



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES

Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de extractos etanólicos de *Arthrospira platensis* con captura de CO₂ obtenido en el proceso de elaboración del vino y de Indura

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico
MARCEL BENOIT ESCOBAR

PROFESOR PATROCINANTE

DRA. CARLA DELPORTE V.
Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

DIRECTORES DE TESIS

DRA. CARLA DELPORTE V.
Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

LIC. GABRIEL CASTRO N.
Aeon Biogroup

SANTIAGO DE CHILE

2013

"Si cierras la puerta a todos los errores, también la verdad se quedará fuera."

- Rabindranath Tagore

AGRADECIMIENTOS

El trabajo reflejado en la presente memoria ha sido realizado a lo largo de varios años, durante ese periodo es mucha la gente que ha ido dejando su impronta, una huella indeleble que ha quedado grabada en lo más profundo de mis afectos, gente que ha colaborado a que esta tesis haya salido adelante. En este apartado quiero mencionar especialmente a mi familia y amigos que siempre han estado a mi lado brindándome todo su apoyo y cariño.

A mis directores de tesis, la doctora Carla Delporte y el licenciado Gabriel Castro, que con sus dos estilos distintos de enfocar y realizar el trabajo, han permitido a esta memoria llegar a buen puerto. Les agradezco en especial por su inagotable dedicación y por compartir conmigo sus enseñanzas científicas, artísticas y filosóficas.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud a todo el equipo del Laboratorio de Productos Naturales y de Aeon Biogroup, por su compañerismo y camaradería.

ESTA MEMORIA FUE FINANCIADA POR

Proyecto FIA: PYT-2011-0055

Investigador responsable: Gabriel Castro N.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	I
TABLA DE ABREVIATURAS	IV
INDICE DE TABLAS.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN	IX
SUMMARY	XI
I. INTRODUCCION.....	1
1. Ficha botánica de <i>Arthrospira platensis</i>	6
1.1. Clasificación taxonómica	6
1.2. Distribución geográfica.....	6
1.3. Descripción de la especie.....	7
1.4. Condiciones de desarrollo	9
2. Estudios anteriores de <i>Arthrospira platensis</i>	12
2.1. Efectos de la aplicación de CO ₂ a cultivos de <i>Arthrospira platensis</i>	12
2.2. Composición fenólica de extractos de <i>Arthrospira platensis</i>	12
2.3. Actividad antioxidante de extractos etanólicos de <i>Arthrospira platensis</i>	14
II. HIPOTESIS	15
III. OBJETIVOS	16
1. Generales.....	16
2. Específicos	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1. Reactivos.....	17
2. Material vegetal	17

3. Obtención del gas de fermentación proveniente de la viña	18
4. Montaje de la red de CO ₂ y de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i>	20
5. Obtención de la biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> desde cultivos sometidos a distintas concentraciones de CO ₂	23
5.1. Monitoreo de los cultivos y del nivel de CO ₂	23
5.1.1. Toma de muestras	24
5.1.2. Análisis previos al conteo celular y a la medición de absorbancia	25
5.1.3. Conteo celular	25
5.1.4. Medición de absorbancia	26
5.2. Cosecha de los cultivos	27
6. Obtención de los extractos seriados de <i>Arthrospira platensis</i>	27
7. Cromatografía en capa fina (CCF)	29
8. Estudio químico de los extractos etanólicos de <i>Arthrospira platensis</i>	30
8.1. Determinación del contenido de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu	31
8.2. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos mediante el método FRAP	32
8.3. Determinación de la presencia de los compuestos fenólicos mayoritarios descritos en extractos de <i>Arthrospira platensis</i> mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detección por UV con arreglo de diodos (CLAE-DAD)	34
V. RESULTADOS Y DICUSIÓN.....	36
1. Rendimiento y crecimiento de los cultivos.....	36
2. Obtención de los extractos seriados y sus rendimientos	40
3. Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos obtenidos.....	42
4. Determinación de la cantidad de fenoles totales presentes en los extractos etanólicos de <i>Arthrospira platensis</i> mediante la reacción de Folin-Ciocalteu.....	44
5. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de <i>Arthrospira platensis</i> mediante el método FRAP	47

6. Determinación de la presencia de los compuestos fenólicos mayoritarios descritos en extractos de <i>Arthrospira platensis</i> por cromatografía de líquidos de alta eficiencia con arreglo de diodos (CLAE-DAD).....	54
VI. CONCLUSIONES.....	61
VII. REFERENCIAS	64
ANEXOS	70

TABLA DE ABREVIATURAS

Ac	Ácido
Ai	Cultivo Indura con 0% de CO ₂
Av	Cultivo Viña con 0% de CO ₂
Bi	Cultivo Indura con 2,5% de CO ₂
Bv	Cultivo Viña con 2,5% de CO ₂
Ci	Cultivo Indura con 5% de CO ₂
Cv	Cultivo Viña con 5% de CO ₂
Di	Cultivo Indura con 7,5% de CO ₂
Dv	Cultivo Viña con 7,5% de CO ₂
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAE-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector UV con arreglo de diodos
DCM	Diclorometano
EHEX	Extracto hexánico
EDCM	Extracto diclorometánico
EET	Extracto etanólico
FRAP	Poder antioxidante reductor de Fe ⁺³ (Ferric ion reducing antioxidant power)
FC	Folin ciocalteu
nm	Nanómetro
NP	Reactivo revelador natural products
ppm	Partes por millón

ROS	Especies reactivas del oxígeno (Reactive oxygen species)
SD	Desviación estándar
Tr	Tiempo de retención
UA	Unidades de absorbancia
μM	Micromolar
UPS	Unidades prácticas de salinidad

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen del aporte de CO ₂ suministrado a cada cultivo.....	22
Tabla 2: Resumen del protocolo de la determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu.	32
Tabla 3: Resumen del protocolo de la determinación de la actividad antioxidante mediante el método FRAP.....	34
Tabla 4: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto al conteo celular (* indica diferencias significativas)	38
Tabla 5: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la absorbancia (* indica diferencias significativas)	39
Tabla 6: Productividad de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i>	40
Tabla 7: Rendimiento del proceso de extracción de la biomasa seca de <i>Arthrospira platensis</i> cultivada con distintas concentraciones de CO ₂	41
Tabla 8: Contenido de fenoles totales de los EET de <i>Arthrospira platensis</i> con distintas concentraciones de CO ₂	46
Tabla 9: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la cantidad de fenoles totales	46
Tabla 10: Poder antioxidante reductor del hierro de los EET de <i>A. platensis</i> con distintas concentraciones de CO ₂	49
Tabla 11: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la actividad antioxidante a los 4 minutos	50
Tabla 12: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la actividad antioxidante a los 30 minutos	50
Tabla 13: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la actividad antioxidante a los 60 minutos	50
Tabla 14: Tabla comparativa entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante.....	52
Tabla 15: Solución de Macronutrientes del medio de cultivo Zarrouk.....	70
Tabla 16: Solución de micronutrientes del medio de cultivo Zarrouk.....	71
Tabla 17: Solución de vitaminas del medio de cultivo Zarrouk.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vista al microscopio de <i>Arthrospira platensis</i> . a) Detalle de la conformación de la colonia filamentosa. b) Colonias coexistiendo en un cultivo.	8
Figura 2: Organización de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i> en donde se aprecia el sistema de inyección de aire enriquecido con CO ₂ y la fuente lumínica.	10
Figura 3: Compuestos fenólicos identificados en <i>Arthrospira platensis</i>	13
Figura 4: Detalle de los filtros presentes en el equipo utilizado para obtener el gas de fermentación.	19
Figura 5: Proceso de extracción del gas de fermentación.	20
Figura 6: Distribución general de una serie X de cultivos de <i>Arthrospira platensis</i>	21
Figura 7: Curva de crecimiento algal. Las fases A, B, C, D, E y F corresponden a ajuste, aceleración, exponencial, retardo, estacionaria y muerte, respectivamente.	24
Figura 8: Vista al microscopio (40x) de un cuadrante de la cámara de Sedgewick-Rafter conteniendo una muestra de <i>Arthrospira platensis</i>	26
Figura 9: Proceso de extracción de la biomasa seca de <i>Arthrospira platensis</i> . EHEX: extracto hexánico; EDCM: extracto de diclorometano; EET: extracto etanólico.	28
Figura 10: Reducción del complejo TPTZ-Fe ⁺³ a TPTZ-Fe ⁺² en el ensayo FRAP	33
Figura 11: Gráfico de crecimiento celular por conteo de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i> con inyección de CO ₂ de Indura	36
Figura 12: Gráfico de crecimiento celular por absorbancia de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i> con inyección de CO ₂ de Indura	37
Figura 13: Gráfico de crecimiento celular por conteo de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i> con inyección de gas de fermentación	37
Figura 14: Gráfico de crecimiento celular por absorbancia de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i> con inyección de gas de fermentación	38
Figura 15: Gráfico comparativo de los rendimientos de extracción de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i>	41
Figura 16: Cromatografía en capa fina de los extractos EHEX (A), EDCM (B) y EET (C), revelados con NP/PEG y visualizados a 365 nm. Fase móvil: Hexano: Acetona (60:40).....	42

Figura 17: Cromatografía en capa fina. Cromatofolio con los EET revelado con NP/PEG y visualizado a 365 nm. Fase móvil: metanol: acetato de etilo (1:1)	43
Figura 18: Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.	44
Figura 19: Contenido de fenoles totales expresados en mg ácido gálico/ g biomasa seca de los EET de <i>Arthrospira platensis</i> con distintas concentraciones de CO ₂	47
Figura 20: Curva de calibración de Fe ⁺² para la determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP.	48
Figura 21: Poder antioxidante reductor del hierro expresados en mmol Fe ⁺² / g de EET de <i>Arthrospira platensis</i>	51
Figura 22: Contenido de fenoles totales vs. Actividad antioxidante (FRAP, 60 minutos) de los EET de <i>Arthrospira platensis</i>	53
Figura 23: Cromatogramas por CLAE-DAD a 280 nm de patrones primarios a) Acido gálico (Tr: 2,521 min) b) Acido cafeico (Tr: 2,301 min) c) Acido ferúlico (Tr: 8,913 min).....	55
Figura 24: Cromatogramas por CLAE-DAD a 280 nm de los EET (5 mg/mL). a) EET Av 0% CO ₂ b) EET Bi 2,5% CO ₂ Indura c) EET Bv 2,5% CO ₂ Viña d) EET Ci 5% CO ₂ Indura e) Cv 5% CO ₂ Viña f) Di 7,5% CO ₂ Indura g) Dv 7,5% CO ₂ Viña	60
Figura 25: Análisis del gas de fermentación de la Viña Miguel Torres certificado por Indura....	72

RESUMEN

Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de extractos etanólicos de *Arthrospira platensis* con captura de CO₂ obtenido en el proceso de elaboración del vino y de Indura

Dentro de las cianobacterias, una de las especies más conocidas es *Arthrospira platensis*, microalga cosmopolita cultivada esencialmente como alimento dadas sus notables propiedades nutricionales, sin embargo, en los últimos años se han indagado y estudiado sus propiedades farmacológicas, destacándose su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiviral. En la presente investigación se realizó un estudio comparativo en cuanto a crecimiento celular, producción de biomasa, rendimiento de extractos, perfil cromatográfico por cromatografía en capa fina y CLAE-DAD, actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales entre extractos etanólicos de *Arthrospira platensis* cultivada con gas de fermentación obtenido del proceso de elaboración del vino de la viña Miguel Torres y con CO₂ obtenido comercialmente de Indura, siendo ambos gases aplicados en cuatro proporciones distintas; 0%, 2,5%, 5% y 7,5% de CO₂.

Se determinó que el crecimiento celular óptimo se logró al utilizar, en el caso de ambos gases, una concentración de 5% de CO₂. Los extractos etanólicos fueron obtenidos agotando la biomasa resultante del proceso de cosecha, de manera secuencial con solventes de polaridad creciente, obteniéndose el mejor rendimiento de extracción en los cultivos con un aporte de 2,5% de CO₂ tanto de Indura como de la Viña Miguel Torres. Estos extractos fueron evaluados en su concentración de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, resultando, para el caso de los cultivos con inyección de CO₂ de Indura que el cultivo con 5% de este gas presentó los mejores valores ($35,98 \pm 1,397$ mg ác. gálico/g extracto) y para el caso de los cultivos con captura de gas de fermentación, el valor óptimo fue de 2,5% de CO₂ ($22,135 \pm 1,046$ mg ác. gálico/g extracto). Posteriormente, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos, para lo cual se realizó el ensayo FRAP, en este caso, los cultivos que presentaron los mejores valores de reducción de Fe⁺³ fueron los cultivos con un 7,5% de CO₂ tanto de INDURA como de la Viña Miguel Torres, llegando a $1,2 \pm 0,06$ y $0,9 \pm 0,02$ (Mmol Fe⁺²/g de extracto), respectivamente. Finalmente, mediante CLAE-DAD, se determinó la ausencia de compuestos fenólicos descritos previamente

para extractos de *A. platensis*, como: los ácidos gálico, cafeico y ferúlico en dichos extractos etanólicos.

Estos resultados permiten establecer que las variaciones en la inyección de CO₂ a cultivos de *A. platensis* afectan positivamente los parámetros analizados en este trabajo, lo que se tradujo en un mayor rendimiento de biomasa obtenida desde los cultivos, mayor rendimiento de los extractos etanólicos, mayor contenido de fenoles totales y mayor actividad antioxidante. Los cultivos con gas de fermentación presentaron resultados más bajos respecto de los parámetros evaluados en esta memoria que los cultivos con CO₂ de Indura, sin embargo, presentaron mejores resultados que los cultivos control (sin inyección extra de CO₂), lo que demuestra la factibilidad de utilizar gas de fermentación en el cultivo de *A. platensis*, lográndose un doble propósito; mejorar las características de esta microalga y disminuir la huella de carbono de la empresa Miguel Torres al utilizar el gas de fermentación que esta genera.

SUMMARY

Comparative evaluation of the antioxidant activity and total phenol content present in ethanolic extracts of *Arthrospira platensis* cultivated with CO₂ addition obtained from fermentation gas produced in the wine making process and Indura.

In cyanobacteria, one of the best known species is *Arthrospira platensis*. This microalgae is cultivated essentially as food given its remarkable nutritional properties. However, in recent years its pharmacological properties have been investigated and studied, highlighting its antioxidant, anti-inflammatory and antiviral activities. In this investigation we performed a comparative study in terms of cell growth, biomass production, extracts's yields, chromatographic profile by thin layer chromatography and HPLC-DAD, antioxidant activity and total phenol content between ethanolic extracts of *Arthrospira platensis* cultivated with fermentation gas obtained from the wine making process from Miguel Torres vineyard and CO₂ obtained commercially from Indura, both gases were applied in four different proportions, 0%, 2.5%, 5% and 7.5% of CO₂.

It was determined that optimum cell growth was achieved, in the case of both gases, at a CO₂ concentration of 5%. Ethanolic extracts were obtained exhausting the biomass obtained in the harvesting process, the extraction process was made sequentially with solvents of increasing polarity, the best extraction yield occurred in the cultures with CO₂ addition of 2.5%, in both gases. The ethanolic extracts were evaluated in its total phenols content using Folin - Ciocalteu test. The greatest phenolic concentration appeared in the cultures with CO₂ (Indura) addition of 5% (35.98 ± 1.397 mg gallic acid/ g extract) and in the case of cultures with fermentation gas addition, the optimum value was obtained at a CO₂ concentration of 2.5 % (22,135 ± 1,046 mg gallic acid/ g extract). Subsequently, antioxidant capacity was evaluated in the ethanolic extracts, for which FRAP assay was performed , in this case , the cultures that showed the best iron reducing values were cultures with a CO₂ concentration of 7.5% in both cases, reaching 1.264 ± 0.060 and 0.992 ± 0.016 (mmol Fe⁺²/ g extract), respectively. Finally, the presence of major phenolic compounds described for *A. platensis* were determined by HPLC -DAD, ruling out the presence in ethanolic extracts of gallic, caffeic and ferulic acids.

These results establish that changes in CO₂ addition to *A. platensis* cultures affects positively the parameters analyzed in this study, which resulted in a higher yield of biomass obtained from cultures, higher yields of ethanol extracts, higher phenolic content and an increase of antioxidant activity. The cultures with fermentation gas addition showed lower scores on the evaluated parameters compared to cultures with addition of CO₂ (Indura), however, they presented better results compared to control cultures (without CO₂ addition), which demonstrates the feasibility of using fermentation gas in *A. platensis* cultures, achieving a dual purpose, to improve the characteristics of this microalgae and to reduce the carbon footprint of Miguel Torres vineyard by using the fermentation gas they generate.

I. INTRODUCCION

Dentro de las microalgas más estudiadas en biotecnología se encuentran las cianobacterias; microorganismos procariotas con características fisiológicas y morfológicas específicas que les permiten adaptarse a cambios ambientales extremos (Helbling *et al.*, 2006). *Arthrospira platensis* es un alga unicelular, cosmopolita, perteneciente al grupo de las cianobacterias. Existen reportes que indican que esta microalga fue utilizada como alimento por la civilización Azteca en México hace mas de 400 años, y actualmente, se cultiva en algunos países, como alimento para consumo humano y animal, así como para la obtención de aditivos utilizados en la industria farmacéutica y alimentaria, lográndose una producción anual de más de 3000 toneladas cúbicas a nivel mundial (Belay, 2002).

En los países en desarrollo, la desnutrición representa un grave problema, por lo que la producción de fuentes alternativas de alimentos es de suma importancia y en este ámbito, *A. platensis* representa una de esas alternativas, ya que además de sus propiedades nutritivas, su cultivo presenta pocas dificultades, puesto que crece bien en aguas altamente alcalinas y por ello, la posibilidad de contaminación con otros microorganismos es muy limitada (Ramírez y Olvera, 2006).

