



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Boca del Río

OPCIÓN XI Titulación Integrada: TESIS

Análisis bioquímico de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta) expuesta a estrés salino

PARA OBTENER EL TÍTULO DE: LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ALI UTRERA GRAJALES

DIRECTOR:

DR. IGNACIO ALEJANDRO PÉREZ LEGASPI

BOCA DEL RÍO, VERACRUZ

Índice

Resumen.....	2
Dedicatoria.....	3
Agradecimientos.....	4
Índice de figuras.....	5
1. Introducción.....	7
1.1 Algas.....	7
1.2 Clasificación de las microalgas.....	8
1.3 Importancias de las microalgas.....	8
1.4 Diatomeas (Bacillariophyceae).....	10
1.5 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	11
1.5.1 Distribución.....	12
1.5.2 Morfología.....	12
1.6 Usos de las microalgas en la industria.....	12
2. Antecedentes.....	15
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.....	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos Específicos.....	18
6. Marco teórico.....	19
6.1 Composición bioquímica de las microalgas.....	19
6.1.1 Lípidos y ácidos grasos.....	19
6.1.2 Proteínas.....	20
6.1.3 Carbohidratos.....	20
6.1.4 Pigmentos y antioxidantes.....	20
6.2.3 Composición bioquímica de <i>P. tricornutum</i>	21
6.3 Aplicaciones de las microalgas para el bienestar humano.....	23
6.3.1 Nutrición.....	23
6.3.2 Microalgas y salud mental: beneficios neuroprotectores y funcionales.....	24
7. Materiales y métodos.....	26
7.1 Diseño Experimental.....	26
7.2 Obtención del cultivo.....	26
7.3 Peso constante de materiales.....	28
7.4 Determinación de peso seco.....	30
7.5 Determinación de proteínas.....	32
7.6 Determinación de carbohidratos.....	34
7.7 Determinación de lípidos.....	37
7.8 Determinación de lípidos saturados e insaturados por el método de Sulfo-fosfovainillina....	40
7.9 Determinación de pigmentos.....	40
8 Resultados.....	43
9. Discusión.....	48
10. Conclusiones.....	51
11. Literatura citada.....	51

12. Anexos.....	63
-----------------	----

Resumen

Las microalgas son organismos capaces de adaptarse a las condiciones adversas del medio modificando su composición bioquímica a través de sus mecanismos fisiológicos. Dentro de la biotecnología azul esto representa una gran oportunidad para el cultivo industrial de estos organismos. Las microalgas son organismos que contienen componentes bioactivos importantes para la industria en diferentes sectores, desde ser útil como fuente nutricional para otro tipo de especies marinas hasta para complementar una dieta sana para los seres humanos. La relativa facilidad de alterar las condiciones del medio en cultivos controlados nos ayuda a saber cómo afectan estos cambios a la composición de las microalgas y por ende tener cultivos más ricos en nutrientes o alguna otra molécula. *Phaeodactylum tricornutum* es una especie de microalga que ha sido estudiada en las últimas décadas debido a su capacidad de adaptación a las adversidades del medio y su uso potencial en la producción de ácidos grasos y pigmentos de interés comercial. En este trabajo se evaluó la composición bioquímica de *P. tricornutum* y los cambios que presentó al ser expuesta a estrés salino durante su cultivo para evaluar su potencial como una alternativa biotecnológica.

Dedicatoria

Quiero dedicar este proyecto a todas las personas que fueron parte fundamental en el desarrollo de esta tesis.

Principalmente a mis padres, quienes me brindaron el apoyo y con su esfuerzo se hizo posible este reconocimiento.

De igual manera dedico este trabajo a todos los compañeros con los que compartí gratos momentos desarrollando esta investigación

Agradecimientos

Quiero dar las gracias al Instituto Tecnológico de Boca del Río por las instalaciones en donde se llevó a cabo mi formación profesional. Agradezco a la Licenciatura en Biología por haber sido la precursora del desarrollo de conocimientos y haber servido como norte en mi desarrollo profesional.

También agradezco profundamente a mi director de tesis, quien sembró la motivación para llevar a cabo este trabajo, Dr. Ignacio Alejandro Pérez Legaspi, brindó un respaldo constante, orientación y contribución esencial en cada etapa del proyecto, así como gratos momentos a lo largo del camino.

De igual manera extiendo mi agradecimiento al Maestro Eugenio Rangel León y a la maestra Citlalli Galicia García, quienes proporcionaron orientación esencial para la realización del trabajo.

Al M.C. José Ángel Valencia Molina, antiguo compañero de laboratorio quien dedicó tiempo compartiendo sus conocimientos y a todos los compañeros del Laboratorio de Alimento Vivo, con quienes compartí buenos momentos y aportaron un pequeño grano de arena a la investigación.

Índice de figuras

Fig. 1. Estructura de las diatomeas (Zepeda, 2019).....	11
Fig. 2. Cultivo industrial de microalgas (MisPeces, 2022).....	14
Fig. 3. Productos derivados de diversas microalgas (García, 2017).....	25
Fig. 4. Cultivos de <i>P. tricornutum</i> en distintas concentraciones de salinidad.....	27
Fig. 5. Preparación de salinidad del medio de cultivo.....	28
Fig. 6. Cultivo de <i>P. tricornutum</i> tomada a 10 y 100 x con un microscopio óptico.....	28
Fig. 7. Lectura de peso constante de cajas petri.....	30
Fig. 8. Lectura de peso constante de tubos de ensayo.....	30
Fig. 9. Muestras de biomasa seca en desecador.....	32
Fig. 10. Biomasa seca obtenida de muestras de 100ml.....	32
Fig. 11. Albumina de huevo diluida a diferentes concentraciones.....	33
Fig. 12. Albúmina de huevo con reactivo Bradford.....	34
Fig. 13. Muestras control de proteínas con reactivo Bradford.....	34
Fig. 14. Muestras de proteínas con reactivo Bradford.....	34
Fig. 15. Lectura de proteínas en espectrofotómetro de Uv-Vis.....	35
Fig. 16. Preparación de muestras de carbohidratos con ácido sulfúrico.....	37
Fig. 17. Muestras de carbohidratos a baño María.....	37
Fig. 18. Muestras de carbohidratos listas para lectura en espectrofotómetro de Uv-Vis.....	38
Fig. 19. Muestras de lípidos con fases metanol - agua y cloroformo - lípido.....	39
Fig. 20. Reducción de líquidos en muestras de lípidos.....	39
Fig. 21. Muestras de lípidos listas para gravimetría.....	40
Fig. 22. Pesado de muestras de lípidos.....	40
Fig. 23. Muestras de lípidos resuspendida.....	41
Fig. 24. Muestras de lípidos con sulfo-fosfovainillina listas para lectura.....	41
Fig. 25. Rompimiento celular en sonicador.....	43
Fig. 26. Muestras limpias de pigmentos lista para lectura en espectrofotómetro de Uv-Vis.....	43
Fig. 27. Cuantificación de lípidos por gravimetría en <i>P. tricornutum</i> a diferentes salinidades....	44

Fig. 28. Determinación de lípidos por espectrofotometría en <i>P. tricornutum</i> a diferentes salinidades.....	45
Fig. 29. Proteínas por espectrofotometría en <i>P. tricornutum</i> a diferentes salinidades.....	46
Fig. 30. Gráfico de carbohidratos por espectrofotometría en <i>P. tricornutum</i> a diferentes salinidades.....	47
Fig. 31. Cantidad de pigmentos presentes en <i>P. tricornutum</i> a diferentes salinidades.....	48

1. Introducción

El volumen de los océanos se conforma por aproximadamente 1.335 millones de km³ representando el 71% del planeta y es el hogar de una inmensa cantidad de especies. Los recursos vivos provenientes del mar tienen un gran potencial para el desarrollo de nuevos alimentos así como para el desarrollo bioquímico, farmacéutico, cosmético y bioenergético. La biotecnología azul (también llamada biotecnología marina) promueve la actividad económica aprovechando recursos marinos sin afectar el medio ambiente marítimo (Pérez, 2022). La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) define a la biotecnología azul como: “aplicación de nuevas metodologías a los organismos marinos para aumentar la oferta de productos del mar, mejorar la seguridad y el control de la proliferación de microorganismos nocivos transmitidos por el agua, desarrollo de nuevos medicamentos y cuidados sanitarios, cosméticos y con aplicaciones en la agricultura y productos alimentarios” (OECD, 2017).

1.1 Algas

Dentro de los organismos fotosintéticos las algas presentan una gran diversidad en cualquier cuerpo de agua. Son capaces de resistir a variaciones en factores como temperatura, salinidad, pH, luminosidad, ausencia de nutrientes y pueden crecer de manera aislada o formar colonias. Para clasificar a las algas de manera general se suelen usar los términos. algas rojas, algas marrones y algas verdes. También se suelen clasificar según su tamaño en microalgas y macroalgas. Se consideran macroalgas a aquellas algas multicelulares de gran tamaño, capaces de verse a simple vista, por otra parte, las microalgas son aquellas que son células individuales, microscópicas y pueden ser procariotas, parecidas a las cianobacterias o eucariotas como las algas verdes (Gonzales *et al.*, 2021).

1.1.1 Microalgas

Las microalgas son organismos de un tamaño reducido (de 2 a 200 µm) capaces de crecer rápidamente debido a su estructura multicelular, unicelular o simple. Pueden reproducirse en

todo tipo de ecosistemas, pueden crecer incluso sobre la tierra, no siendo exclusivamente acuáticos. Se estima que existen más de 100,000 especies de microalgas y solo se han estudiado un 40% aproximadamente de las cuales, gran variedad es capaz de vivir en diferentes condiciones ambientales (Rendón *et al.*, 2015). De la energía solar disponible en la superficie del mar, menos del 1% es absorbida por organismos autótrofos, que son los que constituyen el primer eslabón de la cadena trófica.

1.2 Clasificación de las microalgas

Fue en el año de 1877 cuando Hensen usó por primera vez el término plancton, con este término se refirió a todas las células orgánicas que se movían según los movimientos del agua (Gómez, L., 2007). Las microalgas al igual que las cianobacterias han estado presentes en el planeta desde hace millones de años, formaron parte de los primeros organismos vivos y se les atribuye ser las primeras en realizar fotosíntesis, lo que transformó la dinámica de evolución en el planeta. Las microalgas contienen principalmente un compuesto llamado clorofila a, que sirve para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis (Álvarez *et al.*, 2019). Las cianobacterias o algas verde-azules, procariotas, tradicionalmente se encuentran en el grupo de las microalgas, sin embargo, realizan fotosíntesis mediante bacterioclorofila y no mediante la clorofila presente en las microalgas. Por ende, el significado de microalga no tiene coherencia taxonómica ya que incluye organismos procariontes y eucariontes (Pérez & Carril, 2009).

1.3 Importancias de las microalgas

De la energía solar disponible en la superficie del mar, menos del 1% es absorbida por organismos autótrofos, que como ya se mencionó son los que constituyen el primer eslabón de la cadena trófica, considerándose como la vía de entrada de la energía al ecosistema, de ahí su nombre de productores primarios. Actualmente, las microalgas siguen siendo vitales gracias a su

producción primaria. Se estima que la producción primaria neta es de 65 Pg de carbono al año en ecosistemas oceánicos, 60 Pg de carbono al año para los ecosistemas terrestres, en cuerpos de agua dulce se estima 1 Pg de carbono al año. En el entorno global, más del 75% de la producción de oxígeno ocurre gracias a las microalgas y su alta eficiencia fotoquímica, la cual es de entre 7 a 31 veces mayor que en las plantas terrestres (Díaz-Alejo, 2022).

Las comunidades de microalgas pueden encontrarse en diversos entornos, por ejemplo, en los suelos desérticos las cianobacterias tienen un papel primario en la formación de micro agregaciones en la fijación de nitrógeno, contribuyen a la estabilidad del suelo, aumentan el contenido orgánico de la arena y ayudan en la retención de agua, promoviendo o retardando el crecimiento de las plantas vasculares. Estas interacciones pueden ser aprovechadas para mitigar efectos en cambios climáticos protegiendo los suelos de la desertificación y la erosión (Aguirre-Cavazos *et al.*, 2024).

En la biotecnología, las microalgas se consideran organismos de importancia para la obtención de productos con fines energéticos, como pueden ser el bioetanol, biometano o biodiesel, principalmente como fuentes de calor y electricidad (Chirivella-Martorell *et al.*, 2017). Gracias a la flexibilidad en el metabolismo de las microalgas, también se consideran organismos biorremediadores, capaces de eliminar sustancias tóxicas del medio donde habitan. Son capaces de acumular importantes concentraciones de tóxicos sin afectar su actividad biológica (Ortiz-Villota *et al.*, 2018)

1.4 Diatomeas (Bacillariophyceae)

Las diatomeas pertenecen a la división Bacillariophyta con un registro fósil desde el Jurásico (~190 ma). Las primeras diatomeas fósiles son marinas, las dulceacuícolas tuvieron origen durante el cretácico superior (~70 ma). Algunos ejemplares de las primeras diatomeas dulceacuícolas del mundo se encuentran preservados en sedimentos en Sonora. Durante el Eoceno (55 ma) ocurrió la diversificación de las diatomeas mientras que para el Mioceno (23 ma)

ya existían la mayoría de géneros dulceacuícolas actuales. Las diatomeas son organismos eucariontes, unicelulares de tamaño reducido de entre 10 y 200 μm de largo. La característica principal de las diatomeas es la cubierta de sílice de sus células, dicha cubierta es resistente a la degradación y se conoce como frústula, está formada por dos mitades, la mitad de mayor tamaño recibe el nombre de epiteca e hipoteca la más pequeña. Cada teca tiene una parte principal denominada valva y al conjunto de bandas que unen las valvas se le llama cingulo. Las valvas tienen ornamentaciones particulares que permiten distinguir a las diferentes especies e inclusive las variedades dentro de un grupo (Caballero, s.f.)

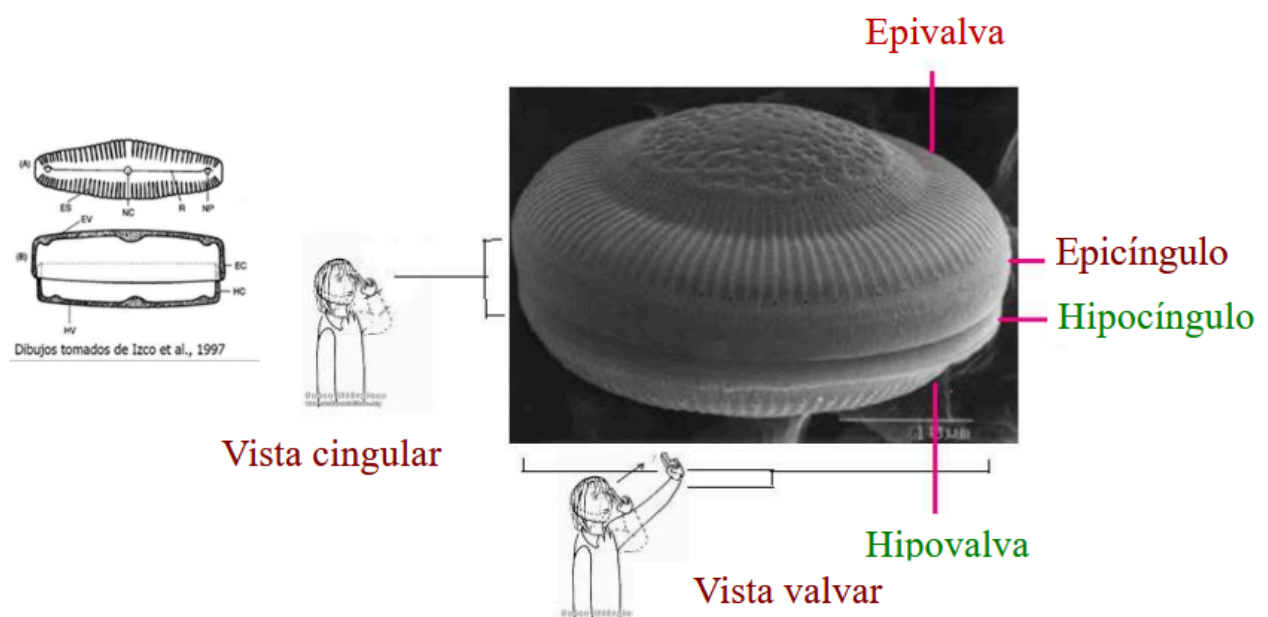


Fig. 1. Estructura de las diatomeas (Zepeda, 2019)

Las diatomeas constituyen casi la mitad de la biomasa fitoplanctónica en los océanos. Habitan en casi todos los ambientes acuáticos y algunos ambientes ácidos o alcalinos, dulceacuícolas o hipersalinos, oligotróficos o muy eutrofizados, además de que también pueden encontrarse como endosimbiontes de otros microorganismos como dinoflagelados y foraminíferos. En cuanto a su forma de vida, mayormente son solitarias, aunque también pueden vivir en colonias formando cadenas o agregados. Se han descrito más de 12,000 especies de diatomeas, aunque se estima que el número de especies puede superar las 100,000. De acuerdo con su simetría y forma, las

diatomeas se clasifican en céntricas y pennadas. Las céntricas corresponden a la clase Coscinodiscophyceae y se caracterizan por tener simetría en diferentes planos y, en su mayoría presentan simetría radial. Las pennadas se organizan en dos clases: Bacillariophyceae las cuales presentan rafe y, Fragilariophyceae que no lo presentan (López-Fuerte *et al.*, 2020).

