



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN
CELULAR, BIOMASA Y CONTENIDO DE
COMPUESTOS FENÓLICOS DE CUATRO
ESPECIES DE MICROALGAS MARINAS
CULTIVADAS EN CONTENEDORES DE
DIFERENTE MATERIAL.**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

ANA LUCÍA GÓMEZ RAMÍREZ

Hermosillo, Sonora, México

Diciembre de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR,
BIOMASA Y CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS
DE CUATRO ESPECIES DE MICROALGAS MARINAS
CULTIVADAS EN CONTENEDORES DE DIFERENTE
MATERIAL**

TESIS

**Que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOCIENCIAS**

Presenta:

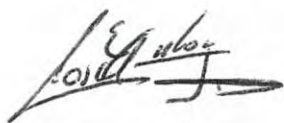
Biol. Ana Lucía Gómez Ramírez

Hermosillo, Sonora.

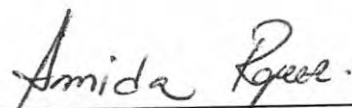
Diciembre de 2014

Forma de Aprobación

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada **Análisis del contenido de compuestos fenólicos, biomasa y crecimiento de cuatro especies de microalgas cultivadas en recipientes con distintas características ópticas** presentada por la alumna **Ana Lucía Gómez Ramírez**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



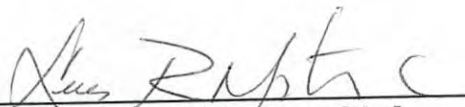
Dr. José Antonio López Elías
Director de Tesis y Presidente del Jurado



M. C. Armida Rodríguez Félix
Co- Directora de Tesis y Sinodal Eterno



Dr. Luis Fernando Enríquez Ocaña
Sinodal Interno



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova
Secretario del Jurado

DEDICATORIA

A mis padres

A mi amor, Osbaldo

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero dar gracias a Dios por darme los elementos necesarios que me permitieron cumplir una meta tan anhelada.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, a la **Universidad de Sonora** y al **Posgrado en Biociencias** por darme las herramientas necesarias para mi formación profesional y por ofrecerme la oportunidad de interactuar con excelentes profesores e investigadores para llegar a esta meta.

A mi director de tesis, **Dr. José Antonio López Elías**, por darme la oportunidad de realizar este tema de tesis. En especial agradezco el brindarme su impulso para seguir adelante, su valioso tiempo y ayuda en la asesoría y corrección para la realización de este documento, así mismo por su gran compromiso ¡Muchas Gracias!

A los miembros de mi comité de tesis, **Dr. Luis Fernando Enríquez Ocaña**, **Dr. Luis Rafael Martínez Córdoba** y **M.C. Armida Rodríguez Félix**, por todos sus comentarios en la realización de este documento de tesis.

Gracias por todo el apoyo que recibí en el CIAD por parte de las maestras **Armida Rodríguez** y **Judith Fortis**, por toda la paciencia y asesoría brindada en mi estancia en su laboratorio.

Agradezco a mis maestros, **Álvaro** y **Lauro** por todo el apoyo que me han brindado siempre desde que llegue al laboratorio, mil gracias!

A mis compañeros y amigos del laboratorio, los cuales hicieron más alegre mi paso por el; **Diana Fimbres**, **Angélica**, **Diana Medina**, **Caro**, **David**, **Perla** y **Enrique**. No habría sido lo mismo sin ustedes y sus ocurrencias, gracias, gracias, gracias.

Gracias a mis Padres por todo el apoyo, paciencia, amor y comprensión que me han dado siempre en cada paso y aventura que he emprendido a lo largo de mi vida.

A Osbaldo por apoyar con paciencia y amor todas mis decisiones, gracias Amor!!

INDICE GENERAL

	PÁGINA
FORMA DE APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1 Importancia de las microalgas	1
1.2 Generalidades de las microalgas evaluadas	2
1.2.1 Descripción de la Clase <i>Chlorophyceae</i>	2
1.2.2 Descripción de la Clase <i>Bacilariophyceae</i>	2
1.3 Composición química de las microalgas	3
1.4 Sistemas de producción en microalgas	5
1.5 Efecto de iluminación en microalgas	7
1.6 Compuestos bioactivos	11
1.6.1 Compuestos fenólicos	12
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
II. OBJETIVOS	17
II.1. Objetivo general	17
II.1.1. Objetivos particulares	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
III.1. Selección de las especies y obtención de las cepas	18
III.2. Diseño experimental	18
III.3 Cultivo de microalgas	18
III.4. Conteos celulares	19

III.5. Floculación de los cultivos	19
III.6. Determinación de biomasa	19
III.7. Determinación de los compuestos fenólicos	20
III.7.1. Extracción de fenoles totales	21
III. 7.2. Cuantificación de fenoles totales mediante espectrofotometría	21
III.8. Análisis de datos	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
IV.1. Iluminación de los cultivos	23
IV.2 Concentraciones celulares	24
IV.3 Producción de biomasa	29
IV.4 Contenido de fenoles totales	30
V. CONCLUSIONES	34
VI. RECOMENDACIONES	35
VII. LITERATURA CITADA	36
VIII. APÉNDICE	44

RESUMEN

Es conocido que tanto algas como microalgas son productoras de compuestos antioxidantes como respuesta protectora al daño producido por estrés (radiación UV, variación de la temperatura, iluminación excesiva, entre otros). En el presente estudio, se evaluó la concentración celular, la biomasa final y el contenido de fenoles totales en cuatro especies de microalgas marinas: *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira weissflogii*, *Dunaliella tertiolecta* y *Tetraselmis chuii*. Los cultivos se realizaron por cuádruplicado bajo condiciones de laboratorio, en garrafones de vidrio transparente y de plástico azul y se hicieron conteos diarios de células entre los días 4 y 6. Los fenoles totales fueron extraídos con etanol al 100% y acetona al 70% y se cuantificaron mediante espectrofotometría. El número de células totales fue mayor en el recipiente de vidrio transparente (744,000 Cél/mL) que en el de plástico azul (596,000 Cél/mL). Independientemente del material del recipiente, el mayor número de células se encontró en las especies *Dunaliella tertiolecta* y *Chaetoceros muelleri* con 904,000 y 965,000 Cél/mL, respectivamente. La concentración de fenoles totales (mg EAG g⁻¹ peso seco) fue diferente por especie de microalga, sin embargo al contrastar los materiales de las unidades de cultivo no se encontraron diferencias significativas. En general se concluye que la producción de compuestos fenólicos y biomasa fueron mayores en los cultivos de las algas verdes, independientemente de las características ópticas del recipiente de cultivo.

ABSTRACT

It is well known that both algae and microalgae are producers of protective antioxidant compounds in response to damage for stress (UV radiation, temperature variation, excessive light and others). In the present study, the cell concentration, biomass and total phenol content in four species of marine microalgae: *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira weissflogii*, *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis chuii*, were evaluated. The cultures were done by quadruplicate under laboratory conditions, in carboy of clear glass and blue plastic. Counts of cells were done daily at days 4 to 6. Total phenols were extracted with ethanol 100% and acetone 70% and quantified by spectrophotometry. The total cell number was higher in the clear glass container (743.656 cells/mL) than in the blue plastic (595.781 cells/mL). Independently of the material of container, the greatest number of cells were found in the species *Dunaliella tertiolecta* and *Chaetoceros muelleri* with 904,000 and 965,000 cells/mL, respectively. The concentration of total phenols (mg EAG g⁻¹) was different for each species of microalgae, however, contrasting the material of the containers, no significant differences were found. It was concluded that the production of phenolic compounds and biomass were higher in cultures of green algae, independently of the optical characteristics of the culture containers.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Las capas del océano y sus diferentes profundidades	8
2	Transmitancia del material de los recipientes de vidrio transparente (a) y recipientes de plástico azul (b).	23
3	Concentraciones celulares diarias de los cultivos de algas verdes en garrafones de vidrio transparente y garrafones de plástico azul. a) <i>Dunaliella tertiolecta</i> , b) <i>Tetraselmis chuii</i> .	27
4	Concentraciones celulares diarias de los cultivo de diatomeas en garrafones de vidrio transparente y garrafones de plástico azul. a) <i>Thalassiosira weissflogii</i> b) <i>Chaetoceros muelleri</i> .	28

INDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Concentración celular final producida por especie cultivada en recipientes de vidrio transparente y plástico azul.	29
2	Biomasa producida por especie cultivada en recipientes de vidrio transparente y plástico azul.	30
3	Contenido de fenoles totales mg de equivalentes de ácido gálico por mg de peso seco (mg EAG g ⁻¹) en cultivos de microalgas en recipientes de plástico y garrafrones de vidrio.	31

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Importancia de las microalgas

Desde los inicios de los años cincuenta, se han venido realizando exploraciones sobre alternativas nuevas y poco convencionales de fuentes de proteínas y/o suplementos alimenticios, principalmente para anticipar el insuficiente suministro de proteínas ante el incremento de la población a nivel mundial. Estas nuevas fuentes provienen principalmente de biomasa de levaduras, hongos, bacterias, algas y microalgas (Richmond, 2004).

El potencial de las microalgas para mejorar el contenido nutricional de los alimentos convencionales y como agentes probióticos que afecten positivamente la salud de las personas y animales, es muy amplio. Hoy en día las microalgas son comercializadas como alimento natural o suplemento alimenticio, se venden frecuentemente en las presentaciones de tabletas, cápsulas y líquidos, además de ser incorporadas en pastas, bocadillos, dulces en barra y bebidas, entre otros, ya sea como suplemento nutricional o como fuente de colorante natural para alimentos (Akpolat, 2008).

Otro uso interesante de las microalgas es su prometedora viabilidad como fuente alternativa para la industria del aceite, debido a que puede acumular de 24-50% de aceite en base a peso seco. Varias especies de microalgas se han estudiado para la producción de lípidos, modificando las propiedades físicas y químicas del medio de cultivo. En el estudio realizado por Araujo *et al.* (2011) se evaluó el contenido de aceite y la biomasa de diez especies de microalgas, entre ellos los géneros *Dunaliella*, *Tetraselmis*, *Chaetoceros* y *Thalassiosira*, encontrándose que *C. gracilis* presentó el mayor contenido de aceite y *C. vulgaris* la más alta producción del mismo.

Las microalgas también son importantes para la acuicultura, ya que son la base de la cadena trófica de numerosas especies tanto de origen marino como dulceacuícola. En México la producción de microalgas por muchos años se ha destinado principalmente a la alimentación de larvas de camarón en laboratorios comerciales; López- Elías *et al.* (2003) reportaron que las especies que mayormente se han cultivado con este propósito son:

Chaetoceros muelleri, *C. calcitrans*, *Isochrysis* sp. *Tetraselmis suecica*, *T. chuii* y *Dunaliella tertiolecta*.