Recientemente, el potencial biotecnológico de *A. platensis* y otras microalgas se ha demostrado en una amplia gama de usos, tales como, en la

degradación de herbicidas organofosforados (Lipok *et al.*, 2007), la fijación de gases de efecto invernadero (de Morais, 2007), como bioacumuladoras de metales pesados (Chojnacka, 2005, Gong, 2005), como catalizadoras en procesos de biotransformación (Utsukihara *et al.* 2007), para la producción de hidrógeno (Juantorena *et al.*, 2007) y en la producción de biocombustibles (Chisti, 2007), entre otros.

Esta especie posee un gran potencial alimenticio debido a su elevado valor nutricional. Es una fuente importante de proteínas, vitaminas, aminoácidos, lípidos, minerales y otros nutrientes, por lo que su principal uso es como suplemento alimenticio (Naranjo *et al.*, 2010), sin embargo, diversos estudios realizados en los últimos años le han atribuido ciertas propiedades farmacológicas, entre las que se cuenta su actividad antioxidante. Este efecto se debe a algunos de sus constituyentes, entre los que destacan los ácidos grasos poliinsaturados w-3 y w-6, β -caroteno, α -tocoferol, ficocianina y compuestos fenólicos (Chamorro *et al.*, 2002). Se ha reportado que el extracto alcohólico de *A. platensis* inhibe la peroxidación lipídica significativamente (65% de inhibición), lo que es considerable comparado con agentes antioxidantes aislados como α -tocoferol (35%), BHA (45%) y β -caroteno (48%). Asimismo, el extracto acuoso de *A. platensis* ha mostrado mayor efecto antioxidante (76%) que el ácido gálico (54%) y el ácido clorogénico (56%) (Manoj *et al.*, 1992).

Los antioxidantes son compuestos que retardan o inhiben la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas por parte de las especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales se producen constantemente en las células como resultado de los procesos metabólicos normales. Debido a que algunos de los antioxidantes sintéticos son altamente inestables bajo las condiciones de trabajo y en ciertos casos ocasionan efectos adversos sobre la salud de animales de experimentación, los investigadores han intentado encontrar sustancias más estables, eficaces, versátiles y/o menos tóxicas. Para cumplir con este objetivo, se han obtenido diferentes tipos de compuestos a partir de rutas sintéticas o fuentes naturales. Así por ejemplo, entre los compuestos de origen natural se encuentran: carotenoides, vitaminas C y E, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides y licopenos, entre otros (Stashenko et al., 2007).

El estrés oxidativo provocado por los radicales libres juega un papel fundamental en la etiología y progresión de enfermedades tan diversas como son aterosclerosis, cáncer y cataratas, además de otros efectos perniciosos, como el envejecimiento celular. Sus efectos se presentan a través de una cascada de eventos, entre los cuales se incluyen la peroxidación de fosfolípidos de membranas, la destrucción oxidativa de proteínas, tanto de enzimas como de proteínas estructurales y la modificación covalente de ácidos nucleicos. Por estas razones, es importante encontrar nuevas fuentes de moléculas bioactivas con propiedades antioxidantes (Rodríguez y Guil, 2007). Existe suficiente evidencia científica que demuestra que una dieta rica en

antioxidantes disminuye la incidencia de las enfermedades nombradas anteriormente, cuya causa, entre otras, es el daño producido por el estrés oxidativo en el organismo, daño que puede ser evitado o disminuido al aumentar la ingesta de antioxidantes. El estrés oxidativo se produce por un desbalance entre la producción de radicales libres y la concentración de antioxidantes presentes en el organismo (Pietta, 2000).

Los compuestos fenólicos son moléculas con reconocida actividad antioxidante, sin embargo, su presencia en cianobacterias ha sido menos documentada que en plantas superiores (Sudha et al., 2011), aún así, se han hecho variados estudios que describen el perfil de compuestos fenólicos del género *Arthrospira*, el cual consta principalmente de ácidos fenólicos tales como: ácido gálico, ácido p-OH-benzóico, ácido clorogénico, ácido vainílico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido salicílico, ácido o-cumárico, ácido ferúlico y ácido cinámico; y flavonoides, entre los que están: quercetina, genisteína y canferol entre otros (Abd el-baky et al., 2009).

Esta memoria fue financiada por el proyecto FIA “Producción de Spirulina (*Arthrospira platensis*) para alimentación animal con captura de CO₂ proveniente de Viña Miguel Torres”. Como es sabido, el CO₂ cumple una función fundamental en las rutas metabólicas de síntesis de nutrientes de las cianobacterias (Castro y Navarro, 2009), por lo que utilizar el gas de fermentación del vino de la viña Miguel Torres tendrá un doble propósito; incrementar la productividad del cultivo y además, reducir la huella de carbono

de esta viña. El uso del CO₂, que normalmente se libera a la atmósfera, como una posible fuente de carbono para el cultivo de microalgas puede ayudar a atenuar las consecuencias del efecto invernadero (Ravelonandro et al., 2011)

Teniendo en consideración estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar el impacto que tiene la incorporación de CO₂ obtenido de distintos orígenes y en distintas proporciones en cultivos de *A. platensis* sobre la generación de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y tasa de crecimiento celular.

1. Ficha botánica de *Arthrospira platensis*

1.1. Clasificación taxonómica (Algaebase, 2013)

Dominio: Prokaryota

Reino: Bacteria

Phylum: Cyanobacteria

Clase: Cyanophyceae

Orden: Oscillatoriales

Familia: Phormidiaceae

Género: *Arthrospira*

Especie: *Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont C

1.2. Distribución geográfica

Arthrospira platensis es originaria del lago Chad en África (Castro y Navarro, 2009), sin embargo, se desarrolla en forma natural en numerosos lugares, siendo las principales poblaciones encontradas en lagos de África, principalmente en Kenia, Etiopía, Egipto, Sudán, Argelia, Congo, Zaire y Zambia. Se la encuentra además en Asia tropical y subtropical (India, Myanmar, Pakistán, Sri Lanka, China, Tailandia y Rusia), en América (Perú, Uruguay, California) y en Europa (España, Francia, Hungría y Azerbaiyán), que como el antiguo lago del Valle de México y las lagunas de Kanem y Chad, son

cuerpos de agua poco profundos que están situados sobre depósitos de bicarbonato de sodio, con un pH alcalino y una salinidad elevada (Vonshak y Tomaselli, 2000).

1.3. Descripción de la especie

Arthrospira platensis es un alga fotosintética que forma colonias filamentosas de color verde azulado (Cyanophyceae). Sus células cilíndricas tienen un ancho de 3 a 12 μm , alcanzando a veces hasta 16 μm . Sus filamentos presentan un esquema en forma de hélice abierta y llegan a medir entre 100 y 200 μm , como se puede apreciar en la figura 1. Las características de esta hélice y sus medidas dependerán de las condiciones ambientales y del crecimiento del alga. Son organismos unicelulares y fotoautótrofos. Poseen una región central, donde se localiza el ácido nucleico (solo una molécula de DNA), una región periférica que contiene las membranas tilacoidales y varias inclusiones rodeadas frecuentemente por una capa de mucílago. Dicha capa no está presente entre las células que forman la colonia. La pared celular es multiestratificada y se caracteriza por presentar una serie de poros alrededor del tricoma, encontrándose dividida por septos visibles al microscopio óptico, además, contiene peptidoglucano y está envuelta en una cápsula o vaina compuesta por mucopolisacáridos, característica que le confiere a esta microalga un alto grado de digestibilidad (88-92%). La pared celular presenta la estructura y composición características de las bacterias Gram negativas, es decir, es delgada y no posee celulosa, lo que facilita su digestión, diferenciándose así de las algas Chlorophytas, como *Chlorella sp* que también

es producida y empleada como alimento en acuicultura. Otros componentes celulares son las inclusiones citoplasmáticas (gránulos de polifosfato, glucógeno y cianoficina), los carboxisomas o cuerpos poliédricos donde se encuentra la rubisco (la principal enzima responsable de la fijación fotosintética de dióxido de carbono) y ribosomas 70S. Las vesículas de gas presentes en *A. platensis* le confieren su capacidad de flotación. Mediante este mecanismo regulan sus migraciones diurnas dentro de la columna de agua, permitiendo que las algas se mantengan en las zonas donde el proceso de fotosíntesis es óptimo y la cantidad de nutrientes necesarios es adecuada (Ramírez y Olvera, 2006).

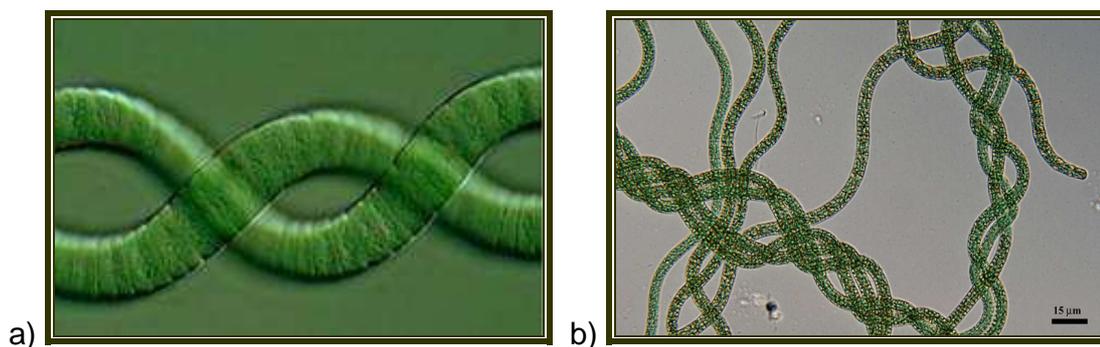


Figura 1: Vista al microscopio de *Arthrospira platensis*. a) Detalle de la conformación de la colonia filamentosas. b) Colonias coexistiendo en un cultivo.

La reproducción se efectúa por fisión binaria transversal. El alargamiento del tricoma o filamento se debe a las numerosas divisiones transversales de sus células. La multiplicación se produce solamente por fragmentación del filamento y es de naturaleza intracelular, destruyendo la célula intercalares existente dentro de los mismos filamentos (Ramírez y Olvera, 2006).

1.4. Condiciones de desarrollo

El crecimiento de cianobacterias en ambientes acuáticos está controlado por una variedad de factores ambientales y para su cultivo, son necesarias las condiciones adecuadas de nutrientes, temperatura, pH e iluminación (Couteau, 1996).

La temperatura del medio de cultivo es el factor climático más importante, que incidirá directamente en la rapidez del crecimiento y la calidad de la microalga. Por debajo de 20°C el crecimiento es prácticamente nulo, siendo la temperatura óptima para el desarrollo alrededor de 37°C, sin embargo, *A. platensis* es un alga termófila capaz de soportar temperaturas tan bajas como la de congelación del agua, y tan altas como 50 °C (Castro y Navarro, 2009).

La iluminación es indispensable para el crecimiento, pero no debe mantenerse en forma continuada las 24 horas del día. Una exagerada iluminación es perjudicial y malogra la fotosíntesis, siendo la luz violeta y la ultravioleta del espectro las más dañinas. Para cultivos de 1 a 2 litros, la intensidad de luz o luminancia, puede ajustarse entre 2000 a 2500 lux (Castro y Navarro, 2009).

El medio en el cual viven suele contener una muy alta concentración de sales minerales (mayor que la del agua de mar), siendo la salinidad óptima de 18–22 UPS. Además el cultivo debe contar con un pH fuertemente alcalino, de aproximadamente 9,5, aunque suele alcanzar extremos de 10,5 - 11, según el

equilibrio establecido entre la absorción y fijación del CO_2 de la solución (Strembel et al., 2004).

Otro aspecto importante es la agitación, que en el caso de la presente investigación se logró mediante inyección de aire filtrado aplicado a cada cultivo individualmente, utilizando como fuerza motriz un equipo “blower”. La agitación del cultivo es un punto clave en el desarrollo óptimo de estos, ya que permite que los nutrientes se encuentren distribuidos homogéneamente en la solución, y además, impide que las microalgas decanten, manteniéndolas en suspensión de modo tal que todas reciban la misma cantidad de luz, como se puede ver en la figura 2.



Figura 2: Organización de los cultivos de *Arthrospira platensis* en donde se aprecia el sistema de inyección de aire enriquecido con CO_2 y la fuente lumínica.

Los cultivos de *A. platensis* en estanques pequeños y muy controlados pueden alcanzar una producción de 15 a 19 g/m²/día; sin embargo, en grandes explotaciones comerciales estos valores se reducen a la mitad (Vonshak y Richmond, 1998). Pequeños biorreactores cerrados, operando por 6 semanas, estrictamente controlados, han alcanzado rendimientos entre 25 a 28 g/m²/día (Tredici & Chini, 1997).

2. Estudios anteriores de *Arthrospira platensis*

2.1. Efectos de la aplicación de CO₂ a cultivos de *Arthrospira platensis*

Un estudio conducido por Ravelonandro et al. (2011) reveló que la incorporación de CO₂ en una concentración de 2% (el máximo utilizado en este estudio) a cultivos de *A. platensis* provocó aumentos en la productividad ($0.16 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), duración de la fase exponencial (12 días), tasa de crecimiento máximo ($0.027 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$), concentración máxima de biomasa ($3.4 \pm 0.2 \text{ g L}^{-1}$) y contenido proteico ($46 \pm 1 \%$ de peso seco).

2.2. Composición fenólica de extractos de *Arthrospira platensis*

La presencia de compuestos fenólicos, tanto ácidos fenólicos como flavonoides, ha sido confirmada en *Spirulina maxima*, una especie íntimamente ligada a *A. platensis* (Abd el-baky et al., 2009). Además los estudios farmacológicos realizados hasta ahora han permitido encontrar una relación entre la capacidad antioxidante de los extractos con su concentración de compuestos fenólicos (Colla et al., 2007).

De esta manera, para extractos etanólicos algales, se han descrito los siguientes polifenoles: ácidos fenólicos como ácido gálico, ácido p-OH-benzóico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido salicílico, ácido o-cumárico, ácido ferúlico y ácido cinámico; y flavonoides, entre los que están: quercetina, genisteína y canferol entre otros que se encuentran en menor proporción (Abd el-baky et al., 2009).

Las estructuras se presentan a continuación, en la figura 3:

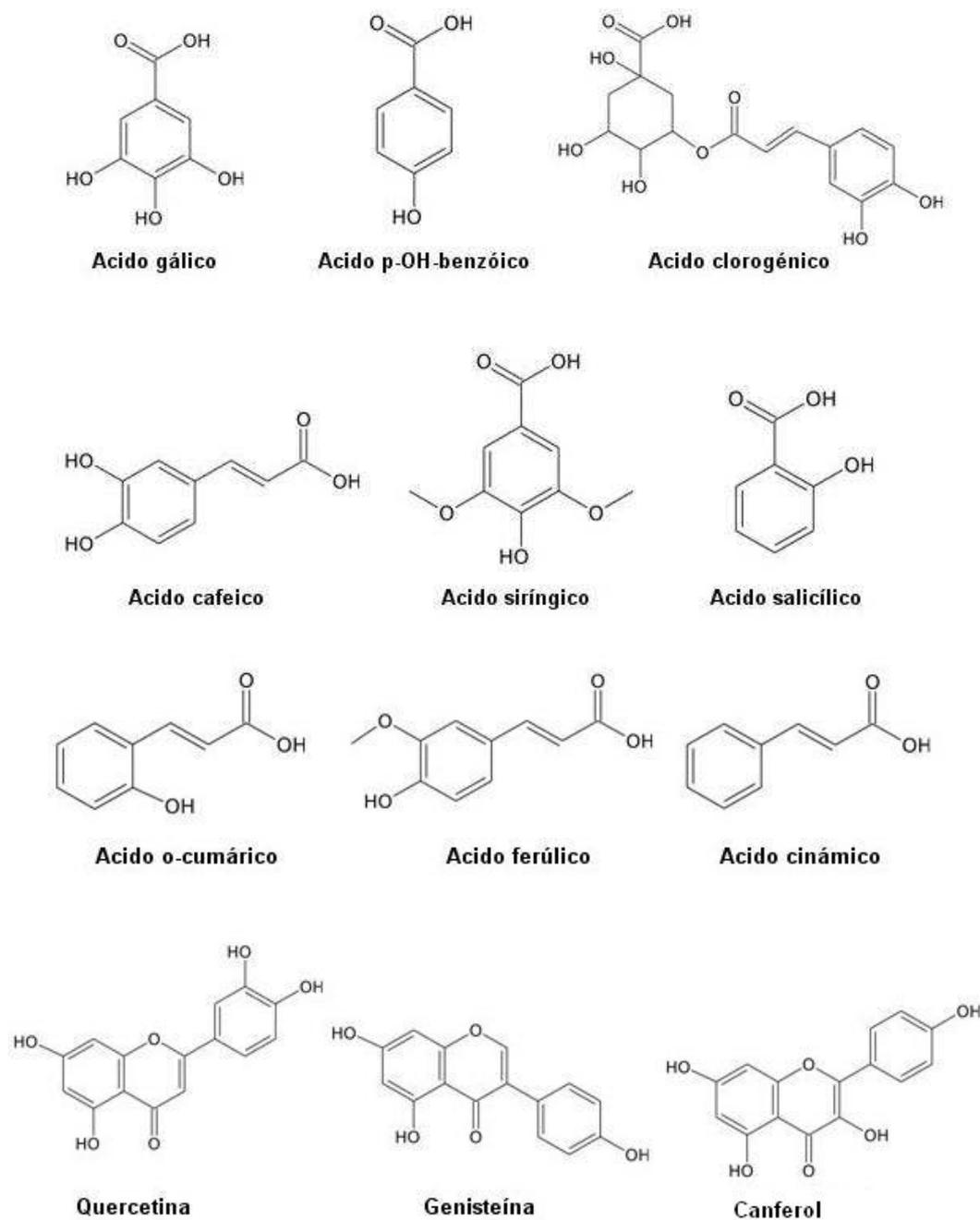


Figura 3: Compuestos fenólicos identificados en *Arthrospira platensis*

2.3. Actividad antioxidante de extractos etanólicos de *Arthrospira platensis*

Es ampliamente conocido que las sustancias antioxidantes son la principal defensa orgánica en contra de radicales libres, cuya presencia en exceso, como se comentó previamente, aumenta el estado oxidativo del organismo lo que desencadena una serie de reacciones perjudiciales provocando estados patológicos severos (Pietta, 1999).

