácidos grasos poliinsaturados de alta calidad en dietas para humanos, entre otras aplicaciones. Además, se utilizan los cultivos de microalgas para obtener compuestos para aplicaciones en farmacéutica y biomedicina utilizando los metabolitos primarios y secundarios (Li *et al.*, 2007).

Los tejidos vegetales, particularmente las microalgas, son fuentes abundantes de antioxidantes. Durante el proceso de fotosíntesis la producción de oxígeno molecular generado puede llegar a alcanzar niveles muy concentrados en las células. Dado que el oxígeno puede transformarse fácilmente en especies reactivas y tóxicas por acción del calor o de la radiación ultravioleta proveniente de la luz solar las plantas superiores y las microalgas han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante (Figura 1) basados en la generación de compuestos capaces de minimizar la concentración de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Rodríguez-García y Guil-Guerrero, 2008).

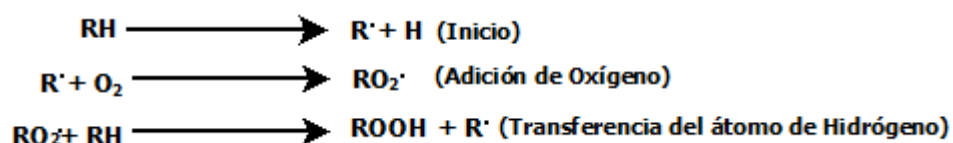


Figura 1. Mecanismo de neutralización de radicales libres por transferencia de hidrógeno (HAT). Tomado de Zapata (2012).

Los antioxidantes retrasan el inicio de la oxidación o disminuyen la velocidad en la que procede. Estas sustancias pueden producirse como constituyentes naturales de los alimentos, pero también pueden ser adicionados intencionalmente a los productos o formarse durante el procesamiento. Para su uso en alimentos procesados los antioxidantes deben ser económicos, no tóxicos, efectivos a bajas concentraciones, estables y capaces de mantenerse en el procesamiento. La elección de cual antioxidante se debe emplear depende de la compatibilidad del producto y las regulaciones de salud (Akoh y Min, 2002).

Se ha comprobado que los compuestos con propiedades antioxidantes desarrollan un rol favorable en la salud humana, llevando el papel de los antioxidantes más allá de su simple uso para preservación de productos alimenticios. A lo largo de la última década se ha comprobado el efecto positivo de ciertos antioxidantes en la incidencia de ciertas afecciones cardiacas, otros estudios han demostrado la prevención y control del crecimiento de ciertos tumores, además se ha comprobado también en ciertos tejidos celulares que los antioxidantes son capaces de retrasar el envejecimiento celular (Guedes *et al.*, 2011).

Las microalgas son una fuente alterna prometedora para la obtención de productos que comúnmente tienen altos costos de elaboración, o bien, al generarlos requieren procesos largos y muchas veces con problemas al ecosistema provocado por el gran número de compuestos secundarios que se desprenden de la producción o el uso de éstos. Además, las microalgas han sido reconocidas como una fuente prometedora alterna para la obtención de lípidos para diversas aplicaciones, entre ellas se destaca su uso como alimento, bioenergéticos y antimicrobianos entre

otras. Algunas especies de microalgas llegan a acumular concentraciones de lípidos superiores al 50% del peso seco celular (Halim *et al.*, 2011).

Las variables medioambientales modifican las características del crecimiento en microalgas, así como de la composición proximal y la producción de metabolitos. Por lo anterior, existen distintos métodos para cultivar microalgas que consisten en realizar cultivos en dos estrategias: en estanques en donde existe poco control de variables ambientales, y en fotobiorreactores en donde se realiza un estricto control de las variables para asegurar el control del proceso de cultivo y obtener un producto en particular. Las variables más importantes que afectan el crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas son: la temperatura, el pH, la concentración de CO₂, la forma química y la concentración de nutrientes, la energía subsidiaria (agitación), la geometría del envase y la cantidad y la calidad de la luz (Sánchez *et al.*, 2011).

1.1. Antecedentes

1.1.1. Microalgas

Las microalgas se encuentran ampliamente distribuidas en los ecosistemas acuáticos y han logrado adaptarse por medio de estrategias que van desde una variedad de tamaños, cambios en la morfologías, estrategias en ciclo de vida, adaptaciones fisiológicas causadas por variaciones en el ambiente que provocan cambios en la síntesis de pigmentos y metabolitos. Además, las microalgas, son uno de los grupos de mayor producción de oxígeno dentro de los ecosistemas acuáticos, aportando aproximadamente la mitad de la actividad fotosintética y oxígeno producido en el mundo (Matsunaga *et al.*, 2005).

Las microalgas son organismos capaces de convertir con alta eficiencia la luz solar en biomasa, presentando tasas de reproducción y crecimiento con eficiencias elevadas. Las tasas de crecimiento y la actividad fotosintética de las microalgas son mucho mayores que las obtenidas en plantas superiores (Bitaubé *et al.*, 2008).

Los productos obtenidos a partir de cultivos de microalgas tienen importantes aplicaciones dentro del área de alimentos debido a sus propiedades nutricionales, su composición de pigmentos, tales como carotenoides y ficobiliproteínas son usados como colorantes naturales en alimentos, incrementando el valor nutritivo de estos productos, por ser compuestos con actividad antioxidante. Estos microorganismos presentan también un aporte considerable de vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos poliinsaturados (ácidos eicosapentaenólico y docosaheptaenólico). Además, también dentro de sus constituyentes presentan otros productos de interés como los antimicrobianos con aplicaciones para la industria farmacéutica (Bitaubé *et al.*, 2008).

Dentro de los grupos más representativos de las microalgas se encuentran las diatomeas, se calcula que existen alrededor de 100 000 especies de diatomeas vivientes alrededor del mundo, distribuidas a lo largo de un gran número de ecosistemas que en su totalidad pueden contribuir a formar aproximadamente el 25% del total de producción primaria sobre la tierra (Scala *et al.*, 2002).

Las diatomeas son organismos eucariotas unicelulares que varían de tamaño (rangos entre 10 y 200 μm), la característica más representativa de este grupo de microalgas es su pared celular formada a base de silicio llamada frústula, la cual es extremadamente diversa en organización entre especies de diatomeas. Así también tales variaciones pueden encontrarse en otros aspectos de las microalgas como en el arreglo de sus organelos, su forma, el tipo de reproducción sexual y sus características fisiológicas (Falkowski y Knoll, 2008).

Las diatomeas tienen la capacidad de ajustar sus características fotosintéticas para permitir tasas máximas de crecimiento en un amplio intervalo de intensidades de luz, así como de utilizar distintas formas químicas de nutrientes y desarrollar estrategias de reproducción exitosas como es la producción de quistes (Scala *et al.*, 2002; Andersen, 2005).

Phaeodactylum tricornerum Bohlin es una diatomea pleomórfica atípica. Su forma fusiforme fue aislada por primera vez por Ellen y Nelson (1910), y fue descrita como *Nitzschia closterium* f. *minutissima*. La forma tri-radial fue anteriormente descrita por Bohlin (1897) y la nombró *Phaeodactylum tricornerum*. Wilson (1946) fue el primero en describir la naturaleza polimórfica de *Phaeodactylum*. Este estudio reveló la existencia de tres morfologías dentro de la misma especie (Figura 2). La ausencia de una estructura silificada en la pared celular de *Phaeodactylum tricornerum* llevó a la conclusión que esta microalga no debería ser clasificada como diatomea. No fue sino hasta después de que Lewin (1958) observó una porción silificada en la forma ovalada que *Phaeodactylum* fue asignada a la clase Bacillariophyceae. *Phaeodactylum* es ahora el único representante del suborden Phaeodactylinae, familia Phaeodactylaceae, género *Phaeodactylum* (Lewin, 1958).

Esta diatomea no es muy abundante en el medio ambiente, sin embargo, parece ser cosmopolita, las especies costeras se encuentran principalmente en ambientes inestables tales como estuarios y zonas intermareales. En estos ambientes la salinidad y la temperatura pueden cambiar rápidamente como consecuencia de los efectos de mareas, radiación solar y actividades antropogénicas. La habilidad de aclimatarse a estas fluctuaciones de condiciones ambientales pudiera estar relacionada con el carácter pleo-mórfico de las células de *Phaeodactylum*, pudiéndose encontrarse típicamente a esta diatomea en uno de sus tres morfotipos: fusiforme, ovalado o tri-radial (Figura 2) (De Martino *et al.*, 2011).

Recientes estudios han identificado a *Phaeodactylum tricornerum* como una microalga con un contenido considerable de actividad antioxidante y se han identificado compuestos fenólicos producidos por esta diatomea tales como ácido fenolcarboxílico y sus derivados, catecoles, flavonoides, carotenoides, y otros compuestos antioxidantes (Rodríguez y Guil, 2008).

1.2 Compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos aromáticos con uno o más grupos hidroxilos unidos al anillo bencénico. Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal, son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de estos vegetales como alimento. En las pasadas dos décadas se le han atribuido cualidades antioxidantes a los fenoles debido a su capacidad para reaccionar con radicales libres y formar compuestos estables (Rappoport, 2003).

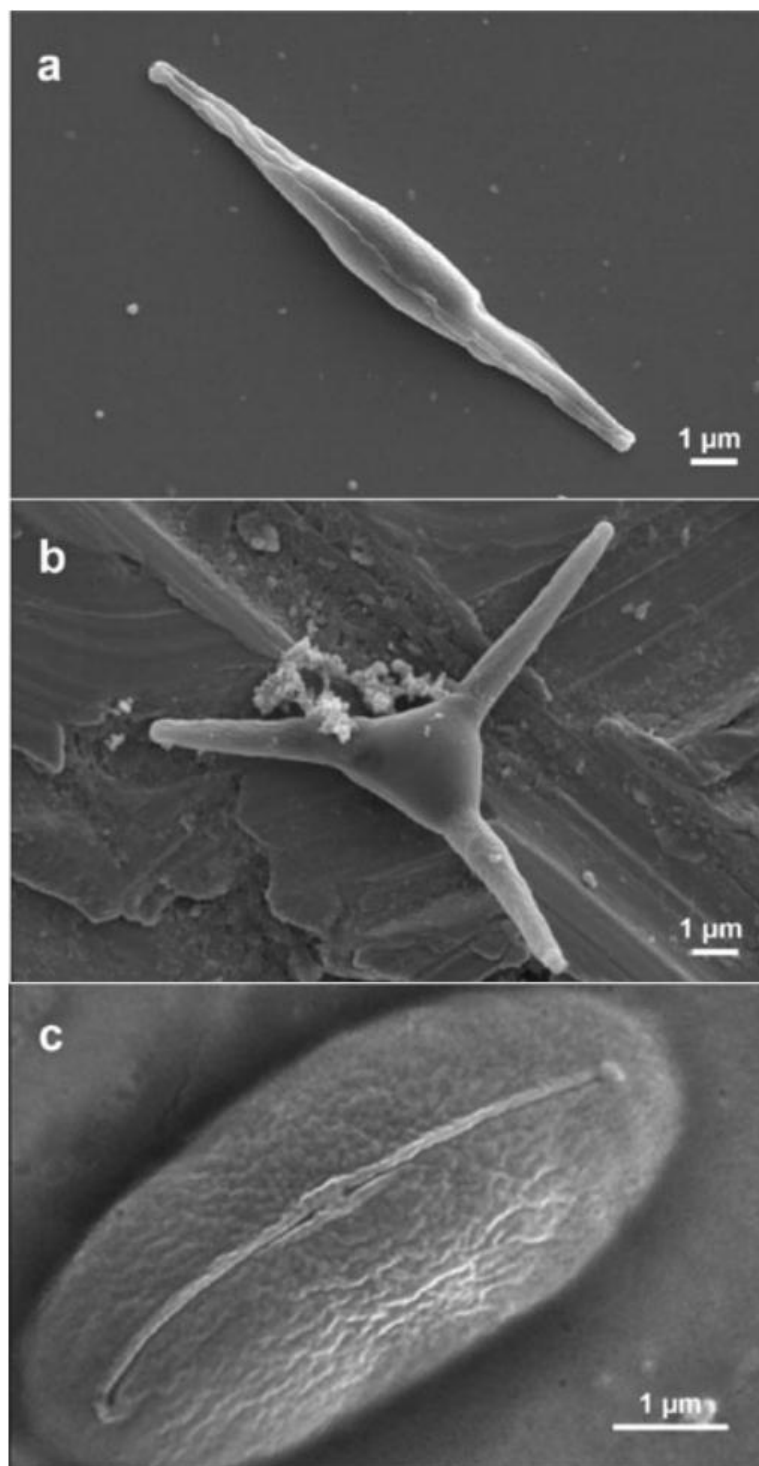
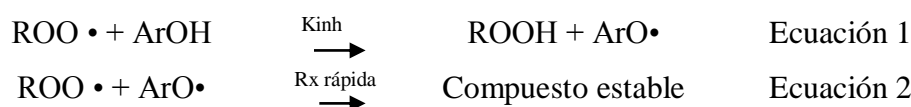


Figura 2. Imagen de microscopía electrónica de barrido de los morfotipos fusiforme (a), tri-radial (b) y ovoide (c) de *Phaeodactylum tricornutum* (Francius *et al.*, 2008).

La cinética y mecanismo de inhibición (K_{inh}) de la oxidación causada por radicales libres ha sido objeto de varias investigaciones. La reacción general para la inhibición de la oxidación por fenoles se presenta en las ecuaciones 1 y 2, en donde un compuesto fenólico se encuentra en presencia de un radical peroxil y éste es atrapado por el grupo hidroxilo del fenol mediante un mecanismo de abstracción del átomo de hidrógeno, resultando en una rápida recombinación que va de peróxido a un radical ariloxil, para posteriormente formar un producto no radical estable (ecuación 1 y 2) (Rappoport, 2003).

Algunos de los compuestos más importantes dentro de los fenoles son los tocoferoles y los tocotrienoles, estos se encuentran distribuidos en un gran número de tejidos vegetales y su impacto benéfico en la salud ha sido de mucho interés en las décadas pasadas (Rappoport, 2003).



1.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ocurre en todos los organismos que se encuentran en contacto con un ambiente oxigenado. Sin embargo, los sistemas biológicos han desarrollado una amplia variedad de defensas antioxidantes para protegerse de estos procesos oxidativos (Fennema *et al.*, 2000). La patología de un gran número de enfermedades crónicas, incluyendo el cáncer involucra daño oxidativo a componentes celulares. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) capaces de causar daño al material genético (ADN) han sido asociadas con reacciones carcinogénicas, enfermedades coronarias y muchos más problemas a la salud relacionados a personas de edad avanzada (Liangli, 2008). En la figura 3 se muestra un diagrama general del estrés oxidativo.