1.5 *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum es una microalga unicelular con un tamaño aproximado de 3 µm de ancho y de 8 a 20 µm de largo existiendo tres morfologías: fusiforme, trirradiada y ovalada, posee un solo plastido. Crece en aguas salobres a salinas. Se diferencia de las diatomeas típicas por una pared celular con más sílice de lo habitual (Lye *et al.*, 2020).

Es una diatomea de crecimiento rápido, apta para un cultivo a gran escala. Es capaz de adaptarse a una amplia variedad de medios de cultivo, tolera altos niveles de pH e intensidad lumínica. (Heimann & Katsaros, 2012)

Clase: Bacillariophyceae

Orden: Bacillariales

Suborden: Phaeodactylineae

Familia: Phaeodactylaceae

Género: *Phaeodactylum*

Especie: *Phaeodactylum tricornutum*

(He *et al.*, 2014)

1.5.1 Distribución

Phaeodactylum tricornutum es una especie de aguas salobres con distribución mundial. Durante el último siglo, ha sido aislada de diferentes áreas geográficas, mayormente de aguas costeras lo que se conoce como su hábitat principal. También ha sido observada en aguas alcalinas saladas en lagos. Existen aproximadamente 10 genotipos que han sido encontrados en aguas de distintos continentes, sin embargo, no se atribuye un genotipo específico a los distintos morfotipos (Heimann & Katsaros, 2012).

1.5.2 Morfología

Phaeodactylum tricornutum es una diatomea marina polimórfica que presenta tres tipos de morfología: fusiforme, trirradiado y ovalado. La célula ovalada fue descrita por Borowitzka y Volcani (1978).

Los tipos fusiforme y trirradiado se adaptan mejor al estilo de vida planctónico mientras que las ovaladas se consideran bentónicas, poseen un rafe y pueden secretar sustancias mucilaginosas favoreciendo la movilidad y adhesión celular. Diversos estudios han demostrado que puede cambiar morfológicamente como respuesta a las fluctuaciones en las condiciones de crecimiento, como la salinidad, la temperatura y el pH (Lye *et al.*, 2020).

1.6 Usos de las microalgas en la industria

Algunas aplicaciones comerciales importantes buscan obtener productos de alto valor añadido con enfoques hacia la nutrición y la salud humana, así como la cosmetología y acuicultura. Los cultivos de algas, son indispensables en la acuicultura como alimento vivo para las especies cultivadas en la industria, como moluscos, crustáceos, peces, rotíferos, artemias y copépodos, a través de estas especies se forma una cadena alimenticia convencional que se aplica en cualquier criadero (Chirivella-Martorell *et al.*, 2017).

Actualmente existen tres problemáticas principales en la sociedad: energías renovables, reducción de gases de efecto invernadero y disponibilidad de agua limpia. Con ayuda de la biotecnología y el desarrollo de técnicas para bioprocesos se ha descubierto que las microalgas son los organismos clave para combatir las problemáticas actuales. En el cultivo de microalgas se hace uso del metabolismo microbiano, células animales, células vegetales, plantas y componentes celulares para producir nuevos productos biotecnológicos y eliminar residuos como dióxido de carbono y otros tipos de contaminantes (Acién *et al.*, 2020).

La limpieza de aguas residuales es cada día más importante debido al aumento de la población y crecimiento de las industrias en todo el mundo. Las exigencias de las normativas de depuración son cada vez más rigurosas, esto ha inducido un desarrollo en nuevas técnicas de

depuración de manera eficiente y además con características sostenibles y limpias. La contaminación de los cuerpos de agua radica en la eutrofización, que es causada por la liberación de compuestos orgánicos e inorgánicos al medio. Se ha demostrado que las microalgas poseen una capacidad ficorremediadora que consiste en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio. Los componentes son captados por la biomasa algal y pueden ser recuperados mediante su cosecha. Este proceso se hace con dos propósitos: la eliminación de los contaminantes y producción de biomasa con fines comerciales. Dichos objetivos dependen del tipo de cultivo, la especie cultivada y los factores ambientales (Ballesteros *et al.*, 2021).

En las últimas décadas se ha demostrado que las algas también absorben y concentran elementos tales como vitaminas, minerales, oligoelementos, aminoácidos, entre otros, importantes para la salud. Algunos extractos de las microalgas se hallan en productos para la cara y piel, en forma de cremas o productos refrescantes y regenerativos, también se usan en productos de protección solar y cuidado del cabello. Por otra parte, en el sector farmacéutico también tienen usos potenciales, siendo proveedoras de: aminoácidos, carotenoides, ácidos grasos, vitaminas y antioxidantes. Desarrollando tabletas, concentrados, suplementos en polvo, productos alimenticios, entre otros (Carmona *et al.*, 2013).



Fig. 2. Cultivo industrial de microalgas (MisPeces, 2022)

2. Antecedentes

Brand (1983) realizó un experimento en el cual evaluó la tolerancia a la salinidad de 46 especies del fitoplancton marino. Una de las especies fue *Phaeodactylum tricornutum*, la cual se desarrolló de manera óptima a una salinidad de 25 UPS.

Lewin *et al.* (1958) estudiaron *P. tricornutum* meticulosamente en distintos medios de cultivo y en las formas oval y fusiforme. Dentro de su estudio recopiló la composición de lípidos y proteínas de los dos tipos de forma, dando como resultado para la forma oval un contenido de: lípidos 24%, proteínas 34% de peso seco. Por otra parte, para la forma fusiforme obtuvo: 34% lípidos, 31% proteínas.

Díaz-Barrera *et al.* (2021) comparten que *Haematococcus pluvialis* es una excelente productora de astaxantina. Expusieron a *H. pluvialis* en un medio al que añadieron acetato de sodio y cloruro de sodio en distintas cantidades y distintas etapas del cultivo. Como resultado, obtuvieron un aumento en la concentración de astaxantina, de 2.530 µg/mL hasta 7.325 µg/mL.

Bermúdez *et al.* (2002) demostraron que el contenido de pigmentos se ve afectado por los cambios de salinidad en microalgas como *Chroomonas* sp., un fenómeno común entre las microalgas consideradas halófilas.

Chávez (2008) estudió la influencia de la irradiancia, temperatura y disponibilidad de nutrientes en la composición bioquímica de *Navicula incerta*, si bien la alteración de estos factores no provocó cambios significativos en la composición de la diatomea, algunos factores si influyen mínimamente en la producción de ciertos compuestos como el contenido de clorofila a, que se vio afectado por irradiancia, temperatura y día de cultivo.

García-Cubero (2014) reconoció que los cambios en el metabolismo de las microalgas *Chlorococcum* sp., *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris*, *Porphyridium purpureum* y *Scenedesmus*

vacuolatus ocurrieron debido a la alteración de la fuente de carbono para cultivos, expuestos a CO₂ puro y CO₂ a partir de gases de combustión. Los resultados obtenidos fueron mejor adaptación y mayor producción de biomasa en las microalgas *Scenedesmus vacuolatus* y *Chlorella vulgaris*.

Cobos *et al.* (2015) evaluaron: *Ankistrodesmus* sp., *A. nannoselene*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *S. quadricauda*, cultivadas en ausencia de nitrógeno. Dentro de los organismos que destacaron por su producción de biomasa con mayor porcentaje de lípidos fueron *A. nannoselene*, *Ankistrodesmus* sp. y *Scenedesmus* sp. concluyendo que la ausencia de nitrógeno favorece el aumento de la producción de lípidos.

López *et al.* (2016) analizaron el contenido de fenoles totales en las especies *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira weissflogii*, *Dunaliella tertiolecta* y *Tetraselmis chuii*. Los cultivos fueron expuestos a diferentes condiciones de iluminación, obteniendo como resultado una mayor producción de células totales en cultivos de *D. tertiolecta* y *C. muelleri*. Por otra parte, la concentración más alta de fenoles totales se encontró en los cultivos de microalgas restantes.

Valencia (2023) observó alteraciones bioquímicas en las cepas *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina* y *Scenedesmus obliquus* al ser sometidas a tres tipos de estrés: tratamiento sin nutrientes, tratamiento sin nutrientes y con alta irradiancia, y alta irradiancia. El resultado obtenido fue el aumento en lípidos en *S. obliquus*, mientras que en las demás cepas (*D. tertiolecta*, *P. tricornutum*, *T. suecica* y *D. salina*) se observó un aumento en la cantidad de carbohidratos, lípidos y capacidad antioxidante.

Arenas (2023) estudió la composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* en cultivos estáticos y continuos, realizando diluciones (20, 30 y 40%) y viendo los efectos sobre la producción de biomasa. Las tasas de dilución mostraron resultados similares para *Phaeodactylum tricornutum* mientras que para *Thalassiosira weissflogii* la dilución al 20%

resultó mejor para la producción de biomasa presentando un aumento en el contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos.

Eriz (2024) realizó un estudio sobre el efecto de la calidad de la luz en el crecimiento y composición de *Phaeodactylum tricornutum*. Probó 4 tratamientos: luz blanca, luz roja, luz azul y luz mixta. La eficiencia fotosintética se mantuvo estable, sin embargo, el uso de la luz azul estimuló la acumulación de ácido eicosapentaenoico, mientras que para la luz blanca, roja y mixta no se obtuvieron resultados con cambios significativos.

3. Justificación

Las microalgas, dentro de la biotecnología azul, se han convertido en un recurso importante debido al alto control que se tiene sobre su desarrollo y la rapidez de su crecimiento. Gracias a su gran capacidad de adaptación a las alteraciones del medio y a la modificación de su metabolismo, se han vuelto un blanco estratégico para la industria.

El presente estudio se enfoca en *Phaeodactylum tricornutum* y como la modificación de la salinidad del cultivo puede inducir cambios fisiológicos que optimicen la producción de compuestos bioactivos de interés como proteínas, lípidos y pigmentos. Estos compuestos mejoran la calidad de alimento vivo para la acuicultura además de mostrar el potencial de ser utilizados como suplementos nutricionales con beneficios en la salud humana.

El impacto de esta investigación es significativo y diverso. Primeramente, contribuirá a la sostenibilidad de la acuicultura promoviendo procesos más eficientes y ecológicos reduciendo el uso de recursos y minimizando el impacto ambiental. En segundo lugar, genera productos con mayor valor agregado, fortaleciendo la competitividad en la industria.

Este proyecto impulsará la innovación tecnológica, así como el desarrollo científico en la región, fomentando la creación de empleos especializados en el área biotecnológica, ayudando a la economía local. Generará conocimiento sobre la respuesta de *Phaeodactylum tricornutum* a condiciones de estrés salino, permitirá crear estrategias de cultivo más eficientes y adaptadas a las necesidades del mercado.

4. Hipótesis

La microalga *Phaeodactylum tricornutum* presentará cambios en su composición bioquímica como respuesta a la exposición a estrés salino durante su cultivo, alterando su contenido de carbohidratos, lípidos, proteínas y pigmentos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la composición bioquímica de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* cultivada en diferentes concentraciones de salinidad

5.2 Objetivos Específicos

1. Analizar el cambio en el contenido de clorofila a, clorofila b, clorofila c, carotenos y fucoxantina en la diatomea *P. tricornutum* bajo estrés salino
2. Cuantificar la variación en el contenido de lípidos en la diatomea *P. tricornutum* bajo estrés salino
3. Calcular el cambio en el contenido de proteínas en la diatomea *P. tricornutum* sometido a cambios en la concentración salina.
4. Evaluar el cambio en el contenido de carbohidratos en la diatomea *P. tricornutum* ocasionados por estrés salino.

6. Marco teórico

6.1 Composición bioquímica de las microalgas

Cuantitativamente el componente más importante en la biomasa de las algas son las proteínas, estas pueden representar hasta el 50% del peso seco total, los cuales junto con los lípidos y los carbohidratos constituyen hasta el 90% del peso seco total. mientras que los minerales, ácidos nucleicos, pigmentos y demás componentes pueden representar una suma del 10% restante del peso (Rendón *et al.*, 2013)

La composición bioquímica de una especie microalgal, contenido de aminoácidos, grado de insaturación de los ácidos grasos o el contenido de vitaminas depende ampliamente de las condiciones de cultivo y del ciclo de crecimiento en que se lleva a cabo la cosecha de la biomasa. Sin embargo, no se pueden realizar generalizaciones sobre las respuestas de las microalgas a las alteraciones ambientales dado que tales respuestas difieren según la especie (Fidalgo, 1995).

En algunas especies estudiadas por Brown *et al.* (1989) bajo efecto de deficiencia de Nitrógeno o Fósforo, los niveles de carbohidratos y/o lípidos tienden a aumentar mientras que los niveles proteicos disminuyen. El nivel de ácidos grasos para algunas especies como el caso de *Cyclotella meneghiniana* varía a lo largo del fotoperiodo, siendo ácidos grasos saturados la fracción predominante al comienzo de la fase de luz. En *Dunaliella salina* se puede observar un aumento en el contenido de β -caroteno y de los aminoácidos esenciales al ser expuesta a altas salinidades.

6.1.1 Lípidos y ácidos grasos

La composición de lípidos y ácidos grasos de las microalgas varía según las condiciones de cultivo a las que se expone; en algunos casos, el contenido de lípidos puede aumentar por condiciones de ausencia de nitrógeno o algún otro factor de estrés. Por otra parte, la producción de ácidos grasos en microalgas tiene una amplia ventaja con respecto a la productividad por hectárea. Comparando con los cultivos agrícolas, la productividad de las microalgas es 30 veces superior al maíz o la soja. Uno de los problemas con la producción de ácidos grasos a partir de cultivos de microalgas es la identificación de especies adecuadas. Existe una diversidad de más

de 40,000 especies de microalgas de las cuales solo se han explorado los usos potenciales de unas decenas y de las cuales solo 10 son explotadas comercialmente a gran escala (Álvarez *et al.*, 2012).

6.1.2 Proteínas

El contenido de proteínas de las algas varía dependiendo de las especies de microalgas y las condiciones en las que se cultiva. Muchas especies pueden contener altos niveles de proteína, generalmente 40-60% de materia seca. Sin embargo, el contenido de proteína cruda en la biomasa de microalgas varía de 6 a 63%. Las diferencias entre el contenido proteico entre las especies de microalgas se adjudican principalmente a las características genéticas. No obstante, la razón de las diferencias en el contenido proteico de una especie es diverso, incluyendo los métodos de análisis, condiciones de cultivo y fases de crecimiento en la que se realizó la cosecha de biomasa de la microalga (McGinn *et al.*, 2021).

6.1.3 Carbohidratos

Los carbohidratos en las microalgas tienen dos propósitos principales: como componentes estructurales en las paredes celulares y como almacenamiento de compuestos dentro de la célula. Brindan la energía necesaria para el metabolismo y, en caso necesario, para la supervivencia temporal en condiciones de oscuridad. Los carbohidratos que almacenan las microalgas cubren una amplia categoría de azúcares y sus polímeros (di-, oligo- y polisacáridos) dependiendo de cada especie. Las cianobacterias sintetizan glucógeno, las algas rojas almidón floridiano, las algas verdes sintetizan amilopectinas como polisacáridos y las diatomeas sintetizan principalmente crisolaminarina. Algunas microalgas pueden acumular altos contenidos de almidón alcanzando hasta un 44% en el peso (Guzmán, 2023).

6.1.4 Pigmentos y antioxidantes

Los pigmentos presentes en las microalgas tienen una gran variedad de colores. La función principal de los pigmentos es la absorción de energía a diferentes longitudes de onda presentes en el espectro de luz visible. Los principales pigmentos fotosintéticos son: clorofila,

ficobiliproteínas y carotenos. Los pigmentos se pueden clasificar en dos: principales y secundarios. Dentro de los principales se encuentra únicamente la clorofila a, el cual es el encargado de romper la molécula de agua para utilizar el electrón en la fotosíntesis. Entre los pigmentos secundarios se encuentran clorofilas b, clorofila c, ficobiliproteínas y carotenos. Las concentraciones de pigmentos en las microalgas generalmente son menores al 5% del peso seco (Martínez & Vera-López, 2001).

Los antioxidantes son una amplia variedad de moléculas que incluyen carotenoides, polifenoles, ficobilinas, tocoferoles y ácidos grasos esenciales. La capacidad antioxidante de las microalgas, por ende, está relacionada fuertemente con su composición bioquímica, lo que varía entre las especies y sus condiciones de cultivo. Dentro de los pigmentos carotenoides, existen algunos de alto interés comercial como β -caroteno, la luteína y la astaxantina. Los antioxidantes desempeñan una función importante en la neutralización de los radicales libres dañinos, previniendo el daño oxidativo a biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Cotas *et al.*, 2024).

6.2.3 Composición bioquímica de *P. tricornutum*

La caracterización bioquímica de *P. tricornutum* se realiza mediante la medición del contenido total de carbohidratos, proteínas y lípidos. Los carbohidratos son el resultado de la fotosíntesis de las microalgas y son el componente que se acumula primero en las células. *P. tricornutum* en un análisis de carbohidratos arrojó un $7,85 \pm 0,22$ % en peso de carbohidratos totales (Branco-Vieira *et al.*, 2018).