En la búsqueda de antioxidantes naturales, se ha reportado que el extracto alcohólico de *A. platensis* inhibe la peroxidación lipídica significativamente (65% de inhibición), asimismo, el extracto acuoso de *A. platensis* ha mostrado mayor efecto antioxidante (76% de inhibición) que el ácido gálico (54%) y el ácido clorogénico (56%) (Manoj et al., 1992).

Además, se ha reportado que extractos acuosos de *A. platensis* con una concentración de 15 mg/mL mostraron un inhibición de 51,94% del radical DPPH, con un valor de IC50 de 14,43 mg/mL (Sudha et al, 2011).

II. HIPOTESIS

“La incorporación de CO₂, tanto de Indura como del gas de fermentación, al sistema de aireación de cultivos de *Arthrospira platensis* tiene un impacto positivo en la generación de compuestos fenólicos y en la actividad antioxidante así como en su tasa de crecimiento”

III. OBJETIVOS

1. Generales

- Determinar la actividad antioxidante y la concentración de fenoles totales de extractos etanólicos de *Arthrospira platensis* obtenidos desde biomasas cultivadas con distintos aportes de CO₂, obtenidos de Indura y del gas de fermentación del vino de la Viña Miguel Torres, e identificar la concentración óptima de CO₂ en la que se obtendrá una mayor actividad antioxidante y una mayor cantidad de fenoles totales.

2. Específicos

- Determinar en forma comparativa la cantidad de biomasa de *Arthrospira platensis* obtenida desde cultivos con distintos aportes de CO₂.
- Determinar las diferencias de crecimiento celular en los cultivos con distintos aportes de CO₂.
- Demostrar si los aportes de CO₂ producen un cambio tanto en el rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos a partir de las biomasas provenientes de los distintos cultivos de *Arthrospira platensis*, como también en el contenido de fenoles y en la actividad antioxidante.
- Demostrar si los aportes de CO₂ producen un cambio en el perfil de compuestos fenólicos de los distintos extractos etanólicos obtenidos desde diferentes cultivos de esta microalga.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de esta memoria se utilizaron materiales y equipos del laboratorio de la empresa AEON Biogroup y del Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Universidad de Chile, desarrollándose con el financiamiento del proyecto FIA: “Producción de espirulina (*Arthrospira platensis*) para alimentación animal con captura de CO₂ proveniente de la Viña Miguel Torres”.

1. Reactivos

Los cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄, el reactivo de Folin-Ciocalteu, el metanol y el agua grado HPLC y los solventes de grado analítico empleados para realizar las extracciones (hexano, diclorometano y etanol) fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El reactivo 2,4,6-tri (2-piridil) triazina (TPTZ) y los patrones de ácido cafeico, ácido gálico y ácido ferúlico fueron adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich (USA). El CO₂ estándar fue comprado a Indura (Chile).

2. Material vegetal

La cepa de *Arthrospira platensis* (código PCO-20090605) se obtuvo de la colección de microalgas de la Universidad de Coimbra (UCO), Portugal, en el año 2009

3. Obtención del gas de fermentación proveniente de la viña

El CO₂ producto de la fermentación del vino se obtuvo de la viña Miguel Torres, ubicada en Longitudinal Sur Km 195, Curicó. El proceso de llenado de los cilindros se realizó el día 26 de abril de 2012. Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó un equipo especialmente diseñado para esta tarea por Aeon Biogroup. Su finalidad es obtener un gas libre de alcoholes, partículas, humedad y aroma. El equipo mencionado consta de las siguientes partes (figura 4):

- **Compresor de membrana.**
- **Filtros de alcoholes:** Dos filtros de agua adaptados para filtrar el gas a los que se les invirtió el flujo. Gracias a ellos el gas entra con cerca de 5000 ppm de alcoholes (etanol y butanol) y sale con menos de 20 ppm.
- **Filtro de partículas:** el filtro retiene partículas de 50 micras.
- **Filtro de humedad:** utilizado para retener la humedad.
- **Filtro de aroma:** el filtro contiene carbón activado para retener el aroma.

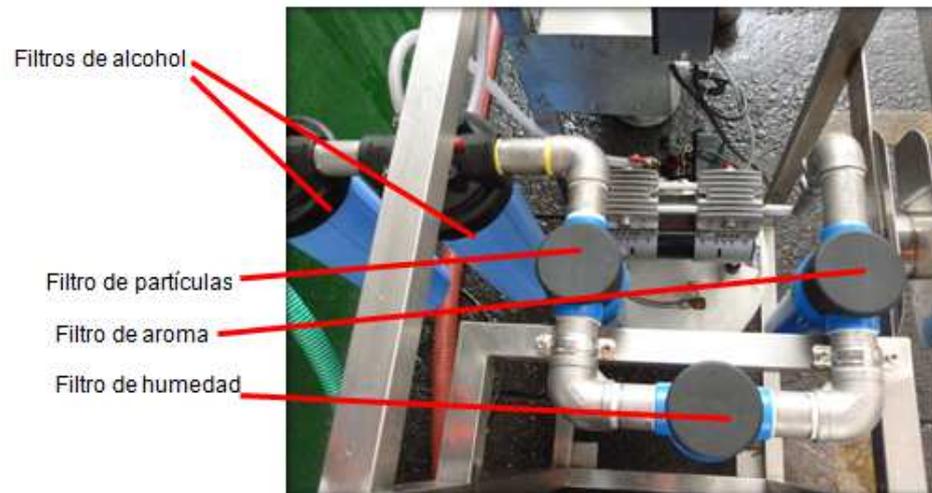


Figura 4: Detalle de los filtros presentes en el equipo utilizado para obtener el gas de fermentación.

Para el proceso de llenado el equipo se ubicó a ras de suelo y se conectó a través de una manguera a la cuba que contiene el vino y a un cilindro vacío, como se puede apreciar en la figura 5, luego se encendió el compresor y procedió el llenado hasta que la presión al interior del cilindro alcanzara 8 bar.

El gas de fermentación obtenido finalmente presentó una composición de 35,1% de CO_2 , certificado por Indura (Anexo 2).



Figura 5: Proceso de extracción del gas de fermentación.

4. Montaje de la red de CO₂ y de los cultivos de *Arthrospira platensis*

Se dispusieron cuatro líneas de cultivo de *A. platensis* en una repisa conteniendo cada una de ellas cinco matraces de 1 litro. Cada línea de cultivo se equipó con un tubo fluorescente y un sistema de aireación con seis salidas, con el fin de suministrar a las microalgas la luz y el CO₂ que necesitan, además a cada línea se le instaló un flujómetro que permitió regular el porcentaje de CO₂ que se le suministró a los cultivos. El fotoperiodo aplicado fue de 9:15 horas.

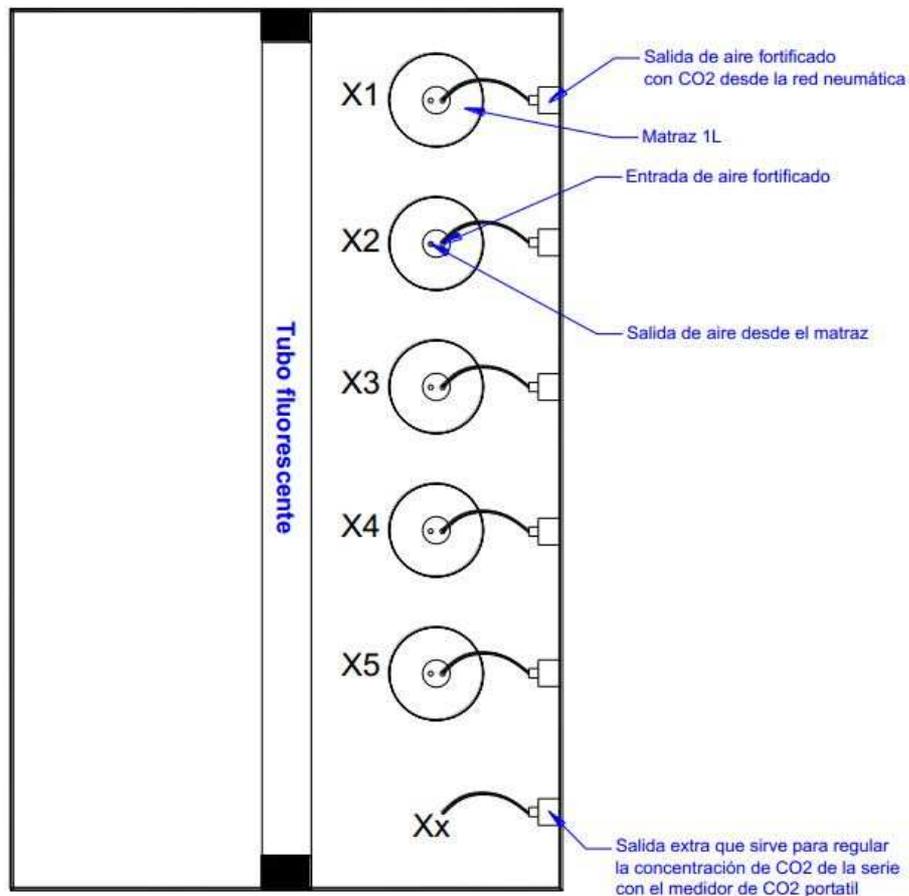


Figura 6: Distribución general de una serie X de cultivos de *Arthrospira platensis*.

Según el esquema mostrado en la Figura 6, Xx representa la salida libre que tiene cada serie. En esta se conectó el medidor de CO₂ portátil para poder efectuar la lectura y calibrar la salida de CO₂ en cada una de las series.

La experiencia de cultivo fue diseñada en dos etapas, en primer lugar se llevó a cabo el cultivo utilizando CO₂ de Indura, determinando así el grupo 1 (CO₂ de marca Indura), y posteriormente, se realizó el cultivo con gas de fermentación de la viña, denominando al grupo 2 (CO₂ proveniente del gas de fermentación del vino de la Viña Miguel Torres). (Tabla 1)

Cada cultivo se inició con 159 mL de un cultivo madre con una absorbancia de 0,4 a 584 nm y se finalizó cuando alcanzó la fase exponencial de la curva de crecimiento algal.

Tanto los cultivos del grupo I como del grupo II, fueron sometidos a 0%, 2,5 %, 5% y 7,5% de CO₂ en el sistema de aireación bajo idénticas condiciones mixotróficas, siendo cubiertos sus requerimientos nutricionales mediante la adición de medio de cultivo Zarrouk (20%), el cual consta de una solución de macronutrientes, una de micronutrientes y una de vitaminas (Anexo 1).

Tabla 1: Resumen del aporte de CO₂ suministrado a cada cultivo. Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

GRUPO I		GRUPO II	
CO ₂ de Indura		CO ₂ del gas de fermentación	
Denominación	CO ₂ (%)	Denominación	CO ₂ (%)
Ai	0	Av	0
Bi	2,5	Bv	2,5
Ci	5	Cv	5
Di	7,5	Dv	7,5

5. Obtención de la biomasa de *Arthrospira platensis* desde cultivos sometidos a distintas concentraciones de CO₂

5.1. Monitoreo de los cultivos y del nivel de CO₂

La entrega de CO₂ (de Indura o gas de fermentación según corresponda) se realizó a diario durante 4 horas, entre las 9:00 AM y las 13:00 PM, siendo este incorporado al sistema de aireación. Después de la apertura del CO₂ en la mañana, se realizaba una calibración del flujo de las válvulas de salida de CO₂ mediante un medidor de CO₂ (CO₂ meter) para que de esta forma las series A, B, C y D reciban 0 %; 2,5%; 5% y 7,5% de CO₂ respectivamente. El total de CO₂ utilizado diariamente fue de 500g en promedio.

Estos porcentajes se escogieron empíricamente, realizando cultivos previos de *A. platensis* con porcentajes de CO₂ de 0%, 1%, 2,5%, 5%, 7,5% y 10%, en los que se hizo un seguimiento de su crecimiento. De esta manera, para el estudio final, se descartaron los cultivos con un 1% de CO₂ por no presentar mayores diferencias con el cultivo sin inyección de CO₂, y los cultivos con un 10% de CO₂, ya que este porcentaje inhibió notoriamente el crecimiento algal.

A cada uno de los cultivos finales (0%; 2,5%; 5% y 7,5% de CO₂) se le realizaron mediciones diarias de absorbancia, pH, temperatura y conteo celular mediante cámara de conteo de Sedgewick-Rafter, con el fin de llevar un registro ordenado y preciso de todos estos parámetros para así obtener una

máxima estandarización de los cultivos a analizar, además de determinar el tiempo óptimo en que se debía realizar la cosecha de los cultivos siguiendo la cinética de la curva de crecimiento algal estándar, siendo el mejor momento para esto aquel en que la curva alcanza la fase de retardo (Figura 7).

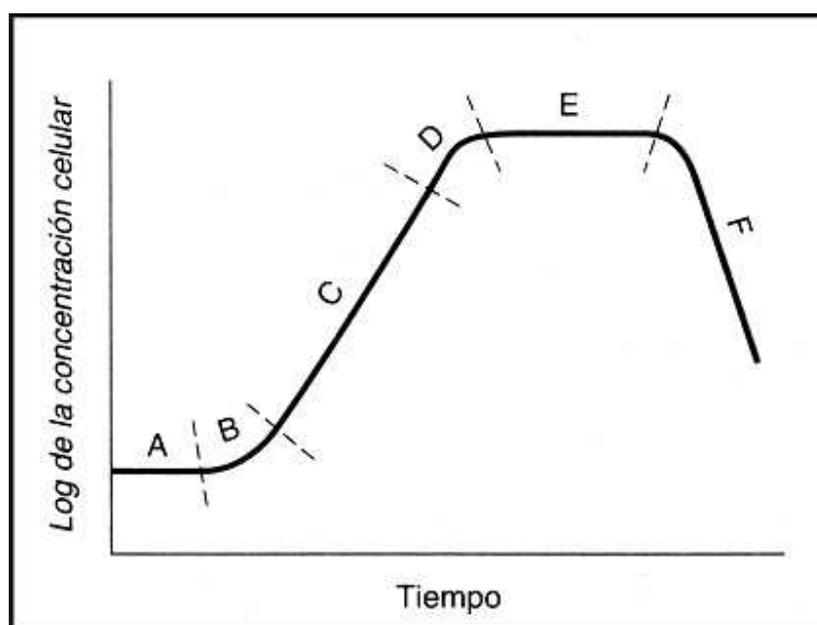


Figura 7: Curva de crecimiento algal. Las fases A, B, C, D, E y F corresponden a ajuste, aceleración, exponencial, retardo, estacionaria y muerte, respectivamente.

5.1.1. Toma de muestras

Transcurridas las 4 horas mencionadas, y una vez cerrado el flujo de CO_2 , se procedía a aforar los matraces para luego hacer la toma de muestras. Para ello se utilizó una pipeta Pasteur plástica por cada matraz y se tomaba 1 ml de muestra, el cual era guardado en un tubo Eppendorf para su posterior análisis.

5.1.2. Análisis previos al conteo celular y a la medición de absorbancia

Cada día se tomó la temperatura, tanto ambiental como de los matraces, con el fin de asegurar que se mantuvieran las condiciones óptimas, esto es, entre $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Este rango de temperaturas se lograba gracias a un sistema de aire acondicionado. Además, se realizó la medición diaria de pH utilizando para esto papel pH Macherey-Nagel, constatando que este siempre estuviera entre 9 y 10.

5.1.3. Conteo celular

El primer método empleado para determinar la densidad del cultivo fue el conteo celular mediante cámara de conteo Sedgewick-Rafter, método que da por resultado el número de células presentes en 1 mL de cultivo. Este conteo se realizó a diario durante el tiempo en que se mantuvieron los cultivos.

Este método consiste en tomar una alícuota de 1 mL de cultivo, diluyéndola según requerimiento (normalmente 1/10), para luego verter 1 mL de esta dilución en la cámara Sedgewick-Rafter para proceder con el conteo. Este se realiza contando 10 cuadrantes de forma horizontal y 5 en forma vertical (figura 8), luego se obtiene el promedio de los conteos y se multiplica por el factor de dilución empleado y luego por 1000.

Esto se resume en la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad celular (cel/ml)} = C * 10^3 * \text{FD}$$

Donde:

- **C**: promedio de filamentos de *A. platensis* contados.
- **FD**: factor de dilución.

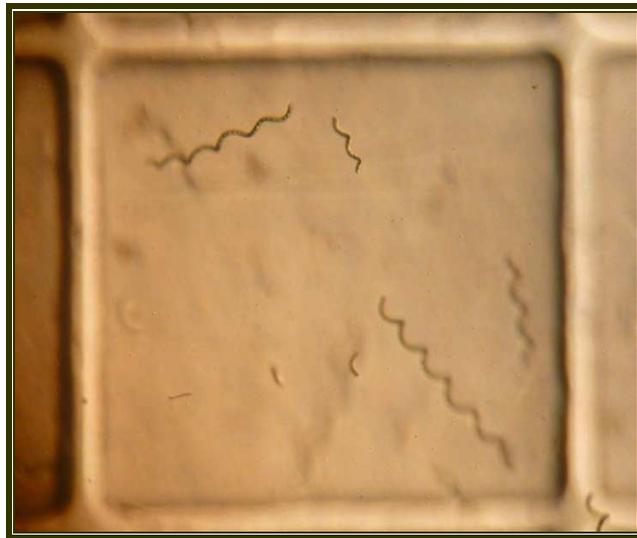


Figura 8: Vista al microscopio (40x) de un cuadrante de la cámara de Sedgewick-Rafter conteniendo una muestra de *Arthrospira platensis*.