1.4. Producción de microalgas como potencial materia prima en la producción de lípidos

Las microalgas han despertado un interés no sólo en la industria farmacéutica y en la biomedicina, también son conocidas por su potencial en la producción de lípidos como aporte nutricional y como biocombustibles. En las últimas décadas un gran número de estudios se han centrado en la producción de lípidos para su potencial uso como biocombustibles ya que la obtención y utilización de estos energéticos a partir de microalgas puede contribuir en tener un menor impacto dañino en el ambiente reduciendo las emisiones de CO_2 generadas por los combustibles derivados del petróleo (Christi, 2007). Una de las ventajas en la producción de biocombustibles por medio de estos microorganismos es la amplia variedad de especies que

existen con características intrínsecas únicas, donde diferentes especies pudieran seleccionarse para optimizar la producción de diferentes biocombustibles (Gouveia, 2011).

La tecnología de producción de biodiésel a partir de aceites extraídos de microalgas se ha llevado a cabo a nivel laboratorio, sin embargo, uno de los grandes retos sigue siendo el desarrollo de tecnología e infraestructura que permita obtener mayores rendimientos de biocombustible producido (Lohrey y Kochergin, 2012).

La diatomea *Phaeodactylum tricornutum* es una especie que se sabe tiene una buena producción de aceite útil para la elaboración de biocombustibles, sin embargo el rendimiento que ésta logre tener dependerá de las condiciones a las cuales sea mantenida en cultivo, a pesar de ser ésta una diatomea con alta capacidad de adaptación a variaciones en su medio ambiente (Hall *et al.*, 2003).

Adicionalmente, el aporte de lípidos en alimentos y piensos formulados está basado en la obtención de aceites que actualmente son obtenidos principalmente de peces. Debido a la disminución de las capturas pesqueras y el continuo aumento de la población humana, es necesario obtener fuentes alternativas de lípidos para el suministro mundial de alimentos (FAO, 1997).

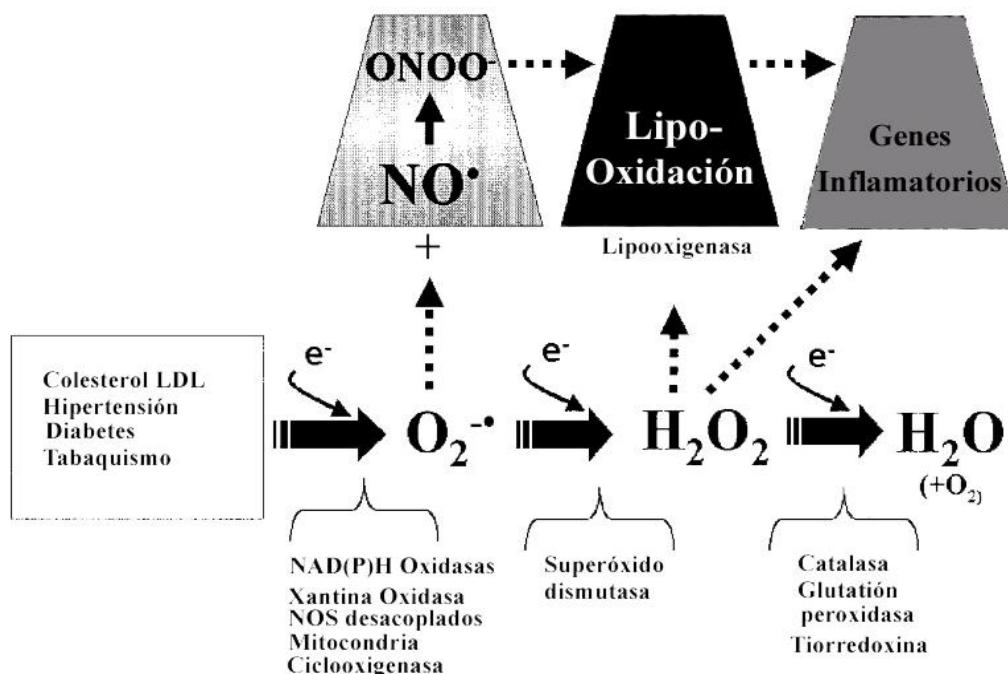


Figura 3. Diagrama general del estrés oxidativo. Tomado de Bourassa (2006).

1.5 Justificación

La propiedad intrínseca de las microalgas de modificar sus procesos bioquímicos al exponerse a cambios medio-ambientales extremos tales como cambios en la irradiancia, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes ha llevado a que estos microorganismos sean objeto de estudio de muchas investigaciones. El interés de investigar la fisiología de las microalgas está relacionado con áreas de potencial económico como en la industria energética y alimentaria (Sánchez *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2007); así como en la producción de compuestos específicos de gran importancia biomédica, como la extracción de compuestos antioxidantes con características de control y prevención de enfermedades relacionadas con especies reactivas de oxígeno (ROS) (Matsunaga *et al.*, 2005).

El aumento de la contaminación ambiental (*i.e.* CO₂ y desechos orgánicos e inorgánicos), el mal uso de los recursos naturales, la desinformación nutrimental y un ritmo de vida acelerado, han generado una problemática que gira en torno al estrés oxidativo, el cual se sabe que puede ser causa de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Niki, 2010).

En la última década ha habido diversas investigaciones dedicadas al estudio de una posible disminución de dichos contaminantes y al incremento en la calidad de vida de las personas. Entre ellas, el estudio de las microalgas ha resultado en una variedad de descubrimientos prometedores para su uso farmacéutico, en la solución de problemas ambientales (*i.e.* eutrofización y emisiones de CO₂) mediante la elaboración de biocombustibles, de salud como la malnutrición (incrementando la calidad proteínica, lipídica y de antioxidantes, adicionándolas a dietas y como suplementos alimenticios), y en la prevención de enfermedades relacionadas al estrés oxidativo (por su gran contenido de compuestos antioxidantes) (Shanab *et al.*, 2012).

La diatomea *Phaeodactylum tricornutum* ha sido ampliamente estudiada y ha mostrado ser una especie tolerante a distintas condiciones ambientales. Por lo anterior, es necesario investigar el efecto de diferentes condiciones de cultivo con relación a su crecimiento, la producción de lípidos, la cantidad de fenoles y la actividad antioxidante de *Phaeodactylum tricornutum*.

Capítulo 2

Hipótesis

El contenido de fenoles totales, la producción de lípidos y la actividad antioxidante en *Phaeodactylum tricornutum* se incrementan al aumentar la irradiancia y al disminuir la disponibilidad de nutrientes.

Capítulo 3

Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la irradiancia y el aporte de nitrógeno en el crecimiento, el contenido de fenoles totales, la producción de lípidos y la actividad antioxidante en *Phaeodactylum tricornutum* en condiciones de cultivo.

3.2. Objetivos específicos

Evaluar el crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos con distintas condiciones de irradiancia, temperatura y aporte químico de nitrógeno.

Analizar la producción de lípidos en *Phaeodactylum tricornutum* en diferentes condiciones de cultivo.

Analizar el contenido de fenoles totales de extractos de *Phaeodactylum tricornutum* mantenidos en diferentes condiciones de cultivo.

Evaluar la actividad antioxidante en extractos etanólicos de *Phaeodactylum tricornutum* en diferentes condiciones de cultivo.

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1. Mantenimiento rutinario de *Phaeodactylum tricornutum*

La cepa de *Phaeodactylum tricornutum* fue proporcionada de la colección particular del Laboratorio de Microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Los distintos análisis que se realizaron fueron llevados a cabo en el Laboratorio Húmedo Central del Departamento de Acuicultura del CICESE. Los cultivos se mantuvieron de forma rutinaria en cultivos no axénicos y estáticos es decir sin adición o recambio de medio de cultivo (Stein, 1973), para el mantenimiento se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 200 mL de medio “f” descrito por Guillard y Ryther (1962). Las condiciones ambientales de mantenimiento fueron una irradiancia continua de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y una temperatura ambiental de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Para el mantenimiento de la cepa se realizaron transferencias de alícuotas de cultivo cada 7 días a matraces Erlenmeyer con 200 mL de medio “f” estéril.

4.2. Curva de calibración para cuantificación de biomasa celular

Se elaboró una curva de calibración entre la cantidad de células y los valores de absorbancia medida en los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* durante siete días de crecimiento. Para lo anterior, se utilizaron diez diluciones seriadas por triplicado, con distintos volúmenes de agua de mar y cultivo (anexo 1). Para cada una de las diluciones se midió la absorbancia a 680 nm con un espectrofotómetro Hach DR4000 UV-VIS, así también, para cada caso se midieron los valores del número de células. Los conteos de células se realizaron con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad marca Hausser Scientific haciendo las observaciones en un microscopio compuesto marca Olympus CX31. Para los conteos con hematocitómetro se mantuvieron rangos de entre 20 y 70 células por campo, por lo que en algunos casos fue necesario hacer diluciones adicionales para mantener los valores en el intervalo antes mencionado. El valor de número de células por mL se obtuvo con la ecuación 3.

Ecuación 3: $\text{Células mL}^{-1} = \text{Promedio de células por cuadrante} \times \text{factor de dilución} \times 10\,000$

Con los datos de absorbancia y del número de células de *Phaeodactylum tricornutum* se realizó una curva de calibración entre los dos métodos de evaluación de la cantidad de biomasa

(Anexo 2). Para obtener la ecuación que permitiera comparar los valores de absorbancia y del número de células por ambos métodos se realizó un análisis de regresión y se obtuvo la ecuación de la recta utilizando el programa SigmaPlot versión 11.0.

4.3. Efecto de la temperatura y la irradiancia

Se evaluó el efecto de la temperatura y de la irradiancia respecto al crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum*. Para este ensayo se inocularon 18 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 200 mL de medio “f” con un inóculo de 865 000 células. Los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* se mantuvieron por triplicado en tres temperaturas experimentales (20, 25 y 30 \pm 1 °C) y con dos irradiancias (50 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Tabla 1). La luz utilizada fue continua y administrada por medio de lámparas fluorescentes de luz fría. La irradiancia se midió con un radiómetro (modelo QSL-100, sensor 4 π , Biospherical Instruments), marcando líneas de igual irradiancia y ajustando los valores experimentales a 50 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 1. Condiciones experimentales utilizadas para los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* mantenidos en sistemas estáticos con dos irradiancias y tres temperaturas y medio de cultivo “f” de Guillard y Ryther (1962).

Variables	CONDICIONES EXPERIMENTALES					
Irradiancia ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	50	50	50	100	100	100
Temperatura (°C)	20	25	30	20	25	30

4.3.1. Curvas de crecimiento

A partir de una alícuota de los cultivos mantenidos en cada condición experimental se evaluó cada día la absorbancia de los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum*. Para obtener el número de células de *Phaeodactylum tricornutum* en cada uno de los días de cultivo, se sustituyeron los valores de la absorbancia en la ecuación de la curva de calibración realizada ya descrita en la sección 4.2. (Anexo 1).

Con los valores del número de células obtenidos en los cultivos mantenidos en los ensayos experimentales, se utilizó una transformación a logaritmo base 2 para obtener para cada día la

curvas de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum*. Además, se registraron los días en que los cultivos se mantuvieron en fase exponencial y la densidad máxima obtenida para cada tratamiento.

4.3.2. Parámetros de crecimiento

Con los datos obtenidos de conteo celular se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) y el tiempo de generación (T_g) utilizando las ecuaciones propuestas por Fogg y Thake (1987).

4.3.3. Peso seco, contenido de cenizas y peso seco orgánico

Se calculó el peso seco total normalizado por mL (PST), el peso seco orgánico normalizado por mL (PSO) y el peso de las cenizas normalizado por mL (PC) utilizando la técnica establecida por Sorokin (1973). Se colectaron submuestras de los cultivos de cada condición experimental y se filtraron para cada caso 20 mL de cultivo. Para el filtrado se utilizaron como soporte filtros de fibra de vidrio Watman GF/C con abertura de poro de 1 μ m, estos filtros fueron previamente incinerados en una mufla modelo Barnstead Thermolyne 1400 durante 2 horas a 490 °C. Los filtros con muestra se mantuvieron en una estufa (VWR, modelo 1321) a una temperatura de 60 °C por 12 horas para eliminar la humedad. Posteriormente, a distintos intervalos de tiempo los filtros se pesaron en una balanza (Mettler modelo AE-20) hasta obtener valores de peso seco constante.

Ecuación 4:
$$PST = \frac{(\text{peso seco del filtro} + \text{microalgas}) - (\text{peso seco del filtro})}{\text{volumen de cultivo}}$$

Para obtener el contenido de cenizas de las muestras los filtros con muestra se colocaron en una mufla durante 4 horas a 490 °C y después se pesaron en una balanza hasta obtener valores de peso constante. Con los valores del peso constante de los filtros, se calculó el peso de las cenizas (PC) con la ecuación 5.

Ecuación 5:
$$PC = \frac{(\text{peso de cenizas de microalgas+ filtro}) - (\text{peso seco del filtro})}{\text{volumen del cultivo}}$$

Finalmente con los valores obtenidos del peso seco total normalizado por mL (PST) y el peso de las cenizas normalizado por mL (PC) se calculó el peso seco orgánico normalizado por mL (PSO) con la ecuación 6.

Ecuación 6:
$$PO = PST - PC$$

4.3.4. Lípidos

Para la extracción de lípidos se utilizó una mezcla de solventes (cloroformo-metanol-agua) siguiendo la técnica descrita por Bligh y Dyer (1959) y modificada por Chiaverini (1972). Para la cuantificación de los lípidos extraídos se siguió el método de Pande *et al.* (1963), donde los datos obtenidos se extrapolaron a una curva de calibración realizada con una solución estándar de tripalmitina al 99%.

4.4. Efecto de la concentración de nitratos y de la irradiancia

Para evaluar el efecto de la concentración de nitratos y de la irradiancia en *Phaeodactylum tricornutum*, se mantuvieron cultivos en 18 matraces Erlenmeyer de 1000 mL con 500 mL de medio “f”. Los cultivos se inocularon con 1 900 000 células de *Phaeodactylum tricornutum* tomadas del cultivo en fase exponencial de crecimiento. Los cultivos se mantuvieron con dos irradiancias (50 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y con tres concentraciones de nitratos (Tabla 2). Las concentraciones de nitratos se establecieron tomando como control los valores de este nutriente (150 mg L⁻¹) en el medio “f” descrito por Guillard y Ryther (1962), y se usaron dos concentraciones inferiores de este nutriente (37.5 y 75 mg L⁻¹). Los cultivos se mantuvieron con iluminación continua, en sistemas estáticos o sin recambio de medio y a una temperatura de 20 ± 1 °C.