1.2 Generalidades de las microalgas evaluadas

1.2.1 Descripción de la Clase Chlorophyceae. Es la clase más numerosa de la división *Chlorophyta*. Son organismos unicelulares y pueden formar colonias, existen alrededor de 500 géneros y comprende 16,000 especies. Se caracterizan por su coloración verde debido a la presencia de la clorofila a y b, las cuales también se encuentran en las plantas terrestres. Algunas especies presentan coloración amarillo-verdoso y rojo-verdoso ya que presentan otros carotenoides como β -caroteno. Las especies marinas del género *Dunaliella* han sido cultivadas comercialmente con fines de suplementación nutricional y producción de β -caroteno. Las especies marinas del género *Tetraselmis* han sido utilizadas como aditivo en alimento de peces principalmente (Mutsunaga *et al.* 2005). Ambos géneros de microalgas se encuentran en la zona costera y pertenecen al orden Volvocales, son organismos flagelados, móviles y representan sólo el 10% de las especies de origen marino.

En las algas verdes, los complejos de pigmentos que captan la luz como la clorofila y carotenoides, son regulados por las condiciones del ambiente como la calidad e intensidad luminosa. La calidad de la luz es un factor sumamente importante en la regulación de los genes, lo cual indica un papel clave para los fotorreceptores específicos en la detección de estos cambios en el ambiente relacionados con la luz. Se ha encontrado que los receptores de luz azul regulan la expresión de los genes en algunas especies de algas verdes (Durnford, 2003).

1.2.2 Descripción de la Clase Bacillariophyceae. Cuenta con el mayor número de especies, aproximadamente 500, 000 con un gran potencial comercial y biotecnológico. Son algas unicelulares que suelen formar cadenas y poseen clorofila a y c y así como los carotenoides fucoxantinas. Sus cloroplastos son de color amarillo- marrón. La mayoría de las diatomeas tienen su esqueleto formado de sílice y consta de dos valvas. Las algas pardas son las algas más grandes y son mayormente marinas, encontrándose en regiones de agua fría y templada,

en las zonas submareal e intermareal. Algunas especies de diatomeas como *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira weissflogii* son utilizadas como alimento vivo para todas los estadios larvarios de moluscos bivalvos, crustáceos y larvas de zooplancton. El potencial biotecnológico de las diatomeas está relacionado con la producción de ácidos grasos polinsaturados (PUFA). La mayoría de las diatomeas contienen un alto porcentaje de ácido eicosapentanoico (EPA) 20:5 (n-3) (Mutsunaga *et al.* 2005).

Estas algas son el grupo más importante en el ambiente marino debido a su contribución a la productividad primaria. Se ha estimado que las diatomeas proporcionan de un 20 a 25% de la productividad primaria neta. Se ha observado migración vertical o estacional en las diatomeas planctónicas, ya que estas son capaces de sumergirse para obtener sus nutrientes en aguas más profundas (Dawes, 1991).

1.3 Composición química de las microalgas

Como en cualquier otra planta superior, la composición química de las microalgas no es un factor constante, varía de cepa a cepa y de lote a lote, principalmente en función de parámetros ambientales como temperatura, iluminación, pH y minerales del medio, suministro de CO₂ y otros. Para obtener biomasa con la composición deseada, la proporción de los constituyentes de la microalga se pueden modificar en cierta medida mediante la variación de las condiciones de cultivo, o el cambio de parámetros físicos tales como la intensidad de la radiación, la densidad del cultivo, la presencia o ausencia de luz, entre otros (Cabello-Paisini *et al.* 2011).

Las microalgas pueden ser cultivadas en biorreactores a gran escala, lo cual permite que la calidad de la biomasa pueda ser controlada; asegura que estén libres de pesticidas, herbicidas y otros compuestos tóxicos, y hacen que sea relativamente sencilla la purificación del compuesto de interés. A pesar de los beneficios prometenciales, la utilización de todos los grupos de microalgas como fuente natural de moléculas bioactivas se ve ensombrecido por una baja tasa de crecimiento o de rendimiento, la dificultad del cultivo y la posibilidad de la producción de compuestos tóxicos (Li *et al.* 2007).

El alto contenido de proteína de varias especies de microalgas fue una de las principales razones para considerar a estos organismos como una fuente poco convencional de este nutriente. Morris *et al.* (1999) reportaron un contenido de proteína del 40% para la especie *Chlorella vulgaris*. La calidad nutricional de la proteína es determinada por su contenido, proporción y disponibilidad de sus aminoácidos, también llamado perfil de aminoácidos. Mientras que las plantas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos, los seres humanos y animales se limitan a la biosíntesis de ciertos aminoácidos (no esenciales), los restantes aminoácidos (esenciales) tienen que ser proporcionados a través de alimentos (Loreto *et al.* 2003).

Becker en 1994, compara el perfil de aminoácidos de las proteínas de diferentes algas con algunos alimentos básicos convencionales, mostrando que el patrón de aminoácidos de casi todas las algas compite favorablemente con las de referencia (proteína de huevo y soya), con deficiencias menores entre los aminoácidos que contienen azufre, como metionina y cisteína, un hecho que es característico en muchas plantas.

En la mayoría de los casos se utiliza la totalidad de la biomasa como alimento o suplemento alimenticio. Esto quiere decir que en adición a la proteína, otros compuestos de la biomasa como los carbohidratos y fibra, entre otros, afectarán el valor total y digestibilidad del producto de la microalga. Los carbohidratos de microalgas pueden ser encontrados en forma de almidón, celulosa, azúcares, entre otros polisacáridos (López-Elías *et al.* 2003).

Los lípidos y ácidos grasos son componentes de todas las células vegetales, donde funcionan como componentes de las membranas celulares, como productos de almacenamiento, como metabolitos y fuente de energía. Los lípidos extraídos con solventes orgánicos lipofílicos (éter, éter de petróleo, cloroformo y otros) son llamados comúnmente lípidos totales.

Factores nutricionales y medioambientales pueden afectar tanto las proporciones de ácidos grasos así como su cantidad total. Dentro de los ácidos grasos, los de mayor importancia comercial son los ácidos grasos poliinsaturados; ácido linoléico, ácido β -linoléico, ácido dihomo-linolénico, ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico (Bigongo *et al.* 2002).

Las microalgas representan también una valiosa fuente de vitaminas importantes que mejoran el valor nutricional de la biomasa. Además de las fluctuaciones naturales del contenido de vitaminas debido a factores ambientales, el tratamiento postcosecha y los métodos de secado de la biomasa de las algas tienen un efecto considerable en su contenido vitamínico. Esto se aplica especialmente para las vitaminas inestables al calor como son B1, B2, C y ácido nicotínico, cuya concentración se reduce considerablemente durante el proceso de secado (Quintana *et al.* 1999; Brown, 2002).

Una de las características básicas de las microalgas es su color, cada filo tiene su propia combinación de pigmentos y un color individual. Los pigmentos con mayor utilización comercial son clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas. En *Dunaliella* sp. se reportan los pigmentos clorofila a y b, β - caroteno, zeaxantina y luteína (Fimbres, 2011; Medina *et al.* 2014).

1.4 Sistemas de producción en microalgas

Un factor importante a considerar para el cultivo de microalgas es el sistema de cultivo. Los sistemas utilizados son numerosos y variados ya que a través del tiempo se han venido desarrollando y modificando desde estanques abiertos, bolsas, fotobioreactores, raceways entre otros, tanto al interior y al exterior. Las características de la especie y la finalidad del cultivo son clave para la elección del tipo de cultivo más apropiado (Bhosale, 2004).

Hoy en día, las técnicas de cultivo de microalgas marinas son diversas, destacando los cultivos estáticos o batch, continuos y semicontinuos. La técnica más utilizada en los laboratorios comerciales es la de cultivos estáticos escalonados, en la cual se inicia con volúmenes pequeños en tubos de ensayo, pasando a matraces, luego a garrafones, y finalmente hasta columnas y/o tinas (López- Elías *et al.* 2003). Los recipientes y volúmenes que se utilizan son muy diversos y el medio de cultivo que se utiliza generalmente en acuicultura es el medio f/2 de Guillard y Ryther (1962), el cual puede ser modificado según las necesidades del cultivo.

Los sistemas de producción son principalmente los estáticos secuenciales y pueden utilizarse como unidades de producción, los recipientes de vidrio y plástico. La mayoría de los fotobiorreactores tubulares al exterior por lo general se construyen con vidrio o tubo de plástico, con iluminación natural o artificial o ambas y aireación constante. Ugwu *et al.* (2008) evaluaron diversos fotobiorreactores en cultivos masivos de algas para la producción de bioproductos. El fotobiorreactor tubular fue el más adecuado para cultivos masivos de microalgas al exterior. Estos autores concluyeron que en general el número de células obtenido es igual en los fotobiorreactores independientemente del material de los recipientes.

Otro componente significativo es el diseño de los recipientes de cultivo, que varía en su forma (redondo, cuadrado, cilíndrico, rectangular y ovalado) y profundidad (60 cm a 2 m), siendo la última sumamente importante para el crecimiento de las microalgas, ya que puede cambiar la concentración celular debido a diferencias en la penetración de la luz. Las condiciones del cultivo como iluminación y temperatura se mantienen controladas (López-Elías *et al.* 2004).

La iluminación del sistema de producción también es un factor a considerar. En los países tropicales y subtropicales la mayoría de los laboratorios mantienen sus cultivos de algas a nivel masivo al aire libre, aunque en algunos casos se cultivan al interior por razones de seguridad, o debido al clima extremo que no sea adecuado para el crecimiento de las microalgas. La iluminación al interior es artificial y generalmente se utilizan lámparas fluorescentes blancas o luz día, que son fuentes pobres de las longitudes de onda rojas y son los principales picos de emisión de estas lámparas (Sánchez *et al.* 2006).

En un trabajo de investigación realizado por Gómez *et al.* (1994) se cultivaron cuatro especies de microalgas (*Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloris oculata* y *Tetraselmis chuii*) utilizando recipientes de plástico y vidrio de 250 L de capacidad con distinta transparencia (40 y 90%), con el fin de optimizar la producción masiva de microalgas para ser utilizadas como alimento de larvas de peces marinos. Los cultivos se realizaron al exterior con temperaturas entre 26 y 34 °C e iluminación constante mediante lámparas fluorescentes de 75 W y aeración. En general no se encontraron diferencias significativas en la producción de las especies *N. oculata* y *T. chuii* cultivadas en ambos recipientes. Las especies

que mejor crecimiento presentaron fueron *C. gracilis* e *I. galbana* en recipientes de menor transparencia (40%). Los efectos de temperatura en el crecimiento mostraron una influencia significativa en cuanto al contenido de proteínas y carbohidratos, pero no afectó el contenido de lípidos en las microalgas.

Oliveira *et al.* (1999) evaluaron el crecimiento y composición química de la biomasa de *Spirulina maima* y *Spirulina platensis* a diferentes temperaturas, cultivadas en biofermentadores de plástico y vidrio. Los experimentos mostraron un comportamiento similar tanto en el crecimiento celular (2.4 g L^{-1}) como en la biomasa final en ambas condiciones de cultivo.