5.1.4. Medición de absorbancia

Antes de efectuar cualquier medición se debe ajustar el espectrofotómetro (Jenway 6320 D) a la longitud de onda adecuada, en el caso de *A. platensis*, se debe ajustar a 584 nm y luego se debe calibrar mediante un blanco (cubeta con 4 ml de agua destilada). Posteriormente, las muestras eran diluidas según correspondiera, con el fin de obtener una absorbancia dentro del rango lineal (0,2 a 0,7) y se procedía a medir su absorbancia.

5.2. Cosecha de los cultivos

La cosecha de la biomasa del alga en estudio se realizó filtrando la suspensión acuosa en que se encuentra la biomasa mediante un sistema de tamices, consistente en cuatro filtros de iguales condiciones adosados cada uno de ellos a una bandeja recolectora, de esta manera se obtuvo una biomasa semisólida húmeda con consistencia pastosa. Esta biomasa se dispuso en bandejas de aluminio, esparciéndola con el fin de que una mayor área de esta se encuentre en contacto con el aire optimizando así el proceso de secado. Finalmente la biomasa fue secada a 30°C en estufa hasta llevar a sequedad, obteniéndose como producto final 8 muestras de biomasa seca, distribuidas de la siguiente forma: 4 proveniente de CO₂ de indura (Ai 0%, Bi 2,5 %, Ci 5% y Di 7,5% de CO₂) y 4 provenientes del gas de fermentación de la Viña Miguel Torres (Av 0%, Bv2,5 %, Cv5% y Dv7,5% de CO₂), las que fueron almacenadas protegidas de la luz y la humedad.

6. Obtención de los extractos seriados de *Arthrospira platensis*

La biomasa seca fue sometida a extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente hasta total agotamiento de la biomasa. Esto se realizó macerando 2 gramos de cada muestra de material vegetal mediante un agitador magnético durante 24 horas por cada uno de los solventes a utilizar, eliminando completamente cada uno de ellos por evaporación a presión reducida en un evaporador rotatorio Büchi. Para cada uno de los 8 cultivos se

obtuvieron los extractos secos de hexano (EHEX), diclorometano (EDCM) y etanol (EET) (Figura 9).

En esta memoria, se trabajó con los extractos etanólicos (EET) debido a que estos contienen los compuestos hidrofílicos de interés, en este caso, los compuestos fenólicos, lo que fue corroborado mediante cromatografía en capa fina. A partir de los extractos se elaboraron soluciones stock a una concentración de 5 mg/ml con el fin de ser utilizados en los ensayos posteriores.

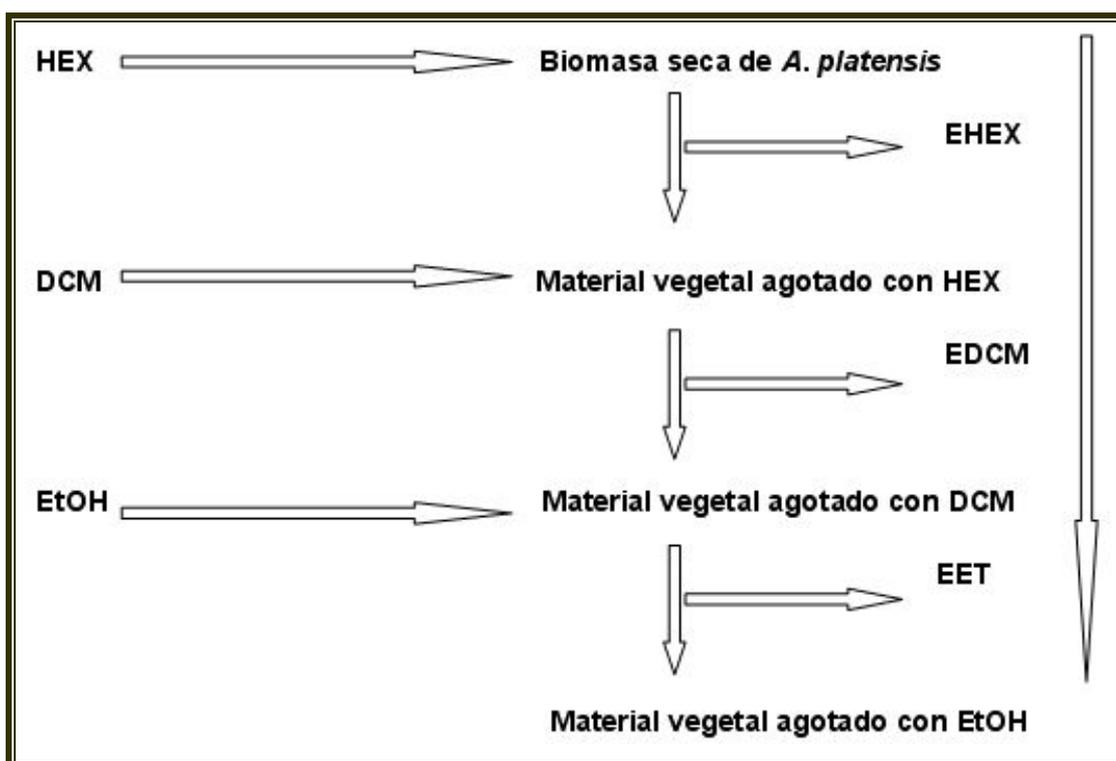


Figura 9: Proceso de extracción de la biomasa seca de *Arthrospira platensis*. EHEX: extracto hexánico; EDCM: extracto de diclorometano; EET: extracto etanólico.

7. Cromatografía en capa fina (CCF)

Con el fin de pesquisar la presencia de compuestos de interés farmacológico, tales como triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos, se realizó un análisis prospectivo utilizándose para ello la técnica de “Cromatografía en capa fina (CCF)”, empleándose cromatofolios de aluminio con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck), en los cuales se sembraron las muestras a analizar para posteriormente introducirlos en una cámara saturada de un sistema de mezcla de solventes (fase móvil), la cual sube por capilaridad en el cromatofolio arrastrando y separando los distintos componentes de la muestra en función de su polaridad. Para esta experiencia se utilizó una fase móvil obtenida empíricamente, consistente en una mezcla de hexano y acetona en proporción 60:40. Finalmente, los cromatofolios son revelados con reactivos específicos y visualizados bajo luz ultravioleta a las longitudes de onda 254 y 365 nm: (Wagner y Bladt, 1996)

Los reactivos reveladores utilizados fueron:

- P-anisaldehído sulfúrico (PAS) (0,5 mL de anisaldehído, 10 mL ácido de acético glacial, 85 mL de Metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado): El cromatofolio rociado con este revelador es secado y calentado a 100°C durante 5-10 min y luego se realiza la observación en el espectro visible. Este reactivo permite detectar triterpenos, esteroides y saponinas, cuyas coloraciones varían desde azul a violeta.

- Liebermann-Burchard (LB) (5 mL de anhídrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 50 mL de etanol absoluto): El cromatofolio rociado con este revelador es secado y calentado a 100°C durante 5-10 min y luego se realiza la observación en el espectro visible. Este reactivo permite detectar triterpenos, esteroides y saponinas, cuyas coloraciones varían desde anaranjado-rojizo a pardo.
- NP-PEG (natural products-polyethylene glycol): El cromatofolio es rociado con la solución NP (2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol) y luego con la solución de PEG (polietilenglicol-4000 al 5% en etanol). Este reactivo permite detectar flavonoides y otros fenoles ácidos, que al visualizar al espectro UV a una longitud de onda de 365 nm, presentan coloraciones que varían desde fluorescencia amarilla, anaranjada o rojiza para flavonoides y blanco-azulada para ácidos fenólicos.

8. Estudio químico de los extractos etanólicos de *Arthrospira platensis*

Con el fin de determinar los compuestos fenólicos presentes en los cultivos de *A. platensis* cultivados con distintas concentraciones y orígenes de CO₂, se cuantificó el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante solo de los EET, ya que son estos extractos los que contienen los compuestos de naturaleza polar, como los compuestos fenólicos, lo que se corroboró tras la realización del análisis químico por CCF

8.1. Determinación del contenido de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu

El contenido de fenoles totales de los extractos etanólicos fue determinado a través del método de Folin - Ciocalteu (FC), el cual se basa en la medición de la capacidad de los fenoles de reducir el Mo(VI) a Mo(V) presente en el complejo fosfomolibdico/fosfotúngstico que caracteriza al reactivo de Folin – Ciocalteu (Piña, 2011). Esta reacción provoca un cambio en la coloración del reactivo, que inicialmente es amarillo, formando un cromógeno azul, el cual es cuantificado mediante espectrofotometría. (Singleton y Rossi, 1965)

Para la cuantificación se utilizará una variación del método descrito por Cicco et al. (2009), denominado micro - FC, el cual evita interferencias producidas por alcoholes (en este caso etanol) que ocurren utilizando el método tradicional, además presenta como ventaja su rapidez, reproductibilidad, bajo costo y la posibilidad de realizar mediciones de fenoles totales a escalas menores. Para ello, se tomó 100 μ L de una solución etanólica del extracto respectivo, incorporándole 100 μ L del reactivo de Folin Ciocalteu y se dejó reaccionar por 2 minutos. Luego se añadió 800 μ L de una solución de carbonato de sodio 5% (p/v). La mezcla se agitó y se llevó a un baño termostático a 40°C por 20 minutos. Posteriormente, se enfrió en un baño con hielo y se procedió a medir la absorbancia a 765 nm usando como blanco una solución de 100 μ L de reactivo de Folin Ciocalteu, 100 μ L de etanol y 800 μ L de la solución de carbonato de Sodio. (Cicco et al., 2009). (Tabla 2)

El valor de fenoles totales en las muestras fue expresado en $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico para lo cual fue establecida una curva de calibración en un rango de 2 a 8 $\mu\text{g/mL}$. El equipo utilizado para determinar la absorbancia fue un espectrofotómetro Unicam UV-VIS.

Tabla 2: Resumen del protocolo de la determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu. EET= extracto etanólico

	Análisis	Blanco
Solución de EET (1,25 mg/mL)	100 μL	----
Etanol	----	100 μL
Reactivo de Folin Ciocalteu	100 μL	100 μL
Homogeneizar y dejar reposar por 2 min		
Na₂CO₃ (5%)	800 μL	800 μL
Homogeneizar y llevar a un baño termostático a 40°C por 20 min. Leer a 765 nm		

8.2. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos mediante el método FRAP

El método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) se basa en la reducción de un complejo tripiridiltriazino férrico a su forma ferrosa coloreada en presencia de antioxidantes. Este método mide el cambio en absorbancia debido a la formación del complejo de color azul Fe^{+2} -tripiridiltriazina a partir del compuesto oxidado e incoloro Fe^{+3} -tripiridiltriazina gracias a la acción donadora

de electrones de los compuestos antioxidantes. (Sudha et al., 2011), como se aprecia en la figura 10.

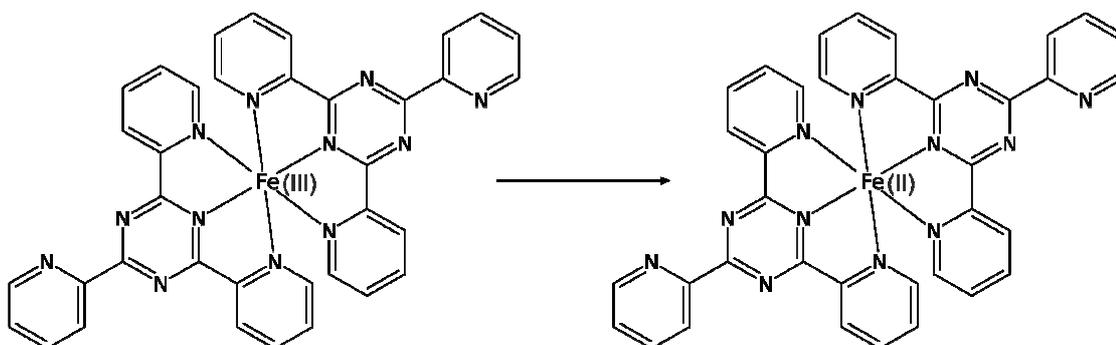


Figura 10: Reducción del complejo TPTZ-Fe⁺³ a TPTZ-Fe⁺² en el ensayo FRAP

Para realizar este ensayo se utilizaron las modificaciones propuestas por Henriquez et al. (2010) al método original de Benzie y Strain (1996). El reactivo FRAP consiste en 1020 μL de buffer acetato 300 mM (3.1 g acetato de sodio + 16mL ácido acético glacial, pH = 3.6), 100uL de TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y 100uL $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Luego al reactivo FRAP se le añadió 10 uL de la muestra, que en este caso corresponde a las soluciones stock de extractos etanólicos con una concentración de 5mg/ml. Posteriormente esta mezcla se incubó a 37°C por 4, 30 y 60 min, efectuándose una medición de absorbancia en cada uno de estos tiempos a 595 nm (tabla 3). Los resultados fueron interpolados en una curva de calibración utilizando FeSO_4 y expresados como mmoles de Fe^{+2} /g de extracto etanólico seco.

Tabla 3: Resumen del protocolo de la determinación de la actividad antioxidante mediante el método FRAP

	Análisis	Blanco
Buffer de acetato de sodio (300 mM)	1020 µL	1020 µL
Solución de TPTZ (10 mM)	100 µL	100 µL
Solución de FeCl₃ (20 mM)	100 µL	100 µL
Muestra	10 µL	---
Etanol	---	10 µL
Homogeneizar y llevar a un baño termostático a 37°C por 4, 30 y 60 min. Leer a 595nm		

8.3. Determinación de la presencia de los compuestos fenólicos mayoritarios descritos en extractos de *Arthrospira platensis* mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detección por UV con arreglo de diodos (CLAE-DAD)

En el presente estudio, se utilizó CLAE de fase reversa (RP-CLAE) la cual consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada, en que el tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente (Casares, 2010).

Todos los análisis cuantitativos por CLAE-DAD se realizaron en un equipo Waters 600 C acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos Waters 996 y equipado con un inyector automatizado Waters 717 plus.

El método empleado es una modificación del desarrollado por Liang et al., 2009. Para la separación por CLAE-DAD se utilizó una columna Hibar Purospher Star RP-18 (250 mm x 4 mm de diámetro interno; tamaño de partículas: 5 µm) Merck. La separación de 20 µL de cada muestra de EET (5 mg/mL) se realizó a temperatura ambiente, utilizando un sistema isocrático como fase móvil a un flujo constante de 1 mL/min durante 70 minutos, detectando a 280 nm. El sistema isocrático utilizado consiste en HCOOH (0,1%) y CH₃CN en una proporción de 88:12.

Como preparación y con el fin de proteger la columna, las muestras fueron filtradas cinco veces cada una, utilizando tres filtros membrana de PVDF, de 0,22 µm de poro y 13 mm de diámetro (Millex) y dos filtros de microfibra de vidrio GF/F de 13 mm de diámetro (Whatman).

Para determinar la presencia de los ácidos fenólicos mayoritarios descritos en *A. platensis* se utilizaron estándares primarios de los ácidos gálico, cafeico y ferúlico (Sigma) y se analizaron por CLAE-DAD bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

El análisis de cromatogramas se realizó por medio del programa Empower Pro.

V. RESULTADOS Y DICUSIÓN

1. Rendimiento y crecimiento de los cultivos

La fase de crecimiento óptima fue alcanzada a los 23 días de iniciado el cultivo con inyección de CO₂ Indura, por lo que, para mantener la coherencia del estudio se mantuvo este tiempo para los cultivos con inyección de gas de fermentación. De acuerdo al análisis del conteo celular con cámara de Sedgewick-Rafter y a la medición de absorbancia, se determinó que el porcentaje de CO₂ aplicado a los cultivos no afecta en gran medida el crecimiento de estos, sin embargo, se observa como tendencia que el crecimiento óptimo se logra a una concentración de 5% de CO₂, tanto en los cultivos con inyección de CO₂ Indura como en los cultivos con inyección de gas de fermentación, es decir, en los cultivos Ci y Cv (Figuras 11, 12, 13 y 14).