Tabla 2. Condiciones experimentales utilizadas para los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* mantenidos en sistemas estáticos con dos irradiancias y tres distintas concentraciones de nitratos.

Variables	CONDICIONES EXPERIMENTALES					
Irradiancia ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	50	50	50	100	100	100
Nitratos (g L⁻¹)	37.5	75.0	150.0	37.5	75.0	150.0

A partir de una alícuota de los cultivos mantenidos en cada condición experimental se evaluó cada día la absorbancia de los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* y de forma análoga a lo descrito en la secciones 4.3.1 a 4.3.4, se calcularon las curvas de crecimiento, los parámetros de crecimiento, el peso seco total, el peso de las cenizas, el peso orgánico y el contenido de lípidos.

4.4.1. Biomasa de *Phaeodactylum tricornutum* para obtención de extractos

Durante la fase estacionaria de crecimiento de los cultivos se colectó el total del volumen de *Phaeodactylum tricornutum* mantenido en las distintas condiciones experimentales. Para cada caso, se colectó la biomasa celular mediante centrifugación a 4 500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga marca Heraeus (modelo 400R), los sobrenadantes fueron descartados y los concentrados fueron almacenados a - 40 °C en un congelador (Revco, modelo Ultima II) por un periodo de 20 horas y posteriormente se transfirieron a un ultracongelador (Revco, modelo DXF) con una temperatura de - 80 °C durante 24 horas. Las muestras congeladas fueron liofilizadas (Labconco Freezone Freeze Dry System, modelo 7670520) y posteriormente fueron almacenadas a - 40 °C hasta el momento de su utilización para la medición del análisis de antioxidantes.

4.4.2. Extracción de componentes antioxidantes con solventes orgánicos

La obtención de los extractos para la evaluación de los componentes antioxidantes se realizaron según el procedimiento de Li *et al.* (2007), con modificaciones que consistieron en extracciones secuenciales con una mezcla 50:50 de etanol y agua con el fin de extraer la mayor parte de los componentes de valor antioxidante de la masa celular de *Phaeodactylum tricornutum*. Una vez obtenidos los extractos se almacenaron a 4 °C hasta su utilización en los análisis de fenoles totales y de evaluación de la actividad antioxidante.

4.5. Fenoles totales

Se cuantificó el contenido de fenoles totales utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). Esta medición se basa en una prueba colorimétrica que se genera al reducir el color amarillo del agente Folin Ciocalteu a un color azul oscuro, que bajo condiciones básicas los grupos fenólicos se encuentran desprotonados y en forma de un anión fenolato con potencial de reducción. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro marca Hach DR/4000 UV-VIS a una longitud de onda de 765 nm, los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca de *Phaeodactylum tricornutum*. Para esta cuantificación se requirió elaborar una curva de calibración utilizando ácido gálico.

4.6. Evaluación de actividad antioxidante por el método TEAC (por sus siglas en inglés Trolox Equivalent Antioxidant Activity)

El método consistió en la formación del radical catiónico ABTS⁺ (cromóforo verde) (Figura 4) basado en la acción oxidativa de persulfato de potasio sobre ABTS. El fundamento de este método consiste en monitorear espectrofotométricamente la pérdida de color del radical ABTS durante la interacción con especies donantes de hidrógeno.

Se registró la absorbancia inicial y la absorbancia después de 6 min (absorbancia final) a 734 nm en un espectrofotómetro marca Hach DR/4000 UV-VIS. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes trolox por gramo de muestra seca de *Phaeodactylum tricornutum*, para lo cual fue necesario elaborar una curva de calibración estándar de trolox que es un análogo soluble de la vitamina E según lo descrito por Re *et al.* (1999).

4.7. Evaluación de actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Este ensayo mide la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH (Figura 6) a una longitud de onda de 517 nm, luego de 30 min de reacción. Para el ensayo se usaron 2.95 mL de solución etanólica de DPPH (10 mg / 200 mL de solución etanólica (50% etanol: 50% agua destilada)) ajustada previamente a 0.7 ± 0.02 de absorbancia y 0.05 mL del extracto. Para cada extracto se calcula el porcentaje de inhibición del radical ($\% \text{ Inhibición} = (\text{Abs inicial} - \text{Abs final} / \text{Abs inicial}) * 100$) (Brand-Williams, 2002).

Se midió la capacidad de las muestras de inactivar el radical DPPH y se evaluó la reacción a una longitud de onda de 515 nm, se dejó actuar 60 min la reacción y se midió el decaimiento de los valores de absorbancia en un espectrofotómetro marca Hach DR/4000 UV-VIS. Para cada extracto se calculó el porcentaje de inhibición del radical utilizando la ecuación 7 y siguiendo el procedimiento descrito por Floegel *et al.* (2011).

Ecuación 7: $\% \text{ Inhibición} = (\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia final} / \text{Absorbancia inicial}) * 100$

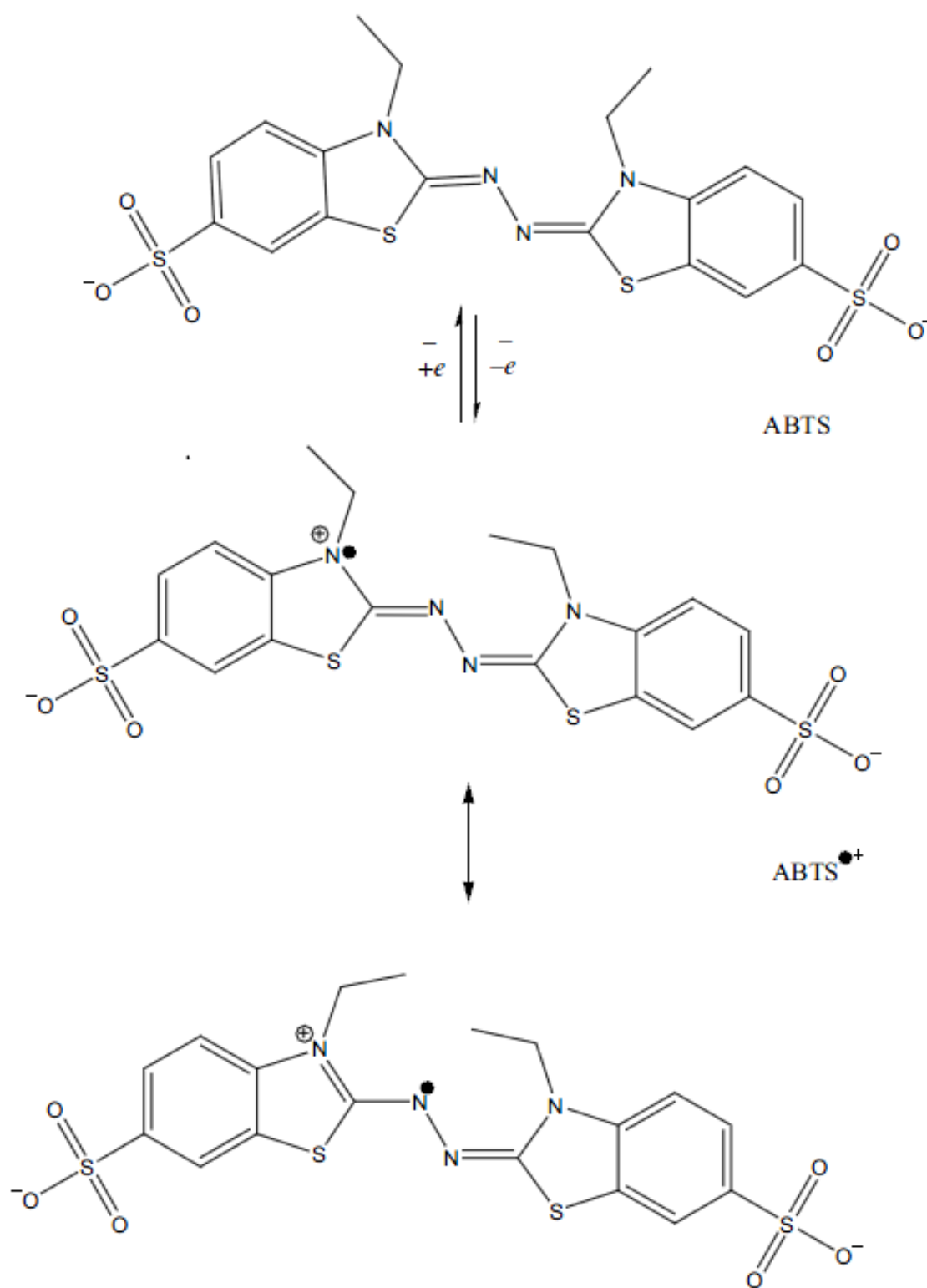


Figura 4. Estructura de la molécula de ABTS y del radical catiónico ABTS. Tomado de Liangli, 2008.

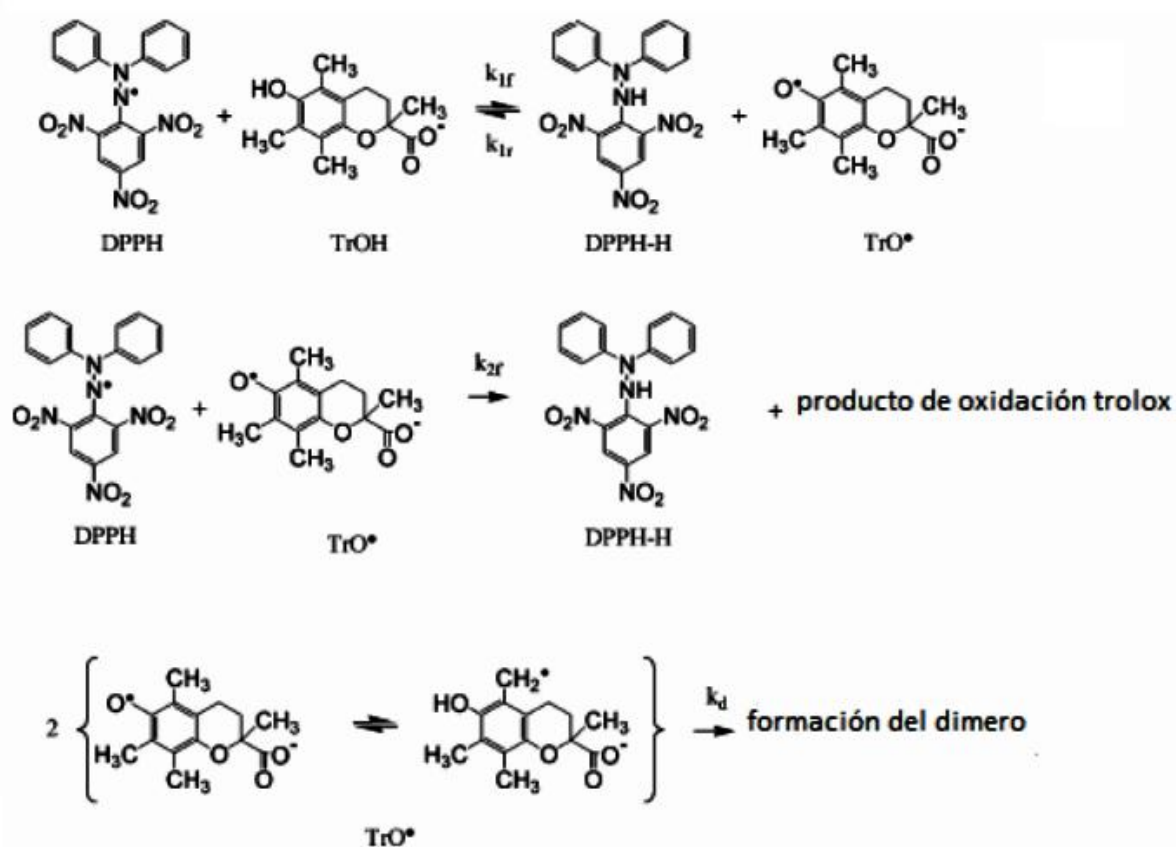
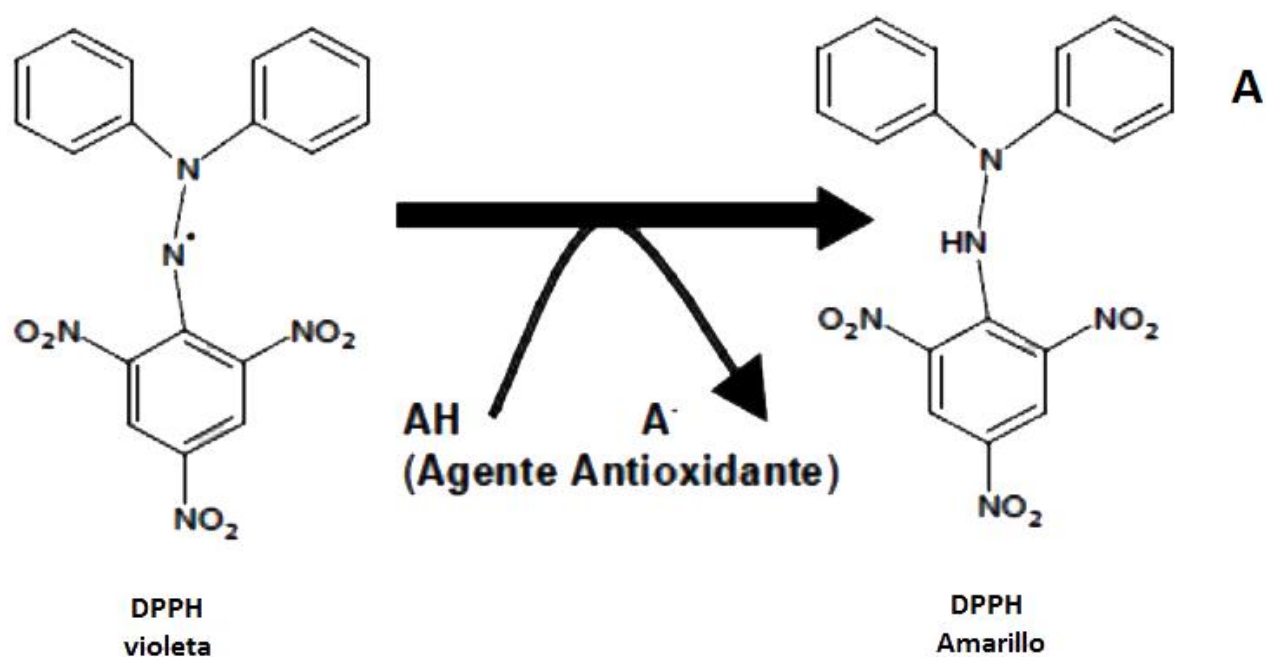


Figura 5. (A) Reacción del DPPH con el método del 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (B) Esquema de reacción entre 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y Trolox. Tomado de Santacruz, 2011.