I.5 Efecto de iluminación en microalgas

La vegetación marina vive en un ambiente muy variable con respecto a la luz, los rayos UV, la temperatura y la salinidad. Evolutivamente su metabolismo se ha adaptado a estas condiciones de cambios, especialmente en la parte alta del litoral. En el submareal inferior, el aparato fotosintético se ha adaptado a las condiciones de poca luz para absorber al máximo los fotones incidentes y así utilizar la energía absorbida con alta eficiencia. En la zona intermareal y sublitoral superior, el aparato fotosintético está expuesto a fuertes tensiones cuando la cantidad de luz absorbida es más alta que la que el organismo puede utilizar para su metabolismo (Fig. 1). La actividad fotosintética de las algas marinas depende de las condiciones de iluminación solar, las cuales pueden ser muy diferentes en la zona costera y en el océano abierto. La penetración de la luz se determina en gran parte por la dispersión y la absorción de material biológico e inorgánico, concentrándose mayormente en las zonas costeras (Hanelt *et al.* 2003).

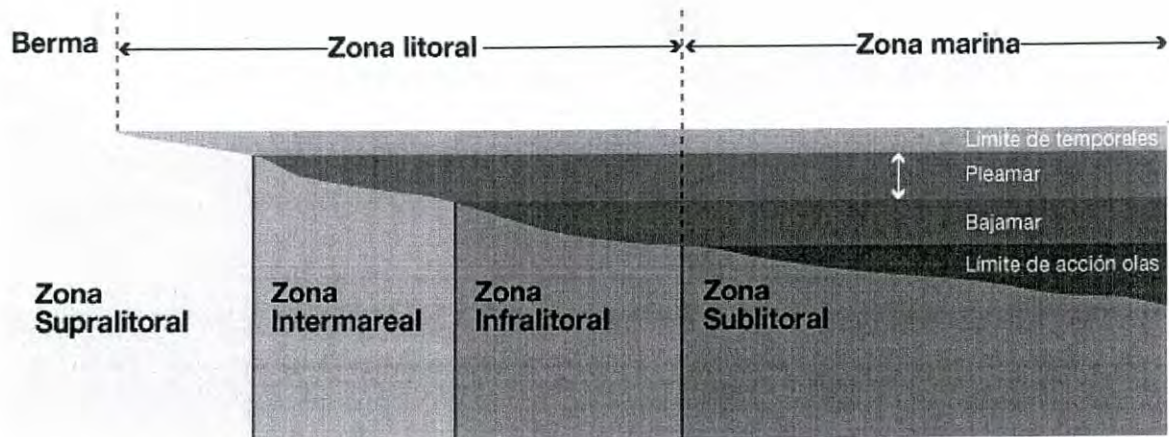


Figura 1. Las capas del océano y sus diferentes profundidades. Fuente: Oceanic_divisions.svg; Chris huh (Oceanic_divisions.svg) [CC0], via Wikimedia Commons.

La luz que llega a la superficie es absorbida en parte y otra es reflejada al exterior. La disminución de la radiación de la luz solar en la columna de agua es determinada por las propiedades ópticas de las masas de agua, material disuelto (clorofila y otros pigmentos fotosintéticos) y la presencia de partículas en suspensión principalmente, las cuales influyen en los coeficientes de absorción y dispersión de las diferentes longitudes de onda. En el primer metro de profundidad, el 60% de la radiación es absorbida y el 80% a los 10 m. Por lo general, la luz penetra a mayor profundidad en aguas oceánicas que en aguas costeras, principalmente por la baja concentración de materia orgánica disuelta y partículas. Al penetrar la luz en el océano cambia su cantidad y también su calidad. El agua absorbe la radiación roja e infrarroja en los primeros metros, por lo que muchas algas deben estar adaptadas a capturar esa luz, como complemento de la luz capturada con menores longitudes de onda. En las algas hay tres clases de pigmentos encargados de capturar la luz para la fotosíntesis: clorofilas, ficobiliproteínas y carotenoides (Edding *et al.* 2006).

Forster & Dring (1994) sugieren que la luz azul tiene el efecto de estimular la fotosíntesis como resultado de aumentar la tasa de transporte del carbono inorgánico desde el agua de mar al cloroplasto. Las respuestas de las algas café a este estímulo sustentan esta

hipótesis, pues la luz es más frecuente en los hábitats que estas plantas ocupan y donde el carbón limita la fotosíntesis.

La intensidad de la luz es uno de los factores más importantes para la fotosíntesis en microalgas, debido a que estimula la productividad de biomasa. Se han realizado investigaciones con la finalidad de evaluar la estrategia de adaptación al efecto de la radiación de diferentes fuentes, tanto luz ultravioleta como luz artificial. Un efecto importante de la exposición excesiva a la luz es un cambio en la distribución de los cloroplastos dentro de la célula. El movimiento del cloroplasto provoca un cambio en la sección transversal de absorción de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, por el llamado efecto de tamiz (Hanelt *et al.* 2003).

Es conocido que tanto algas como microalgas son productoras de compuestos antioxidantes en respuesta protectora al daño producido por estrés (radiación UV, variación de la temperatura, entre otros). Los efectos letales del estrés producidos por la radiación UV en microalgas incluyen la inhibición de la fotosíntesis, daño al ADN, proteínas y lípidos e incluso inhibición en la asimilación de nutrientes. El efecto de la radiación UV se puede desarrollar en condiciones de laboratorio, suplementando con lámparas o tubos tipo UV-A y UV-B en combinación con tubos fluorescentes luz-día. En los experimentos se pueden generar distintas dosis energéticas, variando el número de lámparas, el tiempo de exposición y la distancia entre la fuente de radiación y el organismo a estudiar. La principal desventaja de los experimentos en laboratorio es poder replicar los niveles de radiación y el balance espectral encontrado en el ambiente natural (Edding *et al.* 2006).

Existen trabajos que evidencian la presencia de compuestos fotoprotectores para las células, de la radiación UV tanto en macro y microalgas. En el trabajo realizado por Copia *et al.* (2012) se evaluó la relación de la radiación UV- B ($470 \mu\text{W cm}^{-2}$) y la producción de polifenoles en la especie marina *Chlorella* sp. por periodos de tiempo ascendentes, encontrando que la producción de polifenoles se incrementó significativamente, confirmando así una respuesta adaptativa a la exposición de radiación UV por parte de las microalgas.

Rosales-Loaiza *et al.* (2008) evaluaron el crecimiento, la producción de pigmentos y proteína de la microalga *Dunaliella viridis* a dos diferentes intensidades luminosas ($156 \mu\text{mol}$

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (unilateral, baja iluminación) y $2 \times 156 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (bilateral, alta iluminación)), en un sistema semicontinuo, renovando el 5%, 10% y 30% del volumen del cultivo, observando que el valor máximo de la clorofila a se encontró a 5% de renovación y a baja iluminación a diferencia de la proteína en donde el máximo se encontró a alta iluminación y 5% de renovación.

Kim *et al.* (2012) investigaron la optimización de las condiciones de cultivo y la producción de biomasa de tres microalgas verdes, encontrando que la intensidad luminosa óptima para la máxima productividad de *Chlorella* sp. fue de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y para las cepas del género *Dunaliella* de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Además de los estudios realizados para evaluar su actividad antioxidante, se han estudiado otros compuestos de las microalgas, como los lípidos para su uso como fuente de biocombustibles. En la investigación realizada por Kim *et al.* (2013), se evaluó la alteración de los lípidos bajo condiciones de estrés por intensidad luminosa y limitación de nitrógeno en la especie *Dunaliella tertiolecta*. Los cambios en la composición lipídica se observaron durante la fase estacionaria pudiendo estar relacionada directamente con la fotosíntesis de la microalga.

Sakamoto *et al.* (2012) evaluaron la optimización del crecimiento, fotosíntesis y productividad de *Botryococcus braunii* mediante condiciones de luz roja monocromática (1000 , 200 y $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para la producción de lípidos. Encontraron que la producción de lípidos no está directamente sustentada por el incremento de la actividad fotosintética, así mismo la producción de hidrocarburos y la eficiencia de la energía luminosa no se vieron afectados por la fase oscura del fotoperiodo.

La influencia de la intensidad luminosa en el crecimiento y producción de lípidos de la especie *Nannochloropsis salina* fue estudiada por Sforza *et al.* (2012). En esta investigación, se cultivó la microalga en un fotobiorreactor de cama plana a varias intensidades luminosas (iluminaciones continuas y con ciclo luz:oscuridad). Los resultados mostraron que la microalga puede maximizar la producción de lípidos de manera eficiente incluso en muy altas intensidades (350 y $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

La luz es uno de los factores que más influye en el crecimiento y el almacenamiento de bioproductos en las algas. En un estudio realizado por Ruangsomboon (2012), se evaluó el efecto de la luz, nutrientes, tiempo de cultivo y salinidad para la producción de lípidos de la microalga verde *Botryococcus braunii*, la mayor cantidad de biomasa fue de 1.9 g L^{-1} y se obtuvo en el cultivo con baja intensidad de luz ($87.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), mientras que las altas intensidades ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) limitaron el crecimiento pero beneficiaron el contenido de lípidos.

I.6 Compuestos bioactivos

Las algas son una importante fuente de varios compuestos bioactivos, incluidos los fenoles, los cuales tienen diferentes efectos fisiológicos en la salud humana. Algunos de estos compuestos poseen características antioxidantes, antimicrobianas y antivirales; siendo la protección celular en contra de las condiciones de estrés la más importante (Onofrejová *et al.* 2010).

Hoy en día los estudios sobre los compuestos bioactivos están enfocados principalmente a los compuestos fenólicos (Martínez-Flores *et al.* 2002). Estos compuestos son sintetizados por el organismo en cultivo al final de la fase de crecimiento exponencial y en la fase estacionaria (Skulberg, 2000). Estos compuestos bioactivos son de diversas estructuras químicas y función metabólica. Los ácidos fenólicos son los metabolitos aromáticos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y los consumimos normalmente en la dieta diaria que incluye frutas, verduras, cereales, té, café, especias (Robbins, 2003).

Los compuestos fenólicos han sido exhaustivamente investigados debido a sus diversos beneficios a la salud, ya que actúan como antioxidantes, antiinflamatorios, agentes cardiovasculares y como productos para el tratamiento del cáncer y la diabetes (Acosta-Estrada *et al.* 2014).

Las microalgas han sido hasta ahora la fuente más inexplorada en el desarrollo de la biotecnología de metabolitos secundarios (Skulberg, 2000). Algunas de las investigaciones de estos metabolitos con fines farmacéuticos y medicinales han sido con microalgas marinas de

las divisiones Rhodophyta (algas rojas), Phaeophyta (algas pardas) y Chlorophyta (algas verdes). Entre las sustancias encontradas se incluyen polisacáridos sulfatados como sustancias antivirales, furanonas halogenadas de *Delisea pulchra* como compuestos anti-incrustantes y como un posible tratamiento de cáncer de pulmón, tumores y SIDA (Smith, 2004).

Los extractos de algas marinas se encuentran entre las fuentes más ricas y novedosas de compuestos bioactivos dentro de la rama de la cosmética. Estos extractos pueden ser utilizados de dos maneras, como agentes emulsificantes y estabilizadores o como un agente terapéutico. Algunos de los ingredientes bioactivos de microalgas, como el ácido algarónico (una mezcla heterogénea de exo polisacáridos), poseen beneficios anti-envejecimiento, que puede ser producto de la exposición a la radiación UV, viento y el consumo de tabaco. Los terpenoides, carotenoides, tocoferol, polisacáridos, compuestos fenólicos, amino ácidos y ácidos grasos insaturados derivados de las algas marinas tienen propiedades antioxidantes, protectores de radiación UV, o un efecto inhibitor sobre la melanogénesis, como se ha demostrado por un número de estudios *in vitro* (Agatonovic- Krustrin & Morton, 2013).