Se han obtenido resultados similares en otros estudios realizados exponiendo a la diatomea a una mayor irradiación exterior demostrando que en ausencia de limitación lumínica el contenido de carbohidratos es independiente de la concentración de la biomasa. Sin embargo, otros estudios han demostrado que presenta más del 40% en peso de carbohidratos cuando se cultiva a baja irradiación interior (Sánchez *et al.*, 2013).

Otros estudios muestran que la limitación de nutrientes también afecta el contenido de carbohidratos, en el caso de la ausencia de nitrógeno el peso en carbohidratos ha sido de 60%

mientras que limitando el fósforo han aumentado solo hasta 29% y 39% del peso en carbohidratos (Chauton *et al.*, 2013)

La cantidad de proteínas que produce *P. tricornutum* en un cultivo normal es de 38.40 ± 2.46 % del peso total. No obstante también ha sido estudiado el porcentaje proteico en diferentes fases de crecimiento y se han obtenido los siguientes resultados: el 2.58%, el 13.38% en peso y el 17.51% en peso de proteínas en fase exponencial, fase estacionaria temprana y fase estacionaria tardía del cultivo respectivamente (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989).

Otros estudios comprobaron que el contenido de proteínas ronda de un 16 a un 26% del peso cuando se cultiva en ausencia de nitrógeno. Mientras que si se limita el fósforo el contenido de proteínas varían de un 19 a un 23% (Chauton *et al.*, 2013).

El contenido proteico corresponde a la molécula celular más abundante constituyendo de entre 30 a 60% de la biomasa total en condiciones de abundancia de nutrientes (Geider *et al.*, 2004).

Los lípidos son una macromolécula esencial para el almacenamiento de energía y función estructural. Para un cultivo en condiciones normales se han obtenido resultados de 9.08 ± 0.38 % de peso total (Bligh & Dyer, 1959).

Diversos factores afectan el contenido lipídico de *P. tricornutum* como la intensidad lumínica, fase de cultivo, sistemas de cultivo, disponibilidad de nutrientes y condiciones de estrés. Sin embargo se han alcanzado altos niveles de lípidos (43%) en cultivos controlados dentro de laboratorios a volúmenes pequeños (Vandamme *et al.*, 2004). Aunque el contenido lipídico de la biomasa de *P. tricornutum* puede aumentar a 53.04 ± 3.26 % del peso total exponiendo los cultivos a deficiencias de nitrógeno (Branco-Vieira *et al.*, 2018).

Los pigmentos presentes en *P. tricornutum* son principalmente clorofila “a”, carotenos y fucoxantina. La clorofila “a” al inicio del cultivo se encuentra en un valor de 0.4 ± 0.1 pg cél⁻¹ una semana después de la siembra los valores aumentaron la concentración de clorofila “a” a 2.7 ± 0.2 pg cél⁻¹ (Arena, 2023). Por otra parte, el valor para los carotenos es de 2.3 mg/g⁻¹ para un cultivo en condiciones normales mientras que si se exponen a cambios de iluminación su contenido puede variar de 0.3 a 1.9 mg/g⁻¹. Para la fucoxantina en condiciones normales de

cultivo se obtiene 15 mg/g⁻¹, al igual que los carotenos, se ve afectada por los cambios de iluminación variando su contenido de 0.4 a 15 mg/g⁻¹ (Ding *et al.*, 2023).

6.3 Aplicaciones de las microalgas para el bienestar humano

6.3.1 Nutrición

La elaboración de productos alimenticios suplementados con microalgas, fue incentivado por su alto contenido proteico, de aproximadamente 50% en algunos géneros como *Chlorella*, *Arthrospira*, *Scenedesmus* y *Dunaliella*. Cabe destacar que la proteína proveniente de las microalgas tiene un mayor valor nutricional que las que se encuentran en varios cereales y leguminosas de consumo habitual, aunque no supera a la proteína animal. Uno de los grupos de carbohidratos que más destaca dentro de los producidos por las microalgas son los β -glucanos, que incluye el paramilon y la crisolaminarina. Varios estudios han demostrado que los β -glucanos producen un efecto inmunoestimulador. De igual manera estos componentes combinados con otros como N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina han demostrado acción inhibitoria contra *Listeria monocytogenes* y el hongo *Candida albicans* (Olmedo, 2019).

Otro de los componentes importantes en las microalgas son los ácidos grasos en los que destaca el ácido docosahexaenoico (DHA) que representa entre el 20 a 25% del tejido gris del cerebro humano y entre el 50 a 60% de los lípidos fotorreceptores de la retina, de igual manera es un componente abundante en el tejido muscular cardiaco y células espermáticas. Se considera un nutriente esencial en la infancia. Los ácidos grasos están presentes en una gran variedad de microalgas como es el caso de *Chlorella* y la *Spirulina*. Los pigmentos, a pesar de no ser de alta demanda en el mercado y poder obtenerlos de diversos vegetales, también pueden ser producidos por microalgas, teniendo una ventaja en la amplia gama de producción de pigmentos, la alta concentración que presentan y la rapidez con la que se reproducen las microalgas. Dentro de los pigmentos de mayor importancia encontramos la astaxantina la cual funciona como pigmento protector contra el cáncer, funciona incrementando las lipoproteínas de

alta densidad y mejora el sistema inmune. Otro pigmento importante es el beta caroteno, es un precursor de la vitamina A y un antioxidante natural (Espinoza, 2017).

Productos	Microalga	Productos	Microalga
Alimento humano	<i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Odontella aurata</i> , <i>Tetraselmis chuii</i> , <i>Aphanizomenon flosaquae</i> , <i>Nostoc</i> , <i>A. sacrum</i> , <i>Spirogyna</i> , <i>Oedogonium</i>	PUFA	
Alimento animal	<i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Tetraselmis</i> , <i>Isochrysis</i> , <i>Pavlova</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Chaetoceros</i> , <i>Nannochloropsis</i> , <i>Skeletonema</i> , <i>Thalassiosira</i>	Eicosapentanoico (EPA)	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Monodus subterraneus</i> , <i>P. cruentum</i> , <i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>Nannochloropsis</i> , <i>Schizochytrium</i>
Vitaminas y carotenoides		Docosahexanoico (DHA)	<i>Cryptocodinium cohnii</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Pavlova salina</i> , <i>Schizochytrium</i>
Vitamina B12	<i>Chlorella</i> , <i>Spirulina</i>	Linoleico	<i>D. salina</i>
Vitamina E	<i>Porphyridium cruentum</i>	γ -linolénico	<i>Spirulina</i>
β -caroteno	<i>D. salina</i> , <i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Nanochloropsis gaditana</i>	Oleico	<i>D. salina</i> , <i>Spirulina</i>
α -caroteno	<i>Chlorella</i>	Láurico	<i>Spirulina</i>
Astaxantina	<i>D. salina</i> , <i>H. pluvialis</i> , <i>Chlorella</i>	Polisacáridos	
Luteína	<i>Murellopsis</i> sp., <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus almeriensis</i> , <i>Auxenochlorella protothecoides</i>	Sulfatados	<i>Porphyridium</i> spp.
Zeaxantina	<i>D. salina</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>N. gaditana</i>	Nostoflan	<i>Nostoc flagelliforme</i>
Cantaxantina	<i>Scenedesmus komarekii</i> , <i>D. salina</i> , <i>Chlorella</i>	Esteroles	
Fucoxantina	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Brassicasterol, sitosterol, y estigmasterol	<i>D. salina</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i>
Fitoeno	<i>D. salina</i>	Fenoles y compuestos volátiles	
Fitoflueno	<i>D. salina</i>	Fenoles	<i>Chlorella</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Chlamydomonas</i>
Violaxantina	<i>Chlorella</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>N. gaditana</i>	β -ciclocitral	<i>D. salina</i>
Anteraxantina	<i>Chlorella</i>	α y β -ionona	<i>D. salina</i>
Echinenona	<i>Botryococcus braunii</i>	Neofitadieno	<i>D. salina</i>
Criptoxantina	<i>D. salina</i>	Fitol	<i>D. salina</i>
Ficobiliproteínas		Pentadecano	<i>Synechocystis</i> sp.
Ficocianina	<i>Spirulina</i>	Heptadecano	<i>Spirulina</i>
Ficoeritrina	<i>Porphyridium</i>	Extractos	
Aloficocianina	<i>Spirulina</i>	Total	<i>Chlorella</i> , <i>Chlamydomonas</i>
Clorofila		Lípidos	<i>Nostoc</i> , <i>Ulkenia</i>
Clorofila A	<i>A. flosaquae</i>	Carotenoides	<i>Chlorella</i>

Fig. 3. Productos derivados de diversas microalgas (García, 2017).

6.3.2 Microalgas y salud mental: beneficios neuroprotectores y funcionales

Las microalgas que contienen un alto contenido en proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas, carotenoides, minerales, ácidos grasos esenciales son considerados alimentos funcionales, debido a que su consumo tiene beneficios en la salud humana y mejora el

rendimiento físico y mental. Es importante tener en cuenta que los nutrientes provenientes de las microalgas son fácilmente absorbidos por el cuerpo y restauran rápidamente la deficiencia nutricional a niveles fisiológicos. La alta biodisponibilidad de los micronutrientes permite una rápida distribución en el sistema nervioso, ayudando a que las vitaminas del complejo B, el magnesio y los ácidos grasos lleguen fácilmente al cerebro, aportando efectos neuronales beneficiosos. Muchos estudios *in vivo* en diferentes modelos animales usando microalgas han destacado diversos efectos neuroprotectores en distintas áreas del cerebro. Se demostró que las microalgas tienen componentes que brindan neuroprotección en circunstancias desde neuroinflamación hasta neurodegeneración, neurotoxicidad y más. Además un compuesto oligosacárido provenientes de las algas, el oligomanato de sodio ha sido aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, lo que deja con altas expectativas el uso de fármacos a base de algas (Sorrenti *et al.*, 2021).

7. Materiales y métodos

7.1 Diseño Experimental

El proyecto se inició llevando a peso constante los materiales a utilizar en las técnicas de análisis bioquímico (cajas Petri y tubos de ensayo). Posteriormente se realizó un cultivo control de *Phaeodactylum tricornutum*, cepa almacenada en el Laboratorio de Alimento Vivo y proveniente de CIBNOR con código CIB 41; a 30 Unidades prácticas de salinidad (UPS) en medio F/2 “Guillard” (Stein, 1979), se elaboró en matraces de 1 litro y se aéreo con él usó de una bomba de acuario, se utilizaron focos LED de 2000 lúmenes como fuente de luz sin aplicar fotoperiodo. Con el cultivo control se realizó la estandarización de las técnicas de análisis bioquímico (Lípidos, proteínas, carbohidratos y pigmentos). Posteriormente se aplicaron 3 tratamientos; 0 UPS (tratamiento 1), 3 UPS (tratamiento 2) y 13 UPS (tratamiento 3). De cada cultivo se tomaron muestras de 100 ml por triplicado y, se realizaron análisis de los cambios dentro de la composición bioquímica de la microalga expuesta a un estrés salino.



Fig. 4. Cultivos de *P. tricornutum* en distintas concentraciones de salinidad

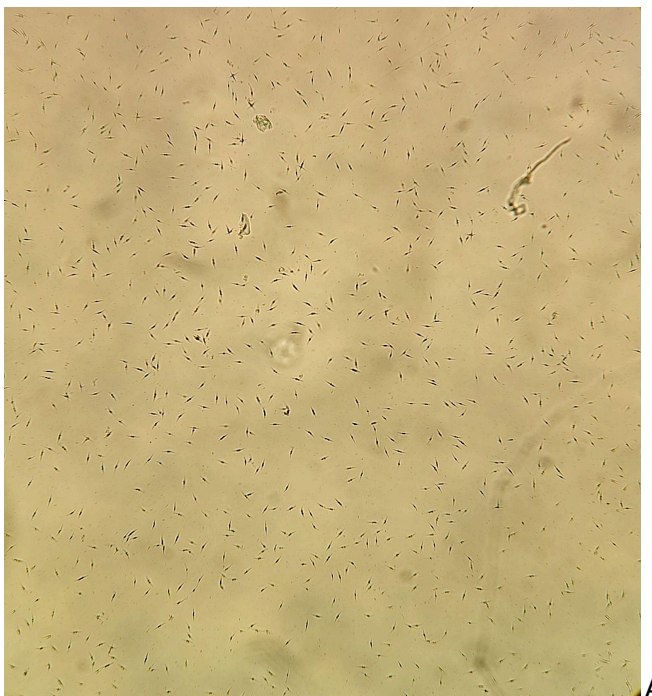
7.2 Obtención del cultivo

Se cultivó la microalga *P. tricornutum* en un matraz Erlenmeyer con medio F/2 “Guillard” (Stein, 1979) hasta obtener un volumen de 1,000 ml de microalga en las siguientes condiciones: aireación constante con bomba marca Elite modelo 799,

fotoperiodo de 24 horas a 3,000 luxes ($59.91 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Con ayuda de una barra luminosa LED marca HEE modelo HEEGA40 y temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$ establecida con ayuda de un aire acondicionado marca Mirage modelo EXC121F. La microalga se cosechó en fase exponencial. Se aseguró que la microalga se encuentre pura y en buen estado realizando lavados de acuerdo a la metodología de Moha-León *et al.* (2018) con ayuda de tubos Falcon de plástico de 50 ml, se centrifugaron a 3000 rpm en centrífuga marca ALC modelo 4218.



Fig. 5. Preparación de salinidad del medio de cultivo



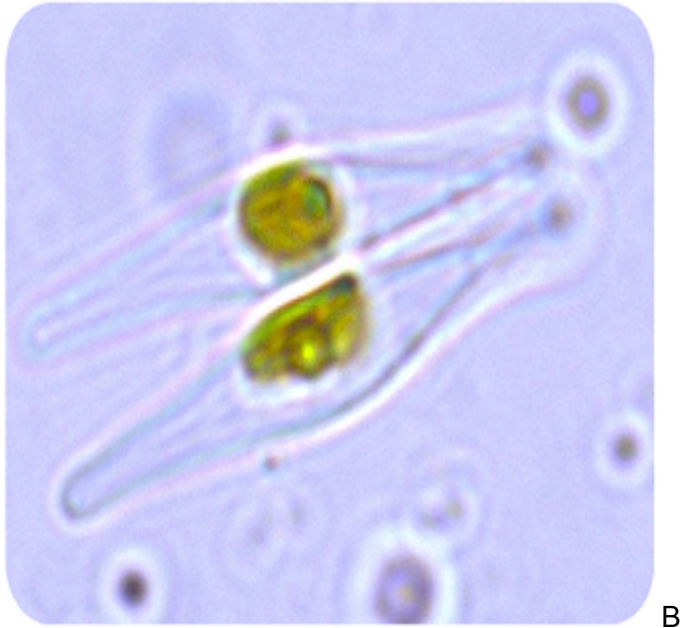


Fig. 6. Cultivo de *P. tricornutum* tomada a 10x (A) y 100x (B) con un microscopio óptico.

7.3 Peso constante de materiales

Se llevó a peso constante los materiales a utilizados para las técnicas de determinación (cajas Petri y tubos de ensaye), etiquetándolos y colocándolos en una incubadora marca Arsa modelo AR-130AD durante 1 hora, después se retiraron y se dejaron enfriar en un desecador de vidrio durante 30 minutos, finalmente fueron pesados en una balanza analítica marca Denver Instrument modelo TP 214 con una precisión de 0.001g. Este procedimiento se realizó dos veces más para poder obtener un promedio y tener registrado el peso de cada uno de los materiales.

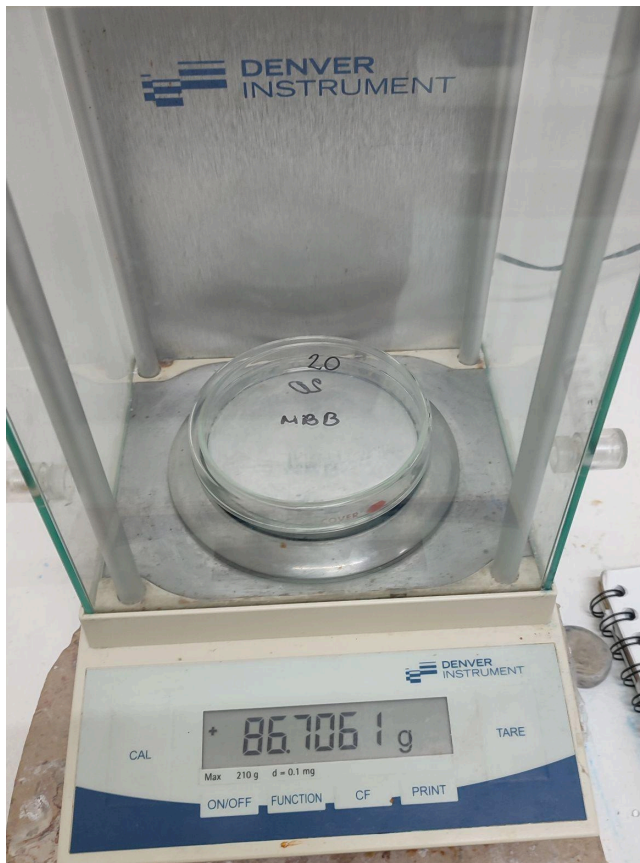


Fig. 7. Lectura de peso constante de cajas Petri



Fig. 8. Lectura de peso constante de tubos de ensayo

7.4 Determinación de peso seco

Se realizó la determinación del peso seco por gravimetría con el uso de una balanza analítica marca Denver Instrument, mediante la toma de muestras de 100 ml añadidas a tubos Falcon. Se realizaron 3 lavados a 3000 rpm con ayuda de una centrífuga marca ALC, para concentrar el volumen en 30 ml y posteriormente se agregó a una caja Petri de cristal (previamente registrado su peso constante), después se llevó a una incubadora durante 24 horas para evaporar el líquido restante. La biomasa seca se obtuvo mediante un raspado realizado de manera cuidadosa con ayuda de una navaja para agregarla a un tubo de ensayo de vidrio (a peso constante). Finalmente se registró el peso seco de la biomasa obtenida.