4.8. Análisis estadístico de los datos

Para evaluar las diferencias entre los tratamientos experimentales por efecto de la temperatura y la irradiancia, así como por efecto de la concentración de nutrientes y la irradiancia, los datos obtenidos de concentración de células, crecimiento, producción de lípidos, peso seco y los valores de antioxidantes fueron tratados con un Análisis de Varianza de dos vías. En el caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizaron pruebas *a posteriori*. Para los análisis estadísticos se utilizó un nivel de significancia de $p < 0.05$. Para el análisis de los datos se utilizó el programa STATISTICA ® versión 7.

Capítulo 5

Resultados

5.1. Curva de calibración para la cuantificación de la biomasa celular

En la Tabla A1 (ver Anexo) se muestran los valores promedio de la densidad celular y la absorbancia obtenidos para los cultivos *Phaeodactylum tricornutum*. Se encontró una relación lineal entre los valores de absorbancia y del número de células. El ajuste al modelo lineal fue de $R^2 = 0.994$ (Figura A1 en Anexo).

El valor de la ecuación de regresión fue: $y = 3 \times 10^{-8} x - 0.0099$.

En donde: y = número de células por mL, x = valor de absorbancia.

Con esta ecuación de regresión fue posible calcular la densidad de células para *Phaeodactylum tricornutum* en distintas condiciones experimentales (Tabla A2 en Anexo).

5.2. Efecto la temperatura y de la irradiancia

5.2.1. Crecimiento

Se encontró que la fase exponencial de crecimiento finalizó en el cuarto día de cultivo para los tratamientos mantenidos a 25 y 30 °C y con una irradiancia de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para el resto de los tratamientos la fase exponencial se alcanzó al tercer día de crecimiento (Figura 6).

El cultivo mantenido con irradiancia de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 25 °C presentó la mayor densidad celular (7.83×10^6 cél. mL^{-1}) al día cuatro al finalizar la fase exponencial, mientras que para el tratamiento con una irradiancia de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 25 °C se presentó una menor densidad celular al finalizar la fase exponencial al tercer día de cultivo (5.49×10^6 cél. mL^{-1}) (Figura 6, Tabla 3).

Se encontraron diferencias significativas en los valores de la tasa de crecimiento (μ) por efecto de la irradiancia ($p = 0.004$) y de la temperatura ($p < 0.001$), además se encontró interacción entre ellos ($p < 0.001$). Los valores mayores de tasa de crecimiento se encontraron a 20 °C para ambas irradiancias (0.99 ± 0.01 , Tabla 3) y los valores menores se obtuvieron a 30 °C con 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.79 ± 0.01 , Tabla 3).

En los valores de tiempo de generación se encontraron diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($p = 0.001$) y por efecto de la temperatura ($p < 0.001$), así también, se encontró que estos dos factores presentaron interacción para este parámetro de crecimiento ($p < 0.001$). Los valores mayores de tiempo de generación se encontraron en el tratamiento a 30 °C con 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.25 ± 0.01) y los valores menores se presentaron en el tratamiento a 20 °C con 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1.00 ± 0.01 , Tabla 3).

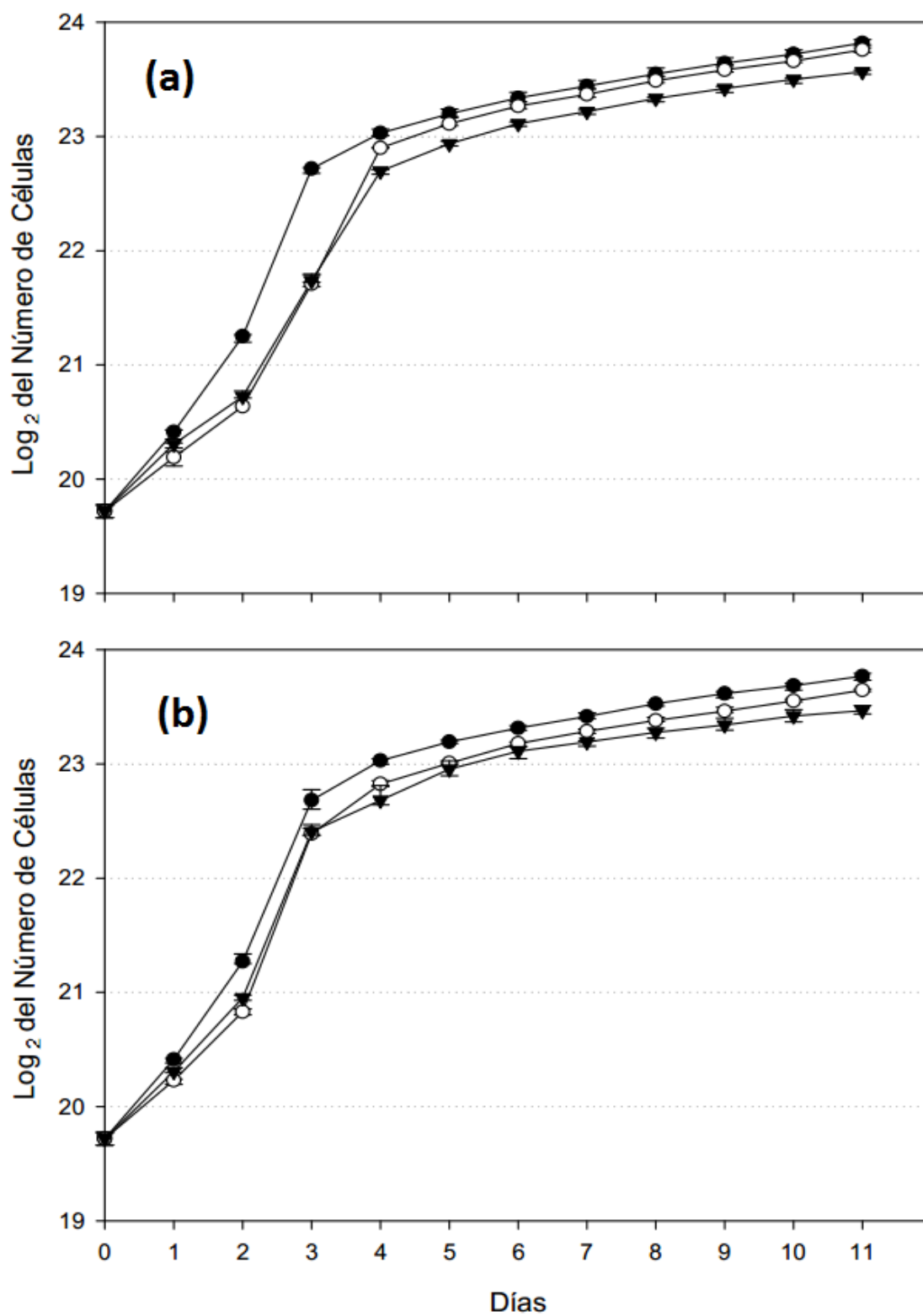


Figura 6. Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células para *Phaeodactylum tricornutum* mantenidos en distintas temperaturas en cultivos (20 (●), 25 (○) y 30 (▼) °C) y con dos irradiancias (50 (a) y 100 (b) $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Tabla 3. Valores promedio (n=3) y desviación estándar de la tasa de crecimiento exponencial (μ en divisiones por día), el tiempo de generación (Tg en días), días en la fase exponencial (FE en días) y densidad celular máxima en la fase exponencial (DCM en cél. mL⁻¹ x 10⁶) para *Phaeodactylum tricornutum* mantenido en distintas condiciones de temperatura e irradiancia.

Irradiancia	°C	μ	Tg	FE	DCM
50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	20	0.99 \pm 0.01 a	1.00 \pm 0.01 c	3	6.89 \pm 0.11 b
	25	0.90 \pm 0.02 b	1.10 \pm 0.02 b	4	7.83 \pm 0.01 a
	30	0.79 \pm 0.01 c	1.25 \pm 0.01 a	4	6.80 \pm 0.08 b
100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	20	0.99 \pm 0.02 a	1.01 \pm 0.02 c	3	6.39 \pm 0.40 b
	25	0.89 \pm 0.00 b	1.11 \pm 0.01 b	3	5.49 \pm 0.12 c
	30	0.90 \pm 0.02 b	1.10 \pm 0.02 b	3	5.83 \pm 0.17 c

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Fisher LSD $\alpha = 0.05$ en donde $a > b > c$.

Con base en los resultados obtenidos de mayor tasa de crecimiento, el menor tiempo de generación y el menor tiempo para alcanzar la fase exponencial en los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum*, se decidió que para los ensayos posteriores se utilizaría la temperatura de 20 °C por ser ésta en donde se obtiene mayor producción de biomasa.

5.2.2. Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico

En la Tabla 4, se muestran los valores del peso seco total normalizado por mL (PST), el peso de las cenizas normalizado por mL (PC) y el peso seco orgánico normalizado por mL (PSO).

Peso seco total: No se encontraron diferencias significativas en el PST por efecto de la irradiancia ($p = 0.320$), pero sí existieron diferencias significativas por efecto de la temperatura ($p = 0.001$). No se encontró interacción entre los factores de irradiancia y de temperatura ($p = 0.574$). Los valores mayores de PST se encontraron en ambas irradiancias con las temperaturas de 20 y 25 °C (Tabla 4).

Peso de cenizas: No hubieron diferencias significativas en el peso de las cenizas por efecto de la irradiancia ($p = 0.504$), ni por efecto de la temperatura ($p = 0.087$), tampoco se encontró interacción entre los factores ($p = 0.672$) (Tabla 4).

Peso seco orgánico: No se encontraron diferencias significativas por efecto del factor irradiancia ($p = 0.343$), pero se encontraron diferencias significativas por efecto de la

temperatura ($p < 0.001$). También se encontró interacción entre estos dos factores ($p = 0.005$). Los valores mayores de PSO se encontraron con la irradiancia de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (0.338 ± 0.030) y para la irradiancia de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (0.333 ± 0.011) entre los cuales no hubo diferencia significativa (Tabla 4).

Tabla 4. Valores promedio ($n=3$) y desviación estándar de peso seco total (PST), peso de cenizas (PC) y peso seco orgánico (PSO) nomalizado por mL de cultivo para *Phaeodactylum tricornutum* mantenido en distintas condiciones de temperatura e irradiancia.

Irradiancia	$^\circ\text{C}$	PST (mg)	PC (mg)	PSO (mg)
$50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	20	$0.60 \pm 0.009\text{a}$	0.308 ± 0.005	$0.300 \pm 0.004\text{b}$
	25	$0.62 \pm 0.02\text{a}$	0.285 ± 0.038	$0.338 \pm 0.030\text{a}$
	30	$0.52 \pm 0.02\text{b}$	0.250 ± 0.019	$0.275 \pm 0.006\text{bc}$
$100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	20	$0.61 \pm 0.02\text{a}$	0.278 ± 0.022	$0.333 \pm 0.011\text{a}$
	25	$0.58 \pm 0.01\text{ab}$	0.284 ± 0.007	$0.296 \pm 0.010\text{b}$
	30	$0.51 \pm 0.07\text{b}$	0.249 ± 0.061	$0.262 \pm 0.017\text{c}$

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Fisher LSD $\alpha = 0.05$ en donde $\text{a} > \text{b} > \text{c}$.

5.2.3. Lípidos

Al comparar el porcentaje de lípidos en los distintos tratamientos se encontró que existen diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($p = 0.001$), por efecto de la temperatura ($p < 0.001$), y además se presentó interacción entre ambas variables ($p = 0.005$) (Tabla 5). Los valores mayores de lípidos se encontraron con la irradiancia de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y las temperaturas 20 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (Tabla 5).

Tabla 5. Valores promedio (n=2) y desviación estándar del porcentaje de lípidos para *Phaeodactylum tricornutum* mantenido en distintas condiciones de temperatura e irradiancia.

Irradiancia	°C	Lípidos (%)
50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	20	15.40 \pm 0.80b
	25	10.43 \pm 1.38d
	30	19.44 \pm 1.26a
100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	20	12.32 \pm 0.27cd
	25	10.87 \pm 0.67cd
	30	13.04 \pm 0.46c

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Fisher LSD $\alpha = 0.05$ en donde $a > b > c > d$

5.3. Efecto de la concentración de nitratos y de la irradiancia

5.3.1. Crecimiento

Se encontró que la fase exponencial finalizó al tercer día de cultivo para los tratamientos con irradiancias de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en todas las concentraciones de nitratos utilizadas, y para el resto de los tratamientos la fase exponencial finalizó al segundo día de cultivo (Figura 7).

El cultivo mantenido con irradiancia de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 150 g L^{-1} de nitratos presentó la mayor densidad celular (9.44×10^6 cél. mL^{-1}) al tercer día al finalizar la fase exponencial, mientras que para el tratamiento con una irradiancia de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 150 g L^{-1} de nitratos se presentó una menor densidad celular al finalizar su fase exponencial al segundo día de cultivo (6.47×10^6 cél. mL^{-1} , Figura 3 y Tabla 6).

Se encontraron diferencias significativas en los valores de la tasa de crecimiento (μ) por efecto de la irradiancia ($p < 0.001$), pero no por efecto de la concentración de nitratos ($p = 0.735$), además no se encontró interacción entre estos dos factores ($p = 0.636$, Tabla 6). Los valores mayores de tasa de crecimiento fueron encontrados en el tratamiento con 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia siendo el mayor el obtenido a una concentración de nitratos de 37.5 g L^{-1} (1.07 ± 0.08 , Tabla 6). Éste fue significativamente diferente a los tratamientos a 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pero no a los llevados a cabo a la misma irradiancia.

En los valores de tiempo de generación se encontraron diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($p = 0.001$), pero no por efecto de la concentración de nitratos ($p = 0.840$), así también, no se encontró interacción entre estos dos factores para este parámetro de

crecimiento ($p = 0.695$). El valor mayor encontrado para el tiempo de generación se presentó en el tratamiento a 75 g L^{-1} de nitratos con $50 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (1.23 ± 0.12), sin embargo no fue significativamente diferente a los demás excepto al tratamiento a 37.5 g L^{-1} y $100 \text{ } \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (0.93 ± 0.07 , Tabla 6).