1.6.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están divididos en grupos, según su estructura: fenoles simples y ácidos fenólicos, cumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides, y ligninas (Ibañez *et al.* 2012). Los ácidos hidroxicinámicos como el ferúlico, sinápico, caféico y p-cumárico se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y granos (Karakaya, 2004).

Las algas son una fuente natural de antioxidantes que puede ser funcional para alimentos, fármacos y productos biotecnológicos (Klejdus *et al.* 2009). Investigaciones realizadas por Klejdus *et al.* (2010) mostraron que varias clases de flavonoides como isoflavonas, flavanonas, flavones y dehidrocalconas pueden encontrarse en microalgas y cianobacterias.

Echavarría *et al.* (2009) analizaron los extractos metanólicos y hexánico de cinco algas colombianas, encontrando que la especie *Sargassum cymosum* es la que presentó mayor

contenido de fenoles totales (flavonoides, taninos y quinonas) y actividad captadora de radicales libres.

Vidal *et al.* (2001) encontraron que el extracto acuoso del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum*, tiene un alto contenido de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, identificando entre ellos, tres ácidos fenólicos reconocidos como antioxidantes eficientes (trans-cinnámico, p-coumárico y ferúlico).

Las algas marinas de la clase Phaeophyceae contienen cantidades más altas de compuestos fenólicos como florotaninos. Estos polifenoles son fundamentales en la protección de las algas pardas contra el pastoreo. La concentración de estos compuestos se debe a variaciones estacionales, geográficas y son afectadas por los niveles de radiación fotosintética activa y radiaciones UV, nutrientes y salinidad. Abdala *et al.* (2014) estudiaron la variación del contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad fenolsulfatasa proveniente del alga *Cystoseira tamariscifolia* del sur de España. En general se encontraron diferencias significativas en el contenido de los compuestos fenólicos entre las secciones apical, media y basal del talo, siendo mayor en la sección apical disminuyendo hacia la sección basal. Los resultados sugirieron que los compuestos fenólicos funcionan como filtro de protección para la radiación.

Numerosos estudios sobre los compuestos bioactivos en microalgas son orientados hacia actividades antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas, antihelmínticas, inmunología citotóxica y a propiedades de inhibición enzimática. Se han reportado informes sobre la evaluación de actividad antioxidante de algunas especies de microalgas pertenecientes a los géneros *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nostoc*, *Phaeodactylum*, *Polysiphonia*, *Scytosiphon*, *Spirulina*, entre otros (Hajimahmoodi *et al.* 2010). Estos estudios concluyen que diversos géneros de microalgas contienen antioxidantes potentes de naturaleza lipofílica e hidrofílica. Una parte importante y conocida de los antioxidantes de algas son los carotenoides y contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante total de las microalgas (Kepekçi y Saygideger, 2012).

Los compuestos fenólicos son parte del complejo mecanismo de defensa de las microalgas y por lo tanto son acumulados en respuesta al estrés por luz UV (Duval *et al.* 2000) y a otros factores.

Los compuestos fenólicos de microalgas no han recibido suficiente interés debido a sus bajas concentraciones, y solo algunos estudios recientes han investigado el papel de dichos compuestos en algas y microalgas. Los estudios han sido enfocados en las mejoras para potencializar las técnicas de extracción así como en concentrar dichos compuestos en las microalgas (Kepekçi y Saygideger, 2012).

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de microalgas a nivel comercial es llevado a cabo tanto en recipientes de vidrio como de plástico. Debido a las diferencias en las características ópticas del material de estos recipientes, existen diferencias en la calidad y la cantidad de la luz que este tipo de materiales permite pasar a través de ellos, dado que en los recipientes de vidrio pasa el espectro total del visible y en cantidades muy altas, mientras que en los de plástico azul se transmiten todas las longitudes del visible a excepción del azul y en cantidades menores, lo cual pudiera influir en el crecimiento, producción de biomasa y la síntesis de compuestos fenólicos, ya que un exceso o limitación de la intensidad luminosa incrementa la producción de esos compuestos. Por lo anterior, es necesario establecer las condiciones de cultivo de las microalgas para aumentar la producción de los compuestos fenólicos como respuesta al estrés por luz.

HIPÓTESIS

La concentración celular, la producción de biomasa y el contenido de compuestos fenólicos de microalgas evaluadas, será diferente al ser cultivadas en recipientes con distintas características ópticas.

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del material de los contenedores, en la concentración celular, biomasa y contenido de compuestos fenólicos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas en condiciones de laboratorio.

II.1.1. Objetivos particulares

- Evaluar la concentración celular de cuatro especies de microalgas cultivadas en recipientes con distintas características ópticas.
- Evaluar el contenido de biomasa en cuatro especies de microalgas marinas cultivadas en recipientes con distintas características ópticas.
- Evaluar el contenido de compuestos fenólicos totales de las cuatro especies cultivadas en recipientes con distintas características ópticas

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. Selección de las especies y obtención de las cepas

Para esta investigación se seleccionaron las especies de microalgas diatomeas *Chaetoceros muelleri* y *Thalassiosira weissflogii*, y las flageladas *Dunaliella tertiolecta* y *Tetraselmis chuii*, debido a que estas son ampliamente utilizadas principalmente como alimento en los cultivos larvarios de camarones peneidos y se tiene información suficiente acerca de las condiciones para su cultivo (López-Elías *et al.* 2013). Estas especies de microalgas se obtuvieron del cepario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), en Hermosillo, Sonora.

III.2 Diseño experimental

Para el estudio se utilizó un diseño completamente al azar factorial 2 x 4 (dos materiales de los contenedores para el cultivo y cuatro especies de microalgas). El experimento se hizo por cuadruplicado. Las microalgas fueron cultivadas en un medio estándar f/2 (Guillard y Ryther, 1962) (APENDICE 1). Los cultivos se desarrollaron bajo condiciones controladas de laboratorio durante 5 a 6 días a 20 °C. Se utilizó una fuente de luz fría con potencia de 60 watts.

III.3.Cultivo de microalgas

Se midió la intensidad luminosa en los garrafones de vidrio transparente y garrafones de plástico azul con un fotómetro LI-COR Quantum/ Radiometer/ Photometer Modelo Spherical LI-250 Light Meter. Para los dos tipos de garrafones se midió la absorbancia con un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC Genesys 20 en longitudes de onda entre 400 y 700 nm; radiación que estimula la clorofila.

Se realizaron inóculos partiendo de la cepa de las especies seleccionadas inicialmente en matraces de 250 ml, posteriormente se transfirieron a matraces de 1 L de capacidad para finalizar con la última etapa en garrafones de plástico y vidrio con capacidad de 20 L. Para la

preparación de los garrafones, se llenaron hasta la capacidad de 15 litros con agua de mar filtrada y desinfectó con cloro. Se utilizó 1 mL de cloro por L de agua. Para neutralizar el cloro se agregaron 0.15 g de tiosulfato de sodio por litro de agua. Posteriormente se adicionaron los nutrientes de medio estéril f/2 (Guillard y Ryther, 1963) a cada garrafón. Se realizó el conteo de las cuatro especies en la etapa de matraz de vidrio para determinar el inóculo que llevaría la etapa de garrafón. Se realizaron conteos celulares cada 24 horas para observar el crecimiento de cada especie y su etapa de crecimiento, con el fin de detener el cultivo en la fase estacionaria (López- Elías *et al.* 2012).

III.4 Conteos Celulares

Para los conteos celulares se tomó 1 mL de cultivo de cada uno de los garrafones y se fijó con una gota de solución lugol) solución de I₂ al 1% y KI al 2%) (Andersen, 2005). Los conteos se realizaron por medio de un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad en un microscopio óptico WWIFT No. 8157401, utilizando el objetivo de 10 X (López- Elías *et al.* 2012). La fórmula para realizar el cálculo es la siguiente:

$$\text{No. Cél/mL} = (\# \text{células totales} / \# \text{de cuadros contados}) \times 10,000$$

III.5 Floculación de los cultivos

Para la concentración de la biomasa se utilizó sulfato de aluminio a una concentración de 0.15 g por litro y se dejó actuar hasta la precipitación de la microalga (López- Elías *et al.* 2012).

III.6. Determinación de biomasa

Se retiró el agua de la microalga precipitada y se pesó en bolsa con zíper para tomar su peso húmedo. Posteriormente se congeló a -80 °C en un ultra congelador New Brunswick Scientific Modelo U9270-0002 para los posteriores análisis.

Las muestras congeladas se liofilizaron en un liofilizador LABCONCO a -40°C hasta peso constante, durante un período de 7 a 10 días. Posteriormente se molieron en un mortero para homogenizar, se colocaron en frascos de plástico de boca ancha forrados con papel aluminio y realizando un arrastre con nitrógeno, se cerraron y se cubrieron las tapas con papel parafilm y se almacenaron a -40°C en un congelador VWR Modelo 5486 hasta su posterior análisis.

III.7. Determinación de los compuestos fenólicos

La determinación de los compuestos fenólicos se realizó en el Laboratorio de Biología y Bioquímica de Plantas del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD), de acuerdo al método colorimétrico descrito por Whaterhouse (2002).

Los reactivos que se utilizaron fueron: (a) Reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N. (b) Solución de carbonato de Sodio al 20%: se disolvieron 10 g de carbonato de sodio anhidro en 50 mL de agua destilada. (c) Solución estándar para fenoles. Se pesaron 0.05 g de ácido gálico, se disolvieron en 50 ml de agua destilada. Esta solución estándar contiene 1 mg por mL.

Para la curva de calibración se tomaron alícuotas de 100 a 1000 μl y se colocaron en tubos de ensaye, se llevó a un volumen de 1000 μL para obtener las concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/mL del estándar. De cada concentración de tomaron 50 μl y se colocaron en tubos de ensaye, se le adicionó 3 mL de agua destilada y 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, se mezcló y se dejó reposar por 8 minutos, posteriormente se agregaron 750 μL de carbonato de sodio al 20% y se llevó a un volumen de 5 mL con agua destilada. Se dejó reposar la mezcla por 2 h a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Varian Modelo Cary 50 Bio.

III.7.1. Extracción de fenoles totales

Para seleccionar las condiciones de extracción se evaluó: cantidad de muestra (0.5, 1, 1.5 y 2 g), tipo de solvente (metanol absoluto, metanol 50%, agua, etanol absoluto y acetona), volumen de solvente (10, 15 y 25 mL), número de extracciones (1 extracción, 2 extracciones sucesivas y 3 extracciones sucesivas), método de extracción (homogenizador de tejidos, sonicador, homogenizador de tejidos y sonicador), tiempo de extracción (1 hora, 2 horas).