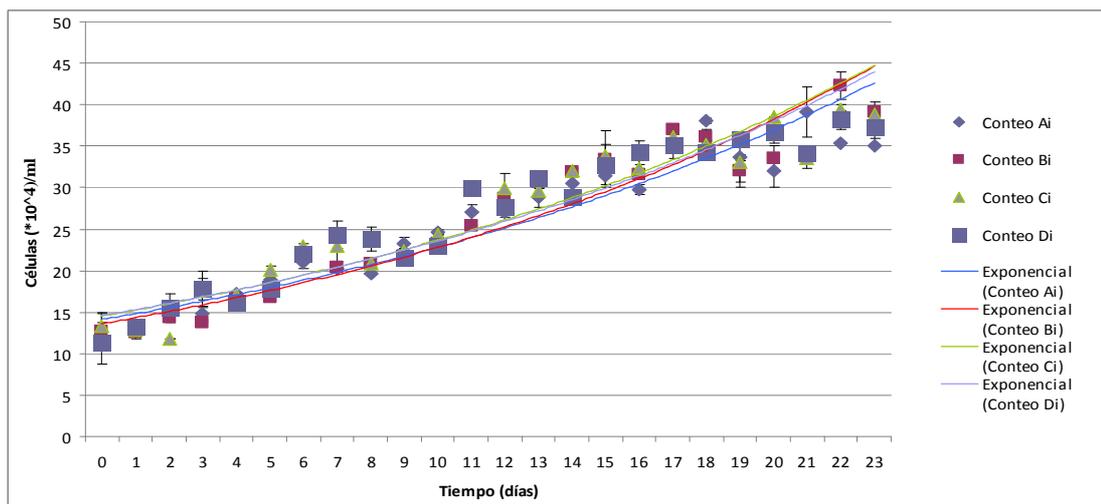


Figura 11: Gráfico de crecimiento celular por conteo de los cultivos de *Arthrospira platensis* con inyección de CO₂ de Indura. Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

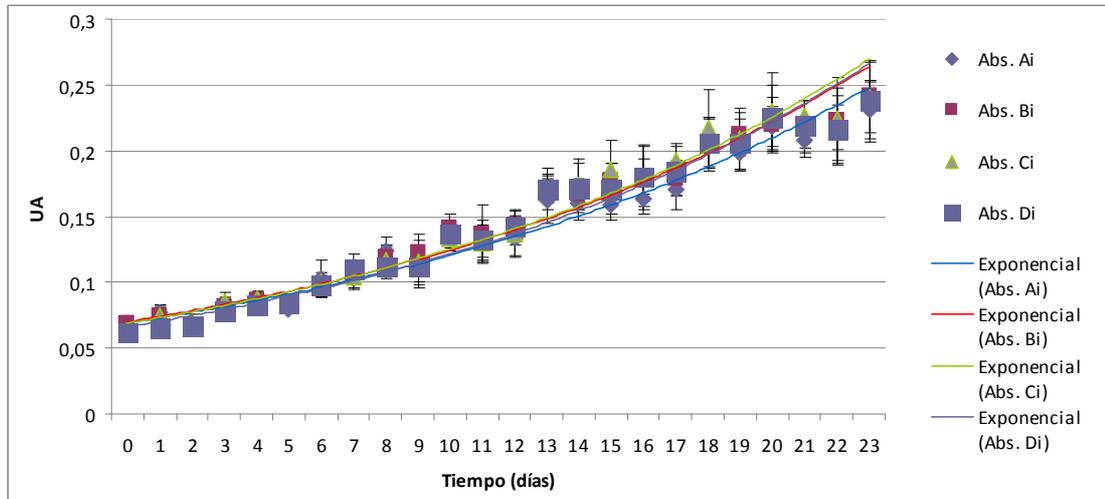


Figura 12: Gráfico de crecimiento celular por absorbancia de los cultivos de *Arthrospira platensis* con inyección de CO_2 de Indura. Ai= 0 % CO_2 indura; Bi= 2,5% CO_2 indura; Ci= 5% CO_2 indura; Di= 7,5% CO_2 indura; Av=0 % CO_2 viña; Bv= 2,5% CO_2 , viña Cv= 5% CO_2 viña; Di= 7,5% CO_2 viña.

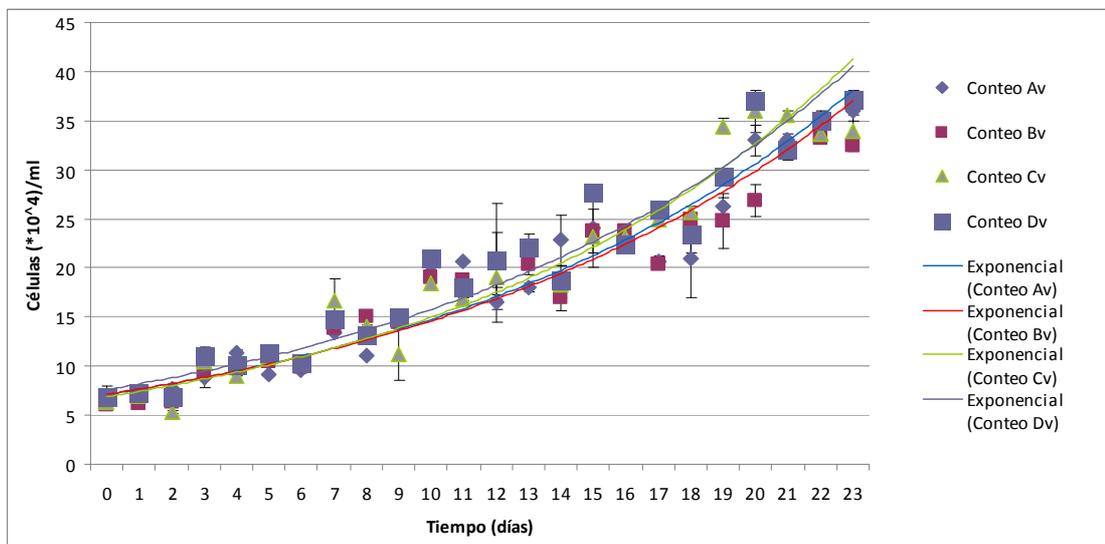


Figura 13: Gráfico de crecimiento celular por conteo de los cultivos de *Arthrospira platensis* con inyección de gas de fermentación. Ai= 0 % CO_2 indura; Bi= 2,5% CO_2 indura; Ci= 5% CO_2 indura; Di= 7,5% CO_2 indura; Av=0 % CO_2 viña; Bv= 2,5% CO_2 , viña Cv= 5% CO_2 viña; Di= 7,5% CO_2 viña.

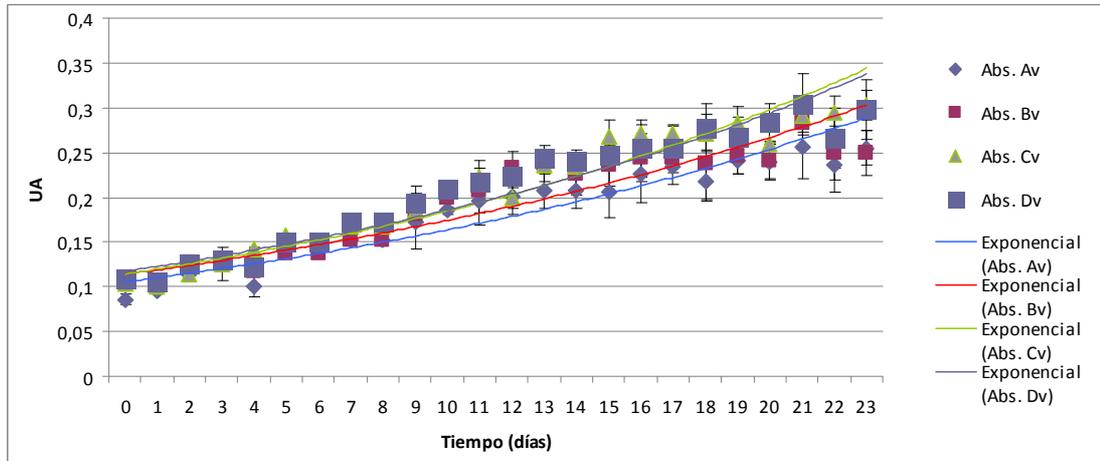


Figura 14: Gráfico de crecimiento celular por absorbancia de los cultivos de *Arthrospira platensis* con inyección de gas de fermentación. Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

La significancia de las diferencias en el crecimiento celular entre los distintos cultivos, fue determinada por el método ANOVA de una vía con un ensayo de comparaciones múltiples de Tukey para no paramétricos, observándose las diferencias significativas (p<0,05) en las tablas 4 y 5.

Tabla 4: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto al conteo celular (* indica diferencias significativas) Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Cultivos	Ai	Bi	Ci	Di	Av	Bv	Cv	Dv
Ai		-	-	-	*	*	*	*
Bi	-		-	-	*	*	*	*
Ci	-	-		-	*	*	*	*
Di	-	-	-		*	*	*	*
Av	*	*	*	*		-	-	-
Bv	*	*	*	*	-		-	-
Cv	*	*	*	*	-	-		-
Dv	*	*	*	*	-	-	-	

Tabla 5: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la absorbancia (* indica diferencias significativas) Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Dv= 7,5%CO₂ viña.

Cultivos	Ai	Bi	Ci	Di	Av	Bv	Cv	Dv
Ai		-	-	-	*	*	*	*
Bi	-		-	-	*	*	*	*
Ci	-	-		-	*	*	*	*
Di	-	-	-		*	*	*	*
Av	*	*	*	*		-	-	-
Bv	*	*	*	*	-		-	-
Cv	*	*	*	*	-	-		-
Dv	*	*	*	*	-	-	-	

En relación a los rendimientos de los cultivos, se observó que la productividad disminuyó a mayor concentración de CO₂ aplicada, obteniéndose la máxima cantidad de biomasa en los cultivos control Ai y Av. Comparando la productividad entre los dos gases empleados, se observó que la cantidad de biomasa obtenida fue mayor en los cultivos con inyección de CO₂ Indura con respecto a los cultivos con inyección de gas de fermentación, determinándose una diferencia de mas de 10% entre ambos (Tabla 6). Esto podría deberse a la presencia de otros compuestos en el gas de fermentación que inhibieron de cierta manera la productividad.

Tabla 6: Productividad de los cultivos de *Arthrospira platensis* Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Cultivos	Producción de biomasa (g)
Ai	12,42
Bi	11,86
Ci	11,64
Di	10,33
Av	9,85
Bv	9,67
Cv	9,44
Dv	9,08

2. Obtención de los extractos seriados y sus rendimientos

El rendimiento de la obtención de los extractos se detalla en la Tabla 7 y se grafica en la Figura 15, en ambos se puede observar que los cultivos Di y Dv fueron los que mostraron los mayores rendimientos de EHEX (9,0 y 8,0% respectivamente) y Bv y Bi fueron los cultivos cuyas biomásas dieron los mayores rendimientos de EET (12,5 y 10,5% respectivamente). Sin embargo, no se observaron grandes diferencias en los rendimientos del EDCM obtenido desde la biomasa de los diferentes cultivos.

Por el contrario, los cultivos que no tuvieron aporte de CO₂ fueron los que presentaron menores rendimientos, excepto en el caso de los EDCM, en los que no se observaron mayores diferencias.

Tabla 7: Rendimiento del proceso de extracción de la biomasa seca de *Arthrospira platensis* cultivada con distintas concentraciones de CO₂ Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Rendimiento (%) obtenido de 2g de biomasa seca de *A. platensis*

Extractos	Cultivos con CO ₂ Indura				Cultivos con CO ₂ Viña			
	Ai	Bi	Ci	Di	Av	Bv	Cv	Dv
EHEX	4	7	7,5	9	3	6	7,5	8
EDCM	3	3,5	3	3	4	4	4,5	3
EET	2,5	10,5	8,5	9	5	12,5	9,5	10,5

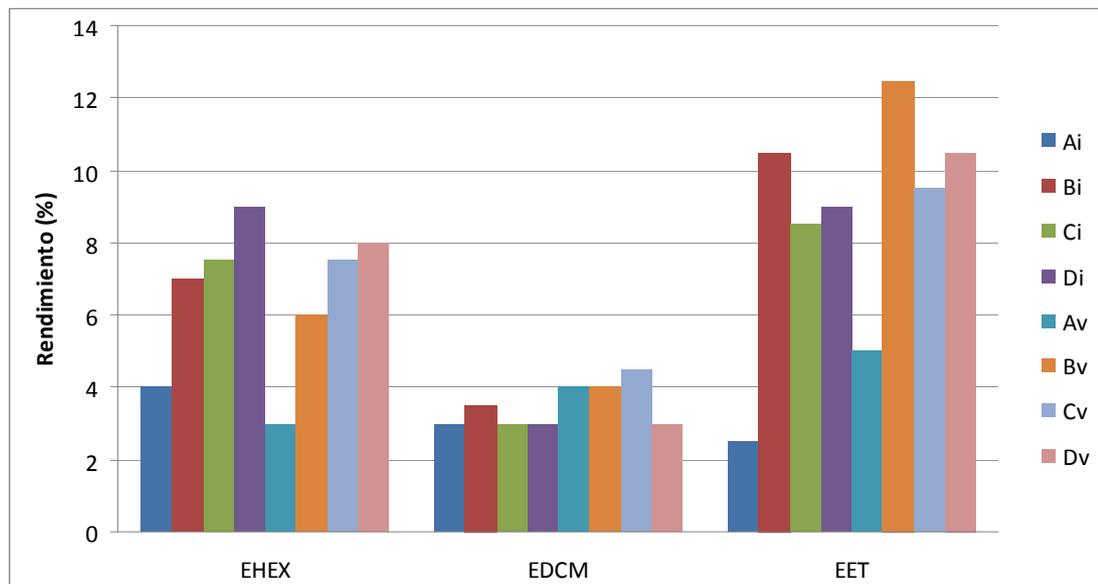


Figura 15: Gráfico comparativo de los rendimientos de extracción de los cultivos de *Arthrospira platensis*. EHEX= extracto hexánico; EDCM= extracto de diclorometano; EET= extracto etanólico. Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

3. Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos obtenidos

El estudio mediante CCF de los extractos fue realizado empleando como sistema de solventes hexano y acetona en proporción 60:40 y al revelar con PAS y LB se descartó la presencia de triterpenos, esteroides y saponinas al no aparecer en los cromatofolios las coloraciones descritas para estos compuestos. Los cromatofolios revelados con NP/PEG muestran que los EDCM y EET presentaron un mayor número de coloraciones anaranjada-rojiza, (indicando la posible presencia de flavonoides) y blanco-azuladas (color característico de los ácido fenólicos), tal como se puede observar en la figura 16.

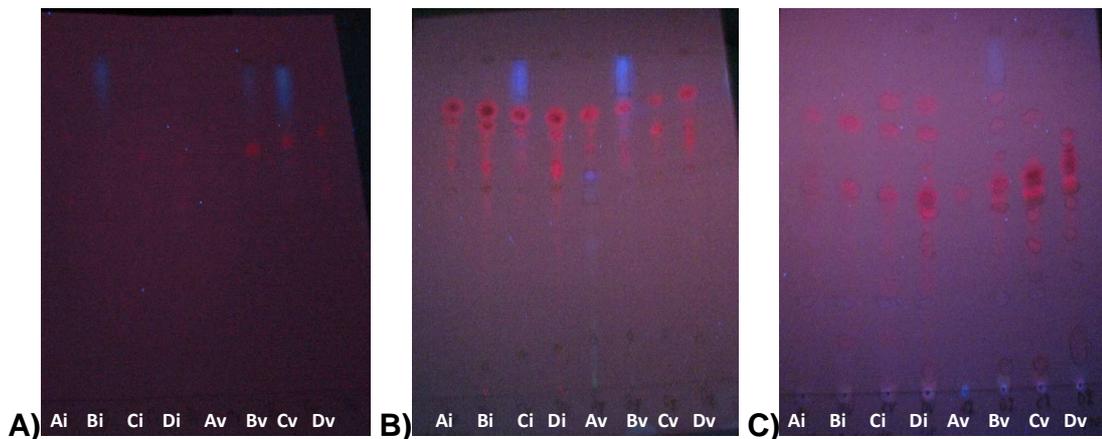


Figura 16: Cromatografía en capa fina de los extractos EHEX (A), EDCM (B) y EET (C), revelados con NP/PEG y visualizados a 365 nm. Fase móvil: Hexano: Acetona (60:40). Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂ viña; Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Posteriormente, con el fin de identificar los principales compuestos fenólicos en los EET, se realizó una nueva CCF de los 8 EET y de los tres

compuestos fenólicos mayoritarios descritos previamente para *A. platensis*; ácidos gálico, cafeico y ferúlico (Abd el-baky et al., 2009), utilizando como fase móvil una mezcla de metanol y acetato de etilo en una proporción 1:1 y como revelador NP/PEG; para luego visualizar bajo luz UV a 365 nm (figura 17). De esta manera se obtuvo un análisis preliminar que demostró la ausencia de estos ácidos fenólicos, lo que posteriormente fue confirmado por CLAE-DAD.

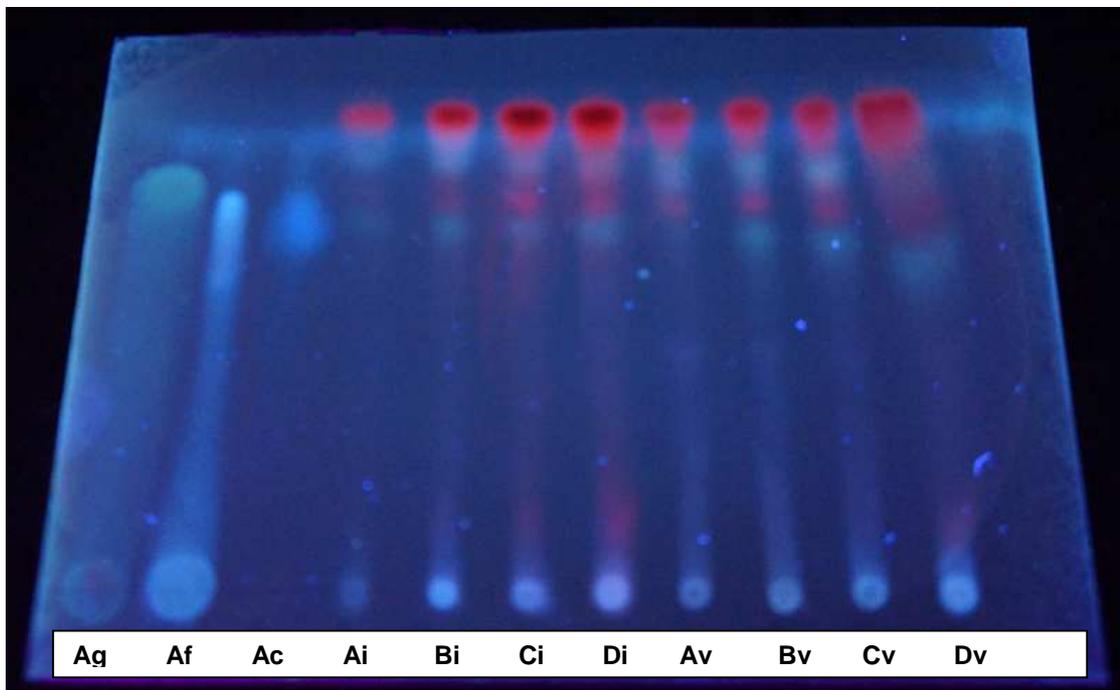


Figura 17: Cromatografía en capa fina. Cromatofolio con los EET revelado con NP/PEG y visualizado a 365 nm. Fase móvil: metanol: acetato de etilo (1:1). Ag= ácido gálico; Af= ácido ferúlico; Ac= ácido cafeico; Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂ viña; Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

4. Determinación de la cantidad de fenoles totales presentes en los extractos etanólicos de *Arthrospira platensis* mediante la reacción de Folin-Ciocalteu

Para determinar la cantidad de fenoles totales en los extractos de los distintos cultivos de *A. platensis*, se obtuvo una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentración 2 a 8 µg/mL. (Figura 18)

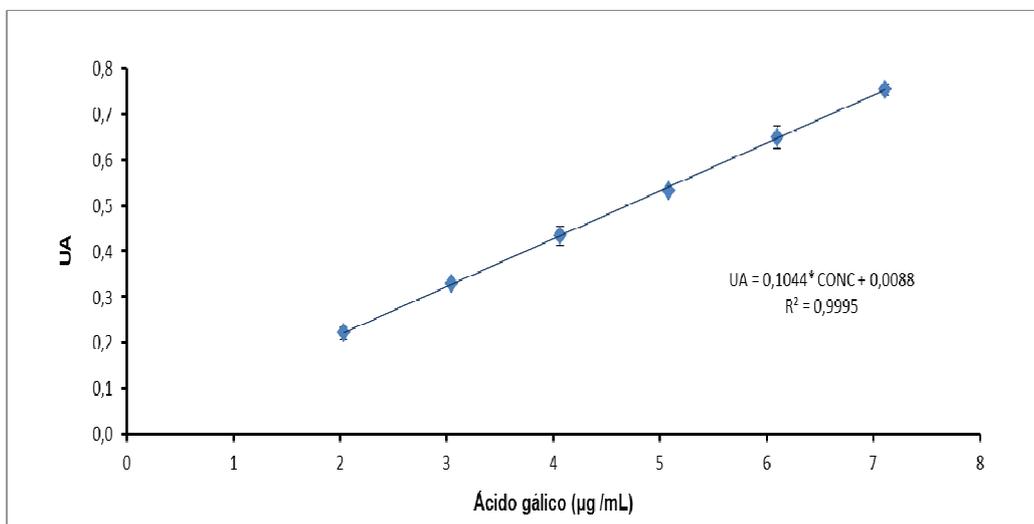


Figura 18: Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

La curva de calibración fue sometida a las pruebas de regresión lineal y de carencia de ajuste con un coeficiente de correlación lineal igual a 0,9995 y un F calculado igual a 0,3445 menor al F estadístico de tabla (3,7082) por lo tanto no se rechaza el modelo lineal.