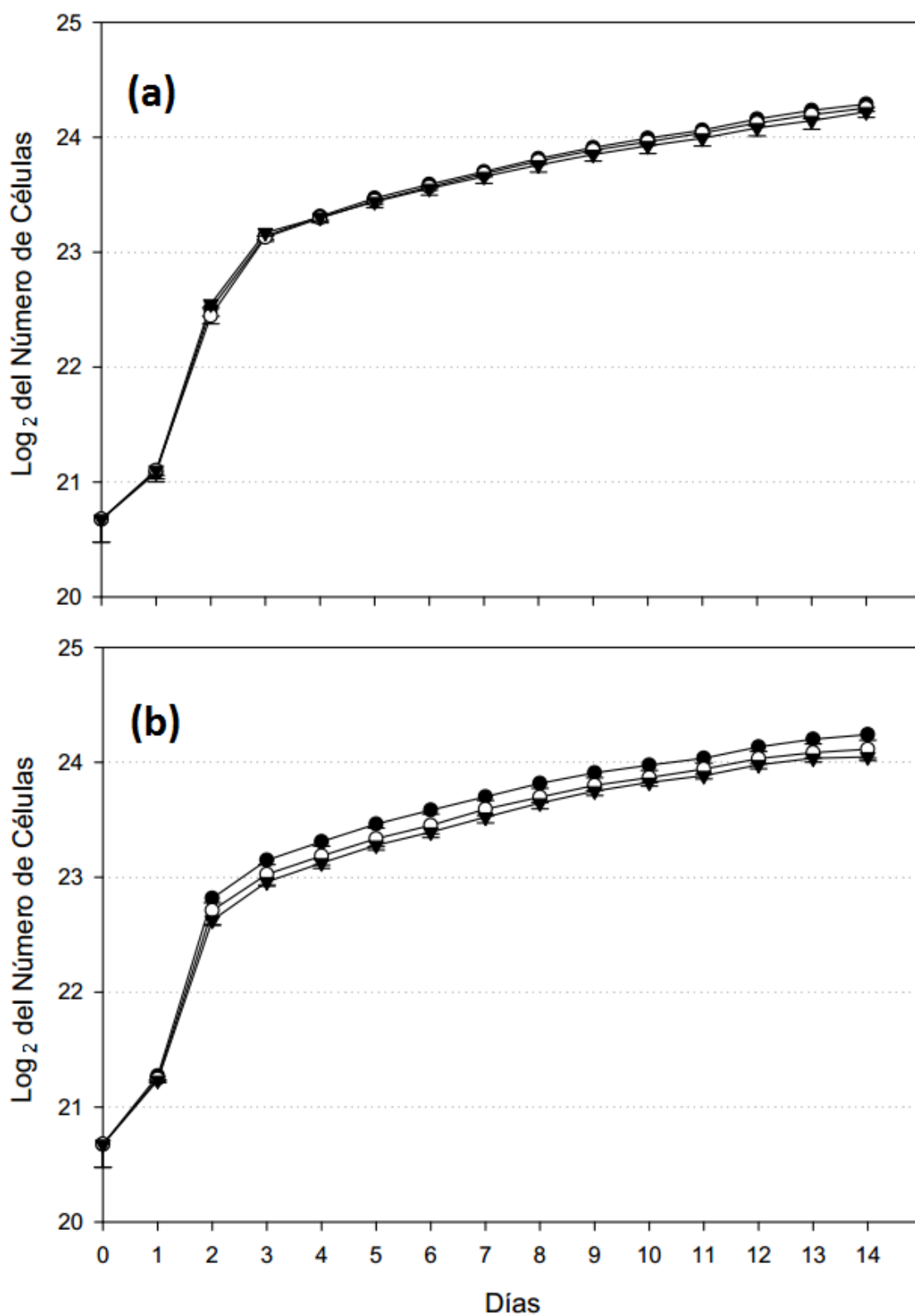


Figura 7. Valores promedio y desviación estándar de la densidad de células para *Phaeodactylum tricornutum* mantenidos en distintas concentraciones de nitratos en cultivos (37.5 (●), 75 (○) y 150 (▼) g L^{-1}) y con dos irradiancias (50 (a) y 100 (b) $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Tabla 6. Valores promedio (n=3) y desviación estándar de la tasa de crecimiento exponencial (μ en divisiones por día), el tiempo de generación (Tg en días), días en la fase exponencial (FE en días) y densidad celular máxima en la fase exponencial (DCM en cél. mL⁻¹ x 10⁶) para *Phaeodactylum tricornutum* mantenido a distintas concentraciones de nitratos (CN: g L⁻¹) y de irradiancia.

Irradiancia	CN	μ	Tg	FE	DCM
50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	37.5	0.82 \pm 0.06 b	1.22 \pm 0.09 a	3	9.24 \pm 0.18 a
	75.0	0.81 \pm 0.07 b	1.23 \pm 0.12 a	3	9.17 \pm 0.21 a
	150.0	0.83 \pm 0.05 b	1.20 \pm 0.08 a	3	9.44 \pm 0.18 a
100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	37.5	1.07 \pm 0.08 a	0.93 \pm 0.07 b	2	7.39 \pm 0.20 b
	75.0	1.01 \pm 0.15 ab	0.99 \pm 0.15 ab	2	6.88 \pm 0.59 bc
	150.0	0.97 \pm 0.11 ab	1.03 \pm 0.12 ab	2	6.47 \pm 0.19 c

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Fisher LSD $\alpha = 0.05$ en donde a>b>c.

5.3.2. Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico

En la Tabla 7, se muestran los valores del peso seco total (PST), el peso de las cenizas (PC) y el peso seco orgánico (PSO), para los tratamientos a diferentes concentraciones de nitratos y distintas irradiancias.

Peso seco total: No se encontraron diferencias significativas en el peso seco total por efecto de la irradiancia ($p = 0.091$), ni por efecto de la concentración de nitratos ($p = 0.617$), así también, no se encontraron diferencias significativas entre los a niveles de interacción de los factores ($p = 0.094$). Los valores mayores de PST se encontraron en el tratamiento a 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia y a una concentración de nitrato de 75 g L⁻¹ (1.00 \pm 0.060, Tabla 7). Sin embargo, no fue significativamente diferente a los demás tratamientos excepto al realizado con 75 g L⁻¹ de nitratos y a una irradiancia de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (0.80 \pm 0.069, Tabla 7).

Peso de cenizas: No hubieron diferencias significativas en el peso de las cenizas por efecto de la irradiancia ($p = 0.544$), ni por efecto de la concentración de nitratos ($p = 0.575$), tampoco se encontró interacción entre los factores ($p = 0.370$).

Peso seco orgánico: Se encontraron diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($p = 0.013$), pero no por efecto de la concentración de nitratos ($p = 0.671$), sin embargo, se encontró interacción entre ambos factores ($p = 0.023$). Los valores mayores de PSO fueron los obtenidos para el tratamiento a irradiancia de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con 75 g L⁻¹ (0.72 \pm 0.023) el cual

no fue significativamente diferente a los demás excepto al llevado a cabo a irradiancia de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con 75 g L^{-1} de nitratos.

Tabla 7. Valores promedio ($n=3$) y desviación estándar de peso seco total (PST), peso de cenizas (PC) y peso seco orgánico (PSO) normalizado por mL de cultivo para *Phaeodactylum tricornutum* mantenido en distintas concentraciones de nitratos (CN: g L^{-1}) y de irradiancia.

Irradiancia	CN	PST (mg)	PC (mg)	PSO (mg)
$50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	37.5	$0.93 \pm 0.034\text{ab}$	0.28 ± 0.012	$0.65 \pm 0.022\text{a}$
	75.0	$0.80 \pm 0.069\text{b}$	0.22 ± 0.032	$0.57 \pm 0.037\text{b}$
	150.0	$0.92 \pm 0.114\text{ab}$	0.26 ± 0.046	$0.65 \pm 0.068\text{a}$
$100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	37.5	$0.95 \pm 0.079\text{a}$	0.27 ± 0.040	$0.68 \pm 0.039\text{a}$
	75.0	$1.00 \pm 0.060\text{a}$	0.27 ± 0.038	$0.72 \pm 0.023\text{a}$
	150.0	$0.91 \pm 0.096\text{ab}$	0.25 ± 0.049	$0.65 \pm 0.046\text{a}$

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Fisher LSD $\alpha = 0.05$ en donde $a > b$.

5.3.3. Lípidos

Al comparar el porcentaje de lípidos en los distintos tratamientos se encontró que existen diferencias altamente significativas por efecto de la irradiancia ($p < 0.001$) y por efecto de la concentración de nitratos ($p < 0.001$), sin embargo no se presentó interacción entre ambas variables ($p = 0.397$). Los porcentajes mayores de lípidos se encontraron con la irradiancia $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una concentración de nitratos de 75 g L^{-1} (14.78 ± 0.63) y los menores se encontraron a una irradiancia de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con la concentración de 150 g L^{-1} de nitratos (6.50 ± 0.96 , Tabla 8).

Tabla 8. Valores promedio ($n=2$) y desviación estándar del porcentaje de lípidos para *Phaeodactylum tricornutum* mantenido en distintas condiciones de concentración de nitratos (CN: g L^{-1}) y de irradiancia.

Irradiancia	CN	Lípidos (%)
50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	37.5	$12.71 \pm 0.74\text{b}$
	75.0	$14.78 \pm 0.63\text{a}$
	150.0	$11.50 \pm 0.07\text{b}$
100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	37.5	$8.70 \pm 0.52\text{c}$
	75.0	$9.61 \pm 0.22\text{c}$
	150.0	$6.50 \pm 0.96\text{d}$

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Fisher LSD $\alpha = 0.05$ en donde $\text{a}>\text{b}>\text{c}>\text{d}$.

5. 4. Fenoles totales

Con los datos de fenoles evaluados en los distintos tratamientos, se encontró que no existen diferencias significativas por efecto de la irradiancia ($p = 0.534$), pero sí existen diferencias significativas por efecto de la concentración de nitratos en los distintos tratamientos ($p < 0.001$), sin embargo no se encontró una interacción entre estas dos variables ($p = 0.055$). Los valores mayores del contenido de fenoles totales se obtuvieron para ambas irradiancias (50 y $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en los tratamientos mantenidos con una concentración de nitratos de 37.5 g L^{-1} , seguido de los tratamientos a 150 g L^{-1} de nitratos. Los de valores menores se encontraron a concentraciones estándar de nitratos (75 g L^{-1}) para ambas irradiancias (50 y $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Tabla 9).

Tabla 9. Valores promedio (n=3) y desviación estándar del contenido de fenoles totales (mgEAG g⁻¹) para *Phaeodactylum tricornutum* mantenido en distintas condiciones de concentración de nitratos (CN: g L⁻¹) y de irradiancia.

Irradiancia	CN	Fenoles Totales
50 μE m⁻² s⁻¹	37.5	2.01 ± 0.086a
	75.0	1.71 ± 0.047c
	150.0	1.95 ± 0.110ab
100 μE m⁻² s⁻¹	37.5	1.96 ± 0.039ab
	75.0	1.85 ± 0.037b
	150.0	1.93 ± 0.031ab

ANOVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Fisher LSD $\alpha = 0.05$ en donde a>b>c.

5.5. Evaluación de actividad antioxidante por el método TEAC (por sus siglas en inglés Trolox Equivalent Antioxidant Activity)

Se encontró un posible efecto de interferencia del radical libre ABTS+ por efecto de los extractos etanólicos en cada uno de los tratamientos, la cinética de la reacción del radical al adicionarle el extracto de *Phaeodactylum tricornutum* siguió un patrón similar en todos los tratamientos, en donde la absorbancia de la reacción se veía reducida como era de esperarse. Sin embargo, el tiempo en que la reacción se llevaba a cabo fue de 10 a 15 veces más prolongado que lo reportado en la bibliografía encontrada para este análisis. En algunos casos la pérdida de color del radical (verde esmeralda) era casi total (corroborado por densidad óptica), por lo que la reacción fue atribuida a un posible efecto de interferencia o degradación del radical más que a un efecto de actividad antioxidante causado por los extractos, dando resultados oscilantes entre los tratamientos, entre un mismo tratamiento e incluso entre repeticiones de una misma muestra.

5.6. Evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Los resultados obtenidos en la medición de DPPH presentaron una respuesta poco común para este tipo de ensayo, las absorbancias para cada tratamiento fueron ligeramente mayores que las que se encontraron en el blanco (DPPH + dilución etanol (50% etanol: 50% agua destilada), la Figura 8 muestra los resultados de las lecturas de las absorbancias para cada tratamiento.

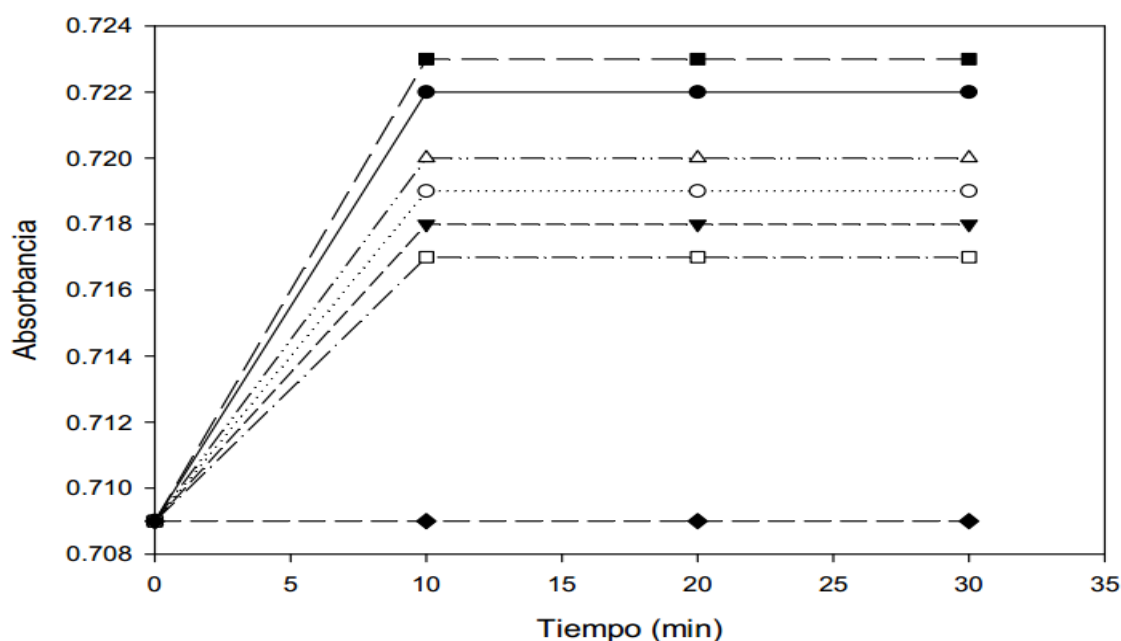


Figura 8. Absorbancia de los distintos extractos etanólicos en la reacción con radical DPPH. Tratamiento control de DPPH + dilución de etanol (♦). Tratamientos a irradiancia de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y concentraciones de nitratos de 37.5 (●), 75 (○) y 150 g L^{-1} (▼), tratamientos a irradiancia de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y concentraciones de nitratos de 37.5 (□), 75 (■) y 150 g L^{-1} (△).