Para el procedimiento de la extracción de fenoles totales se utilizó microalga liofilizada, la cual se homogenizó manualmente en un mortero. Posteriormente, por triplicado se pesaron 2 g de microalga en una balanza analítica METTLER AE 240; se colocaron en tubos de centrifuga, los cuales se cubrieron con papel aluminio para evitar la oxidación de los compuestos. Se agregó 10 mL de etanol al 100%, posteriormente se homogenizó a 13,500 rpm por un minuto en un homogenizador de tejidos Ultra Turrax T25. A continuación los tubos se sonicaron por 1 h en un sonicador BRANSON 2210, se centrifugaron a 4,500 rpm por 10 minutos a 10° C en una centrifuga refrigerada Thermo Fisher Scientific Scruall ST 16R. Posteriormente la muestra se filtró en papel filtro Wathman No.1, se recolectó el filtrado en recipientes de 50 ml y se dio un arrastre de nitrógeno. Los residuos se extrajeron una vez más con 10 ml de acetona al 70% procediendo de igual forma que la primera extracción de acuerdo a la metodología propuesta por López *et al.* (2011). Finalmente se filtraron a través de filtros de membrana Millipore de 0.22 µm.

III.7.2. Cuantificación de fenoles totales mediante espectrofotometría

De los extractos se tomaron 50 µL y se siguió el mismo procedimiento utilizado en la curva de calibración; el blanco para la lectura se preparó de igual manera que la muestra sólo que en lugar de extracto se añadieron 50 µl de solvente. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico/ g de peso seco.

III.8 Análisis de datos

Las curvas de crecimiento se obtuvieron con los datos promedio. Previo al análisis de datos se aplicó la prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizó un análisis de varianza de dos vías a un nivel de significancia de 0.05 donde los factores fueron el recipiente del cultivo y la especie de microalga.

Cuando hubo significancia se efectuaron comparaciones de medias por la prueba de rangos múltiples de Tukey para estimar diferencias significativas entre tratamientos a un nivel de significancia del 5%. Los datos fueron procesados con el paquete estadístico STATISTICA para Windows (StatSoft, 1997).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Iluminación de los cultivos

Los valores de transmitancia de los materiales de los garrafones presentaron diferencias. Para el plástico azul se registró una transmitancia entre 52 y 64 % y en el vidrio transparente de 45 y 47 % (Figuras 2a y b).

La intensidad luminosa internada en ambos materiales resultó diferente. Las microalgas cultivadas en garrafones de cristal transparente estuvieron bajo condiciones de iluminación entre 43 y $56 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mientras que las cultivadas en garrafones de plástico azul estuvieron bajo una intensidad entre 26 y $31 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

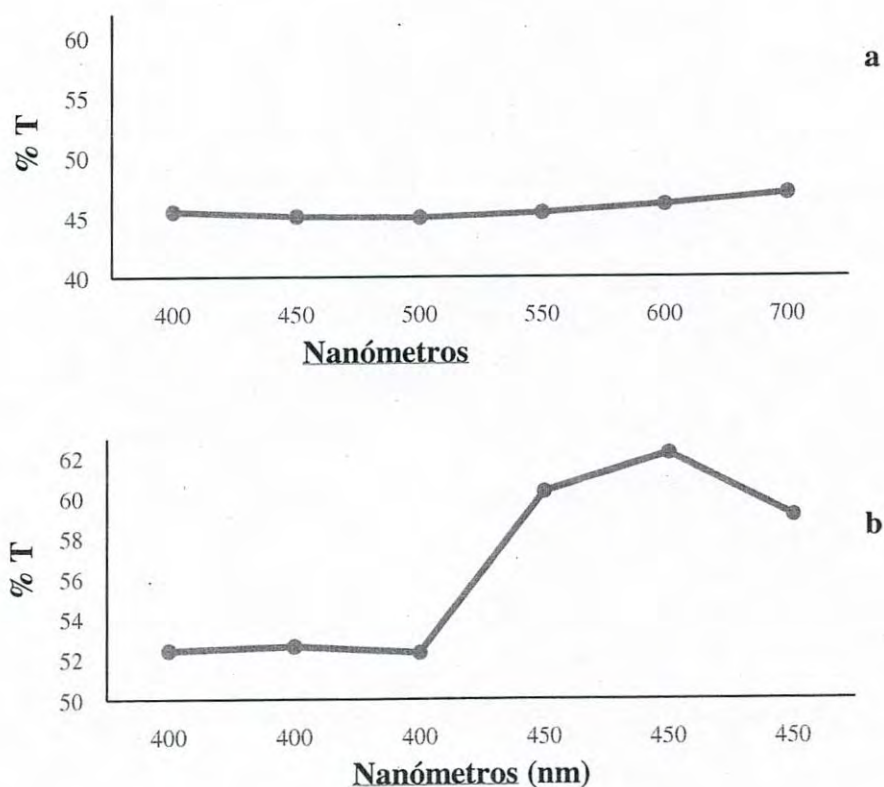


Figura 2. Transmitancia del material de garrafones de vidrio transparente (a) y garrafones de plástico azul (b).

Está suficientemente documentado que el fitoplancton responde de diferente forma a la cantidad de luz recibida, en general las clase Bacillariofita (*C. muelleri* y *T. weissflogii*) crece a intensidades entre 6.4 y 84 $\mu\text{moles m}^2 \text{s}^{-1}$, mientras que las Clorofitas (*D. tertiolecta* y *T. chuii*) crecen entre 30.6 y 211 $\mu\text{moles m}^2 \text{s}^{-1}$ (Richardson *et al.* 1983). Es por ello que probablemente en el presente estudio se haya tenido una limitación de iluminación para las especies flageladas verdes.

También hay suficientes reportes de que para los organismos fitoplanctónicos, la calidad de luz es muy importante en su desempeño, dado que cada clase tiene su estructura pigmentaria para atrapar eficientemente la energía luminosa a diferentes longitudes de onda. Las Bacillariofiteas tienen clorofila a (que absorbe óptimamente entre 420 y 660 nm), c (que lo hace entre 445 y 625 nm) y carotenoides (que absorben mejor entre 425 y 480 nm, 420 y 470 nm); mientras que las Clorofiteas contiene la clorofila a, b (con absorción óptima entre 435 y 643 nm) y ficoeritrinas (con mejor absorción entre 490, 546 y 576 nm) (Richardson *et al.* 1983).

IV.2. Concentraciones celulares

No se observaron diferencias significativas respecto a la concentración celular entre los cultivos realizados en garrafones de vidrio transparente y en garrafones de plástico azul, ($p > 0.05$). Sin embargo, para las 4 especies evaluadas se observó una tendencia a ser mayor en los garrafones de vidrio respecto a los de plástico azul (Figuras 3a y b).

La densidad celular final para las microalgas verdes fue de 1.24×10^6 Cél/mL para *Dunaliella tertiolecta* y de 0.74×10^6 Cél/mL al ser cultivada en recipientes de vidrio y de plástico, respectivamente; mientras que para *Tetraselmis chuii* fue de 1.01×10^6 Cél/mL y de 0.50×10^6 Cél/mL en los cultivos en recipientes de vidrio y plástico, respectivamente. En las diatomeas, se observó que para *Thalassiosira weissflogii* la densidad celular final fue de 2.25×10^6 Cél/mL y 2.02×10^6 Cél/mL en los cultivos en recipientes de vidrio y plástico,

respectivamente mientras que para *Chaetoceros muelleri* de 1×10^6 Cél/mL y 0.93×10^6 Cél/mL en los cultivos en recipientes de vidrio y plástico, respectivamente (Figuras 4a y b).

Al analizar el desarrollo de los cultivos, el crecimiento de todos los tratamientos fue muy similar hasta el tercer día. En general la concentración celular fue más alta en los recipientes de vidrio en comparación con los de plástico, tendencia que ha sido reportada en investigación de Oliveira *et al.* (1999) para cultivos de dos especies de *Spirulina*, al contrastar fermentadores de material de plástico y vidrio.

En investigación es realizadas por Gómez *et al.* (1994) y Ugwu *et al.* (2008) encontraron que el crecimiento celular fue similar en recipientes de plástico y vidrio. Las especies de microalgas evaluadas en la primera investigación fueron *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloris oculata* y *Tetraselmis chuii*, encontrando que en los cultivos de *Chaetoceros gracilis* se obtuvieron $5,5 \times 10^5$ Cél/mL en recipientes de plástico y de $2,4 \times 10^5$ Cél/mL en recipientes de vidrio, mientras que en los cultivos de *Tetraselmis chuii* fue de 5,1 y de $5,5 \times 10^5$ Cél/mL en los recipientes de plástico y de vidrio, respectivamente. En la segunda investigación se encontró productividad de biomasa de 1.20 a $1.90 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para la diatomea *Phaeodactylum tricornutumy* y de $1.47 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para la clorofita *Chlorella sorokiniana*.

Trejo (2002), encontró que *Chaetoceros muelleri* cultivada en garrafones de plástico azul y vidrio transparente alcanzó concentraciones de 1.17 y 1.25×10^6 Cél/mL, respectivamente. Estos valores son ligeramente mayores a los alcanzados en esta investigación, esto pudo deberse a la concentración celular inicial que en el trabajo referido fue de 50, 000 Cél/mL mientras que en la presente investigación fué de 25, 000 Cél/mL. Las concentraciones celulares encontradas por Lemus *et al.* (2006) para la misma especie de diatomea, fluctuaron entre 1.8 y 2.2×10^6 Cél/mL pero en un sistema de cultivo semi-continuo.

Piña *et al.* (2007) compararon el crecimiento poblacional de cuatro especies de microalgas (*Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira weissflogii*, *Isochrysis sp* y *Tetraselmis suecica*) con diferentes fuentes de nutrientes y se observó para *C. muelleri* cultivada en el medio F una concentración celular de 2.71×10^6 Cél/mL, el doble de células comparado con

los de esta investigación. Los mayores valores de concentración celular obtenidos por estos autores pueden atribuirse a que utilizaron un medio con el doble de las concentraciones de nutrientes que el empleado en el presente estudio. Estos autores encontraron en *T. weissflogii* concentraciones celulares por debajo de las obtenidas en nuestra investigación, utilizando el medio f/2, lo cual pudo deberse a que el tamaño de inóculo utilizado, que en nuestro caso fue mayor que el utilizado por el autor citado.

En un estudio de Moheimani (2013), se cultivaron microalgas verdes de las especies *Chlorella* sp, *Tetraselmis suecica* y *Dunaliella tertiolecta*, en cultivos al exterior con el fin de incrementar la densidad celular de *T. suecica*, con lo cual se obtuvo una concentración celular final de 1.02×10^6 Cél/mL a los diez días de cultivo; este valor es similar al obtenido en el presente estudio para *T. chuii* a los seis días de cultivo en garrafones de vidrio al interior.

La concentración celular reportada por López- Elías *et al.* (2013) para *Dunalilella tertiolecta*, fue de 1.28×10^6 Cél/mL, similar a la registrada para *D. tertiolecta* (1.24×10^6 Cél/mL) cultivada en garrafón vidrio en esta investigación. Por otro lado, Rosales-Loaiza *et al.* (2008) cultivaron *D. viridis* en un sistema semicontinuo bajo dos condiciones de iluminación ($116 \pm 8 \mu\text{moles m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ al interior y $139 \pm 22 \mu\text{moles m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ al exterior) para determinar sus condiciones de crecimiento y para la producción de pigmentos, encontrando que la mayor concentración celular con valores entre $1,49 \times 10^9$ y $1.99 \times 10^9 \text{ cel/ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, se obtuvo a baja iluminación ($156 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), valor ligeramente superior a las condiciones de iluminación utilizadas en esta investigación.