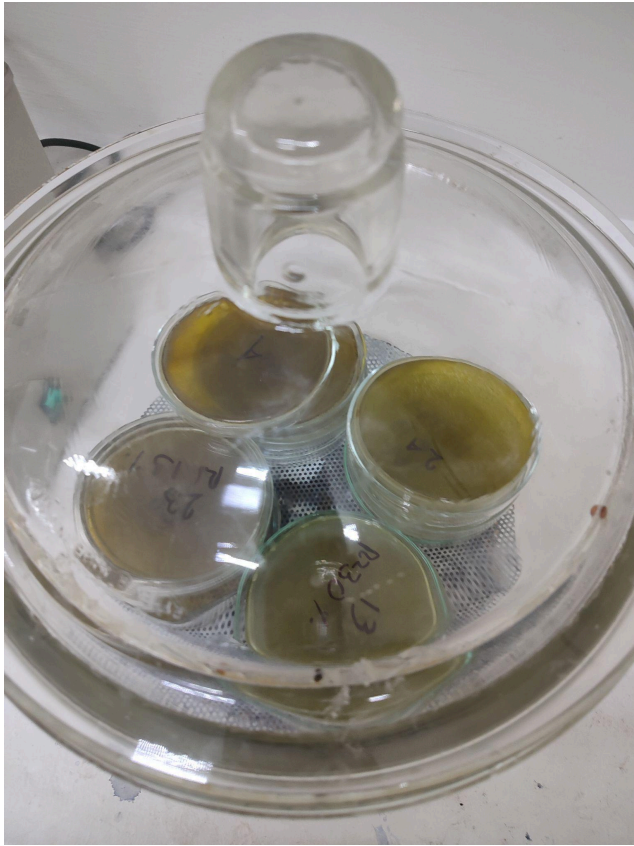


Fig. 9. Muestras de biomasa seca en desecador

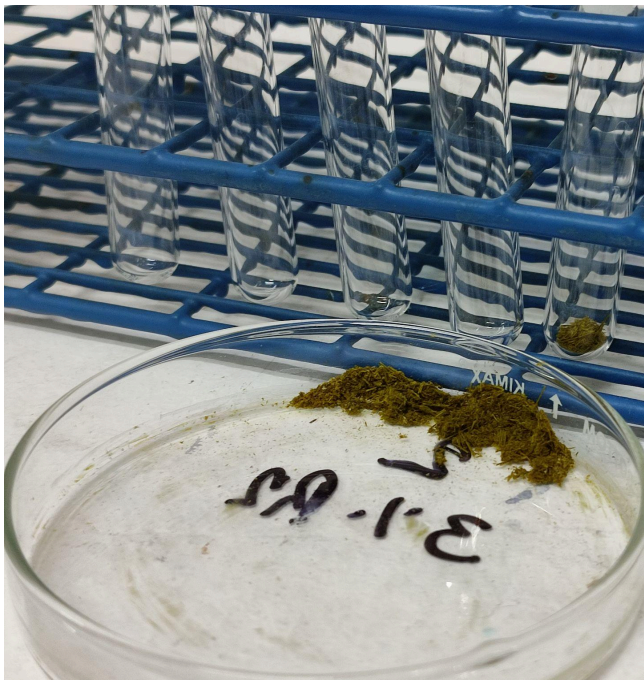


Fig. 10. Biomasa seca obtenida de muestras de 100ml

7.5 Determinación de proteínas

Se llevó a cabo la determinación de proteínas usando el método de Bradford adaptado para microalgas propuesto por Arredondo *et al.* (2007). Primero se realizó una curva de calibración usando albúmina de huevo marca LABESSA® con NaOH al 0.1N a partir de una solución madre de 200 mg/L con las siguientes concentraciones de referencia: 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 100 y 200 mg/L, se leyeron los datos usando un espectrofotómetro de luz uv/vis marca Thermo scientific modelo Genesys 100s a $\lambda = 595$ nm hasta obtener la curva. Se tomaron 2 mL de biomasa de *P. tricornutum* en tubos de ensaye de vidrio añadiendo 5 ml de NaOH al 0.1N, después se llevó a incubar a baño María marca CIVEQ® modelo HH-2 durante 20 minutos a 100°C. Posteriormente se realizaron 2 ciclos de 5 minutos en un sonicador marca Branson® modelo 1800 con agua fría para terminar el rompimiento celular. A continuación las muestras se colocaron en una centrífuga con refrigeración marca CENCE® modelo H1650R a 10,000 rpm, 10°C durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se vertió en tubos de ensayo de vidrio, limpios y etiquetados. De la muestra resultante se tomó 1 ml y se le agregaron 5 ml de reactivo Bradford, se dejó reaccionar durante 5 minutos, se leyó en un espectrofotómetro de luz uv/vis marca Thermo scientific a $\lambda = 595$ nm, usando NaOH–N como blanco.



Fig. 11. Albumina de huevo diluida a diferentes concentraciones



Fig. 12. Albumina de huevo con reactivo Bradford

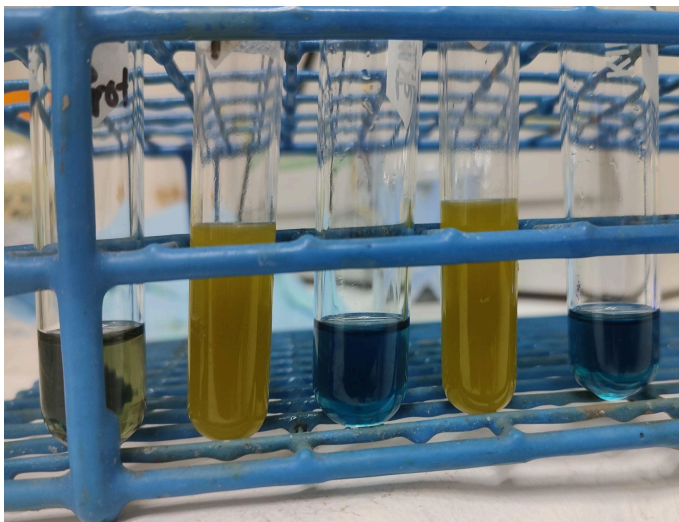


Fig. 13. Muestras control de proteínas con reactivo Bradford



Fig. 14. Muestras de proteínas con reactivo Bradford

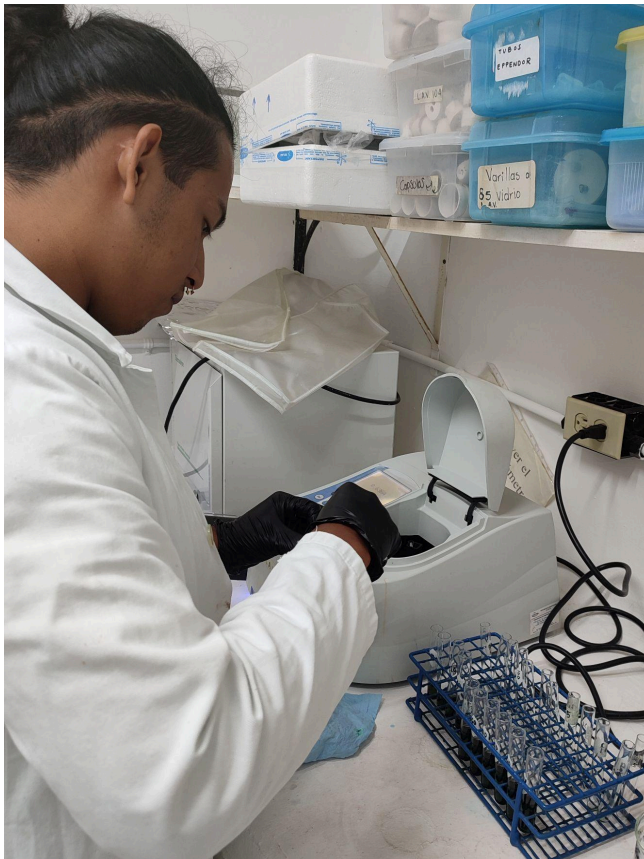


Fig. 15. Lectura de proteínas en espectrofotómetro de Uv-Vis

7.6 Determinación de carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó por el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico modificado para microalgas por Arredondo *et al.* (2007). La curva de calibración que servirá de referencia se realizó usando D-glucosa anhidra. Se tomaron por duplicado muestras de 100 ml de *P. tricornutum* previamente secas y se colocaron en tubos de ensayo de vidrio. Después se añadió 1 ml de H_2SO_4 a 1.0 M a temperatura ambiente. En el siguiente paso, se llevará 5 minutos al sonicador Marca BRANSON® modelo 1800. Posteriormente se agregaron 4 ml de H_2SO_4 a 1.0 M a cada muestra. Cada tubo de ensayo con muestra se llevó al baño María a 100°C durante 1 hora, se retiraron las muestras del baño María y se dejaron enfriar. En el siguiente paso se llevaron las muestras a una centrifuga con refrigeración marca CENCE® a 4,000 rpm, 10°C durante 15 minutos, se retiraron las muestras de

la centrifuga y se extrajo el ácido cuidadosamente con una micropipeta para no resuspender los residuos sólidos. Finalmente se tuvo cada muestra etiquetada, se llevó a lectura en espectrofotómetro de luz uv/vis a $\lambda = 315 \text{ nm}$, se usará H_2SO_4 como blanco y llevo el mismo proceso de preparación de las muestras.

Para determinar los carbohidratos totales (%) se utilizó la ecuación propuesta por Dubois *et al.* (1956), adaptado por Arredondo y Voltolina (2007) para microalgas y, con ligeras modificaciones de Guzman-Ferman (2013) y Lopez-Legarda *et al.* (2017) y, estandarizada por Valencia Molina (2023)

$$\% \text{ Carbohidratos} = (m \cdot A_{315\text{nm}}) / V_m \cdot V_E / P_s \cdot 100$$

Dónde:

P_s =Peso seco

V_E =Volumen extracto ácido

V_M =Volumen de muestra

m = Valor de la pendiente

$A_{315\text{nm}}$ = Absorbancia

(Dubois *et al.*, 1956; Arredondo y Voltolina, 2007; Guzman-Ferman, 2013; López-

Legarda *et al.*, 2017; Valencia Molina, 2023.)



Fig. 16. Preparación de muestras de carbohidratos con ácido sulfúrico



Fig. 17. Muestras de carbohidratos a baño María

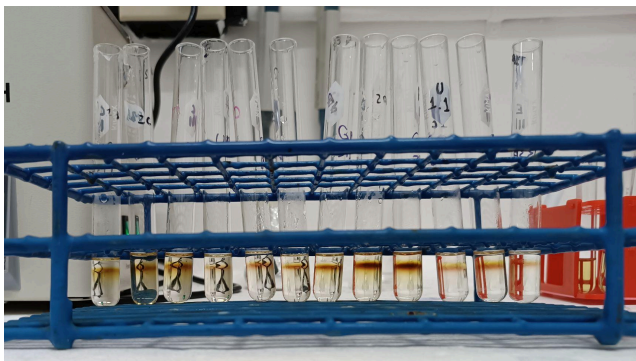


Fig. 18. Muestras de carbohidratos listas para lectura en espectrofotómetro de Uv-Vis.

7.7 Determinación de lípidos

Se realizó la extracción de lípidos a partir del método de cloroformo-metanol (1:2) adaptado para microalgas. Primero se preparó una solución de cloroformo metanol donde se añadió 50 ml de cloroformo y 100 ml de metanol. A cada tubo de ensayo con biomasa seca se le añadió 3 ml de la mezcla cloroformo-metanol (1:2) y se llevaron por 3 ciclos de 15 minutos en un sonicador con agua fría. Finalmente se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C en tubos de ensaye de plástico con tapa en una centrífuga con refrigeración marca CENCE®. Después se regresó el sobrenadante a los tubos de ensaye de cristal previamente pesados, la pastilla resultante se lavó 2 veces, primero con 1.5 ml de la mezcla de cloroformo-metanol (1:2), se agregó 2 ml de agua destilada (fase metanol agua) y el segundo lavado se realizó con 3 ml de cloroformo-metanol (1:2) para formar una segunda fase cloroformo-lípido, se desechó la fase metanol agua para conservar sólo la fase de cloroformo-lípido.

Por último se aplicó la fórmula siguiente:

$$\text{Lípidos (\%)} = 100 \cdot [(PTL - PTV) / P]$$

Dónde:

PTL= Peso del tubo de ensayo con lípido (mg)

PTV= Peso del tubo de ensayo vacío (mg)

P=Peso de la muestra (mg).

(Bligh y Dyer, 1959; Arredondo y Voltolina, 2007; Nuñez, 2008; Guzman-Ferman, 2013; Valencia Molina, 2023).

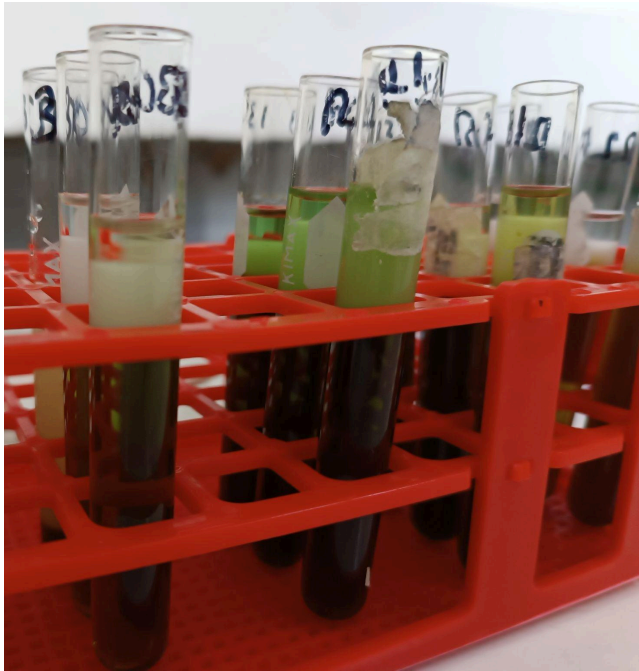


Fig. 19. Muestras de lípidos con fases metanol-agua y cloroformo-lípido

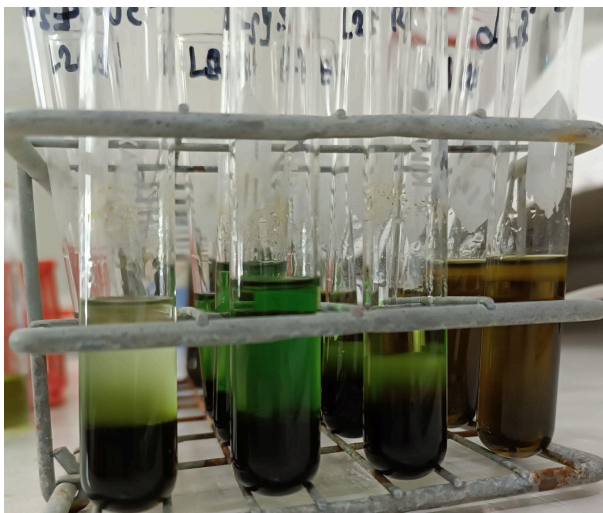


Fig. 20. Reducción de líquidos en muestras de lípidos

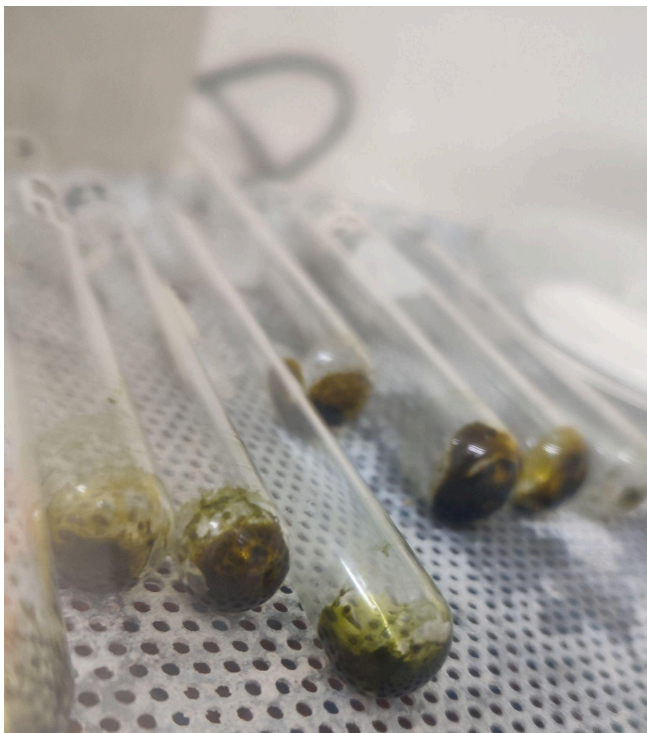


Fig. 21. Muestras de lípidos listas para gravimetría



Fig. 22. Pesado de muestras de lípidos

7.8 Determinación de lípidos saturados e insaturados por el método de Sulfo-fosfovainillina.

Se inició realizando una curva de calibración con aceite de oliva extravirgen de marca Kirkland. Posteriormente Se utilizó el extracto obtenido en lípidos totales por método gravimétrico resuspendiendo en 5 ml de cloroformo, se tomó la muestra y se depositó en un tubo de ensaye de cristal limpio. Después se le añadió 0.100 ml de ácido sulfúrico concentrado y se llevó al baño María a 100°C durante 10 minutos para evaporar el cloroformo y posteriormente se dejó enfriar. Finalmente a cada muestra se le añadió 2.4 ml de reactivo de sulfo-fosfovainillina y se dejó reaccionar 10 minutos para llevar a lectura en espectrofotómetro de luz uv/vis a $\lambda = 734 \text{ nm}$ (Bligh y Dyer, 1959; Park *et al.*, 2016).