La coloración en los tubos después de ocurrida la reacción entre DPPH y los extractos de cada tratamiento fue de un color ligeramente más oscura que la del blanco reactivo en cada uno de los tratamientos (Figura 9).

Se realizaron pruebas para identificar las causas de la interferencia en el análisis de DPPH. La Figura 10.A, muestra los resultados que se esperarían encontrar en un análisis de DPPH (A), en este caso se utilizó ácido gálico a concentraciones de 1000 , 500 , 250 , 125 , 62.5 , 31.2 y $0 \mu\text{g mL}^{-1}$, como control positivo en la reacción. En la Figura 10.B, se muestran los resultados de la prueba realizada para identificar si la interferencia se encontraba en el medio de cultivo. Se utilizó por separado cada uno de los nutrientes adicionados al medio “f” y se realizó para cada caso una prueba de la reacción con el radical DPPH. Para esta prueba, se utilizó el volumen indicado en la metodología establecida por Brand-Williams *et al.* (1995) para la evaluación de actividad antioxidante por el método de DPPH. En la Figura 10.B, se muestra también la coloración de la reacción del radical DPPH y mezcla de nutrientes del medio de cultivo “f”, las proporciones en las que se adicionó la mezcla de nutrientes se hicieron según lo establecido por Guillard y Ryther (1962).

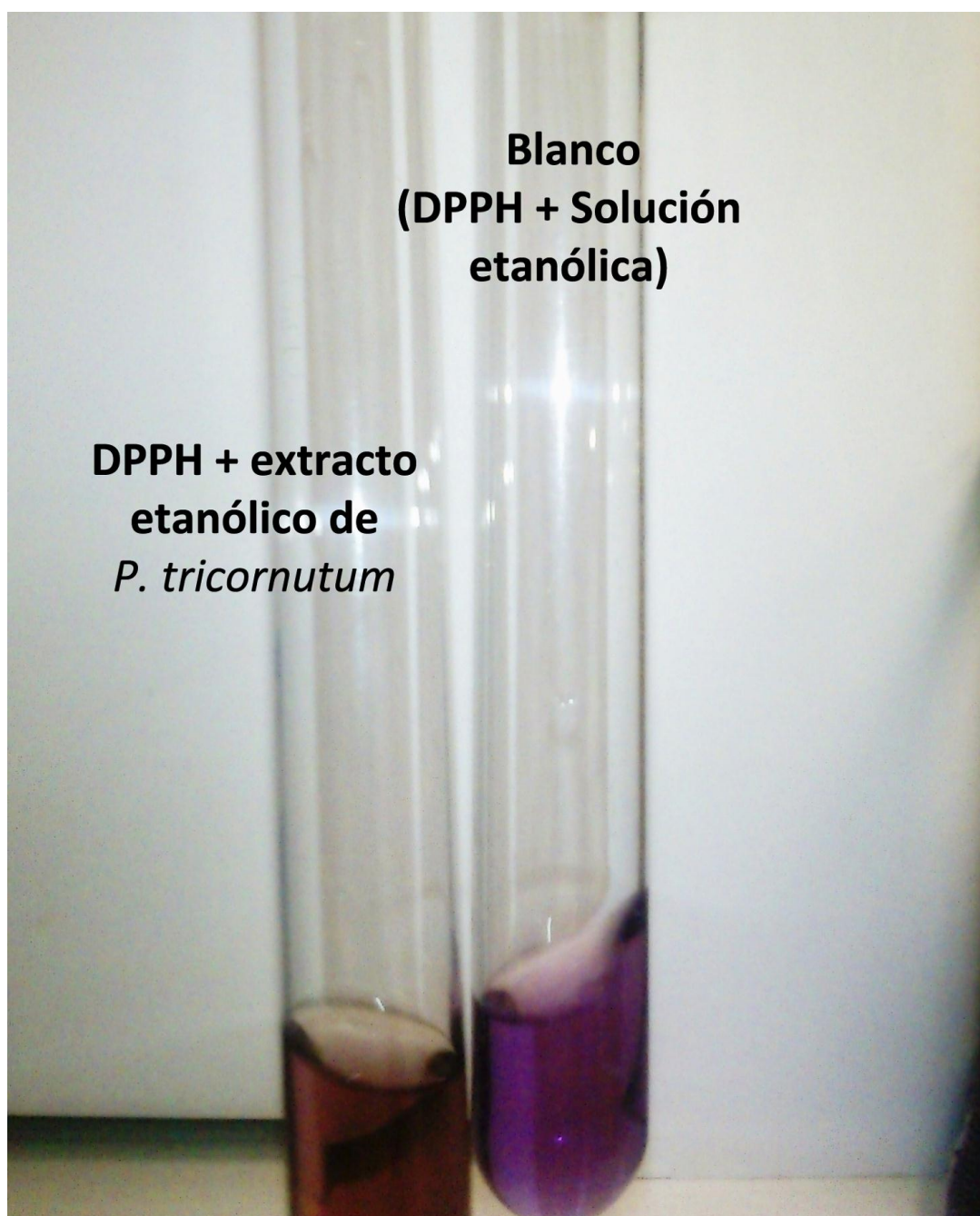


Figura 9. Coloración del radical DPPH + extractos etanólicos de *Phaeodactylum tricornutum*. Muestra seleccionada al azar de pruebas de la reacción de DPPH + extractos etanólicos (tubo izquierdo) y el tratamiento control de reactivo (DPPH+ solución etanólica) (tubo derecho).

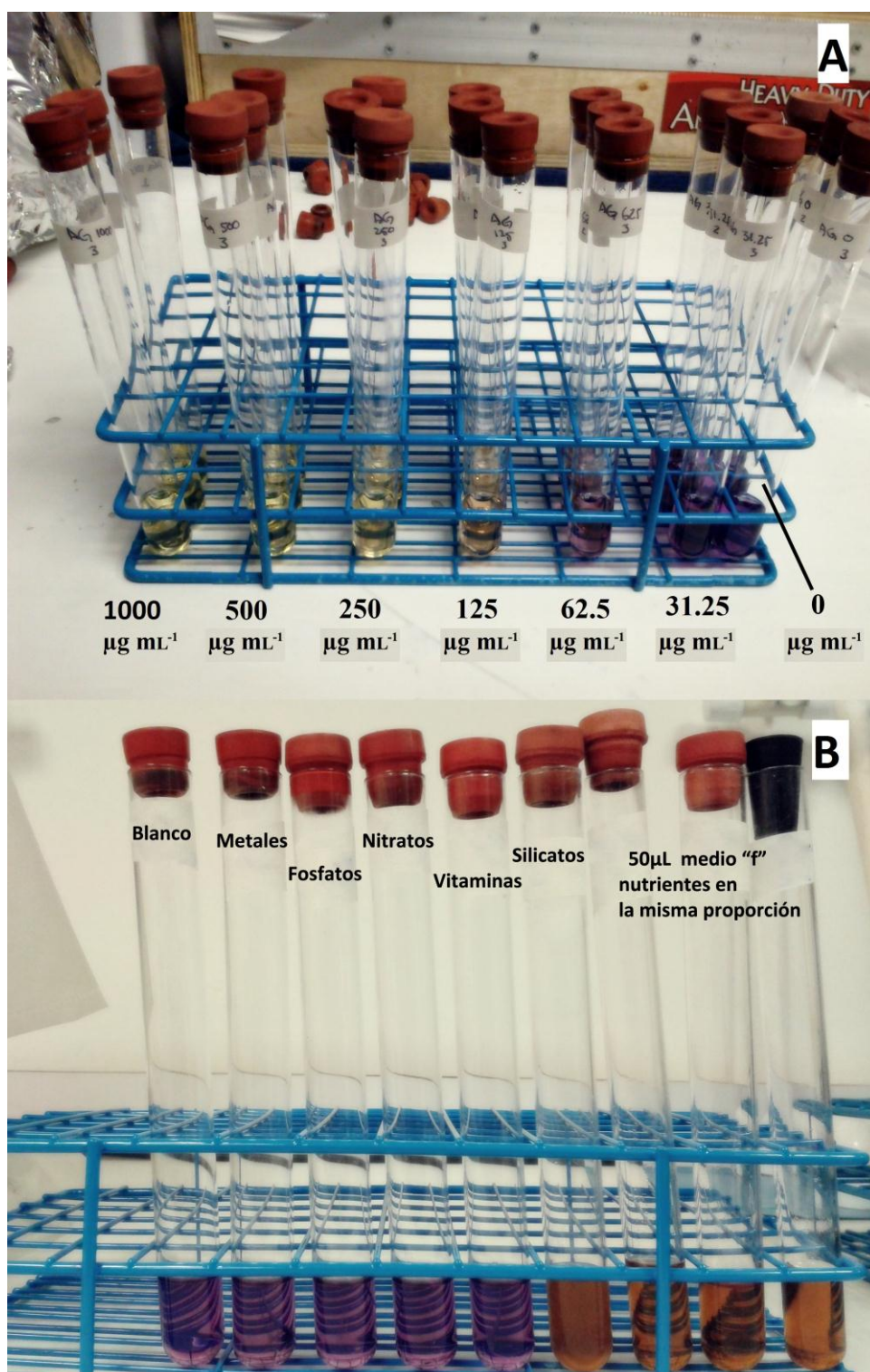


Figura 10. Evaluación de actividad antioxidante por el método de DPPH. (A) Coloraciones esperadas en un análisis de DPPH usando ácido gálico como control positivo de la reacción a concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2 y 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. (B) Prueba de actividad antioxidante utilizando los nutrientes del medio "f" con el radical DPPH. Cada nutriente (o agua en caso del blanco) se agregó a un volumen de 50 μL según lo indicado en el método de DPPH. La mezcla de nutrientes de medio "f" (últimos tres tubos a la derecha) se preparó según lo establecido por Guillard y Ryther (1962).

Capítulo 6

Discusión

6.1. Efecto de la temperatura y de la irradiancia

6.1.1. Crecimiento

Diversos estudios relacionados con el crecimiento de microalgas tanto en el medio natural, como *in vitro*, muestran que el crecimiento es modificado por las variables ambientales (Dubinsky *et al.*, 1985; Andersen, 2005). La temperatura de cultivo de 20 °C con irradiancias de 50 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *Phaeodactylum tricornutum* inducen a una mayor biomasa celular a tiempos de generación más cortos y se tienen las mayores tasas de crecimientos respecto a las otras condiciones experimentales utilizadas. La intensidad de la luz y la temperatura determinan el crecimiento de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* y sostienen una estrecha relación que varía según el grado en que cambian ambas variables. Fawley (1984), realizó un estudio con *Phaeodactylum tricornutum* con altas y bajas irradiancias (208 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 7 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y en rangos de temperatura entre 14 y 25 °C y encontró una relación directamente proporcional entre el efecto de la irradiancia y el de la temperatura en relación a la tasa de crecimiento de esta especie de microalga. Por lo anterior, en el presente trabajo también se modificó la duración de la fase exponencial de crecimiento en las distintas condiciones experimentales y fue menor con la mayor cantidad de luz utilizada en los ensayos (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y con las tres temperaturas experimentales (20, 25 y 30 °C).

Ruivo *et al.* (2011) evaluaron el crecimiento de siete distintas especies de microalgas, entre éstas *Phaeodactylum tricornutum* cultivado con medio “f/2” a 19 ± 1 °C a irradiancias de 20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz y encontraron que para *Phaeodactylum tricornutum* la fase exponencial tuvo una duración de entre 3 y 4 días y alcanzó una densidad celular máxima aproximada en la fase estacionaria de 14×10^6 cél. mL^{-1} . Los valores reportados por este autor resultan similares a los encontrados en el presente trabajo (14×10^6 cél. mL^{-1}) (Tabla A2) para la misma especie al cultivarse con mayor cantidad de nutrientes (medio “f”) y de luz (50 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Kräbs y Buchel (2011) analizaron la capacidad de adaptación de *Phaeodactylum tricornutum* a cambios abruptos en distintas condiciones ambientales y encontraron era capaz de crecer a cambios extremos en la temperatura y la salinidad, incluso demostraron que a pesar de estos cambios *Phaeodactylum tricornutum* tenía la capacidad de continuar creciendo cuando los valores de salinidad y temperatura eran llevados nuevamente a los valores estándar de cultivo (20 °C y 35 UPS).

Li y Morris (1982) calcularon la tasa de crecimiento de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* en cultivos mantenidos con medio “f/2”, a irradiancia de $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con intervalos de temperatura de entre 5 y 30 °C y concluyeron que la mayor tasa de crecimiento se alcanza en los cultivos que permanecían a 20 °C de temperatura, lo que genera mayor número de biomasa celular. Los resultados obtenidos para el presente trabajo de investigación muestran una respuesta de crecimiento similar para *Phaeodactylum tricornutum* en condiciones de temperatura similares a las utilizadas por los autores antes mencionados, esto fue a pesar de utilizar el doble de la cantidad de nutrientes disponibles en el medio de cultivo (medio “f”), que la descrita por Li y Morris (1982) (medio “f/2”).

Las irradiancias seleccionadas para *Phaeodactylum tricornutum* para los diferentes tratamientos de temperatura no causaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento. Bartual *et al.* (2002) demostraron, con cepas de *Rhodomonas salina*, que al variar las condiciones de irradiancia en cultivos en medio “f/2” no había diferencias significativas en las tasas de crecimiento de este microorganismo. Dubinsky *et al.* (1995) describen la capacidad de fotoaclimatación del fitoplancton como respuesta adaptativa a los cambios en la luz por efecto de variaciones naturales en el medio ambiente a las que estos microorganismos se encuentran constantemente expuestos, básicamente este proceso se refiere a la optimización en el uso de la luz disponible que el alga realiza para la biosíntesis de compuestos necesarios para su crecimiento y desarrollo.