En relación al número de células totales, se encontró que los recipientes de vidrio transparente presentaron valores mayores (743,656 Cél/mL) que los de garrafón de plástico (595,781 Cél/mL) (F=10 y P= 0.001). Independientemente del tipo de recipiente el mayor número de células se observó en las especies *Dunaliella* sp y *Chaetoceros muelleri* con 904,583 y 965, 313 Cél/mL respectivamente, con una F=58 y P= 0.01 (Tabla 1).

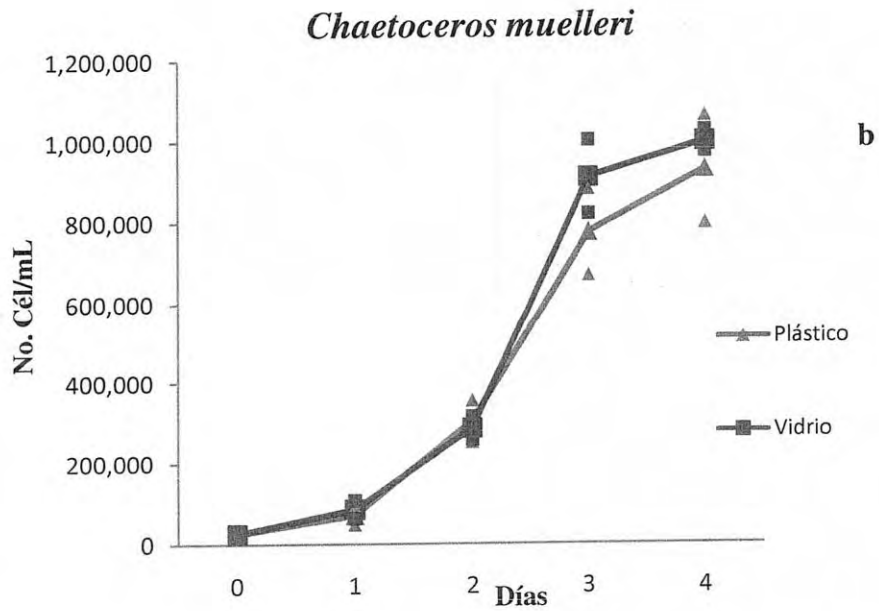
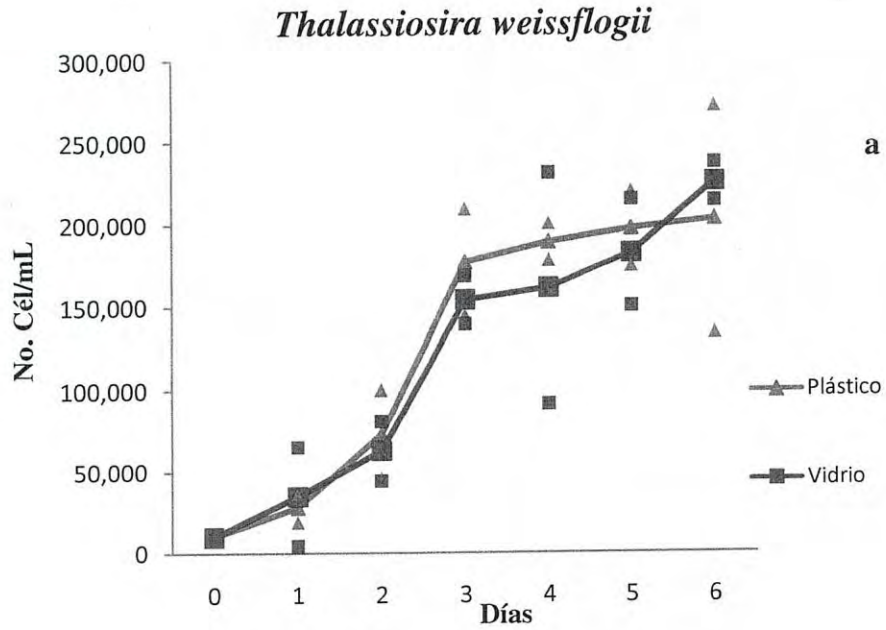


Figura 4. Concentraciones celulares diarias de los cultivo de diatomeas en garrafones de vidrio transparente y garrafones de plástico azul. a) *Thalassiosira weissflogii* b) *Chaetoceros muelleri*.

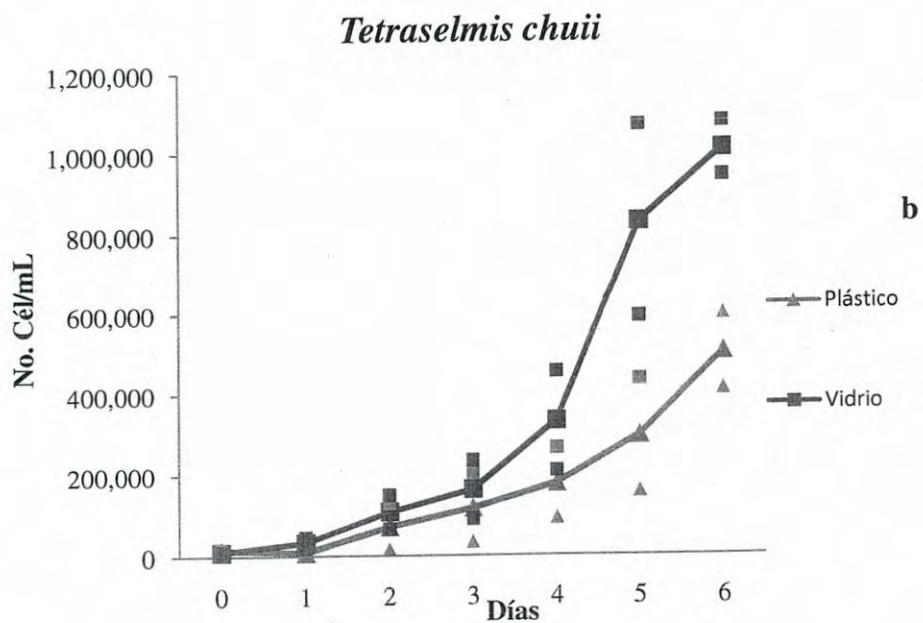
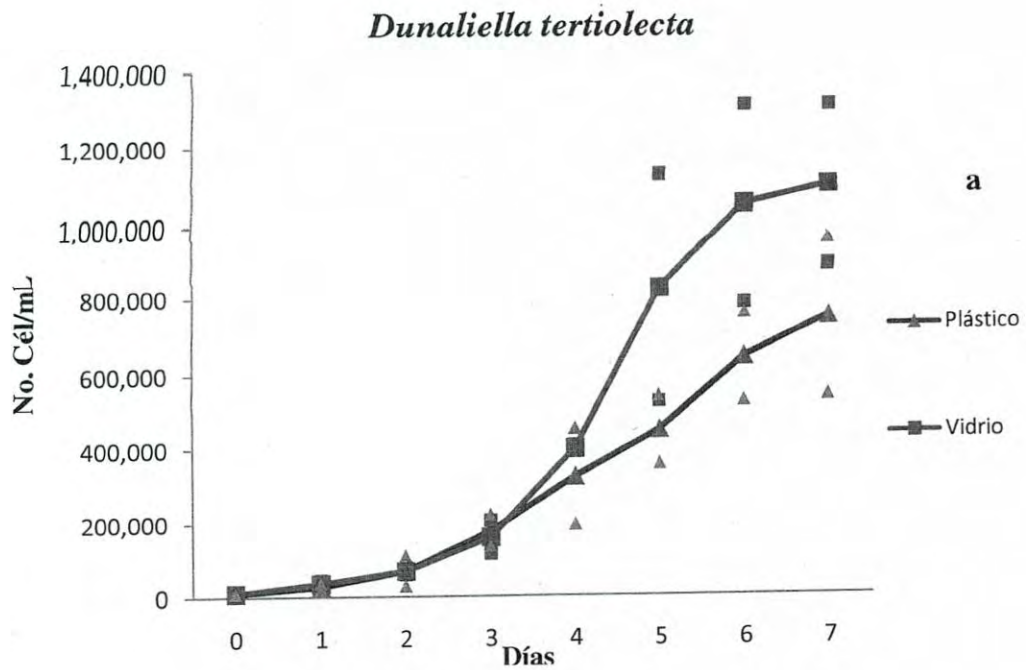


Figura 3. Concentraciones celulares diarias de los cultivos de algas verdes en garrafones de vidrio transparente y garrafones de plástico azul. a) *Dunaliella tertiolecta*, b) *Tetraselmis chuii*.

Tabla 1. Concentración celular final producida por especie cultivada en recipientes de vidrio transparente y plástico azul.

Especie	No. Cél/mL	
	Plástico ^a	Vidrio ^b
<i>Thalassiosira weissflogii</i> ^a	202,917±68,000	225,667±11,000
<i>Tetraselmis chuii</i> ^b	503,750±93,000	685,625±32,000
<i>Dunaliella tertiolecta</i> ^c	745,833±208,000	1,063,333±160,000
<i>Chaetoceros muelleri</i> ^c	930,625±132,000	1,000,000±26,200

Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05)

IV.3. Producción de biomasa

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar el contenido de biomasa producida en las cuatro especies de microalgas, con el fin de observar diferencias entre las condiciones de cultivo, además de relacionar la biomasa cosechada con el contenido de fenoles totales.

No se observaron diferencias significativas entre los promedios de peso húmedo total obtenido en los dos tipos de materiales. Al comparar los promedios obtenidos por especie, se observaron diferencias (P<0.05), siendo menores los de las algas verdes, *D. tertiolecta* (266 mg/L) y *T. chuii* (346 mg/L), mientras que los de las diatomeas fueron más altos, pero similares entre ellas, con valores de 839 y 865 mg/L para *C. muelleri* y *T. weissflogii* (Tabla 2).

En la investigación realizada por Moheimani en 2013, quién cultivó microalgas verdes bajo condiciones al exterior con la finalidad de producir alta cantidad de biomasa y de lípidos, para la elaboración de biodiesel, se observaron valores de biomasa para *T. suecica* de $115 \pm 29.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y para *T. chuii*, de $345 \pm 76 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a los diez y a los seis días de cultivo,

respectivamente. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos en la presente investigación, lo cual pudiera atribuirse a que en nuestro estudio las condiciones fueron controladas y por lo tanto más estables, ya que los cultivos fueron al interior.

Tabla 2. Biomasa producida por especie cultivada en recipientes de vidrio transparente y plástico azul.