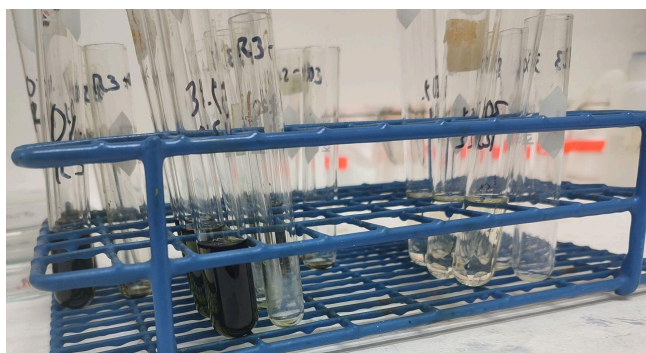


Fig. 23. Muestras de lípidos resuspendida



Fig. 24. Muestras de lípidos con sulfo-fosfovainillina listas para lectura

7.9 Determinación de pigmentos

En esta determinación se evaluaron pigmentos, clorofilas, carotenoides totales y fucoxantinas mediante los métodos de Jeffrey y Humphey (1975), Anderson

et al. (2006) y Motten (2004) y estandarizados por Valencia Molina (2023). A partir de la biomasa seca previamente añadida y etiquetada en tubos de ensayo de cristal, se añade 10 ml de acetona al 100%, se transfirieron 5 ml de cada tubo de ensayo con muestra a nuevos tubos de ensayo de cristal cubriéndolos con papel aluminio para evitar la foto oxidación y se llevaron 2 ciclos de 5 minutos al sonicador con agua fría, se retiro del sonicador y se llevaron a reposar a 4°C durante toda la noche (16 horas). Después del tiempo de reposo se llevó a sonicar nuevamente 2 ciclos de 5 minutos en las mismas condiciones. Se tomó 1 ml de cada muestra y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga con refrigeración marca CENCE® modelo H1650R, se retiró de la centrifuga y se tomó el sobrenadante con una micropipeta marca Science Med de 1 ml y se colocó en otro tubo de ensaye limpio protegido de la luz. Finalmente, las muestras se colocaron en una celda de cuarzo y se leyeron en espectrofotómetro de luz uv/vis marca Thermo scientific modelo Genesys 100s, usando acetona al 100% como blanco a longitudes de onda de 630, 647 y 664 nm para clorofilas, 480 y 510 nm para carotenoides totales y 470, 630, 580 y 664 nm para fucoxantinas. Para determinar el contenido se utilizaron las siguientes ecuaciones para clorofilas (Jeffrey y Humphrey, 1975), carotenoides totales (Strickland y Parsons, 1972) y Fucoxantina (Motten, 2004), dichas ecuaciones fueron estandarizadas por Valencia Molina (2023):

Clorofila a (mg/g alga):

$$v \times [(11.85 \times A_{664}) - (1.54 \times A_{647}) - (0.08 \times A_{630})] / g \text{ alga.}$$

Clorofila b (mg/g alga):

$$v \times [(21.03 \times A_{647}) - (5.43 \times A_{664}) - (2.66 \times A_{630})] / g \text{ alga.}$$

Clorofila c (mg/g alga):

$$v \times [(2.45 \times A_{630}) - (1.67 \times A_{664}) - (7.60 \times A_{647})] / g \text{ alga.}$$

Carotenos (mg/g alga):

$$v \times [(7.60 \times A_{480}) - (1.49 \times A_{510})] / g \text{ alga.}$$

Fucoxantina (mg/L):

$$(A_{470} - 1.239 \times (A_{630} + A_{580} - 0.3A_{664}) - 0.0275A_{664}) / 141$$



Fig. 25. Rompimiento celular en sonicador

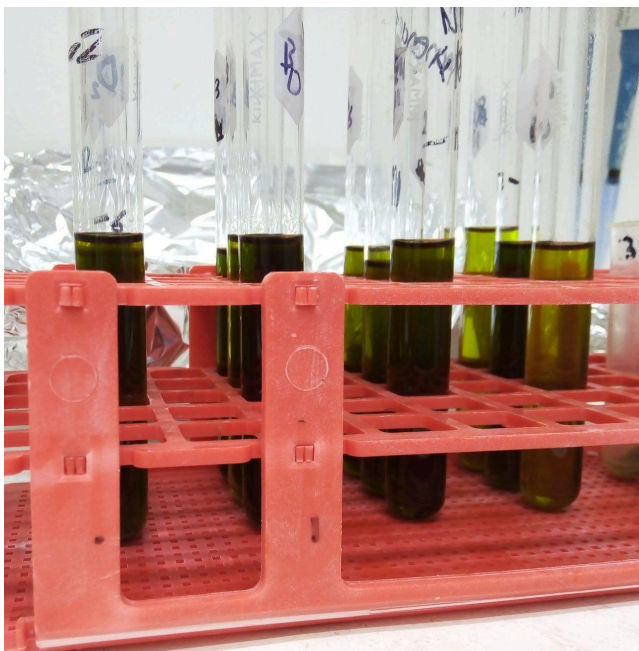


Fig. 26. Muestras limpias de pigmentos lista para lectura en espectrofotómetro de Uv-Vis

8 Resultados

Resultado de cuantificación de lípidos por método gravimétrico.

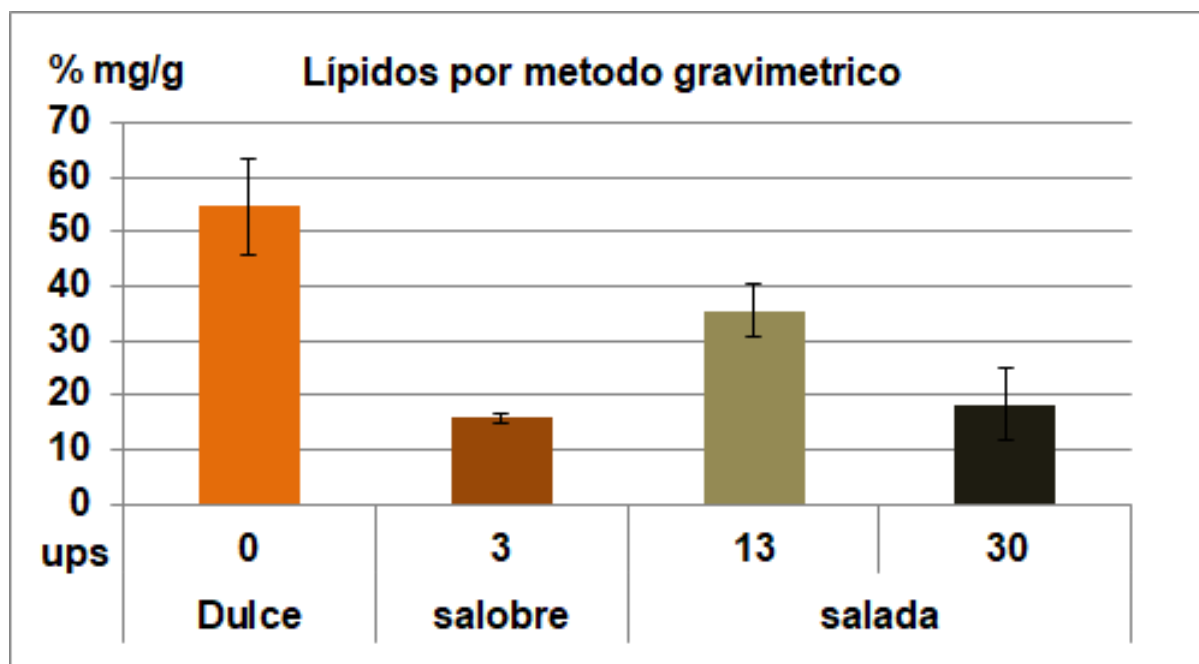


Fig. 27. Cuantificación de lípidos por gravimetría en *P. tricornutum* a diferentes salinidades.

La gráfica de lípidos obtenida por método gravimétrico nos muestra que el cultivo a 0 UPS tiene un mayor contenido en lípidos totales mientras que, el cultivo a 13 UPS es el segundo con mayor productividad, siendo el cultivo de 3 UPS el más deficiente en contenido de lípidos totales

Resultados de determinación de lípidos por espectrofotometría de Uv-Visible.

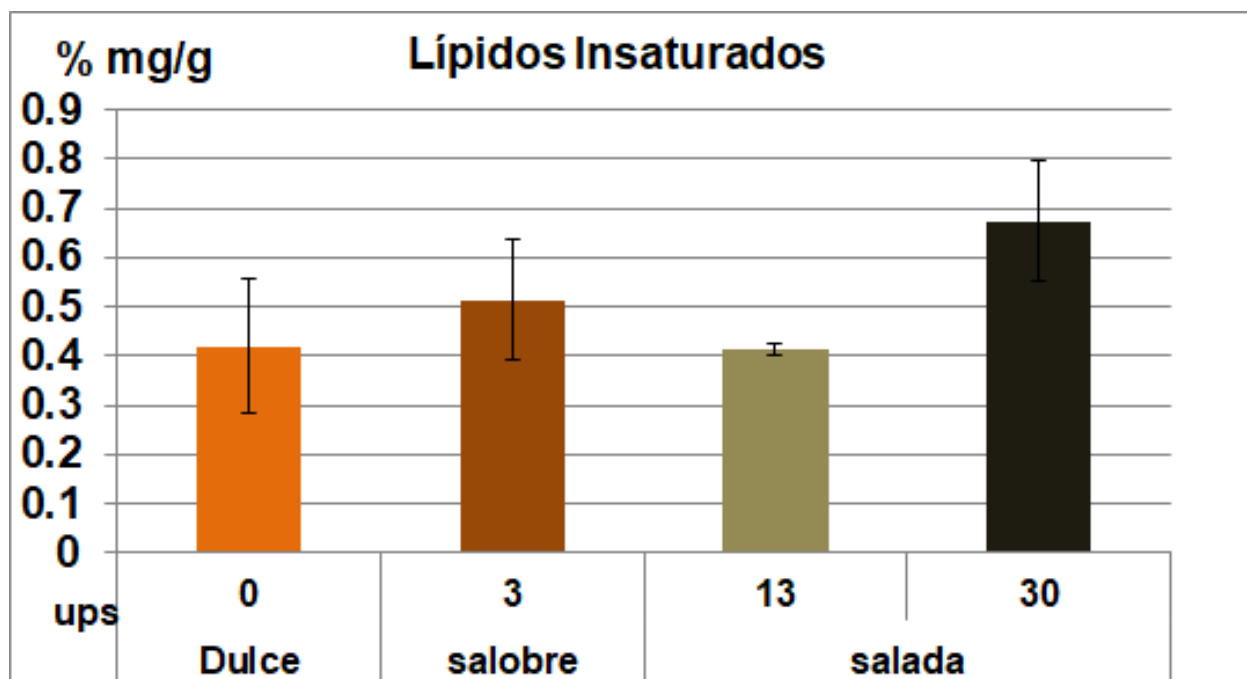


Fig. 28. Determinación de lípidos por espectrofotometría en *P. tricornutum* a diferentes salinidades.

Para los lípidos insaturados se obtuvo un valor mayor en el cultivo de 30 UPS, seguido del cultivo de 3 UPS, mientras que los cultivos de 0 y 13 UPS fueron los menos productivos en lípidos insaturados. Esto nos demuestra que a pesar de que los cultivos de 0 y 13 UPS tuvieron mayor producción en lípidos totales no significa que sean lípidos de calidad, ya que en cuestión de lípidos totales los cultivos de 3 y 30 UPS fueron menos productivos en contenido total de lípidos, pero con mayor producción de lípidos insaturados.

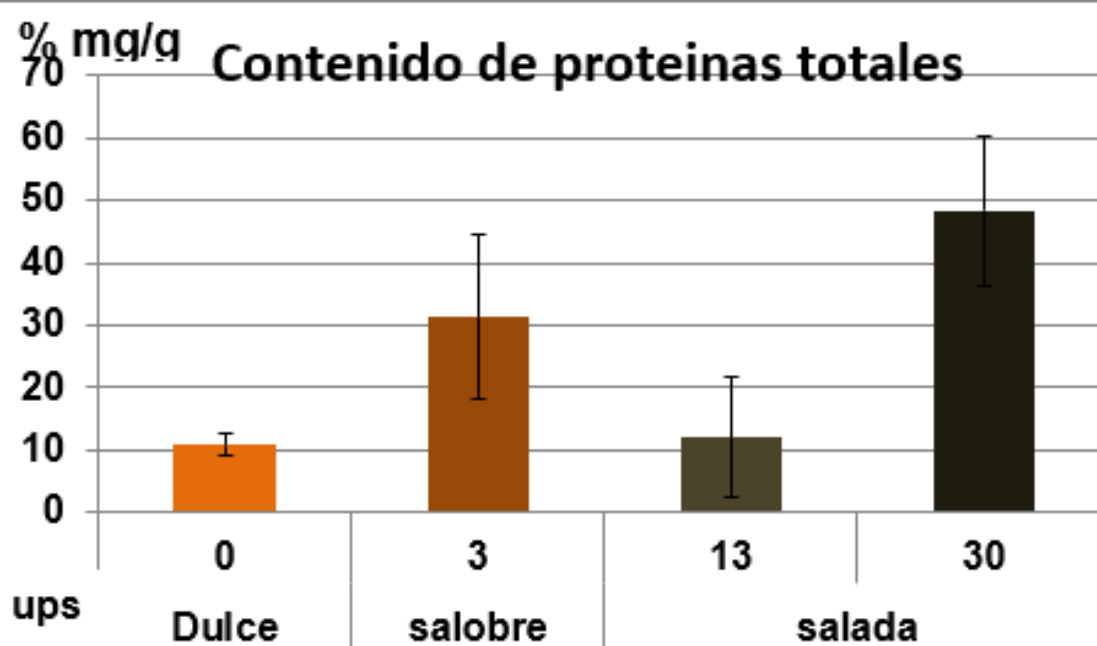


Fig. 29. Proteínas por espectrofotometría en *P. tricornutum* a diferentes salinidades.

La producción de proteínas destacó en el cultivo de 30 y 3 UPS, con una producción de 48.35% y 31.34% del peso de la biomasa seca respectivamente, mientras que, para los cultivos de 0 y 13 UPS la producción fue de 10.91% y 12.05%. Relacionándolo con la producción de lípidos, a mayor cantidad de lípidos totales se presenta una menor producción de proteínas.

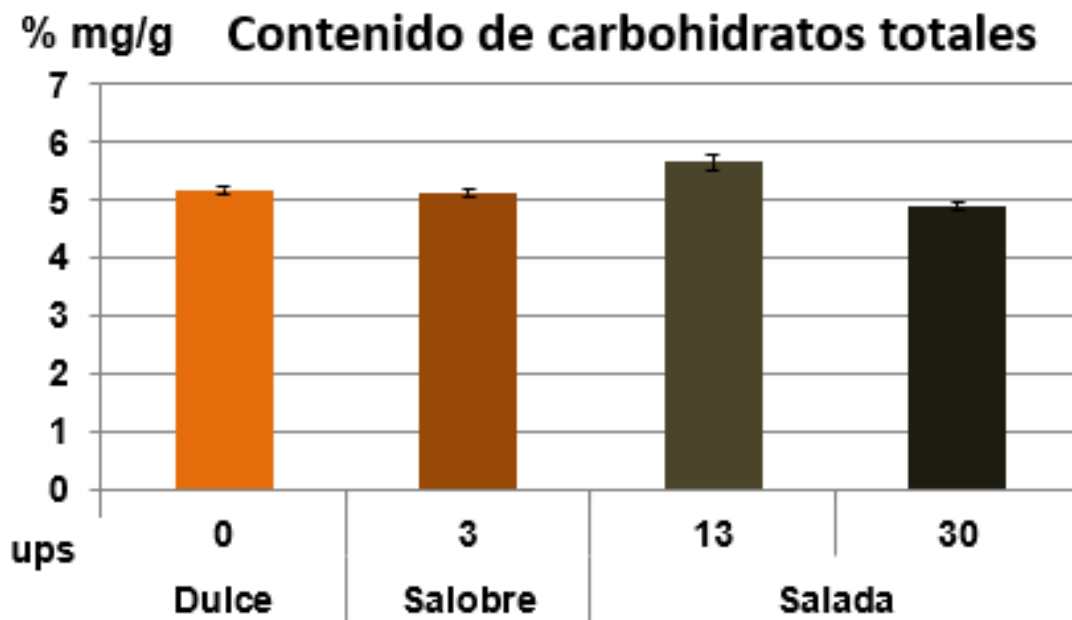


Fig. 30. Gráfico de carbohidratos por espectrofotometría en *P. tricornutum* a diferentes salinidades.