6.1.2. Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico

El peso seco total y el peso seco orgánico se vieron modificados por efecto de la temperatura, obteniendo el valor mayor para los tratamientos a temperaturas de 20 y 25 °C. Flores (1998) indica que existe una respuesta especie-específica en la generación de biomasa por efecto de la temperatura. Jiang y Gao (2004) encontraron que para cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* enriquecidos con nutrientes y en distintas temperaturas, se obtuvo la mayor cantidad de biomasa a 20 °C. Estos resultados coinciden con lo encontrado en este trabajo para *Phaeodactylum tricornutum*, ya que la mayor biomasa obtenida se encontró en los tratamientos a temperaturas de 20 °C (Tabla A2).

6.1.3. Lípidos

El porcentaje de lípidos en *Phaeodactylum tricornutum* se vio afectado por la temperatura, obteniendo mayores porcentajes de lípidos a medida que la temperatura se incrementó para los tratamientos mantenidos con las dos irradiancias utilizadas (50 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En un experimento realizado por Rousch *et al.* (2003) midieron el porcentaje de lípidos en *Phaeodactylum tricornutum* a temperaturas de 24, 30, 35 y 40 °C y encontraron que el porcentaje de lípidos se incrementó en los tratamientos expuestos a temperaturas de 30 °C en comparación con los tratamientos a 24 °C, además encontraron que el porcentaje de lípidos era igual en los tratamientos mantenidos a 35 y 40 °C.

La cantidad de luz a la que la microalga *Phaeodactylum tricornutum* es expuesta influye directamente en el porcentaje de lípidos que produce. Los valores mayores se encontraron en este trabajo en los tratamientos con irradiancias de 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Wagenen *et al.* (2012) analizaron el efecto de la luz y la temperatura sobre la producción de ácidos grasos en cultivos de *Nannochloropsis salina* y encontraron que el contenido total de ácidos grasos puede incrementar exponiendo a *Nannochloropsis salina* a un estrés foto oxidativo.

6.2. Efecto de la concentración de nitratos y de la irradiancia

6.2.1. Crecimiento

Los cultivos con tratamientos a menor concentración de nitratos no presentaron diferencias significativas en el crecimiento en comparación con el resto de las concentraciones de nitratos entre tratamientos a una misma condición de irradiancia, tanto para los tratamientos con 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como para los tratamientos con 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia. Nigam *et al.* (2011) realizaron un estudio con cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* donde analizaron diferentes concentraciones de nitratos en el medio (0.1, 0.2 y 0.4 g L^{-1}) y encontraron que la concentración de biomasa de la microalga aumentaba conforme la concentración de nitratos era menor.

Los valores mayores de tasa de crecimiento para *Phaeodactylum tricornutum* se encontraron en el tratamiento de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a la menor concentración de nitratos (37.5 g L^{-1}), sin embargo no presentó diferencias significativas entre las demás concentraciones de nitratos en esta misma irradiancia, se observó un comportamiento similar en los tratamientos a 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Raimbault y Gentilhomme (1990) analizaron los parámetros de crecimiento en la microalga *Phaeodactylum tricornutum* cultivada en diferentes concentraciones de nitrato, y encontraron que esta diatomea es capaz de tomar concentraciones de nitratos menores y metabolizarlas a

tasas de crecimiento más elevadas que las estándar durante todo el periodo de consumo de nitrato. Esta capacidad de metabolizar los compuestos nitrogenados es una posible explicación para los valores mayores de densidad celular evaluadas en las bajas concentraciones de nitratos utilizadas para los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* en este trabajo.

6.2.2. Peso seco total, contenido de cenizas y peso seco orgánico

La cantidad de biomasa producida se ve afectada por factores tales como la temperatura, la irradiancia y la concentración de nitratos, entre otras variables (Fawley, 1984). En el estudio realizado por Nigam *et al.* (2011), encontraron una relación proporcional de la cantidad de biomasa producida en *Chlorella pyrenoidosa* cuando el contenido de nitratos se encontraba en escasez. Sin embargo, las concentraciones de nitratos utilizados en su trabajo oscilaron entre los rangos de 0 y 0.4 g L⁻¹.

En el presente trabajo con *Phaeodactylum tricornutum* la concentración mínima de nitratos utilizada fue de 37.5 g L⁻¹ y la más alta fue de 150.0 g L⁻¹, por lo que posiblemente la microalga en estudio no se encontraba en situación de estrés en relación a la escasez de nitrógeno, por lo que seguramente es la razón por la cual peso seco total (PST), el contenido de cenizas y el peso seco orgánico no tuvo diferencias significativas en la mayor parte de los tratamientos utilizados.

6.2.3. Lípidos

La producción de lípidos en microalgas se ve afectada por diversos factores pero uno de los más representativos es la limitación de nitrógeno, lo que causa un estado de estrés en las células de las microalgas lo que normalmente produce ruptura de carbohidratos y proteínas los cuales son utilizados por la microalga para la producción de lípidos (Feng *et al.*, 2011).

El porcentaje de lípidos se vio incrementado al utilizar la concentración estándar de nitratos en el medio de cultivo “F” (75 g L⁻¹) tanto en el tratamiento con irradiancia de 50 como el de 100 μE m⁻² s⁻¹. En un estudio realizado por Huang *et al.* (2013) donde midieron entre otras variables el contenido total de lípidos en las microalgas *Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* y *Pavlova viridis* encontraron que la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo “f/2” incrementaba el contenido total de lípidos en estas tres especies. Sin embargo en el presente trabajo no se observó esto ya que el mayor porcentaje de lípidos no se obtuvo a la menor concentración de nitratos.

Feng *et al.* (2011) elaboraron un estudio con la microalga *Ischrysis zhangjiangensis* en donde determinaron la mayor producción de lípidos de esta microalga complementando el medio de cultivo “f/2” con diferentes tiempos de administración de nitratos (24, 48 y 72 h). En los resultados muestran que al adicionar nitratos a intervalos de 24 horas de suplemento, tuvieron una mayor producción de lípidos de aproximadamente 6% mayor con respecto a las suplementadas en intervalos de 48 horas y 10% mayor que aquellas a intervalos de 72 horas. En el presente estudio la mayor producción de lípidos se dio a las concentraciones estándares de nitrógeno para el medio “F” y posiblemente (al igual que para los valores de peso seco) la concentración de nitratos suplementado en los tres tratamientos (37.5, 75 y 150 g L⁻¹) no fue suficiente para producir un estrés para *Phaeodactylum tricornutum* y que en consecuencia se incrementaran la producción de lípidos.

6. 3. Fenoles totales

Los compuestos fenólicos en las microalgas cumplen un rol importante dentro las reacciones oxigénicas que se llevan a cabo en la célula, dado que estos compuestos son capaces de donar átomos de hidrógeno o electrones con el fin de formar compuestos radicales estables previniendo daño celular (Hajihmamoodi *et al.*, 2010).

En un trabajo realizado por El Baz *et al.* (2002) utilizando *Dunaliella salina* en medio de cultivo WC modificado a una concentración alta y una baja concentración de nitrógeno (0.07 y 0.005 g L⁻¹) encontraron que en condiciones de reducción de nitrógeno *Dunaliella salina* tiene una producción de antioxidantes tales como tocoferoles y otras vitaminas antioxidantes en comparación con los cultivos en donde la concentración de nitrógeno era mayor. En este estudio también encontraron una relación directa entre el aumento en la irradiancia de mantenimiento de los cultivos y el porcentaje de tocoferoles en esta especie de microalga. Cabe destacar, que los autores solo mencionan mantener los cultivos con 100 Watts.

En el presente estudio se encontró que para *Phaeodactylum tricornutum* mantenido en los tratamientos en donde el contenido de nitratos era menor (37.5 g L⁻¹) el contenido de fenoles totales fue mayor en las dos condiciones de irradiancia utilizadas. En un estudio realizado por Písal y Lele (2005), encontraron que para cultivos de *Dunaliella salina* en medio WC bajo condiciones de estrés de nitrógeno (0 g L⁻¹), el contenido de carotenos se incrementó aproximadamente seis veces más en comparación con los medios de cultivo a concentraciones estándar de nitratos (medio “F”) utilizados para el crecimiento de esta especie de microalga.

Goiris *et al.* (2012) publicaron un estudio en el cual evaluaron el potencial antioxidante y la relación de este con el contenido de fenoles y carotenos totales en distintas especies de microalgas, entre ellas cuatro cepas de *Phaeodactylum tricornutum*. En este trabajo encontraron que el contenido de fenoles totales para tres de estas cepas de *Phaeodactylum tricornutum* (cultivadas en bioreactores con medio de cultivo WC e irradiancias de $125 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) el contenido de fenoles totales varió entre 2.26 y 3.14 mg equivalentes de ácido gálico, siendo estos muy similares a los resultados encontrados en el presente estudio.

6.4. Evaluación de actividad antioxidante por el método TEAC (por sus siglas en inglés Trolox Equivalent Antioxidant Activity)

En un trabajo realizado por Tournebize *et al.* (2013) en donde registran los fallos cometidos comúnmente en ensayos dedicados a evaluar estrés oxidativo o bien medir la actividad antioxidante, exponen (entre otros problemas) las interferencias causadas por componentes derivados del silicio en análisis colorimétricos de evaluación antioxidante como TEAC y DPPH. Ellos mencionan que la interferencia puede ser causada por compuestos tales como nanopartículas inorgánicas, entre ellas nanopartículas de silicio, este problema se da al modificar los indicadores presentes en los métodos, causando interferencia óptica. En el presente trabajo de investigación, los datos obtenidos para el análisis de evaluación antioxidante medido por el método de TEAC, se encontró que la cinética de reacción entre el radical ABTS y los extractos etanólicos de *Phaeodactylum tricornutum* ocurrió de manera muy lenta, alcanzando en algunos casos tiempos mayores a las 2 horas de reacción, cuando en la bibliografía reportada para este análisis los valores máximos son de 20 minutos (Re *et al.*, 1999; Floegel *et al.*, 2011) y para muestras de microalgas los valores máximos de tiempo de reacción son de 6 minutos (Li *et al.*, 2007; Hajimahmodi *et al.*, 2010), por lo que se cree que los silicatos presentes en el medio de cultivo “f” causan interferencia en la cinética de reacción del análisis de TEAC.

6.5. Evaluación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Los resultados obtenidos con *Phaeodactylum tricornutum* mostraron un efecto de interferencia del radical DPPH con los extractos etanólicos de todos los tratamientos y que fue de manera diferente a los encontrados en el ensayo de TEAC. En este análisis no hubo pérdida de color del radical, pero sí se encontró que al agregar el extracto de *Phaeodactylum tricornutum* (sin importar a qué concentración o valor de pH final), la mezcla resultante tomaba un color inusual para esta reacción ya que cambió de un color violeta a un color café oscuro (Figura 9). En estos análisis se registraron lecturas de absorbancia ligeramente mayores que las obtenidas en

el tratamiento control o blanco (Solución de DPPH + solución etanólica (50% etanol: 50% agua destilada), Figura 8).

Al-Dabas *et al.* (2007) evaluaron el efecto de diferentes sales inorgánicas (en diferentes concentraciones) en el análisis de la actividad antioxidante medida por el método del DPPH. Estos autores encontraron que algunas de estas sales presentaron inhibición frente al radical DPPH, sin embargo cuatro de las sales probadas ($MgCl_2$, $CaCl_2$, K_2SO_3 y K_2SO_4) incrementaron ligeramente la intensidad del color del radical DPPH. En los resultados encontrados en el presente trabajo se corroboró esta interferencia con sales de silicio (Figura 10).

Se realizaron pruebas a diferentes concentraciones de extractos etanólicos y de radical DPPH, se midió también el pH de las reacciones resultantes y esta variable se mantenía en los rangos reportados en la literatura en que la reacción se lleva a cabo de manera adecuada (pH entre 5.0 y 6.5; Molineux, 2004). Sin embargo, el resultado por observación visual y el obtenido al medir la absorbancia de estas pruebas resultaban similares, donde la absorbancia marcada era mayor que la del blanco, indicando que no existía inhibición en ninguna de las pruebas, o posiblemente (como se aprecia en la Figura 11) los silicatos del medio de cultivo “f” interfieren con el análisis de actividad por el método del radical DPPH.

Los resultados anteriores muestran que *Phaeodactylum tricorutum* es una diatomea capaz de modificar sus procesos bioquímicos y adaptarse a cambios fisicoquímicos en su entorno, tales como cambios en luz disponible, diferentes temperaturas y cambios en concentración de nitratos, y que al variar estas mismas condiciones, es posible variar a su vez la producción de compuestos tales como lípidos, fenoles totales, tasa de crecimiento y por lo tanto mayor producción de biomasa en los cultivos de *Phaeodactylum tricorutum*, característica que podría ser aprovechada a gran escala si se considera utilizar a esta especie para distintas aplicaciones biotecnológicas y acuícolas.

Conclusiones

Las tasas de crecimiento evaluadas para *Phaeodactylum tricornutum* se modificaron por efecto de la temperatura (20, 25 y 30 °C) y resultaron en valores mayores al mantener los cultivos a 20 °C a las dos irradiancias utilizadas (50 y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Los mayores valores de producción de biomasa evaluados como peso seco orgánico para *Phaeodactylum tricornutum*, se obtuvieron al mantener los cultivos a 25 °C y 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a 20 °C y 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los menores valores de biomasa se tuvieron con ambas irradiancias y con la temperatura de 30 °C.

El contenido de lípidos para *Phaeodactylum tricornutum* se modificó por efecto de la temperatura y de la irradiancia, los valores mayores se tuvieron en los cultivos expuestos a 30 °C y 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La tasa de crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* no se modificó por efecto de la concentración de nitratos disponibles en el medio y ni por efecto de la irradiancia. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos exceptuando el tratamiento a concentraciones de nitratos de 37.5 g L⁻¹ e irradiancia de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

No hubo diferencias significativas en la cantidad de biomasa producida en los cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* al modificar la concentración de nitratos disponibles en el medio. Los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos para los valores de peso seco total. El porcentaje de lípidos se modificó al cambiar la disponibilidad de nitratos en el medio de cultivo de *Phaeodactylum tricornutum* y los valores mayores se tuvieron con la menor irradiancia (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con las tres concentraciones de nitratos utilizadas.