Especie	mg/L	
	Plástico ^a	Vidrio ^a
<i>Thalassiosira weissflogii</i> ^b	639±309	1,091±433
<i>Tetraselmis chuii</i> ^b	352±121	339±76
<i>Dunaliella tertiolecta</i> ^a	250± 35	281±59
<i>Chaetoceros muelleri</i> ^a	866±243	812±97

Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

IV.4. Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales de las diferentes especies de microalgas en las dos condiciones de cultivo se encontró en un rango de 0.32 a 1.54 mg EAG g⁻¹ de peso seco (mg de equivalentes de ácido gálico/ g de peso seco). Se encontraron diferencias significativas (P<0.05) en el contenido de fenoles dependiendo de la especie de microalga (F= 34.46, p<0.001), pero no en cuanto al material del recipiente de cultivo (F= 0.27, p>0.06). Los valores más altos se encontraron en *D. tertiolecta* y *T. chuii*, es decir en las microalgas verdes, independientemente del material del recipiente utilizado para su cultivo; observándose que las diatomeas *Thalassiosira weissflogii* y *Chaetoceros muelleri* mostraron los valores menores (Tabla 3).

Como se puede observar el promedio del promedio del peso liofilizado total no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, a excepción de las especies *T. chuii* (garrafón

vidrio y plástico) que presentó concentraciones mayores en comparación con *T. weissflogii* (garrafón vidrio).

Tabla 3. Contenido de fenoles totales mg de equivalentes de ácido gálico por mg de peso seco (mg EAG g⁻¹) en cultivos de microalgas en recipientes de plástico y garrafones de vidrio.

Especie	mg EAG g ^{-1*}	
	Plástico ^a	Vidrio ^a
<i>Thalassiosira weissflogii</i> ^a	0.84 ± 0.0837	0.58 ± 0.0571
<i>Chaetoceros muelleri</i> ^a	0.32 ± 0.0296	0.64 ± 0.0482
<i>Tetraselmis chuii</i> ^b	1.52 ± 0.0837	1.47 ± 0.0379
<i>Dunaliella tertiolecta</i> ^b	1.25 ± 0.1125	1.54 ± 0.1133

Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05).

* Mg EAG g⁻¹: mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco.

La cantidad de fenoles totales en las microalgas está directamente relacionada con la cantidad de iluminación recibida. Para las algas diatomeas (Bacillarioficeas) la intensidad de luz recibida durante los días de cultivo fue parecida a la cantidad óptima que necesitan para desarrollarse (hasta 84 $\mu\text{moles m}^2 \text{s}^{-1}$); sin embargo, las cantidades elevadas de compuestos fenólicos en las algas verdes (Cloroficeas) pudo ser debido a que se cultivaron en condiciones de iluminación limitantes para su desarrollo óptimo, ya que estas especies toleran hasta 211 $\mu\text{moles m}^2 \text{s}^{-1}$ y se tuvieron entre 84 y 111 $\mu\text{moles m}^2 \text{s}^{-1}$ (Richardson *et al.* 1983).

Existen diversos trabajos en donde se evalúa el contenido de fenoles totales en distintas especies de microalgas. En un trabajo realizado por Goiris *et al.* (2012) se evaluó la capacidad antioxidante, el contenido de carotenoides y de fenoles totales de tres especies de microalgas, encontrando un contenido de fenoles totales de 1.71 mg EAG g⁻¹ de peso seco en *Tetraselmis suecica* y de 1.84 mg EAG g⁻¹ de peso seco en *Chaetoceros calcitrans*. Estos resultados son

similares a los obtenidos en la presente investigación para las mismas especies; cabe señalar que estos autores evaluaron diferentes solventes en dos extracciones sucesivas de los compuestos fenólicos, que fueron etanol/agua (3/1 v/v), ya que estos autores encontraron que los mayores valores de fenoles totales se obtuvieron al utilizar esta mezcla de solventes, mientras que en este trabajo se realizaron extracciones sucesivas con etanol absoluto y acetona, ya que en las pruebas preliminares se observó que fueron estos solventes en los que se extrajo la mayor cantidad de fenoles totales en las especies de microalgas evaluadas.

López *et al.* (2011) evaluaron el efecto de diversos solventes (agua, agua-metanol, metanol y etanol) en la extracción de fenoles totales y capacidad antioxidante de la especie de alga *Stypocaulon scoparium*, obteniéndose concentraciones de 1.23 a 3.29 mg EAG g⁻¹ de peso seco y los mejores resultados con el extracto acuoso con valores de.

Ulloa *et al.* (2012) evaluaron el efecto de magnesio, silicio y estroncio en el crecimiento y actividad antioxidante en *T. suecica* cultivada en sistema semicontinuo y con intensidades de luz de 220 $\mu\text{mol foton m}^2\text{s}^{-1}$ a 20 °C. Para el tratamiento control se obtuvo un contenido de compuestos fenólicos totales de alrededor de 0.5 mg EAG/g peso seco, el cual es inferior al obtenido en el presente trabajo. El resto de los tratamientos presentó valores entre 0.5 y 1.3 mg EAG g⁻¹ peso seco, que son similares a los obtenidos. El valor más alto fue para las microalgas cultivadas con estroncio 10 mM, que presentaron valores superiores a 3 mg EAG g⁻¹ peso seco.

Wang *et al.* (2009), encontraron que para varias especies de algas, la extracción de compuestos fenólicos con acetona al 70%, fue más eficiente (0.4- 24.2 g EPG/100 g⁻¹ de extracto cetónico) que con agua, lo cual es debido a que las algas marinas contienen altos niveles de componentes solubles en agua, tales como polisacáridos solubles, proteínas y péptidos. Las algas cafés mostraron mayor contenido de polifenoles que las algas rojas y verdes.

En un trabajo realizado por Li *et al.* (2007) se evaluó la capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales de 23 especies de microalgas, evaluando extracciones sucesivas con tres solventes: hexano, etilacetato y agua. El contenido varió ampliamente entre las especies evaluadas, encontrándose valores dentro del rango de 3.59 a 60.35 mg EAG g⁻¹. El

más alto contenido se obtuvo mediante extracción con hexano. En el caso de las microalgas verdes del género *Chlorella* se encontraron valores de 8.58 a 19.03 mg EAG g⁻¹ de peso seco.

Copia *et al.* (2012) evaluaron el efecto de la radiación UVB (RUV-B, 280-315 nm) en el contenido de polifenoles de la especie de microalga verde *Chlorella* sp. mostrando un aumento de dichos compuestos y actividad antioxidante como respuesta al estrés oxidativo producido por dicha radiación.

El efecto de la iluminación incidente en los cultivos de microalga ha sido evaluado en diversos trabajos. Duval *et al.* (2000) evaluaron el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de la microalga verde *Chlamydomonas nivalis*, expuesta a luz UV-A a 365 nm por 8 días seguidos y a UV-C por 7 días a 254 nm, encontrando un aumento del 12 al 24% en los fenoles totales en la exposición a luz UV- C por siete días a 254 nm.

Kepekçi y Saygideger (2012), cultivaron *Spirulina platensis* en una cámara con fotoperiodo de 12h luz y 12h oscuridad con una intensidad luminosa de 40, 60 y 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 30° C, obteniendo valores de 6.32±3.89, 25.73±3.16, y 49.83±5.56 mg EAG g⁻¹ al ser cultivada a 40, 60 y 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente; encontrando así que el contenido de fenoles totales se incrementó conforme aumenaba la intensidad luminosa durante el cultivo.

V. CONCLUSIONES

La concentración celular de las cuatro especies de microalgas marinas *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira weissflogii*, *Dunaliella tertiolecta* y *Tetraselmis chuii* fue independiente de las características ópticas del recipiente de cultivo.

La mayor concentración de células totales fue obtenida con las especies *Dunaliella tertiolecta* y *Chaetoceros muelleri*, independientemente de las características ópticas del recipiente de cultivo.

La biomasa de las cuatro especies de microalgas fue similar en las dos condiciones de cultivo, encontrando que las diatomeas presentaron mayor biomasa que las algas verdes.

El contenido de fenoles totales fue diferente entre las especies de microalgas. La mayor concentración de fenoles totales se encontró en las algas verdes *Dunaliella tertiolecta* y *Tetraselmis chuii*, independientemente de las características ópticas del recipiente durante el cultivo.

En general se encontró que las concentraciones celulares, biomasa y la producción de compuestos fenólicos de las cuatro especies de microalgas marinas evaluadas en el presente estudio son independientes de las condiciones ópticas del material durante su cultivo, sin embargo existen diferencias por especie de microalga, encontrándose los valores más altos en las flageladas verdes. Es por ello que el garrafón de plástico puede ser una excelente alternativa, ya que es de bajo costo, fácil de manejar y mantener, bajo peso e irrompible, disminuyendo así los costos operativos generales para el cultivo de microalgas.

VI. RECOMENDACIONES

Del análisis y discusión de resultados presentes en este trabajo, se hacen las siguientes recomendaciones:

Se sugiere utilizar al momento de la cosecha de biomasa centrífuga, para eliminar la mayor cantidad de agua y agilizar el proceso de liofilización.

Es importante explorar otros métodos de extracción tales como extracción con fluido supercríticos (SFE), extracción con líquidos a presión (PLE), extracción asistida por microondas (MAE).

Se hace necesario el estudio particular de los ácidos fenólicos presentes en estas especies de microalgas, así como evaluar su capacidad antioxidante y estudiar el rendimiento de éstos con el fin de aislar compuestos con potencial uso medicinal y farmacológico.

VII. LITERATURA CITADA

- Abdala, D. R. T. Cabello, P. A. Márquez, G. E. y López F. F. (2014). Variación intratalo de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad de la fenolsulfatasa en *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyceae) del sur de España. *Cien. Marin.* 40(1): 1–10.
- Agatonovic-Kustrin S. and Morton, D.W. (2013). Cosmeceuticals derived from bioactive substances found in marine algae. *Oceanog.* 1: 106. doi:10.4172/ocn.1000106.
- Acosta- Estrada, B. A. Gutiérrez, U. J. A. and Serna, S. S. O. (2014). Bound phenolic in food, a review. *Food Chem.* (152): 46-55.
- Akpolat, O. (2008). Determination of consumer expectations by illustration of *Spirulina* marketing of biotechnological products. *Trends in Agric. Econ.* 1(1):27-34.
- Andersen, R.A. (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Acad Press. USA. 578 p.
- Araujo, G. S. Matos, J.B.L. Gonçalves L. R.B. Fernandes, F. A. N. and Farias W. R. L. (2011). Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bio. Tech.* (102): 5248–5250
- Bigongo, C. Khozon-Goldberg, I. Boussiba, S. Vonshak, A. and Cohen, Z. (2002). Lipids and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incise*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochem.* (60): 497-503.
- Becker, E. W. (1994) *Microalgae – Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bhosale P. (2004). Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl. Micro. Biotech.* (63): 351–361
- Brown, M. R. (2002). Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E. Ricque-Marie, D. Tapia-Salazar, M. Gaxiola-Cortés, M. G. Simoes, N. (Eds.). *Avances*

en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.