En los resultados nos muestra que no hay una diferencia significativa en la producción de carbohidratos con respecto a los cambios en la salinidad. Los resultados se mantuvieron alrededor del 5% del peso de la biomasa seca total.

Resultados de determinación de pigmentos por espectrofotometría de Uv-Visible

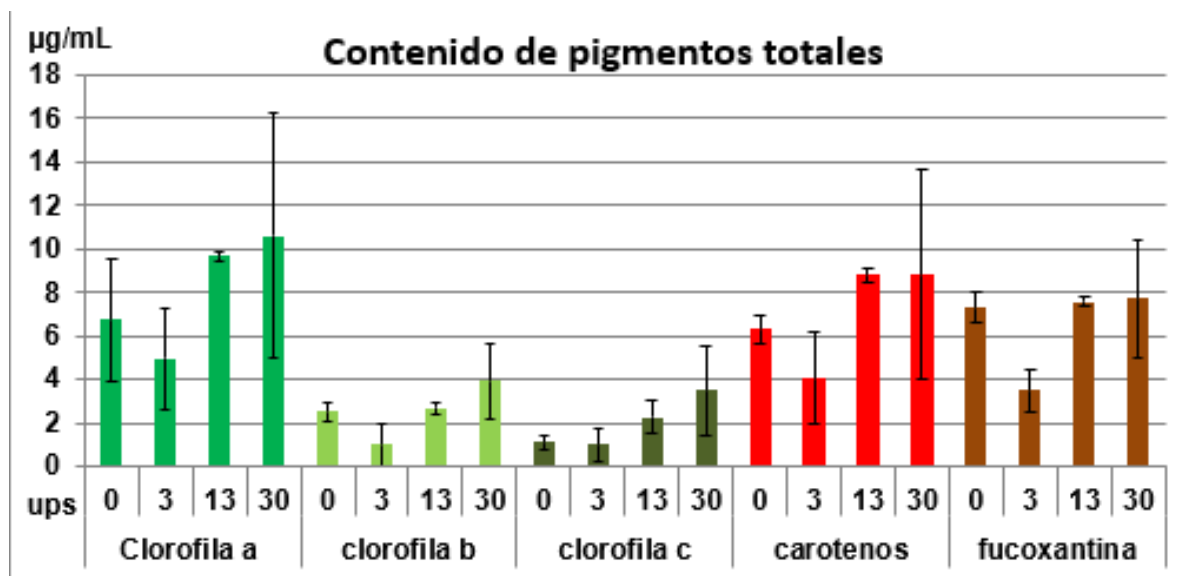


Fig. 31. Cantidad de pigmentos presentes en *P. tricornutum* a diferentes salinidades.

La lectura de los pigmentos totales arrojó resultados significativos en la producción de los cultivos de 13 y 30 UPS, teniendo mayor producción en clorofila "a", carotenos y fucoxantina, seguido del cultivo a 0 UPS que se mostró en alrededor de 2-3 µg/mL por debajo de los valores de clorofila "a" y carotenos, mientras que para la fucoxantina presentó valores similares a los cultivos a 13 y 30 UPS. El cultivo a 3 UPS presentó una menor productividad. El contenido de clorofila "b" y clorofila "c" estuvieron por debajo de 4 µg/mL en todos los cultivos.

9. Discusión

A través de la presente investigación se pudo observar la variación en la composición bioquímica de la microalga *P. tricornutum* expuesta a distintas concentraciones de salinidad. Las microalgas son organismos capaces de resistir alteraciones en los parámetros físicoquímicos y adaptarse para su óptimo crecimiento (Gonzales *et al.*, 2021).

Los lípidos son fundamentales en la regulación de las funciones de la membrana celular, determinan la fluidez y la disminución de la permeabilidad de la membrana, modificando su tamaño y masa celular. Debido a esto, es importante reconocer que la salinidad como factor de estrés va a afectar tanto el crecimiento como la composición bioquímica de las microalgas dependiendo de las condiciones de cultivo y la especie seleccionada (Eldredge, 2017).

Se ha demostrado que la salinidad es un factor que afecta la composición bioquímica de otras especies como *Chroomonas* sp., sin embargo en *P. tricornutum* no hay estudios que especifiquen los cambios en la composición bioquímica al exponer la diatomea a estos factores de estrés (Bermúdez *et al.*, 2002).

En esta investigación el contenido de lípidos presentó un aumento significativo en la microalga *P. tricornutum* cultivada a dos distintas salinidades que fueron 0 y 13 UPS obteniendo un resultado de 54.69 y 35.45% de biomasa seca respectivamente, mientras que para las salinidades de 3 y 30 UPS los resultados fueron de 15.72 y 18.29 % de biomasa seca respectivamente. En comparación con el estudio realizado por Aguayo (2024) en el que el porcentaje de lípidos disminuyó con el uso de tratamientos fitohormonales donde su valor más alto fue de 15% y el valor mínimo fue de 10% con respecto al peso total de la biomasa seca. Con esto podemos observar que la salinidad del medio afecta directamente la producción de lípidos en la célula. Sin embargo, resultados similares fueron obtenidos en el estudio realizado por Valencia (2023) en el cual expuso a *P. tricornutum* a tres tratamientos diferentes, modificando el contenido de nutrientes y la irradiancia. En sus resultados se puede observar una producción de entre 48 y 54% de lípidos para un cultivo a 0 UPS.

Ramírez (2024) en su estudio de valorización de la biomasa de *P. tricornutum*, cultivada en medio Walne (Walne, 1970) a condiciones normales, obtuvo un contenido de proteínas en un rango de 8.86 a 11.15% de peso de la biomasa seca. Por otra parte, Felix (2015) en una valoración de la composición química de *Phaeodactylum t.* en condiciones normales, obtuvo un porcentaje de 31.98% de la biomasa seca, en comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio en el que el valor más bajo fue de 10.91% de peso de la biomasa seca para 0 UPS y el valor más alto fue a 30 UPS, de 48.35% de peso de la biomasa seca. Con esto podemos atribuir a la salinidad que es un factor ambiental que estimula la capacidad de producir mayor cantidad de proteínas dependiendo de la concentración a la cual se cultive la especie *P. tricornutum*.

Por otra parte, para el contenido de carbohidratos no se encontró una variación significativa a diferentes salinidades, los resultados se mantuvieron en el $5 \pm 0.4\%$ del peso de la biomasa seca. Estos resultados pueden ser debido a la respuesta metabólica de *P. tricornutum*, optando por la producción de otros compuestos como lípidos, proteínas o pigmentos como método de adaptación a estrés salino, siendo estas lecturas el contenido de carbohidratos pertenecientes a la parte estructural de la célula.

En el estudio de Valencia (2023), se observa que la cantidad de pigmentos producidos por *P. tricornutum* presenta una menor producción, obteniendo como resultado para clorofila “a” un valor máximo de 4 $\mu\text{g/mL}$, para clorofila “b” 2.20 $\mu\text{g/mL}$, clorofila “c” 0.8 $\mu\text{g/mL}$, carotenos 3.9 $\mu\text{g/mL}$ y fucoxantina 3.80 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que para el estudio realizado se obtuvieron valores máximos de 10.5 $\mu\text{g/mL}$ para clorofila “a”, para clorofila “b” 3.8 $\mu\text{g/mL}$, clorofila “c” 3.4 $\mu\text{g/mL}$, carotenos 8.7 $\mu\text{g/mL}$ y fucoxantina 7.7 $\mu\text{g/mL}$ en la salinidad de 30 UPS. Reforzando la investigación de Valencia (2023), se comprueba que a 30 UPS se consigue un mejor perfil nutricional en *P. tricornutum*, no obstante, en los tratamientos que realizo probando factores de estrés como la ausencia de nutrientes y alta irradiancia obtuvo mejor productividad metabólica para *P. tricornutum* a 0 UPS. Por otra parte, el cultivo a 13 UPS realizado en la presente investigación también obtuvo buena productividad, la cual puede

ser aprovechada con algunas modificaciones como la alta irradiancia o falta de nutrientes para aumentar la productividad de algunas otras moléculas.

Es importante resaltar que no existen muchos estudios enfocados a la salinidad del medio de cultivo con diatomeas como *P. tricornutum* y otras especies del mismo grupo, siendo este un factor importante y fácil de manejar, con repercusiones significativas para la composición bioquímica de las microalgas. El estrés salino y la respuesta adaptativa de *P. tricornutum* nos muestra que dependiendo de la cantidad de sal en el medio de cultivo, algunos componentes bioquímicos como lípidos, proteínas, carbohidratos, pigmentos, etc., pueden aumentar o disminuir.

10. Conclusiones

En esta investigación se observó que la salinidad es un factor importante que modula la composición bioquímica de la microalga, afectando de manera diferente la producción de lípidos, proteínas, pigmentos.

La producción de lípidos totales en *P. tricornutum* se registraron los valores más altos a bajas salinidades (0 y 13 UPS), donde se alcanzaron 54.69 y 35.45% con respecto al peso de su biomasa. En cambio para un mayor contenido de lípidos insaturados, las condiciones óptimas se encuentran a 3 y 30 UPS. Por otra parte, la producción de proteínas en cultivos de 30 UPS mostraron mayor rendimiento con un 48.35% del peso seco, lo que sugiere que las concentraciones más elevadas de salinidad favorecen la síntesis de proteínas.

La producción de pigmentos fotosintéticos como clorofilas y fucoxantina destacó en cultivos a 13 y 30 UPS, lo que indica que estas condiciones pueden mejorar el perfil nutricional y funcional de la biomasa. Por lo tanto si se busca un mayor rendimiento en lípidos es recomendable cultivar a 0 y 13 UPS y si se busca una mayor productividad en proteínas se recomienda cultivar a 3 y 30 UPS.

El manejo adecuado de la salinidad permitirá manipular la composición bioquímica de *P. tricornutum* para fines específicos, ya sea para la obtención de lípidos, proteínas o pigmentos, lo que posiciona a esta microalga como una fuente versátil y sostenible para aplicaciones biotecnológicas.

11. Literatura citada

1. Acién, F.G., Berenguel, M., & Guzmán, J.L. (2020). *Modelado y control de la producción de microalgas en fotobiorreactores industriales*. Revista Iberoamericana de Automatica e Informatica Industrial 18, 1-18. <https://doi.org/10.4995/riai.2020.13604>
2. Álvarez, A., Álvarez, I., Alfonso, M. Gallo, A., Gómez, L., Montero-Sánchez, Y., Ramírez, L., Sabina, L., & Támbara, Y. (2012). *Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas*. Investigación y Saberes, Vol. 1 No. 2. 37-43.

https://www.researchgate.net/profile/Yanet-Tambara-Hernandez/publication/257233224_Productividad_de_Lipidos_y_composicion_de_acidos_grasos_de_cinco_especies_de_microalgas/links/02e7e52559c7782277000000/Productividad-de-Lipidos-y-composicion-de-acidos-grasos-de-cinco-especies-de-microalgas.pdf

3. Álvarez, A., Barona, K., Guzmán, D., & Salgado, J. (2019). Microalgas y cianobacterias: ¿que son? ¿donde encontrarles? ¿cómo cultivarles?. Microciencia. Vol. 8. Universidad Libre. Colombia. <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/microciencia/article/view/7405>
4. Aguiar, M. B. (2016). *Efecto de las alteraciones en el contenido de Fe y la salinidad producidas por el cambio climático sobre el metabolismo oxidativo en microalgas antárticas*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Comahue. <http://rdi.uncoma.edu.ar/bitstream/handle/uncomaid/16902/Version%20FINAL%20010817%20correcciones%20jurado%20AGUIAR.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. Aguirre-Cavazos, D.E., Flores-Villarreal, R.A., & Orozco-Flores, A.A. (2024). Microalgas de ambientes desérticos: Importancia, potencial y aplicaciones. Revista Planta, 17(29). Recuperado a partir de <https://revistaplanta.uanl.mx/index.php/p/article/view/172>
6. Andreassen, K. E., & Indergård, A. (2023). Effect of environmental factors on growth and development of *Phaeodactylum tricornutum*. Master's thesis. Norwegian University of Science and Technology <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/3077929>
7. Arenas Encinas, Y.A. (2023). Composición bioquímica de las diatomeas *Phaeodactylum tricornutum* y *Thalassiosira weissflogii* en cultivo estático y semicontinuo. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 39 pp. https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/3904/1/tesis_Yaneth%20Alejandra%20Arenas%20Encinas_05%20julio%202023.pdf
8. Arredondo, B.O., & Voltolina D. (2007b). *Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico*. Capítulo 3. En: Arredondo, B.O., & D Voltolina (eds.). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C La Paz, B.C. Sur. México. 27-30,

9. Arredondo, B.O., & Voltolina D. (2007c). Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. Capítulo 4. En: Arredondo, B.O., & D. Voltolina (eds.). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C La Paz, B.C. Sur. México. 31-39.
10. Arredondo, B.O., & Voltolina D. (2007d). *Determinación de carbohidratos por métodos espectrofotométricos*. Capítulo 5. En: Arredondo, B.O., & Voltolina, D. (eds.). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C La Paz, B.C. Sur. México. 41-45.
11. Arredondo, B.O., & D. Voltolina. (2007e). Determinación de pigmentos por espectrofotometría. Capítulo 7. En: Arredondo, B.O., & D Voltolina (eds). Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C La Paz, B.C. Sur. México. (59-67).
12. Anderson M., Schubert H., & M. Pendersén (2006). Different patterns of carotenoid composition and photosynthesis acclimation in two tropical red algae. *Marine. Biology*. 149: 635-665.
13. Ayala, S. (2015). Clasificación taxonómica de microalgas presentes en un consorcio microbiológico que biorremedia el efluente de una planta de sacrificio de bovinos y porcinos. Tesis de licenciatura. Universidad de los Andes. Colombia. <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/94cecdda-3f0a-43fd-9b80-2b39ea8dcba9/content>
14. Ballesteros, C., Jacome-Pilco, C., Poma-Villafuerte, P., Rea, E., & Rea, L. (2021). Microalgas en el tratamiento de aguas residuales generadas en industrias de curtiembres. *Ciencia Y Tecnología*, 14(2), 47–55. <https://doi.org/10.18779/cyt.v14i2.502>
15. Barranco, A., Herrero, M., & López, G. (2015). Biorrefinería de microalgas: Estudio de procesos a partir de *Phaeodactylum tricornutum*. Tesis de Maestría. Instituto de investigación en ciencias de la Alimentación. <https://digital.csic.es/handle/10261/152094>.
16. Barros-Gómez, J., Ospina-Salazar, G. H., Trujillo, C. A., & Velasco, L. A. (2009). Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga

- Isochrysis galbana* (Clon T-ISO). Intropica, 4(1), 93–99. Recuperado a partir de <https://umapp002.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/142>
17. Bauen, A., & Slade, R. (2013) Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. Biomass and Bioenergy, Volume 53, Pages 29-38, ISSN 0961-9534 <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.019>.
 18. Bermúdez, J.L., Lodeiros, C., & Morales, E. (2002). Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR, 31(1), 167-185. Retrieved February 23, 2025, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612002000100009&lng=en&tlng=es.
 19. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian journal of biochemistry and physiology 37(8), 911-917.
 20. Brand, L. E. (1984). The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 18(5), 543–556. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(84\)90089-1](https://doi.org/10.1016/0272-7714(84)90089-1)
 21. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein.-dye binding. Reproduction Research Laboratories, Departament of Biochemistry.University of Georgia, Athens.72, 248-254. http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf, <http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/kit-proteinas-bradfor.pdf>
 22. Brown, M.R., Jeffrey, S.W., & Garland, C.D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Marine Laboratories, Report ns 205.
 23. Caballero, M. (s.f.). Diatomeas: División *Bacillariophyta*. Instituto de Geofísica, UNAM. Coyoacán, Ciudad de México. https://www.geofisica.unam.mx/iframes/laboratorios/institucionales/paleolimnologia/sitio_web/diatomeas.html

24. Carmona, M. Rendón-Castrillón, L., & Vélez-Salazar, Y. (2013). Microalgas para la industria alimenticia. Universidad Pontificia Bolivariana. https://www.researchgate.net/publication/299769593_Microalgas_para_la_industria_alimenticia
25. Castillo, T., Galindo, E., García, T., & Martínez, A. (2021). *Phaeodactylum tricornutum*, una fuente potencial de ácido eicosapentaenoico. Revista BioTecnología 2021, 25 (5). <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Garcia-et-al.-2021.pdf>
26. Chavez, C. (2008). Efecto de distintas variables ambientales en la fisiología y composición bioquímica de *Navicula incerta*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 116 pp. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1156>
27. Chauton, M.S., Olsen, Y., & Vadstein O. (2013). Biomass production from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Nutrient stress and chemical composition in exponential fed-batch cultures. Biomass and Bioenergy 58 (2013):87–94.
28. Chirivella-Martorell, J., García-Romeral, J., García-Sanz, T., Pavía-Gomez, M., & Serrano-Aroca, A. (2017). Principios de biotecnología y bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. Nereis (9). <https://revistas.ucv.es/nereis/index.php/Nereis/article/view/100/80>
29. Cobos Ruiz, M., Paredes Rodríguez, J. D., & Castro Gómez, J. C. (2016). Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. Acta Biológica Colombiana, 21(1), 17-26. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n1.47439>
30. Cotas, J., Pereira, L., & Valado, A. (2024). Antioxidants from microalgae and their potential impact on human well-being. Explore Drug Sci. 2024;(2):292-321. <https://doi.org/10.37349/eds.2024.00048>
31. Diaz-Alejo, H. (2022). Microalgas y elementos químicos clave en la industria energética: I. El caso del litio: captura y fraccionamiento II. Diversidad y adaptación exitosa: el caso del

uranio. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

<https://docta.ucm.es/bitstreams/1cb23be7-a8ef-4a20-a626-45d1b0713cb4/download>

32. Ding W., Ye Y., Yu L., Liu M., & Liu J. (2023). Physiochemical and molecular responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to illumination transitions. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 1-22. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02352-w>
33. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-356. <http://pubs.acs.org>
34. Eldredge, N. (2017). Evaluación del efecto de la salinidad sobre el crecimiento y acumulación de lípidos en microalgas provenientes de áreas protegidas del ecuador. Tesis de licenciatura. Universidad de las Américas. Quito, Ecuador. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8228/1/UDLA-%20EC-%20TIB-2017-43.pdf>
35. Eriz Arancibia, C.A. (2024) Efecto de la calidad de la luz en el crecimiento y composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). Tesis de licenciatura. Universidad de Concepción, Chile. <https://repositorio.udec.cl/server/api/core/bitstreams/082ce9a2-5639-4450-82b0-57b3a0f50563/content>
36. Espinoza, F. (2017). Microalgas en la alimentación ¿Suplementos novedosos o reinventados? *Revista Ciencia* 68(2)
37. Fal, S., Aasfar, A., Rabie, R., Smouni, A., & Arroussi, H. E. L. (2022). Salt-induced oxidative stress alters physiological, biochemical and metabolomic responses of green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Heliyon*, 8(1), e08811. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08811>
38. Fernández-Reiriz MJ, Perez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J., & Lubarta, U. (1989). Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83,17–37.