El contenido de fenoles totales se determinó por interpolación del gráfico obtenido. Los resultados se expresaron como mg ácido gálico/ g de extracto

seco \pm SD. De esta manera se pudieron establecer diferencias esperables entre los cultivos con distinto aporte de CO₂ (tanto CO₂ de Indura como del gas de fermentación), en ambos casos, el aporte de CO₂ aumentó considerablemente el contenido fenólico, siendo este óptimo en los cultivos Bi y Ci (2,5% y 5% de CO₂) en el caso del gas de Indura y Bv (2,5% de CO₂) en el caso del gas de fermentación.

En general, los cultivos con inyección de CO₂ Indura mostraron un contenido de fenoles totales más alto que los cultivos con inyección de CO₂ de la viña. Los resultados más bajos fueron los cultivos control sin CO₂ (Ai y Av), lo que indica que la inyección de CO₂ a las muestras contribuye al aumento de su contenido de fenoles totales. Los resultados se presentan en la tabla 8 y se grafican en la figura 19.

La significancia de las diferencias en el contenido de fenoles totales entre los distintos cultivos, fue determinada por el método ANOVA de una vía con un ensayo de comparaciones múltiples de Tukey para no paramétricos, observándose las diferencias significativas ($p < 0,05$) en la tabla 9.

Tabla 8: Contenido de fenoles totales de los EET de *Arthrospira platensis* con distintas concentraciones de CO₂. Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Cultivo	Fenoles totales (mg ácido gálico/g de extracto ± SD)
Ai	14,5 ± 1,0
Bi	28,4 ± 0,3
Ci	35,9 ± 1,4
Di	31,9 ± 1,2
Av	15,8 ± 1,2
Bv	22,1 ± 1,0
Cv	19,3 ± 4,2
Dv	20,4 ± 2,4

Tabla 9: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la cantidad de fenoles totales (* indica diferencias significativas) Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Cultivos	Ai	Bi	Ci	Di	Av	Bv	Cv	Dv
Ai		*	*	*	-	*	-	*
Bi	*		*	-	*	*	*	*
Ci	*	*		-	*	*	*	*
Di	*	-	-		*	*	*	*
Av	-	*	*	*		*	-	-
Bv	*	*	*	*	*		-	-
Cv	-	*	*	*	-	-		-
Dv	*	*	*	*	-	-	-	

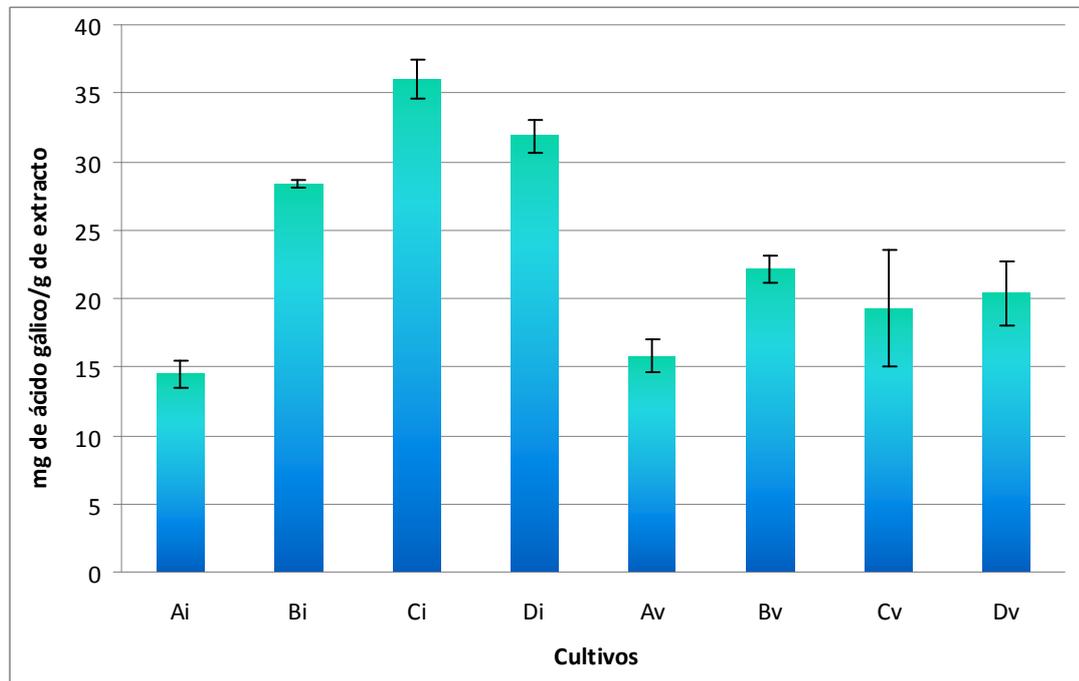


Figura 19: Contenido de fenoles totales expresados en mg ácido gálico/ g biomasa seca de los EET de *Arthrospira platensis* con distintas concentraciones de CO₂. Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña; Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

5. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *Arthrospira platensis* mediante el método FRAP

Para determinar el poder antioxidante de los extractos etanólicos de los distintos cultivos de *A. platensis*, se obtuvo una curva de calibración de Fe⁺² en un rango de concentración de 14 - 32 µM. (Figura 20).

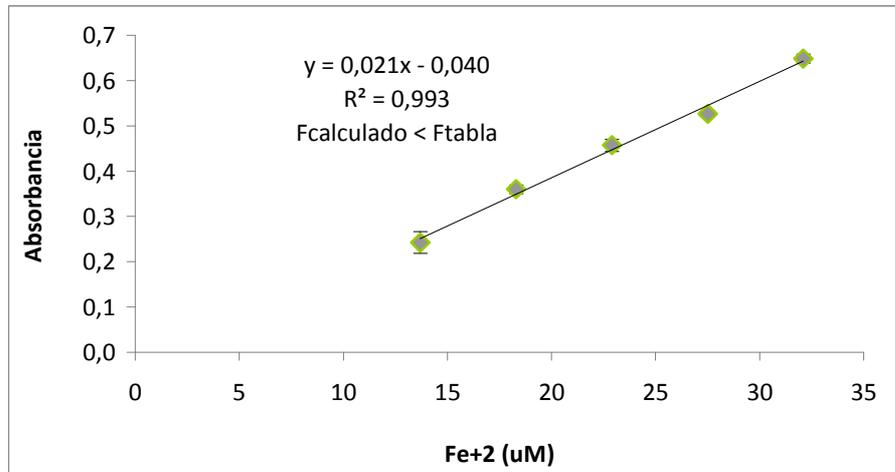


Figura 20: Curva de calibración de Fe⁺² para la determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP.

Esta curva fue sometida a los análisis de regresión lineal y de carencia de ajuste presentando un R^2 de 0,993 y un F calculado igual a 3,3965 menor al F de tabla 3,7082, sin presentar evidencia que justifique el rechazo del modelo lineal.

Como se puede apreciar en la tabla 10 y en la figura 21, la actividad antioxidante es claramente superior en los cultivos con inyección de CO₂ Indura, en especial en los cultivos con 5% y 7,5% de CO₂ (Ci y Di), llegando a los 60 minutos a $1,221 \pm 0,014$ mmol Fe⁺²/g de EET y $1,264 \pm 0,060$ mmol Fe⁺²/g de EET, respectivamente. Al comparar estos valores con los obtenidos de los cultivos control Ai ($0,378 \pm 0,007$ mmol Fe⁺²/g de ex) y Av ($0,459 \pm 0,009$ mmol Fe⁺²/g de EET) se aprecia que tienen una actividad antioxidante tres veces superior, aproximadamente, en cada uno de los tiempos analizados. Respecto de los cultivos con inyección de gas de fermentación, se observó la

mayor actividad antioxidante en el cultivo Dv (7,5% de CO₂ del gas de fermentación), en donde se obtuvo 0,992± 0,016 mmol Fe⁺²/g de EET a los 60 minutos, lo que es considerablemente mayor con respecto a los cultivos control Ai y Av.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía con un ensayo de comparaciones múltiples de Tukey, observándose diferencias significativas (p<0,05) entre los cultivos a los tres tiempos de medición; 4, 30 y 60 minutos, como se puede observar en las tablas 11, 12 y 13, respectivamente.

Tabla 10: Poder antioxidante reductor del hierro de los EET de *A. platensis* con distintas concentraciones de CO₂ Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Cultivos	Poder antioxidante reductor del hierro (mmol Fe ⁺² /g de ex)		
	Tiempo (min.)		
	4	30	60
Ai	0,285± 0,005	0,321± 0,006	0,378± 0,007
Bi	0,606± 0,063	0,782± 0,081	0,85± 0,078
Ci	0,909± 0,007	1,132± 0,023	1,221± 0,014
Di	0,934± 0,044	1,163± 0,059	1,264± 0,060
Av	0,318± 0,020	0,422± 0,004	0,459± 0,009
Bv	0,445± 0,013	0,547± 0,018	0,594± 0,008
Cv	0,375± 0,013	0,521± 0,020	0,574± 0,026
Dv	0,750± 0,011	0,920± 0,015	0,992± 0,016

Tabla 11: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la actividad antioxidante a los 4 minutos (* indica diferencias significativas) Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Cultivos	Ai	Bi	Ci	Di	Av	Bv	Cv	Dv
Ai		*	*	*	-	*	*	*
Bi	*		*	*	*	*	*	*
Ci	*	*		-	*	*	*	*
Di	*	*	-		*	*	*	*
Av	-	*	*	*		*	-	*
Bv	*	*	*	*	*		-	*
Cv	*	*	*	*	-	-		*
Dv	*	*	*	*	*	*	*	

Tabla 12: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la actividad antioxidante a los 30 minutos (* indica diferencias significativas) Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Cultivos	Ai	Bi	Ci	Di	Av	Bv	Cv	Dv
Ai		*	*	*	-	*	*	*
Bi	*		*	*	*	*	*	*
Ci	*	*		-	*	*	*	*
Di	*	*	-		*	*	*	*
Av	-	*	*	*		*	-	*
Bv	*	*	*	*	*		-	*
Cv	*	*	*	*	-	-		*
Dv	*	*	*	*	*	*	*	

Tabla 13: Diferencias significativas entre los cultivos con respecto a la actividad antioxidante a los 60 minutos (* indica diferencias significativas) Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Cultivos	Ai	Bi	Ci	Di	Av	Bv	Cv	Dv
Ai		*	*	*	-	*	*	*
Bi	*		*	*	*	*	*	*
Ci	*	*		-	*	*	*	*
Di	*	*	-		*	*	*	*
Av	-	*	*	*		*	*	*
Bv	*	*	*	*	*		-	*
Cv	*	*	*	*	*	-		*
Dv	*	*	*	*	*	*	*	

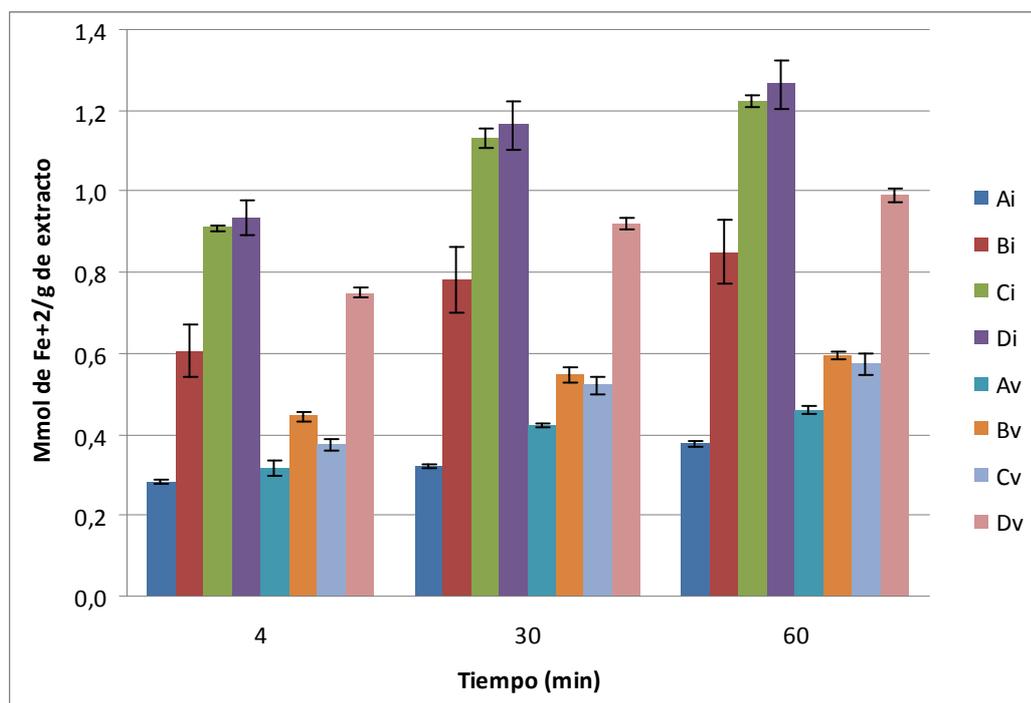


Figura 21: Poder antioxidante reductor del hierro expresados en mmol Fe⁺²/ g de EET de *Arthrospira platensis*. Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂ viña; Cv= 5%CO₂ viña; Dv= 7,5%CO₂ viña

Al comparar la cantidad de fenoles totales con la actividad antioxidante de los EET se puede apreciar que no existe una relación directa entre ambos parámetros. Para los cultivos con CO₂ de Indura se observó que la cantidad mas alta de fenoles totales se alcanzó con 5% de CO₂ (cultivo Ci) y bajó al aumentar a 7,5% la concentración de CO₂ (cultivo Di), lo contrario ocurrió para la actividad antioxidante, en donde la máxima actividad se registró en el cultivo Di. En el caso de los cultivos con gas de fermentación, el contenido fenólico fue relativamente similar entre los distintos cultivos, encontrándose un valor mayor en el cultivo Bv (2,5% de CO₂), en cambio, la máxima actividad antioxidante se encontró en el cultivo Dv (7,5% de CO₂), marcando una notoria diferencia con

los cultivos con menores porcentajes de CO₂. Esto se puede observar en la tabla 14 y en la figura 22.

Tabla 14: Tabla comparativa entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante. Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Cultivo	FRAP (mmol Fe ⁺² /g de ex)	Fenoles totales (mg ácido gálico/g de extracto)
	FRAP (60 min)	Folin-Ciocalteu
Ai	0,378± 0,007	14,5 ± 1,0
Bi	0,850± 0,078	28,4 ± 0,3
Ci	1,221± 0,014	35,9 ± 1,4
Di	1,264± 0,060	31,9 ± 1,2
Av	0,459± 0,009	15,8 ± 1,2
Bv	0,594± 0,008	22,1 ± 1,0
Cv	0,574± 0,026	19,3 ± 4,2
Dv	0,992± 0,016	20,4 ± 2,4

Coef. de Pearson= 0,887. Existe correlación positiva entre ambos parámetros.