- Cabello- Paisini, A. Macías- Carranza, V. Abdala, R. Korbee, N. and Figueroa, F. L. (2011) Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulvarigida* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* (23): 363–369.
- Copia, J. Gaete, H. Zúñiga, G. Hidalgo, M. y Cabrera, E. (2012) Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella* sp. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 40(1): 113-123.
- Dawes, C. J. (1991). *Botánica Marina*. Primera reimpresión. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México.
- Durnford D. G. (2003). Structure and regulation of algal light-harvesting complex Genes. *Photosynthesis in algae*. Chapter 4. En: pp 63-82.
- Duval, B. Shetty, K. and Thomas, W. H. (2000). Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomona snivalis* after exposure to UV light. *J. Appl. Phycol.* (11): 559–566.
- Echavarría, Z. B. Franco, S. A. de Martínez M. A. (2009). Actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *VITAE, Fac. Q. Farm.* 16 (1): 126-131.
- Edding, M. Tala, F. y Vazques, J. (2006). Fotosíntesis, productividad y algas marinas. Cap. XI. En: *Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

- Fimbres, O. D. (2011). Evaluación del crecimiento, biomasa y producción de carotenoides de *Dunaliella* sp. a diferentes concentraciones de nitrógeno. Tesis Maestría. Universidad de Sonora. 57p. México.
- Foster R.M. and Dring M. J. (1994). Influence of blue light on the photosynthetic capacity of marine plants from different taxonomic, ecological and morphological groups. *Euro. J. of Phyc.* 29: (1), 21-27
- Goiris, K. Muylaert, K. Fraeye, I. Foubert, I. De Brabanter, J. & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J. Phycol.* 24:1477-1486.
- Gómez, O. A. Gómez & J. Rosas. 1994. Cultivo masivo de las microalgas *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Nannochloris oculata* y *Tetraselmis chuii*, utilizando recipientes de distinta transparencia. *Saber*, 6: 28-32.
- Guillard, R. L and Ryther J. H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Husted and *Denotula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. of Microb.* 8: 229-239.
- Hajimahmoodi, H. Mohammad, A. F. Mohammadi, N. Soltani, N. Mohammad R. O. and Nafissi- Varcheh N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J. Appl. Phycol.* 22:43–50.
- Hanelt, D. Wiencke, C. and Bischof, K. (2003). Photosynthesis in marine microalgae. Ch. 18. In: *Photosynthesis in Algae*. pp 413-435.
- Ibañez, E. Herrero, M. Mendiola, J. A. and Castro P. M. (2012). Ch. 2. In: *Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria and Invertebrates*. DOI 10.1007/978-1-4614-1247-2_2, Spring. Sci. Bus. Media, LLC.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *R Food Scie. and Nutr.* (44):453–464.

- Kepekçi, R. A. and Saygideger, S. D. (2012) Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. *J. Phycol.* 24: 897-905.
- Kim, S-H. Liu, K-H. Lee, S-Y, Hong, S-J. Cho, B-K, Lee, H. Lee, C-G. and Choy, H-K. (2013). Effects of light intensity and nitrogen starvation on glycerolipid, glycerophospholipid, and carotenoid composition in *Dunaliella tertiolecta* culture. *PLoS ONE* 8(9): e72415.
- Kim, W. Park J. M. Gim, G. H. Kim, S. W. Jeong, S. H. Chang M. K. and Kim D. J. (2012). Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Biop. Biosyst Eng.* 35:19–27.
- Klejdus, B. Kopecký J. Benešová, L. and Vacek, J. (2009). Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *J. Chrom. A.* (1216): 763–771.
- Klejdus, B. Lojková, L. Plaza M. Snóblová M. and Stěrbová D. (2010) Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217:7956–7965.
- Lemus, N. Urbano, T. Arredondo, V. B. Guevara, M. Vásquez, A. Carreón, P. L. y Vallejo, N. (2006). Crecimiento bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivada en sistemas discontinuos y semicontinuos. *Cienc. Mar.* 32 (3): 397-603.
- Li, H. Cheng, K. Wong, C. Fan, K. Chen, F. and Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.* (102): 771–776.
- López-Elías, J.A. Voltolina, D. Chavira-Ortega, C.O. Rodríguez-Rodríguez, B.B. Sáenz-Gaxiola, L.M. Cordero-Esquivel, B. y Nieves, M. (2003). Mass production of microalgae in six commercial shrimp hatcheries of the Mexican northwest. *Aquac. Engin.* (29): 155-164.

- López- Elías, J. A. Voltolina, D. Nieves-Soto, M. y Figueroa-Ortiz, L. (2004). Producción y Composición de Microalgas en Laboratorios Comerciales del Noroeste de México. En: L.E. Cruz Suárez, D. Ricque Marie, M.G. Nieto López, D. Villarreal, U. Scholz, y M. González. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, México. 16-19 Noviembre. P: 636-649.
- López- Elías, J. A., Huerta, A. N., Murguía, L. A. y Mercado, C., L. R. (2012). Manual de laboratorio de cultivos de apoyo acuícola. Editorial Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. 62 p.
- López- Elías, J. A. Fimbres, O. D. Medina, J., L. A. Miranda, B, A. Martínez, C. L. R. y Molina, Q. D. M. A. (2013). Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados en nitrógeno. FYTON (82): 23-30.
- López, A. Rico, M. Rivero, A. and Suárez D. T. M. (2011). The Effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoprium* algae extracts. Food Chem. (125): 1104-1109.
- Loreto, C. Rosales, N. Bermúdez, J. y Morales, E. (2003). Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. Guay. Bot. 60(2): 83-89.
- Martínez – Flores, S. González, G. J. Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. XVII (6): 271-278.
- Medina, F. D. López, E. J. A. Martínez, C. L. R. López, T. M. A. Hernández, L. J. Rivas, V. M. E. y Mendoza, C. Fernando (2014). Evaluation of the productive and physiological responses of *Litopenaeus vannamei* infected with WSSV and fed diets enriched with *Dunaliella* sp. J of Invert Path (117): 9-12.

- Moheimani N. R. (2013). Long-term outdoor growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) in bag photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 25:167–176.
- Morris, Q. H. Quintana, C. M. Almarales, A. A. and Hernández, N. L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorellavulgaris*. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 13(2): 123-8.
- Mutsunaga, T. Takeyama, H. Miyashita, H. and Yokoushi, H. (2005) Marine Microalgae. *Adv Biochem. Engin/Biotech.* 96: 165–188.
- Oliveira, M. A. C. I. DE, M. P. C. Monteiro & D. G. F. Leite. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina máxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. *Aquacu Intern.* 7: 261-275.
- Onofrejová, L. Vašíková, J. Klejdus, B. Stratil, P. Misurcová, L. Krácmar, S. Kopecký, J. and Vacek, J. (2010). Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharm Biom Anal.* 51: 464–470
- Piña, P. Medina, M. A. Nieves, M. Leal, S. López- Elías, J. A. y Guerrero, M. A. (2007). Cultivo de cuatro especies de microalgas con diferentes fertilizantes utilizados en acuicultura. *Rev. Invest. Mar.* 28 (3): 225-236.
- Quintana, C. M. Nazario, H. L. Morris, Q. H. and González, F. (1999). Contenido de algunas vitaminas en cultivos de microalga *Chlorella* sp. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 13(1): 9-13.
- Richardson, K. Beardall, J. and Raven, K. (1983). Adaptation of unicellular algae to irradiance an analysis of strategies. *New Phyt.* (93): 157-191.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science. EUA.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in food: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2866-2887.

- Rosales- Loaiza, N. Avendaño D. Otero, A. y Morales, E. (2008). Crecimiento, producción de pigmentos y proteínas de la microalga *Dunaliella viridis* (chlorophyta) en cultivos semicontinuos. Bol. Centro Invest. Biol. 42(3): 323–334.
- Ruangsomboon, S. (2012). Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. Bio. Tech. 109: 261–265.
- Sakamoto, K. Baba, M. Suzuki, I. Watanabe, M. M. and Shirawa Y. (2012). Optimization of light for growth, photosynthesis, and hydrocarbon production by the colonial microalga *Botryococcus braunii* BOT-22. Bio. Tech. 110: 474–479.
- Sánchez, S. M. P. and Voltolina, D. (2006). The growth rate, biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light sources. Aquac. Engin. 35: 161–165.
- Sforza, E. Simionato, D. Giacometti, G. M. Bertucco, A. and Morosinotto, T. (2012) Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. PLoS ONE 7(6): e38975.
- Skulberg, O. (2000). Microalgae as source of bioactive molecules- experience from cyanophyte research. J. Phycol. 12: 341-348.
- Smith, A. J. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. J. Appl. Phy. 16: 245–262.
- StatSoft, Inc. 1997. STATISTICA Industrial System
- Trejo, E. R. (2002). Crecimiento y composición de *Chaetoceros* sp. cultivados en recipientes de diferentes características ópticas. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa.

- Ugwu, C. U. Aoyagi, H. and Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Biores. Tech.* (99) 4021–4028.
- Ulloa, G. Otero, A. Sánchez, M. Sineiro, J. Núñez, M. J. y Fábregas J. (2012). Effect of Mg, Si, and Sr on growth and antioxidant activity of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s10811-011-9764-2
- Vidal, N. A. Motidome, M. Mancini, F. J. Fallarero L. A. Midori, M. T. Brandao, T. M. and Lapa, A. J. (2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Braz. J. Pharm. Scs.* 37 (3): set. /dez.
- Wang, T. Jónsdóttir R. and Ólafsdóttir, G. (2009) Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.* 116, 240–248.
- Waterhouse, A. L. (2002) Determination of total phenolics. *Current Prot. in Food Analy. Chem.* 11.1.1-11.1.8.
- Wikimedia Commons. Las capas del océano y sus diferentes profundidades. Fuente: *Oceanic_divisions.svg*: Chris huh (*Oceanic_divisions.svg*) [CC0].

T. 160204

VIII. APÉNDICE

Soluciones madre para preparar el medio de cultivo f/2. Para preparar un litro de medio, agregar 1 mL de cada una de las soluciones 1; 2,2 y 3,2 a 1 litro de agua de mar filtrada (Guillard y Ryther, 1962).

Constituyentes	Cantidad	
1.	Nutrientes mayores	g/L de agua destilada
1.1.	Nitrato de sodio, granulado y refinado	75
1.2.	Fosfato de sodio monobásico	5
1.3.	Silicato de sodio metasoluble*	30
2.	Metales traza	g/100 mL de agua destilada
2.1.	<u>Solución primaria</u>	
2.1.1.	Sulfato cúprico, cristales finos	0,98
2.1.2.	Sulfato de zinc, cristales finos	2,2
2.1.3.	Cloruro de cobalto, cristales finos	1,0
2.1.4.	Cloruro manganoso, cristales finos	18,0
2.1.5.	Molibdato de sodio, cristales finos	0,63
2.2.	<u>Solución secundaria</u>	g/L de agua destilada
2.2.1.	Cloruro férrico	3,15
2.2.2.	EDTA disódico	4,36
2.2.3.	Metales traza o alternativamente	1 mL de c/u de las sol. 2.1.1. a 2.1.5.
2.2.1.	EDTA férrico	5,0
2.2.2.	Metales traza	1 mL de c/u de las sol. 2.1.1. a 2.1.5.
3.	Vitaminas	
3.1.	<u>Solución primaria</u>	g/L de agua destilada
3.1.1.	Biotina cristalizada	0,1
3.1.2.	Cianocobalamina	1,0
3.2.	<u>Solución secundaria</u>	Cantidad en 100 mL de agua destilada
3.2.1.	Biotina	1 mL de la sol. 3.1.1
3.2.2.	Cianocobalamina (B12)	1 mL de la sol. 3.1.2
3.2.3.	Tiamina clorhídrica (B1)	20

*En caso de Diatomeas