39. Fidalgo, J. (1995). Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. Tesis de doctorado. Universidad de la Coruña. España.
https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/12344/FidalgoParedes_JosePablo_TD_1995.pdf?sequence=1&isAllowed=y
40. Félix, J. (2015). *Empleo de la biomasa residual de la microalga Phaeodactylum tricornutum en la formulación de una bebida funcional*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.
https://mcta.uas.edu.mx/pdf/repositorio/2013-2015/09_Felix_Medina_Jennifer_Vianey.pdf
41. García Morales, J., López Elías, J. A., Medina Félix, D., García Lagunas, N., & Fimbres Olivarría, D. (2020). Efecto del estrés por nitrógeno y salinidad en el contenido de β -caroteno de la microalga *Dunaliella tertiolecta*. Biotecnia, 22(2), 13-19. Epub 07 de agosto de 2020. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1241>
42. García, N., López, E., Miranda, A., Martínez, M., Huerta, N., & García, A. (2012). Effect of salinity on growth and chemical composition of the diatom *Thalassiosira weissflogii* at three culture phases. Latin american journal of aquatic research, 40(2), 435-440. Recuperado en 24 de febrero de 2025, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-560X2012000200018&lng=es&tlng=en.
43. Garcia Cubero, R. (2014). Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=69788>
44. Gómez, A. L., López, J. A., Rodríguez, A., Fortiz, J., Martínez, L. R., Apolinar, A., & Enríquez, L. F. (2016). Production of phenolic compounds by four species of marine microalgae under different light conditions. Latin American Journal of Aquatic Research, 44(1), 137-143. <https://dx.doi.org/10.3856/vol44-issue1-fulltext-14>
45. Gómez, L. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. Revista Cubana de Química, XIX(2), 3-20. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.
<https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543707001.pdf>

46. González, Y., Martín, C., & Santos, A. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Universidad Pontificia Comillas. Madrid, España.
<https://repositorio.comillas.edu/xmlui/handle/11531/4927>
47. González Salas, R., Vidal del Río, M. M., & Pimienta Concepción, I. (2021). *Microalgas: Ecología, repercusión en la salud y nutrición*. Revista Universidad y Sociedad, 13(S3), 297-302. <https://rus.ucf.edu.cu/index.php/rus/article/view/2481/2436>
48. Guzmán, A. (2023). Análisis de la dinámica de producción de carbohidratos de sistemas de cultivo de microalgas a través de simulación matemática. Tesis de doctorado. Instituto Tecnológico de Ciudad Madero. Tamaulipas.
http://51.143.95.221/bitstream/TecNM/5624/2/D18073012_donacion_tesis_bib.pdf
49. Guzman-Ferman, B. M. (2013). Características bromatológicas de las microalgas marinas *Dunaliella salina*, *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis sp.* y su efecto en el rotífero *Brachionus ibericus*. Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico De Boca Del Río, Veracruz, México.
50. Geider, R., Osborne, B.A., & Raven, J.A. (2004). Light Dependence Of Growth And Photosynthesis In *Phaeodactylum Tricornutum* (Bacillariophyceae). J Phycol 21 (2004):609–19
51. Heimann, K., & Katsaros, C. (2012). Advances in Algal Cell Biology. De Gruyter. pp 43-80.
52. Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 49(2).
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>
53. Jeffrey, S.W., & Humphrey, G.F. (1975). *New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton*. Biochimie and Physiology Pflanze 167:191-194.
54. Ledesma, T. (2000). Reactivos de alto valor agregado en cultivos alternativos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyceae, Bacillariophyta). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur.
<https://biblio.uabcs.mx/tesis/TE1183.pdf>

55. Lewin, J., Lewin, R., & Philpott, D. (1958). Observations on *Phaeodactylum tricornutum*. Microbiology. (18)2: 418-426. <https://doi.org/10.1099/00221287-18-2-418>
56. López-Fuerte, L., Lora-Vilchis, A., & Pérez-Rojas, J. (Ed.). (2020). *Algas de cristal: Diatomeas*. 6(1). Recursos naturales y sociedad. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2020.06.06.01.0003>
57. López-Legarda X., Taramuel-Gallardo A., Arboleda-Echavarría C., Segura-Sánchez F., & Restrepo-Betancur L. (2017). *Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales*. Revista Cubana de Química. (29)180-198. <http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq>
58. Lye, G., Parker, B., & Zhongdi, C. (2020). Morphological and biochemical changes in *Phaeodactylum tricornutum* triggered by culture media: Implications for industrial exploitation. Algal Research, Volume 47, 2020, 101822, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101822>.
59. Martel, A., Ojeda, A., Soler, E., & Viera, M. (2015). *Estudios de las diatomeas (Heterokontophyta, Bacillariophyceae) del bosque húmedo subtropical del Barranco de Azuaje, Gran Canaria, Islas Canarias*. Tesis doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. <https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/22751/5/Estudio%20de%20las%20diatomeas.pdf>
60. Martínez, A., & Vera-López. (2001). *Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de reproducción*. Sociedad Mexicana De Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Vera-Lopez-Portillo-y-Martinez-Jimenez-2021.pdf>
61. Marine Biotechnology: Definitions, Infrastructures And Directions For Innovation. (2017) Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Science, Technology And Innovation Policy Papers. No. 43.

https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2017/09/marine-biotechnology_4f0e209f/9d0e6611-en.pdf

62. McGinn, P., Tibbetts, S., & Wang, Y. (2021) *Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements*. Foods. 10(12). PubMed Central. https://pmc-ncbi-nlm-nih-gov.translate.goog/articles/PMC8700990/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=tc
63. Branco-Vieira, M., San Martin, S. Agurto, C. Freitas, M.A.V., Mata, T.M., Martins, A.A., & Caetano, N. (2018). *Biochemical characterization of Phaeodactylum tricornutum for microalgae-based biorefinery*. Energy Procedia, Volume 153, 2018, Pages 466-470, ISSN 1876-6102, <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.079>.
64. Motten A.F. (2004). Diversity of photosynthetic pigments. 159-177. In: Tested studies for laboratory teaching, 25 (M.A. O'Donnell, Ed.) Proceeding of the 25th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).16. 81-98.
65. Nuñez, C. E. (2008). *Extracciones con equipo Soxhlet*. 1-5. <http://cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>
66. Jonte, L., Molina, L., Mora, R., Morales, E., & Ortega, J. (2007). Influencia de la salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Rhodospirillum rubrum* (Rhodophyta) en cultivos discontinuos. Revista de la Facultad de Agronomía (Vol. 24, Supl. 1). 249-256. Maracaibo, Venezuela. https://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/supl_mayo_2007/v24supl43.pdf
67. Olmedo, V. (2019). *Carbohidratos y proteínas en microalgas: potenciales alimentos funcionales*. Brazilian Journal of Food Technology. 22 <https://doi.org/10.1590/1981-6723.04319>
68. Ortiz-Villota, M., Romero-Morales, M., & Meza-Rodríguez, L. (2018). La biorremediación con microalgas (*Spirulina máxima*, *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia. Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación, 9(1), 163-176. <https://doi.org/10.19053/20278306.v9.n1.2018.8153>

69. Park J., Jeong H., Yoon E., & Moon S. (2016). Easy and rapid quantification of lipid contents of marine dinoflagellates using the sulpho-phospho-vanillin method. *Algae*. 31(4) 391-91. <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.12.7>
70. Pérez, Fátima. (2022). Biotecnología azul: bioprospección y desarrollo del potencial de microalgas marinas. Tesis de Licenciatura. Universidad de la laguna. <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/29025/Biotecnologia%20azul%20bioprospeccion%20y%20desarrollo%20del%20potencial%20de%20microalgas%20marinas..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
71. Pérez, E., & Carril, C. (2009) Evolución del metabolismo: desde las porfirinas hacia la fotosíntesis. Universidad Complutense de Madrid. Revista eVOLUCIÓN 4(1): 37-41. <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/0103bd27-14b3-4d68-bd07-1689f6904103/content>
72. Ramírez, D. (2024). Valorización de la biomasa remanente del proceso de extracción de aceite de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Concepción. <https://repositorio.udec.cl/server/api/core/bitstreams/1ab0c851-e066-41a1-9f41-c7f0c13b8eb2/content>
73. Rendón, L. J., Ramírez, M. E., & Vélez, Y. (2015). Microalgas para la industria alimenticia. Universidad Pontificia Bolivariana, Primera edición. Recuperado de <http://hdl.handle.net/20.500.11912/2306>
74. Salazar, D. (2022). Revisión sistemática y caracterización de microalgas incorporadas como alimento vivo en cultivos de especies bioacuáticas en ecuador, 2010-2021. Tesis de licenciatura. Universidad Estatal Península de Santa Elena. <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/8864/1/UPSE-TBM-2022-0032.pdf>
75. Sánchez Mirón, A., Cerón García, M.C., García Camacho, F., Molina Grima, E., & Chisti, Y. (2002). *Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture*. *Enzyme Microb Technol* 31 :1015–23.

76. Sorrenti, V., Castagna, D. A., Fortinguerra, S., Buriani, A., Scapagnini, G., & Willcox, D. C. (2021). *Spirulina* Microalgae and Brain Health: A Scoping Review of Experimental and Clinical Evidence. *Marine Drugs*, 19(6), 293. <https://doi.org/10.3390/md19060293>
77. Strickland, J.D., & T.R. Parsons. (1972). *A practical handbook of seawaters analysis. Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. Pigments analysis.* Fisheries Research Board of Canada. 167:185-199.
78. Vandamme, D., Gheysen, L., Muylaert, K., & Foubert, I. (2018). Impact of harvesting method on total lipid content and extraction efficiency for *Phaeodactylum tricornutum*. *Sep Purif Technol* 194 (2018):362–7.
79. Valencia, J. Á. (2023). *Mejoramiento de la composición bioquímica de microalgas con potencial biotecnológico para su aprovechamiento en la acuicultura.* Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Boca del Río. Repositorio Institucional del Tecnológico Nacional de México. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/6586>

12. Anexos

	Replica	Peso caja petri vacío(g)	Peso de caja petri con muestra(g)	l(mg/mL)
P. tricornutus	0% R1	78.5909	78.6406	0.0497
Fase: Log	0% R2	87.1073	87.137133	0.029833333
Clave : T	0% R3	83.8554	83.892833	0.037433333
	3% R1	91.7585	91.856833	0.098333333
	3% R2	86.523	86.621333	0.098333333
	3% R3	80.2118	80.305133	0.093333333
	13% R1	80.1716	80.231933	0.060333333
	13% R2	90.965	91.031167	0.066166667
	13% R3	73.0149	73.0672	0.0523
	30% R1	79.4668	79.509533	0.042733333
	30% R2	84.0048	84.0476	0.0428
	30% R3	82.4797	82.519167	0.039466667

Anexo A. Peso seco de lípidos.

Clave	Peso sin m	Segundo pr	Tercer pr	peso con	segundo r	tercer pr	lipidos	Lípidos (mg)	Concen	Promedio	Desv es	Relacion de %	%	metodo gr	Sulfo-fosfovanilina (%)	cantidad me	cantidad deso
0% R1	7.6014	7.6024	7.6014	7.6255	7.6232	7.6235	0.0223	22.33333333	449.36	546.9905	88.126	11.09966667	45	54.69905	58.2	31.834847	22.864203
0% R2	6.4108	6.4108	6.4108	6.4277	6.4279	6.4279	0.017	17.03333333	570.95			5.08161111	57				
0% R3	10.678	10.6756	10.6757	10.7006	10.6994	10.699	0.0232	23.23333333	620.66			8.69701111	62				
3% R1	8.5968	8.5962	8.5965	8.6111	8.6114	8.6114	0.0148	14.8	150.51	157.20137	9.611	14.55333333	15	15.72014	58.2	9.149199	6.5710174
3% R2	8.4747	8.475	8.4756	8.4899	8.4902	8.4903	0.015	15.03333333	152.89			14.78277778	15				
3% R3	8.4465	8.4462	8.4464	8.4617	8.4624	8.4621	0.0157	15.7	168.21			14.65333333	17				
13% R1	10.7556	10.7556	10.7556	10.7783	10.7772	10.7777	0.0221	22.13333333	366.85	354.59007	47.888	13.35377778	37	35.45901	58.2	20.637142	14.821865
13% R2	10.649	10.6467	10.6474	10.6667	10.6677	10.6686	0.02	19.96666667	301.76			13.21277778	30				
13% R3	10.5797	10.5796	10.5797	10.6007	10.6002	10.6001	0.0207	20.66666667	335.16			10.80866667	40				
30% R1	10.7549	10.7544	10.7546	10.7614	10.7617	10.7598	0.0063	6.333333333	148.21	182.91019	64.904	2.706444444	15	18.29102	58.2	10.645373	7.645646
30% R2	10.534	10.5335	10.5333	10.5443	10.5449	10.5447	0.011	11.03333333	257.79			4.722266667	26				
30% R3	10.581	10.582	10.5806	10.5867	10.5869	10.5869	0.0056	5.633333333	142.74			2.223288889	14				

Anexo B. Promedio de peso y relación de lípidos.

	Resultados ensayos Bromatológicos Lípidos Totales			
Lípidos tot	Dulce	salobre	salada	
ups	0	3	13	30
	54.69905	15.720137	35.459007	18.291019
	8.81256	0.9610975	4.7888458	6.4903863

Anexo c. Resultado de lípidos totales.

Microalga	Fase	Volumen	Peso seco d	Peso seco total															
		100 ml	Log	10.66															
Clave	Peso Seco De Lípidos T	Dilución	Volumen de Reactivo (Sulfo-fosfovanilina)																Resultado en porcentaje
T	Peso de L	Peso lípido t (Ac. Sulfo)	Reactivo (2.4)	Lecturas a 53	Dilución		mg/g de 1mL concentra	total	D. E total	D. E Total									%
0% R1	0.010463	10.463333	0.1	2.4	0.683	2	442.8977	42.32855	4.232854991	41.97639565	14	4.197639565	1.4					0.423285499	
0% R2	0.010671	13.67	0.1	2.4	0.578	2	383.2396	28.03501	2.803501363									0.280350136	
0% R3	0.010686	10.66	0.1	2.4	0.946	2	592.3295	59.58662	5.95866234									0.595866234	
3% R1	0.008003	8.003333	0.1	2.4	0.646	2	421.875	52.712415	5.2712415	51.39408679	12	5.139408679	1.2					0.52712415	
3% R2	0.007933	7.933333	0.1	2.4	0.442	2	305.9659	38.56713	3.85671314									0.385671314	
3% R3	0.00649	6.49	0.1	2.4	0.622	2	408.2396	62.90272	6.290271747									0.629027175	
13% R1	0.010783	10.783333	0.1	2.4	0.715	2	461.0795	42.75854	4.27585359	41.43457474	1.1	4.143457474	0.1					0.427585359	
13% R2	0.01085	10.85	0.1	2.4	0.683	2	442.8977	40.82007	4.082006703									0.40820067	
13% R3	0.010571	11.056667	0.1	2.4	0.696	2	450.2841	40.725128	4.072512128									0.407251213	
30% R1	0.00513	5.13	0.1	2.4	0.627	2	411.0795	80.13247	8.0132465	67.36101632	12	6.736101632	1.2					0.80132465	
30% R2	0.00603	6.03	0.1	2.4	0.492	2	334.375	55.45191	5.545190713									0.554519071	
30% R3	0.00584	5.84	0.1	2.4	0.587	2	388.3523	66.49668	6.649667684									0.664966768	

Anexo D. Peso seco de lípidos insaturados y volumen de reactivos.