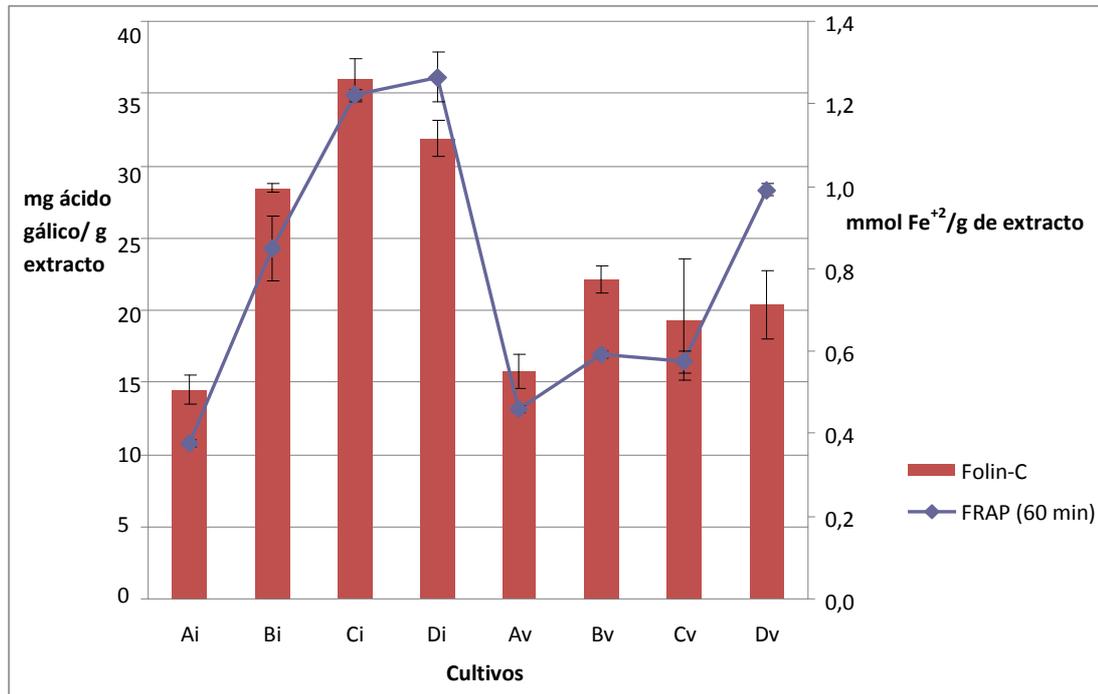
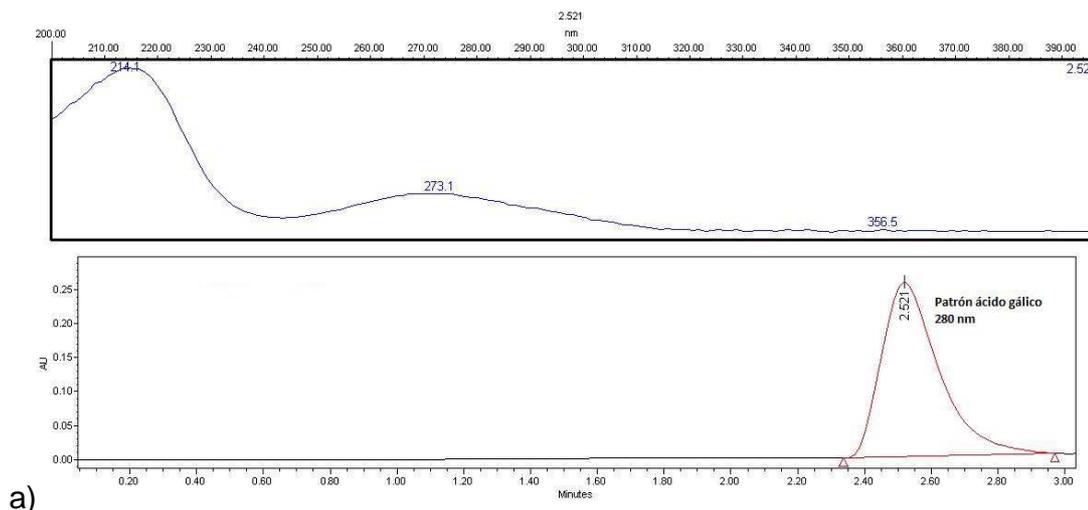


Figura 22: Contenido de fenoles totales vs. Actividad antioxidante (FRAP, 60 minutos) de los EET de *Arthrospira platensis*. Ai= 0 %CO₂ indura; Bi= 2,5%CO₂ indura; Ci= 5%CO₂ indura; Di= 7,5%CO₂ indura; Av=0 %CO₂ viña; Bv= 2,5%CO₂, viña Cv= 5%CO₂ viña; Di= 7,5%CO₂ viña.

Por lo tanto cabe destacar que si bien están relacionados, un alto contenido en fenoles totales no se traduce necesariamente en una buena actividad antioxidante, ya que esta depende del tipo de polifenoles presentes en los extractos a evaluar, además hay que considerar que la presencia de otros compuestos no fenólicos, tales como pigmentos, pueden aportar a la actividad antioxidante, por estas razones, es importante obtener la composición química completa de los extractos evaluados.

6. Determinación de la presencia de los compuestos fenólicos mayoritarios descritos en extractos de *Arthrospira platensis* por cromatografía de líquidos de alta eficiencia con arreglo de diodos (CLAE-DAD).

Para esta experiencia se decidió determinar la presencia de los tres ácidos fenólicos mayoritarios descritos para extractos de *A. platensis*, estos son los ácidos gálico, cafeico y ferúlico. Para esto se utilizaron los patrones primarios de cada uno de estos compuestos y se analizaron por CLAE-DAD, en las condiciones descritas en la metodología. De esta manera se obtuvieron los cromatogramas para cada uno de estos compuestos (Figura 23), su tiempo de retención y su espectro UV, determinándose de esta forma la longitud de onda de máxima absorción, parámetros que permiten identificar las moléculas en cuestión en cada uno de los EET.



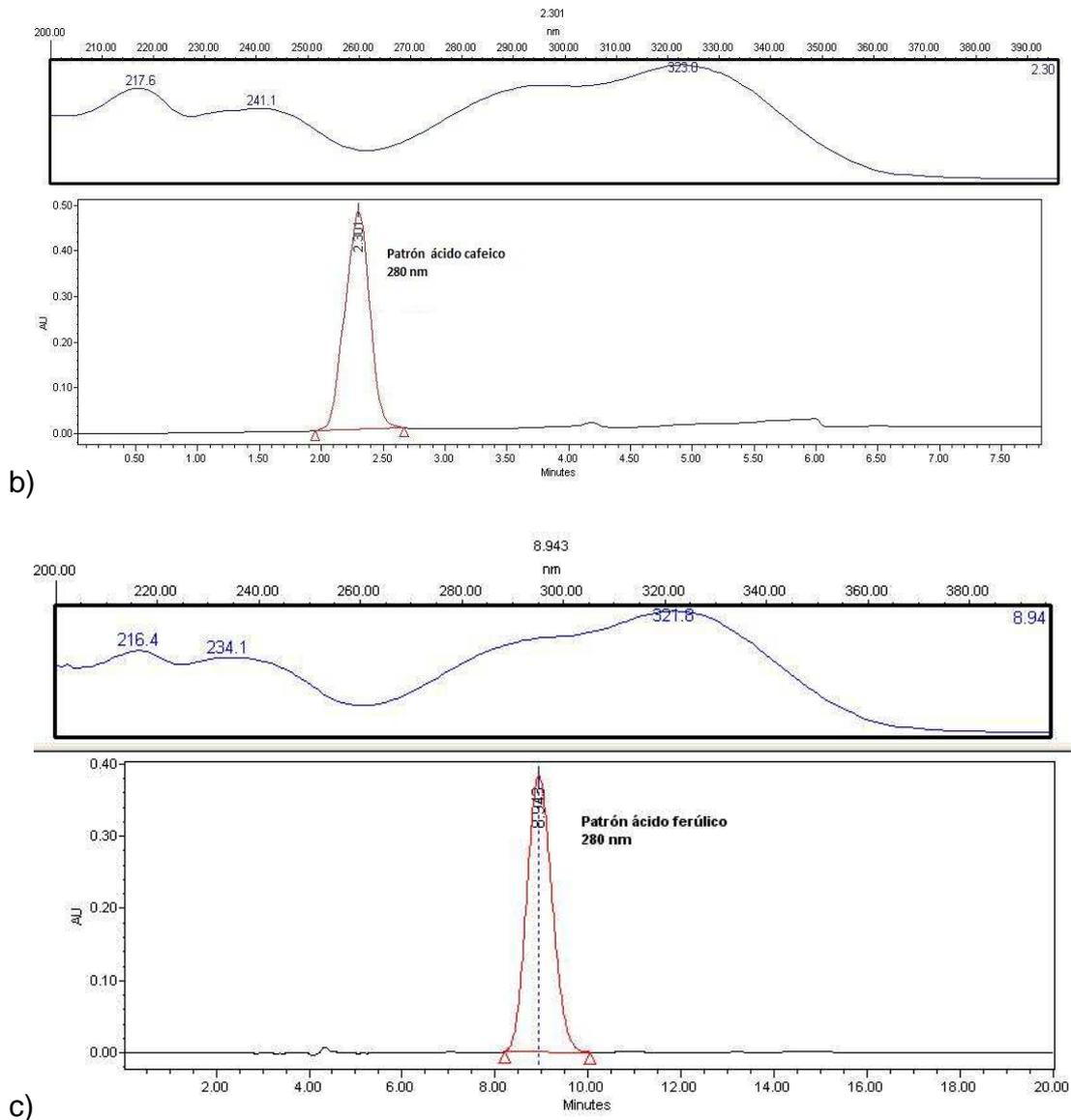


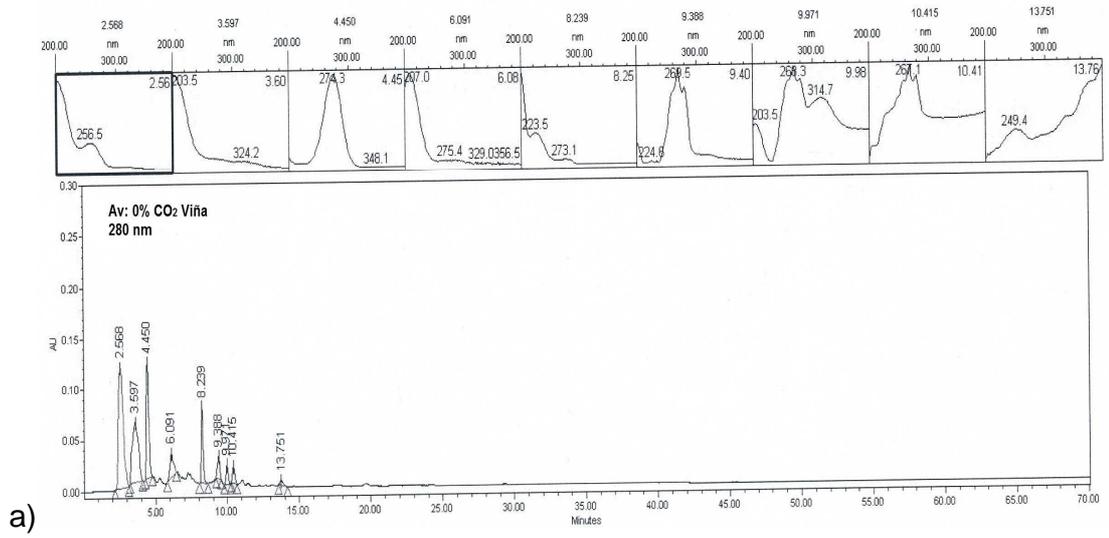
Figura 23: Cromatogramas por CLAE-DAD a 280 nm de patrones primarios a) Acido gálico (Tr: 2,521 min) b) Acido cafeico (Tr: 2,301 min) c) Acido ferúlico (Tr: 8,913 min)

Posteriormente, se realizó CLAE-DAD para las muestras Av (0% CO₂), Bi (2,5% CO₂ Indura), Bv (2,5% CO₂ Viña), Ci (5% CO₂ Indura), Cv (5% CO₂ Viña), Di (7,5% CO₂ Indura) y Dv (7,5% CO₂ Viña) bajo las condiciones descritas en la metodología, obteniéndose los cromatogramas expuestos en la figura 24. Luego

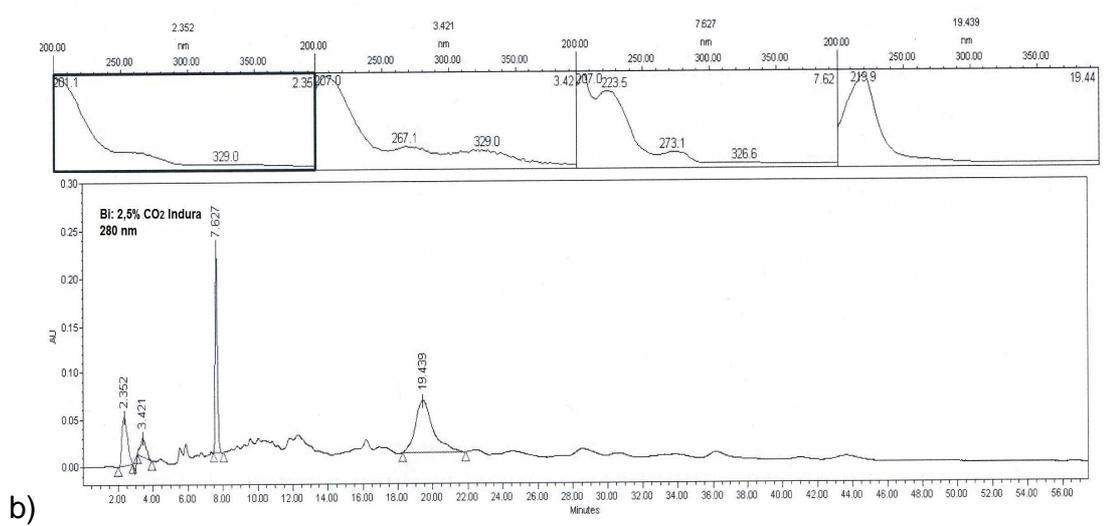
se compararon los picos presentes en estos cromatogramas con los picos de los patrones primarios y se concluyó que ninguno de estos compuestos se encontraba en las muestras, ya que tanto el tiempo de retención, así como los máximos de absorbancia a 280 nm no coincidieron con ninguno de los picos presentes en los cromatogramas de las muestras.

Se encontraron dos picos principales en todos los cromatogramas, uno de ellos con un Tr de 2,5 min y el otro con un Tr de 7 min. La altura de estos picos varió con el porcentaje de CO₂ aplicado en los cultivos, observándose una altura máxima en los EET de cultivos con 2,5% de CO₂. Otro pico digno de mención es el que tiene un Tr de 3 minutos, que aparece en todos los cromatogramas y cuya altura permanece relativamente constante exceptuando en el cromatograma del EET Ci donde desaparece. Como observación final, cabe destacar que la aparición de picos disminuyó a mayor concentración de CO₂, observándose la mayor cantidad de estos en los cromatogramas de los EET A y B, para ambos tipos de gases. Estos resultados demuestran que los aportes de CO₂ generan cambios en el perfil de compuestos fenólicos.

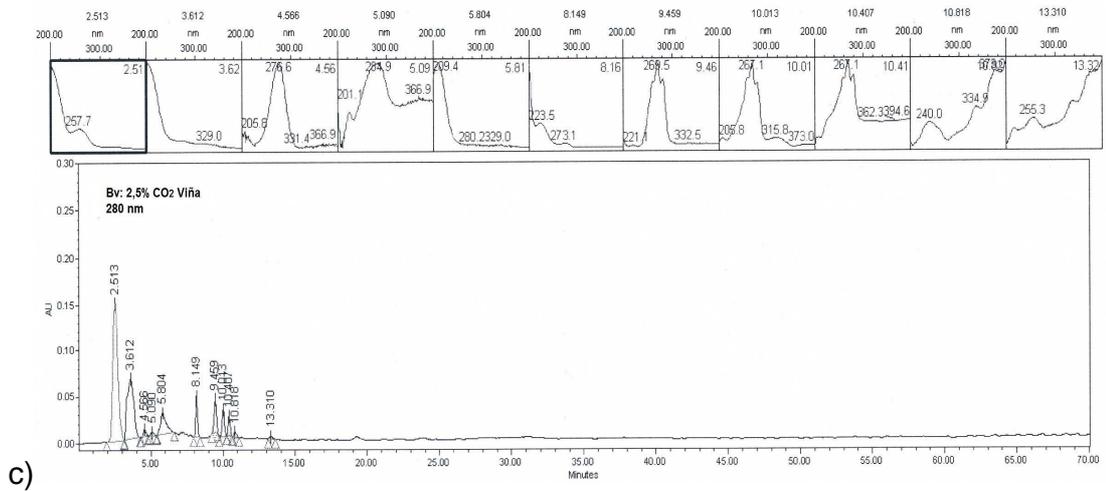
La identificación de los picos presentes en los cromatogramas se dejará para futuras investigaciones en el tema.