La concentración de fenoles para *Phaeodactylum tricornutum* se modificó por efecto de la concentración de nitratos en el medio y por la irradiancia. El valor mayor correspondió a la menor concentración de nitratos (37.5 g L⁻¹) y la menor irradiancia (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

La actividad antioxidante no pudo ser evaluada debido a que se encontraron interferencias químicas, posiblemente por efecto de los silicatos que afectaron el análisis de la actividad antioxidante por el método del radical libre.

Recomendaciones

El medio de cultivo “f” de Guillard y Ryther (1962) (en específico los silicatos) causa interferencia con la reacción de evaluación de la actividad antioxidante por medio de radicales libres, se recomienda utilizar otro medio de cultivo donde se conozca que *Phaeodactylum tricornutum* tenga buen crecimiento y no presente esta interferencia con la evaluación de la actividad antioxidante.

Elaborar un diseño experimental en donde el contenido de nitratos ocasione un mayor nivel de estrés en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* utilizando en los tratamientos experimentales un ensayo con carencia de aporte de nitrógeno en el medio.

Se recomienda evaluar el efecto de la irradiancia en valores mayores a $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y conocer el efecto de esta variable en los parámetros de crecimiento, composición proximal, antioxidantes y contenido de fenoles totales.

Optimizar el proceso de extracción de compuestos antioxidantes de los liofilizados de la biomasa microalgal, utilizando técnicas de mayor recuperación de compuestos como por ejemplo, extracción de fluidos supercríticos.

Realizar cultivos en bioreactores que permitan un sistema de aireación y suministro de CO_2 para obtener mayor rendimiento en cantidad de biomasa y mayor volumen de cultivo.

Hacer cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* con fotoperiodos de luz y oscuridad para evaluar el efecto de esta variable respecto al crecimiento, el peso seco, el contenido de lípidos y en la actividad antioxidante.

Referencias bibliográficas

- Al-Dabas, M.M., Al-Ismail, K., Kitahara, K., Chishaki, N., Hashinaga, F., Suganuma, T., Tadera, K. 2007. The effect of different inorganic salts, buffer systems, and desalting of *Varthemia* crude water extract on DPPH radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 104: 734-739.
- Allen, E.J. and E.W. Nelson. 1910. On the artificial culture of marine plankton organisms. *Journal of the Marine Biological Association UK*. 8: 421–474.
- Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Academic Press, Amsterdam. 578 pp.
- Akoh, C., Min, D. 2002. *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. 2nd ed. Ed. Marcel Dekker. 840 pp.
- Bartual, A., Lubián, L.M., Gálvez, J.A., Niell, F.X. 2002. Effect of irradiance in growth, photosynthesis, pigment content and nutrient consumption in dense cultures of *Rhodomonas salina* (Wislouch) (Cryptophyceae). *Ciencias Marinas*. 28(4):381-392.
- Bitaubé, P.E., Pina, C.I., Pérez, R. 2008. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 40: 520-525.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Journal of Biochemistry & Physiology*. 37:911-917.
- Bohlin, K. 1897. Zur Morphologie und Biologie einzelliger Algen. *Öfvers. Kongl. Vetens. Akad. Förh.* 9: 507–529.
- Bourassa, M. 2006. *Antioxidants and Cardiovascular Disease*. 2nd ed. Ed. Springer Science-i-Business Media, Inc. United States of America. 494 pp.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*. 28: 25-30.

- Chiaverini, J. 1972. Techniques d'extraction et d'analyse des lipides. Université de Paris et Marie Curie, Paris. Station Zoologique Ville France sur mer. Notes de Travail 12. 12 pp.
- Christi, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294-306.
- De Martino, A., Bartual, A., Willis, A., Meichenin, A., Villazán, B., Maheswari, U., Bowler, C. 2011. Physiological and molecular evidence that environmental changes elicit morphological interconversion in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protist*. 162: 462-481.
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R., Karube, I. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology*. 2:61-65.
- El Baz, F.K., Aboul-Enein, A.M., El-Baroty, G.S., Youssef, A.M., Abdel-Baky, H.H. 2002. Accumulation of antioxidant vitamin in *Dunaliella salina*. *Journal of Biological Sciences*. 2(4): 220-223.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud). 1997. Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición – 57. Roma. <http://www.fao.org/docrep/v4700s/v4700s00.htm#Contents>, recuperado 12/09/13.
- Falkowski, P.G. y Knoll, A.H. 2008. Evolution of Primary Producers in sea. Ed. Elsevier inc. United States of America. 206 pp.
- Fawley, M.W. 1984. Effect of light intensity and temperature interactions on growth characteristics of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 20: 67-72.
- Fennema R., Bernabé P., James B. 2000. Química de los Alimentos. 2nd. ed. Ed. Acriba. España. 1258 pp.

- Feng, D., Chen, Z., Xue, S., Zhang, W. 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology*. 102: 6710-6716.
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S.I., Chun, O. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assay to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:1043-1048.
- Flores, V.C. 1998. Crecimiento y composición bioquímica de microalgas bentónicas cultivadas bajo diferentes condiciones de temperatura e intensidad de luz. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 130 pp.
- Fogg, G.E., Thake, B.J. 1987. *Algal Culture and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, London. 266 pp.
- Francius, G., Tesson, B., Dague, E., Martin-Jézéquel, V., Dufrene, Y.F. 2008. Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environmental Microbiology*. 10(5): 1344-1356.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., Brabanter, J.D. y Cooman, L.D. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their fenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*. 24: 1477-1486.
- Gouveia, L. 2011. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Ed. Springer. United States of America. 69 pp.
- Guedes, A.C., Amaro, H. M., Malcata, F.X. 2011. Microalgae as source of carotenoids. *Marine Drugs*. 9:625-644.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Journal of Microbiology*. 8:229-239.

- Hajihmamoodi, M., Faramarzi, A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., Nafissi-Varcheh, N. 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic content of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 22: 43-50.
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K., Webley, P.A. 2011. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 102: 178-185.
- Hall, D.O., Ación, F.F.G., Cañizares, G.E., Krishna, R. K., Molina, G.E. 2003. Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: Modeling of fluid-dynamics and mass transfer and assessment of biomass productivity. *Biotechnology and Bioengineering*. 82: 62-73.
- Huang, X., Huang, Z., Wen, W., Yan, J. 2013. Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). *Journal of Applied Phycology*. 25:129–137.
- Jiang, H., Gao, K. 2004. Effect of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 40: 651-654.
- Kräbs, G., Büchel, C. 2011. Temperature and salinity tolerances of geographically separated *Phaeodactylum tricorutum* Böhlin strains: maximum quantum yield of primary photochemistry, pigmentation, proline content and growth. *Botanica Marina*. 54:231-241.
- Lewin, J.C., Lewin R.A., Philpott, D.E. 1958. The taxonomic position of *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of General Microbiology*. 18:427–432.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. 102: 771–776.

- Li, W.K.W., Morris, I. 1982. Temperature adaptation in *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: Photosynthetic rate compensation and capacity. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology* 58: 135-150.
- Liangli, Y. 2008. *Wheat Antioxidants*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. United States of America. 275 pp.
- Lohrey, C., Kochergin, V. 2012. Biodiesel production from microalgae: Co-location with sugar mills. *Bioresource Technology*. 108: 76-82.
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Miyashita, H., Yokouchi, H. 2005. Marine microalgae. *Advances in Biochemistry Engineering / Biotechnology*. 96: 165-188.
- Molineux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenilpicrylhydrazyl (DPPH) for the estimating of antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*. 26(2):211-219.
- Nigam, S., Rai, M.P., Sharma, R. 2011. Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 7 (3): 124-129.
- Niki, E. 2010. Assesment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*. 49:503-515.
- Pande, S.V., Parvin, R.K., Venkitasubramanian, T.A. 1963. Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry* 6:415-423.
- Pisal, D.S. y Lele, S.S. 2005. Carotenoid production from microalga *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology*. 4: 476-483.
- Raimbault, P., Gentilhomme, V. 1990. Short- and long-term responses of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* to spike addition of nitrate at nanomolar level. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 135: 161-176.
- Rappoport, Z. 2003. *The Chemistry of Phenols*. Ed. Wiley. Jerusalem. 1506 pp.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9-10):1231-1237.
- Rodríguez-García, G.I., Guil-Guerrero, G.L. 2008. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry*. 108:1023-1026.
- Rousch, J.M., Bingham, S.E., Sommerfeld, M.R. 2003. Changes in fatty acids profiles of thermo-intolerant and thermo-tolerant marine diatoms during temperature stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 295: 145-156.
- Ruivo, M., Amorim, A., Cartaxana, P. 2011. Effects of growth phase and irradiance on phytoplankton pigment ratios: implications for chemotaxonomy in coastal waters. *Journal of Plankton Research*. 33(7):1012-1022.
- Sánchez, E., Ojeda, K., El-Halwagi, M., Kafarov, V. 2011. Biodiesel from microalgae oil production in two sequential esterification/transesterification reactors: pinch analysis of heat integration. *Chemical Engineering Journal*. 176-177:211-216.
- Santacruz, C.L.A. 2011 Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 97 pp.
- Scala, S., Carels, N., Falciatore, A., Chiusano, M.L., Bowler, C. 2002. Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology*. 129:993-1002.
- Shanab, S.M.M., Mostafa, S.S.M., Shalaby, E.A., Mahmoud, G.I. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 608-615 pp.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.

- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-344. En: Stein, J. (ed). Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge University Press, London. 448 pp.
- Stein, J.R. 1973. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press. London. 448 pp.
- Tournebize, J., Sapine-Minet, A., Bartosz, G., Leroy, P., Boudier, A. 2013. Pitfalls of assay devoted to evaluation of oxidative stress induced by inorganic nanoparticles. Talanta. 116: 753-763.
- Wagenen, J.V., Miller, T.W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, P., Huesemann, M. 2012. Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. Energies. 5: 731-740.
- Wilson, D.P. 1946. The triradiate and other forms of *Nitzschia closterium* (Ehrenberg) Wm. Smith, forma *minutissima* of Allen and Nelson. Journal of the Marine Biological Association UK. 24: 235-27.
- Zapata, C.J.C. 2012. Obtención de una Nueva Serie de Compuestos Pirrólicos y Estudio Teórico de su Potencial Actividad Antioxidante. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Escuela Química Medellín, Colombia. 136 pp.

Anexos

Tabla A1. Valores promedios de la absorbancia (680 nm) y de densidad celular tomados en consideración para calcular una curva de calibración para cultivos de *Phaeodactylum tricornutum*.

Número de dilución	Concentración celular $\times 10^6$ (cél. mL ⁻¹)	Absorbancia
1	9.75	0.251
2	8.01	0.220
3	7.02	0.191
4	6.30	0.164
5	5.39	0.137
6	4.30	0.113
7	3.75	0.088
8	2.69	0.065
9	1.93	0.044
10	1.05	0.022

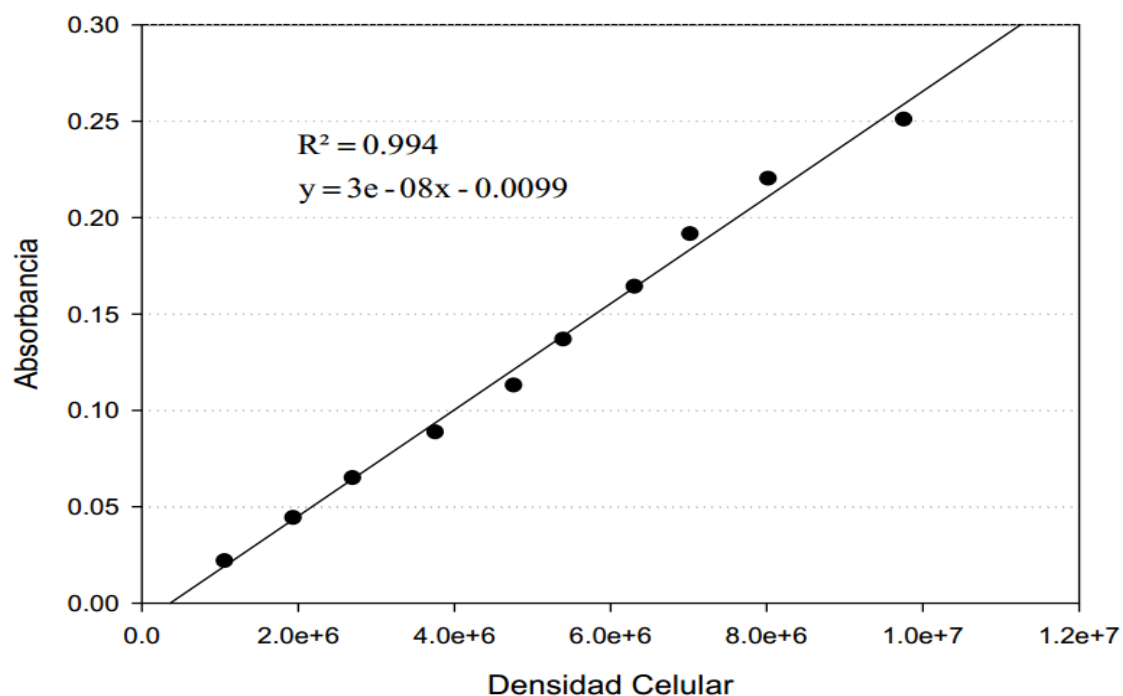


Figura A1. Curva de calibración con los valores de absorbancia y densidad celular para cultivos de *Phaeodactylum tricornutum*.

Tabla A2. Valores promedio y desviación estándar del número de células ($\times 10^6$) por día obtenidas en cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* mantenidos en distintas condiciones de cultivo.

Días	$50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$			Días	$100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$		
	20 °C	25 °C	30 °C		20 °C	25 °C	30 °C
*0	0.86	0.86	0.86	*0	0.86	0.86	0.86
1	1.37	1.18	1.28	1	1.38	1.21	1.30
2	2.46	1.63	1.75	2	2.57	1.86	2.03
3	6.83	3.50	3.54	3	6.77	5.55	5.63
4	8.60	7.84	6.76	4	8.51	7.45	6.95
5	9.68	9.17	8.04	5	9.59	8.41	8.17
6	10.66	10.07	9.05	6	10.44	9.46	8.98
7	11.49	10.91	9.74	7	11.24	10.23	10.11
8	12.39	11.83	10.49	8	12.04	10.99	10.68
9	13.24	12.60	11.16	9	12.78	11.65	10.68
10	13.94	13.35	11.76	10	13.40	12.34	11.24

* Se tomaron muestras al azar al tiempo cero de cultivo y se promedió debido a que todos los tratamientos se inocularon con el mismo número de células.