Resultados ensayos Bromatologicos Lípidos Insaturados				
Lípidos Insaturados	Dulce	salobre	salada	
ups	0	3	13	30
	0.419763956	0.513940868	0.4	0.673610163
D.E.	0.137686829	0.122212386	0	0.123628559

Anexo E. Resultado de lípidos por insaturado

Peso de cajas petri sin muestra			Peso de cajas petri con muestra (100 mL de biomasa norm)			Peso seco de la muestra - Proteínas									
Peso 1	peso 2	peso 3	Peso 1	Peso 2	Peso 3	Promedio s D.E.	Promedio c D.E.	promedio p (mg/mL)		Promedio l (mg/mL)		promedio l (mg/mL)		promedio l (mg/mL)	
0% R1	89.1636	89.1673	89.168	0% R1	89.3408	89.3423	89.3438	89.1663	0.0023643	89.3423	0.0015	0.176	176	0.00176	176
0% R2	80.6145	80.6123	80.6109	0% R2	80.8045	80.8035	80.8017	80.612567	0.0018148	80.803233	0.0014189	0.1906667	190.66667	0.0019067	190.66667
0% R3	82.5413	82.5556	82.5378	0% R3	82.7031	82.703	82.7079	82.5449	0.0094303	82.706667	0.0031374	0.1617667	161.76667	0.0016177	161.76667
3% R1	83.943	83.9554	83.9467	3% R1	83.9675	83.9695	83.9695	83.950367	0.0045081	83.9655	0.0043589	0.1151333	115.13333	0.0011513	115.13333
3% R2	86.9886	86.9903	86.9863	3% R2	87.0894	87.0916	87.0923	86.988433	0.0020744	87.091367	0.0017898	0.1029333	102.93333	0.0010293	102.93333
3% R3	86.2358	86.2372	86.237	3% R3	86.3355	86.3385	86.3397	86.236667	0.0007572	86.3379	0.0021633	0.1012333	101.23333	0.0010123	101.23333
13% R1	86.5225	86.523	86.5232	13% R1	86.7065	86.7097	86.7072	86.5229	0.0003606	86.7078	0.0016823	0.1849	184.9	0.001849	184.9
13% R2	78.12	78.1744	78.1418	13% R2	78.3097	78.3095	78.3118	78.145433	0.0273716	78.310333	0.0012741	0.1649	164.9	0.001649	164.9
13% R3	97.1845	97.1975	97.182	13% R3	97.3643	97.3647	97.3671	97.188	0.0083217	97.365567	0.0013317	0.1775667	177.56667	0.0017757	177.56667
30% R1	87.6219	87.6247	87.6237	30% R1	87.6748	87.6804	87.6793	87.623433	0.0014189	87.678367	0.0030989	0.0549333	54.933333	0.0005493	54.933333
30% R2	96.9717	96.8725	96.9734	30% R2	97.0285	97.0305	97.0298	96.9392	0.0577701	97.0296	0.0010149	0.0904	90.4	0.000904	90.4
30% R3	85.9513	85.9507	85.9528	30% R3	86.0078	86.0088	86.0117	85.9516	0.0010817	86.009433	0.0020257	0.0578333	57.833333	0.0005783	57.833333

Anexo F. Peso seco de muestras para proteínas.

<i>P. tricornutum</i>									
Replica	Volumen en	Dilución	Volumen p.	Lecturas	Conc (mg/L)		%	Valor promi	D. E. (mg/g)
0% R1	6	2	4	0.968	16882.941	95.925802	9.5925802	94.23349	12.699867
0% R2	6	2	4	0.884	15400.588	80.772316	8.0772316	Total(%)	D. E. (%)
0% R3	6	2	4	0.983	17147.647	106.00235	10.600235	9.423349	1.2699867
3% R1	6	2	4	2.104	36930	320.75854	32.075854	Valor promi	D. E. (mg/g)
3% R2	6	2	4	1.357	23747.647	230.70901	23.070901	276.07881	45.028733
3% R3	6	2	4	1.599	28018.235	276.76887	27.676887	Total(%)	D. E. (%)
13% R1	6	2	4	1.021	17818.235	96.366876	9.6366876	27.607881	4.5028733
13% R2	6	2	4	1.488	26059.412	158.03161	15.803161	Valor promi	D. E. (mg/g)
13% R3	6	2	4	0.2	3330	18.75352	1.875352	91.050667	69.791066
30% R1	6	2	4	1.91	33506.471	609.94789	60.994789	Total(%)	D. E. (%)
30% R2	6	2	4	1.832	32130	355.42035	35.542035	9.1050667	30.906782
30% R3	6	2	4	1.716	30082.941	520.16613	52.016613	Valor promi	D. E. (mg/g)
3% R1	6	3	4	1.627	28512.353	247.64638	24.764638	328.04059	129.09054
3% R2	6	3	4	2.012	35306.471	343.00328	34.300328	Total(%)	D. E. (%)
3% R3	6	3	4	0.746	12965.294	128.07337	12.807337	49.517812	12.909054
13% R1	6	3	4	2.005	35182.941	190.28091	19.028091	Valor promi	D. E. (mg/g)
13% R2	6	3	4	1.315	23006.471	139.51771	13.951771	239.57434	107.69208
13% R3	6	3	4	0.259	4371.1765	24.6171	2.46171	Total(%)	D. E. (%)
30% R1	6	3	4	1.718	30118.235	548.26885	54.826885	23.957434	10.769208
30% R2	6	3	4	1.63	28565.294	315.98777	31.598777	Valor promi	D. E. (mg/g)
30% R3	6	3	4	1.505	26359.412	455.78234	45.578234	118.13858	84.875941
0% R1	6	2	4	1.252	21894.706	124.40174	12.440174	Total(%)	D. E. (%)
0% R2	6	2	4	1.271	22230	116.59091	11.659091	11.813858	8.4875941
0% R3	6	2	4	1.213	21206.471	131.09296	13.109296	Valor promi	D. E. (mg/g)
3% R1	6	5	4	3.011	52935.882	459.77894	45.977894	440.01298	116.94071
3% R2	6	5	4	2.72	47800.588	464.38395	46.438395	Total(%)	D. E. (%)
3% R3	6	5	4	0.746	12965.294	128.07337	12.807337	44.001298	11.694071
13% R1	6	3	4	1.445	25300.588	136.8339	13.68339	Valor promi	D. E. (mg/g)
13% R2	6	3	4	2.62	46035.882	279.17454	27.917454	124.02853	7.2582233
13% R3	6	3	4	0.352	6012.3529	33.859694	3.3859694	Total(%)	D. E. (%)
30% R1	6	3	4	1.963	34441.765	626.97387	62.697387	12.402853	0.7258223
30% R2	6	3	4	1.832	32130	355.42035	35.542035	Valor promi	D. E. (mg/g)
30% R3	5	3	4	1.716	25069.118	433.47177	43.347177	350.74542	192.8534
								Total(%)	D. E. (%)
								35.074542	19.28534
								Valor promi	D. E. (mg/g)
								149.95605	123.18274
								Total(%)	D. E. (%)
								14.995605	12.318274
								Valor promi	D. E. (mg/g)
								471.95533	139.80725
								Total(%)	D. E. (%)
								47.195533	13.980725

Anexo G. Lecturas de proteínas y relación porcentual.

Salinidad	Resultados ensayos Bromatologicos Proteinas Totales			
	Dulce	salobre	salada	
ups	0	3	13	30
	10.913101	31.341211	12.050336	48.356673
D.E.	1.8759285	13.17594	9.517807	12.102051

Anexo H. Resultados de proteínas.

Peso seco de la muestra - Carbohidratos									
Promedio sir	D.E.	Promedio co	D.E.	promedio pe (mg/mL)		Promedio 1 r (mg/mL)		promedio 1 r (mg/mL)	
78.574367	0.0288968	78.7459	0.0014731	0.1715333	171.53333	0.0017153	1.7153333	0.0171533	17.153333
87.099967	0.006901	87.244433	0.0011846	0.1444667	144.46667	0.0014447	1.4446667	0.0144467	14.446667
83.850367	0.0045081	83.9974	0.000781	0.1470333	147.03333	0.0014703	1.4703333	0.0147033	14.703333
91.757767	0.0011846	92.0393	0.0016523	0.2815333	281.53333	0.0028153	2.8153333	0.0281533	28.153333
86.5229	0.0003606	86.829867	0.0539823	0.3069667	306.96667	0.0030697	3.0696667	0.0306967	30.696667
80.209667	0.0018502	80.479767	0.0003215	0.2701	270.1	0.002701	2.701	0.02701	27.01
80.172533	0.0009504	80.322867	0.0005774	0.1503333	150.33333	0.0015033	1.5033333	0.0150333	15.033333
90.965933	0.0020648	91.114133	0.0017616	0.1482	148.2	0.001482	1.482	0.01482	14.82
73.007967	0.0060575	73.156533	0.0015177	0.1485667	148.56667	0.0014857	1.4856667	0.0148567	14.856667
79.467233	0.0005859	79.6071	0.0006245	0.1398667	139.86667	0.0013987	1.3986667	0.0139867	13.986667
84.0075	0.0023812	84.153167	0.0010017	0.1456667	145.66667	0.0014567	1.4566667	0.0145667	14.566667
82.481833	0.0018903	82.625	0.001562	0.1431667	143.16667	0.0014317	1.4316667	0.0143167	14.316667

Anexo I. Peso seco de muestras de carbohidratos.

Microalga	Fase	Volumen	Peso seco de 1 ml(mg/mL)						Resultados en Porcentaje		
<i>P. tricornutu</i>	semi-continúo	1 ml	5.009	3.1576					%	total (%)	D. E. (%)
Replica	Volumen co	Dilución(1:1)	Volumen pa	Lecturas	Conc (mg/L)	Conc (mg/g)	Total (mg/g)	D. E.			
0% R1	5	10	4	3.835	263.46774	52.693548	51.864695	0.7203515	5.2693548	5.1864695	0.0720352
0% R2	5	10	4	3.747	257.55376	51.510753			5.1510753		
0% R3	5	10	4	3.738	256.94892	51.389785			5.1389785		
3% R1	5	10	4	3.789	260.37634	52.075269	51.259857	0.7708698	5.2075269	5.1259857	0.077087
3% R2	5	10	4	3.675	252.71505	50.543011			5.0543011		
3% R3	5	10	4	3.721	255.80645	51.16129			5.116129		
13% R1	5	10	4	4.018	275.76613	55.153226	56.609319	1.3103518	5.5153226	5.6609319	0.1310352
13% R2	5	10	4	4.207	288.46774	57.693548			5.7693548		
13% R3	5	10	4	4.154	284.90591	56.981183			5.6981183		
30% R1	5	10	4	3.504	241.22312	48.244624	48.862903	0.6544747	4.8244624	4.8862903	0.0654475
30% R2	5	10	4	3.601	247.74194	49.548387			4.9548387		
30% R3	5	10	4	3.545	243.97849	48.795699			4.8795699		
3% R1	5	10	4	1.393	99.354839	19.870968	15.435484	3.8414533	1.9870968	1.5435484	0.3841453
3% R2	5	10	4	0.895	65.887097	13.177419			1.3177419		
3% R3	5	10	4	0.901	66.290323	13.258065			1.3258065		
13% R1	5	10	4	0.869	64.139785	12.827957	29.364695	23.70596	1.2827957	2.9364695	2.370596
13% R2	5	10	4	4.12	282.62097	56.524194			5.6524194		
13% R3	5	10	4	1.309	93.709677	18.741935			1.8741935		

Anexo J. Lectura del espectrofotómetro de Uv-Vis en muestras de carbohidratos.

Carbohidrato	Dulce	Salobre	Salada	
	0	3	13	30
	5.1864695	5.1259857	5.6609319	4.8862903
	0.0720352	0.077087	0.1310352	0.0654475

Anexo K. Resultados de pruebas de carbohidratos.

Peso seco de la muestra - Pigmentos									
Promedio s	D.E.	Promedio c	D.E.	promedio p (mg/mL)		Promedio 1 (mg/mL)		promedio 1 (mg/mL)	
86.5229	0.0003606	86.646167	0.0004163	0.1232667	123.26667	0.0012327	1.2326667	0.0123267	12.326667
87.099967	0.006901	87.210233	0.0007371	0.1102667	110.26667	0.0011027	1.1026667	0.0110267	11.026667
83.850367	0.0045081	83.949667	0.0005033	0.0993	99.3	0.000993	0.993	0.00993	9.93
82.481833	0.0018903	82.677433	0.0004041	0.1956	195.6	0.001956	1.956	0.01956	19.56
79.4659	0.0027221	79.6481	0.0003	0.1822	182.2	0.001822	1.822	0.01822	18.22
78.591033	0.0001528	78.7843	0.0005292	0.1932667	193.26667	0.0019327	1.9326667	0.0193267	19.326667
73.007967	0.0060575	73.143933	0.000611	0.1359667	135.96667	0.0013597	1.3596667	0.0135967	13.596667
91.757767	0.0011846	91.8919	0.0005	0.1341333	134.13333	0.0013413	1.3413333	0.0134133	13.413333
80.209667	0.0018502	80.343133	0.000611	0.1334667	133.46667	0.0013347	1.3346667	0.0133467	13.346667
90.965933	0.0020648	91.059133	0.0003055	0.0932	93.2	0.000932	0.932	0.00932	9.32
80.172533	0.0009504	80.260467	0.0004933	0.0879333	87.933333	0.0008793	0.8793333	0.0087933	8.7933333
84.007833	0.0026274	84.098467	0.0002309	0.0906333	90.633333	0.0009063	0.9063333	0.0090633	9.0633333

Anexo L. Peso seco para muestras de pigmentos.

Determinación de Pigmentos Condi mg/L												
Mediciones de Absorbancia en Espectrofotometro de Rayos UV-Vis(Thermo Scientific)												
Microalga	Fase de Cre	Muestra	Peso seco (	Peso seco(	Dilución pa	Dilución para Lectura					Blanco	
<i>P. tricornuta</i>	Semi-conti	10ml (Conci	0.0131603	0.1316028	1:10(10 ml di	1:4(1 ml de muestra con extracto y 3 ml de acetona al 80%)					Acetona al 80%	
			0.052678									
Muestras												
Ondas de l	0% R1	0% R2	0% R3	3% R1	3% R2	3% R3	13% R1	13% R2	13% R3	30% R1	30% R2	30% R3
630	0.455	0.451	0.514	1.212	0.431	0.428	0.767	0.853	0.808	0.441	1.16	0.437
647	0.789	0.784	0.852	1.584	0.62	0.618	1.039	1.193	1.084	0.644	1.539	0.641
664	1.98	0.977	2.069	3.351	1.516	1.513	2.823	2.955	2.876	1.512	3.379	1.5
470	3.239	3.241	3.21	4.518	2.293	2.292	4.255	4.192	4.327	2.399	4.586	2.381
480	2.755	2.75	2.095	4.597	1.884	1.881	4.264	4.069	4.385	1.989	4.567	1.972
510	1.156	1.151	1.2	2.183	0.786	0.782	1.779	1.804	1.86	0.844	2.149	0.839
581	0.292	0.289	0.343	0.806	0.286	0.283	0.5	0.565	0.532	0.294	0.763	0.295
610	0.527	0.529	0.583	1.255	0.42	0.417	0.792	0.898	0.837	0.435	1.211	0.434

Anexo M. Lectura de pigmentos en diferentes ondas

Contenido de pigmentos					
					mg/L
	Clorofila a	Clorofilab	Clorofila c	carotenos	Fucoxantina
0% R1	7.2076387	2.0326825	0.7396744	6.235444	6.892703359
0% R2	3.748734	2.8112721	1.3701511	6.9594958	6.844589261
0% R3	9.3310977	2.7668963	1.1425901	5.6934542	8.171603494
3% R1	7.6018466	2.7633742	1.855816	6.479454	4.599214202
3% R2	3.7267442	1.0928386	0.5978288	2.8863359	2.99950051
3% R3	3.5066761	1.0263622	0.557228	2.7175757	2.835674224
13% R1	9.3526247	2.3250905	1.3704565	8.7538191	7.629870901
13% R2	9.8741421	2.8384026	2.8384026	8.4204095	7.301317626
13% R3	9.6942857	2.8525804	2.503013	9.1572228	7.772353604
30% R1	7.2489957	3.5844292	2.2607897	5.948	6.114404773
30% R2	17.093991	2.3961971	5.8865914	14.332308	10.86075783
30% R3	7.3937036	5.7112277	2.3174211	6.0627098	6.229924957
Total	7.9817067	2.6834461	1.9533302	6.970519	6.520992895
Desviacion	3.7040885	1.2049868	1.4581818	3.0646101	2.23873197

Anexo N. Resultado de contenido de pigmentos.