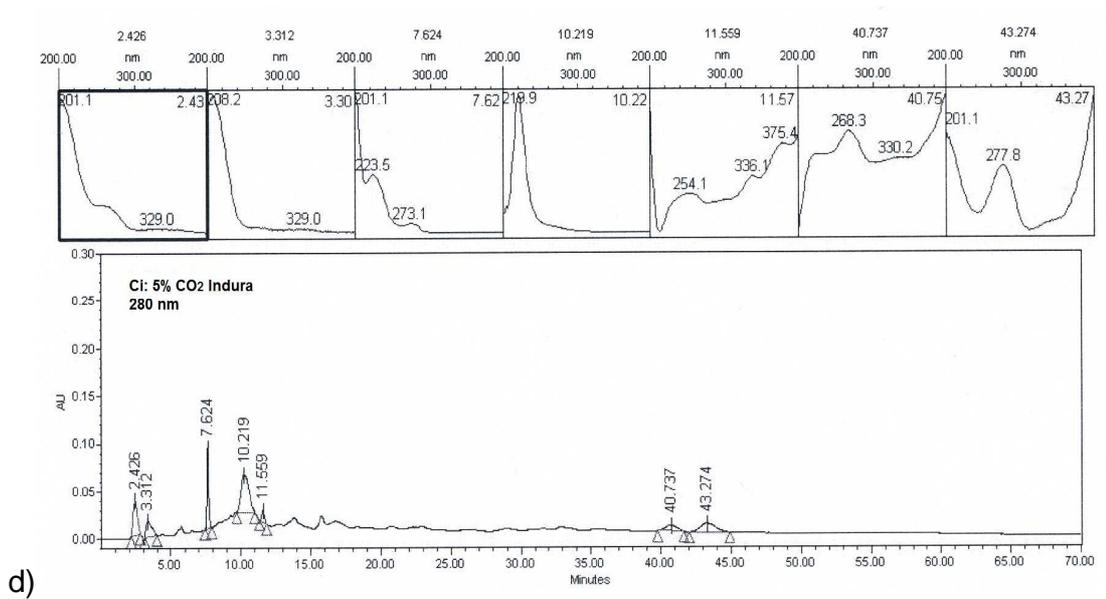
a)



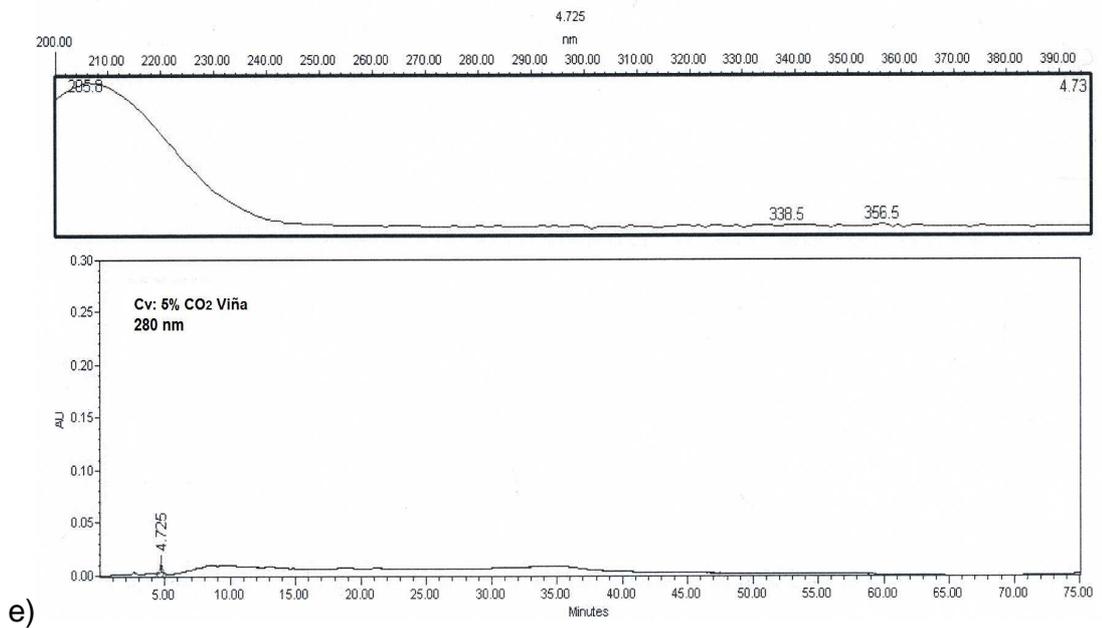
b)



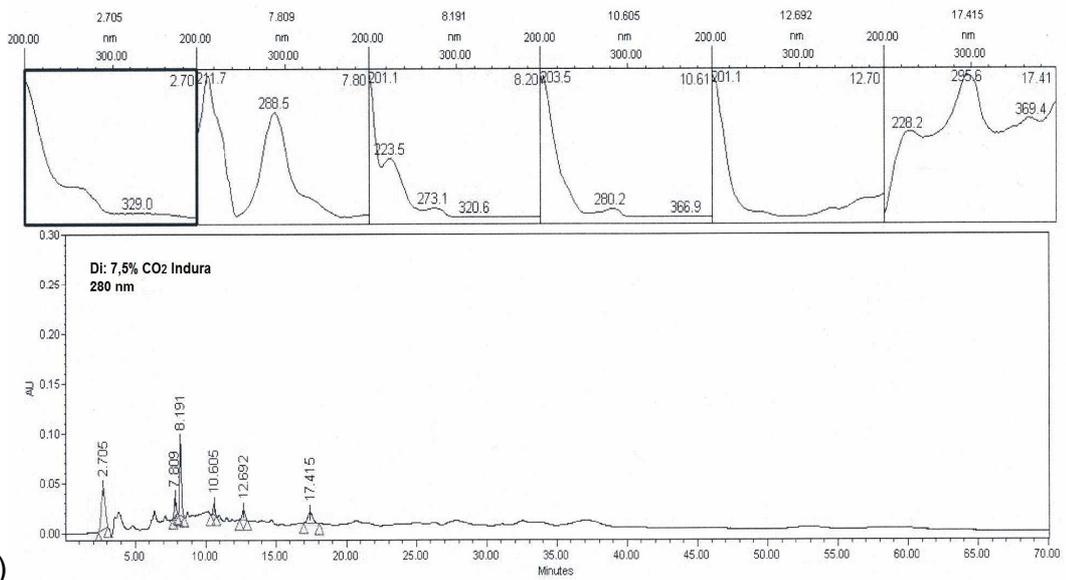
c)



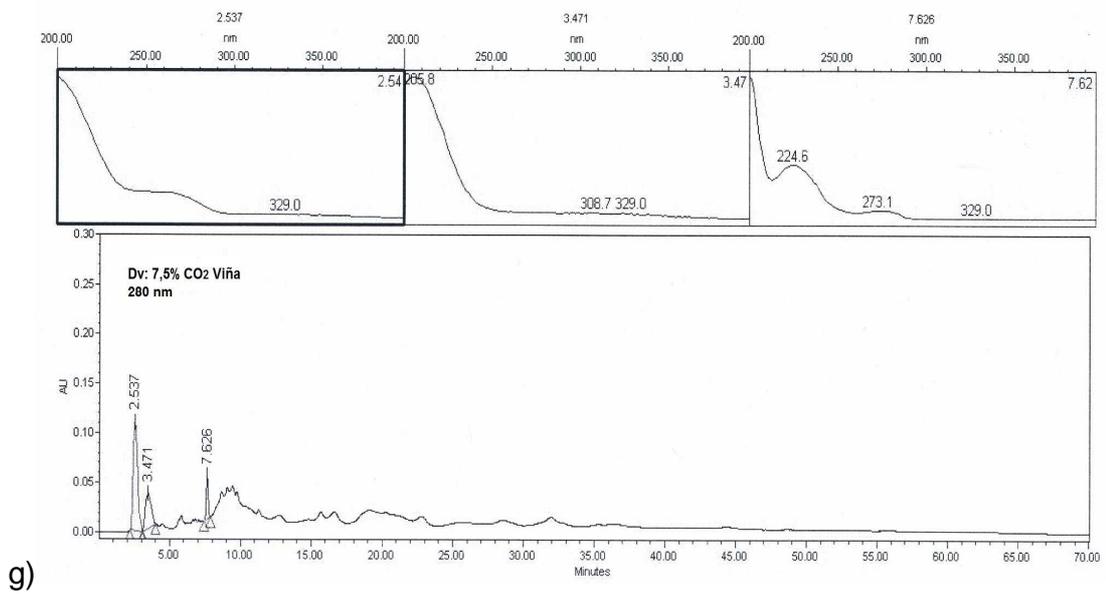
d)



e)



f)



g)

Figura 24: Cromatogramas por CLAE-DAD a 280 nm de los EET (5 mg/mL). a) EET Av 0% CO₂ b) EET Bi 2,5% CO₂ Indura c) EET Bv 2,5% CO₂ Viña d) EET Ci 5% CO₂ Indura e) Cv 5% CO₂ Viña f) Di 7,5% CO₂ Indura g) Dv 7,5% CO₂ Viña

VI. CONCLUSIONES

- El aporte de CO₂ de distintos orígenes influyó positivamente en el crecimiento celular observándose que una concentración de 5% de CO₂ aumentó levemente el crecimiento.
- El mayor rendimiento en la obtención de los extractos etanólicos (EET) se obtuvo en la extracción de la biomasa de los cultivos Bi y Bv (2,5% de CO₂ para cada tipo de gas), los que presentaron un rendimiento considerablemente mayor que los cultivos control sin inyección de CO₂. Para los extractos hexánicos, el porcentaje de CO₂ óptimo fue 7,5% y en el caso de los extractos de diclorometano se observó que la inyección de CO₂ no generó mayores diferencias en el rendimiento.
- Existen diferencias importantes entre la composición química de las muestras de *A. platensis* evidenciadas mediante ensayos cualitativos en cromatografía en capa fina (CCF). Las CCF realizadas revelaron que tanto los ácidos fenólicos como los flavonoides se encontraron mayoritariamente en los EET, como se esperaba.
- Mediante la cuantificación de fenoles totales, se establecieron diferencias esperables entre los distintos EET. El aporte de CO₂ aumentó considerablemente el contenido fenólico, siendo este óptimo

en los cultivos Bi y Ci (2,5% y 5% de CO₂) en el caso del gas de Indura y Bv (2,5% de CO₂) en el caso del gas de fermentación, obteniéndose un contenido promedio de fenoles totales cuatro veces mayor que el de los EET de los cultivos control.

- La actividad antioxidante de los EET se determinó *in vitro* mediante el método FRAP, observándose que a los tres tiempos analizados (4, 30 y 60 minutos) la máxima actividad antioxidante se encontró en los cultivos con 7,5% de CO₂ para los dos gases utilizados (cultivos Di y Dv).
- Se observó que el contenido fenólico de las muestras está relacionado con la actividad antioxidante, sin embargo, un alto contenido en fenoles totales no se traduce necesariamente en una buena actividad antioxidante, ya que esta depende tanto del tipo de polifenoles presentes en los extractos a evaluar y de la presencia de otros compuestos no fenólicos, tales como pigmentos que pueden aportar a la actividad antioxidante, de aquí radica la importancia de obtener la composición química completa de los extractos evaluados.
- Queda planteado como desafío futuro la identificación de los compuestos mayoritarios hallados en EET de *A. platensis* cultivada con distintos aportes de CO₂, realizando estudios por CLAE-MS que

permitan identificar y cuantificar los principales compuestos fenólicos presentes en las muestras.

- Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que es recomendable el uso de gas de fermentación producido en la elaboración del vino como fuente de carbono para cultivos de *A. platensis*, aportando 2,5% de CO₂, ya que su inclusión potencia la actividad antioxidante y la cantidad de fenoles totales, así como su productividad, demostrando de esta manera la factibilidad de su utilización, y además, al utilizar este gas se disminuye la huella de carbono de empresas vitivinícolas.

VII. REFERENCIAS

ABD EL-BAKY, H., El Baz, F. y El-Baroty, G. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects in vitro toward hepatotoxicity model. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 3(4): 133 - 139, 2009.

ALGAEBASE, (2013). *Arthrospira platensis* f. [en línea] <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=67855&sk=0&from=results> [Consulta 20 Abril 2013].

BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. The Journal of the American Nutraceutical Association. 5(2): 27 - 49, 2002.

BENZIE, I. y Strain, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239: 70 - 76. 1996.

CASARES, A. Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación. Tesis (Ingeniería Técnica Industrial). Universidad Politécnica de Catalunya. Barcelona, España, 2010

CASTRO, G. y Navarro, A. Manual Ficológico: Algas para la Vida. Unidad de Investigación Biotecnología en Cultivos de Microalgas. Aquasolar, 2009.

CHAMORRO, G., Salazar, M., Gómez, K., Pereira, C., Ceballos, G. y Fabila, L. Actualización en la farmacología de *Spirulina* (*Arthrospira*), un alimento no convencional. Archivos Latinoamericanos De Nutrición. 52(3): 232 - 240, 2002.

CHISTI Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25: 294 - 306, 2007.

CHOJNACKA, K., Chojnacki A. y Górecka, H. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. Chemosphere. 59: 75 - 84, 2005.

CICCO, N., Lanorte, M., Paraggio, M., Viggiano, M. y Lattanzio, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical journal. 91: 107 - 110, 2009.

COLLA L., Badiale Furlong E. y Vieira Costa J. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian archives of biology and technology*. 50 (1): 161-167, Enero 2007.

COUTEAU, P. Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO fisheries technical paper 361, 1996.

DE MORAIS, M. y Costa, J. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology. 129: 439 - 445, 2007.

- GONG, R., Ding, Y., Liu, H., Chen, Q. y Liu, Z. Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass. Chemosphere. 58: 125 - 13, 2005.
- HELBLING, E., Gao, K., Ai, H., Ma, Z. y Villafañe, V. Differential responses of *Nostoc sphaeroides* and *Arthrospira platensis* to solar ultraviolet radiation exposure. Journal of Applied Phycology. 18: 57 - 66, 2006.
- HENRÍQUEZ C., Almonacid S., Chiffelle I., Valenzuela T., Araya M., Cabezas L., Simpson R., Speisky H. Determination Of Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content And Mineral Composition of Different Fruit Tissue Of Five Apple Cultivars Grown In Chile. Chilean Journal of Agricultural Research 70(4): 523 - 536, 2010
- JUANTORENA, A., Sebastian, P., Santoyo, E., Gamboa, S., Lastres, O., Sánchez-Escamilla, D., Bustos, A. y Eapen, D. Hydrogen production employing *Spirulina maxima* 2342: A chemical analysis. International Journal of Hydrogen Energy. 32: 3133 - 3136, 2007.
- LIANG, X., Zhang, X., Dai, W., Lv, Y., Yan, S., Zhang, W. A combined HPLC-PDA and HPLC-MS method for quantitative and qualitative analysis of 10 major constituents in the traditional Chinese medicine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 49: 931 – 936, 2009.
- LIPOK, J., Owsiak. T., Młynarz, P., Forlani, G. y Kafarski, P. Phosphorus NMR as a tool to study mineralization of organophosphonates - The ability of

Spirulina spp. to degrade glyphosate. Enzyme and Microbial Technology. 41: 286 - 291, 2007.

MANOJ, G., Venkataraman, L., Srinivas, L. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Spirulina platensis*). Seshadri and Bai. *Spirulina*. MCRC. 48 - 154, 1992.

NARANJO, L., Rojas, D., González, H., Torres, R., Zegarra, J., Sena, L. y Sosa, D. *Arthrospira platensis* como biofactoría de metabolitos secundarios de interés farmacológico: el ácido pipercolico. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal. 1(1): 64 - 90, 2010.

PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products. 63(7): 71 - 76, 2000.

PIÑA, Y. Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de ecotipos de *Ugni molinae* Turcz. Memoria para optar por el título de Químico farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, 2011. 72 h.

RAMÍREZ, L. y Olvera, R. Conocimientos acerca del alga *Spirulina* (*Arthrospira*). Interciencia. 31(9), 2006.

RAVELONANDRO, P., Ratianarivo, D., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., Raherimandimby, M. Improvement of the growth of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition. Food and bioproducts processing. 89: 209 - 216, 2011.

RODRÍGUEZ, I. y Guil, J. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. Food Chemistry. 108: 1023 - 1026, 2007.

SINGLETON, V. y Rossi, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphtungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16: 144 - 158, 1965.

STASHENKO, E., Vásquez, A., Cala, M., Miranda, I., Tafurt, G. y Martinez, J. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. Scientia et Technica. Año XIII, 33: 205 - 207, Mayo 2007.

STREMBEL, C. Clasificación de las algas Spirulina. Laboratorios HydroGrow. Spiruline, 2004.

SUDHA S., Karthic, R., Rengaramanujam, J. Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* and *Aphanothece* sp. on selected clinical bacterial isolates and its Antioxidant activity. South Asian Journal of Biological Science. 1(2): 87 - 98, 2011.

TREDICI, M. y Chini, G. Cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis* in flat plate reactors: *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology Cell-biology and Biotechnology. Avigad Vonshak (Ed.) Taylor and Francis Publishers. 117 - 130, 1997.

UTSUKIHARA, T., Okada, S., Kato, N. y Horiuchi, C. Biotransformation of α -bromo and α, α' -dibromo alkanone to α -hydroxyketone and α -diketone by *Spirulina platensis*. Journal of Molecular Catalysis B. 45: 68 - 72, 2007.

VONSHAK, A. y Richmond, A. Mass production of the blue-green algae *Spirulina*: an overview. Biomass and Bioenergy. 15: 233 - 247, 1998.

VONSHAK, A. y Tomaselli, L. *Arthrospira (Spirulina): Systematics and Ecophysiology*. The ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda. 505 - 522, 2000.

WAGNER H. y Bladt S. *Plant drug análisis: A thin layer chromatography atlas*. Springer, 1996.

ANEXOS**Anexo 1:** Componentes del medio de cultivo Zarrouk**Tabla 15:** Solución de Macronutrientes del medio de cultivo Zarrouk

Reactivo	g/L
NaHCO ₃	18
NaNO ₃	2,5
K ₂ HPO ₄	0,5
K ₂ SO ₄	1
NaCl	1
CaCl ₂	0,04
Na ₂ EDTA	0,08
MgSO ₄	0,2
FeSO ₄	0,01

Tabla 16: Solución de micronutrientes del medio de cultivo Zarrouk

Reactivo	g/L
H ₃ BO ₃	2,86
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,02
MnCl ₂	1,8
Cu ₂ SO ₄	0,08
ZnSO ₄	0,22

Tabla 17: Solución de vitaminas del medio de cultivo Zarrouk

Reactivo	g/L
Cianocobalamina	1
Tiamina (vitamina B1)	12

Todos los reactivos empleados para la preparación del medio de cultivo Zarrouk son de grado técnico y fueron adquiridos a Hein Ltda. Las soluciones fueron almacenadas a 4°C.

Anexo 2: Análisis del gas de fermentación de la Viña Miguel Torres**RESULTADO DE ANALISIS**

Muestra 1
01/03/2012

Análisis composición gaseosa	Niveles (%)
Dióxido de Carbono	35.1
Oxígeno	12.5
Nitrógeno	50.9

Muestra 2
28/03/2012

Análisis composición gaseosa	Niveles (ppm)
Óxidos de Nitrógeno	3.0

COMENTARIOS

- ❖ Ensayo realizado en laboratorio con temperatura controlada a 20° C y 38% humedad.

Figura 25: Análisis del gas de fermentación de la Viña Miguel Torres certificado por Indura.