



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

**DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES Y ACTIVIDAD
SOBRE LA 15-LIPOXIGENASA DE EXTRACTOS DE
Arthrospira platensis PRODUCIDOS CON CAPTURA DE CO₂**

Memoria para optar al título de Química-farmacéutica:

CONSTANZA ISABEL TÖLG AROS

PROFESOR PATROCINANTE

DRA. CARLA DELPORTE V.

Depto. de Química Farmacológica
Toxicológica

DIRECTORES DE TESIS

DRA. CARLA DELPORTE V.

Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

LIC. GABRIEL CASTRO N.

AeonBiogroup

SANTIAGO DE CHILE

ENERO 2014

ESTA TESIS SE REALIZÓ GRACIAS AL

PROYECTO FIA

CÓDIGO PYT-2011-0055

*“A Dios y a todos los angelitos
que me cuidan desde el cielo”*

Agradecimientos

A Dios y a la Virgen por permitirme hacer realidad este sueño, acompañarme en cada paso que doy y por haber puesto en mi camino a tantas bellas personas, algunas que ya no me acompañan físicamente, pero que están siempre presente en mi corazón.

A la profesora Carla Delporte, a la cual admiro por su dedicación y preocupación por los alumnos y la profesión, le agradezco la confianza y oportunidad brindada para el desarrollo del presente trabajo. Además incluyo a todas las personitas que componen el maravilloso laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Chile, especialmente a Gabriela Valenzuela, quien para mí es un claro modelo a seguir, por su humildad, constante esfuerzo, dedicación al trabajo en equipo y por su extraordinaria disposición con los alumnos de los prácticos de laboratorio como fui yo.

A Gabriel Castro por brindarme parte de su tiempo y conocimientos en la tarea del cultivo microalgal, parte fundamental en esta investigación, así como también a toda la familia AeonBiogroup por su hospitalidad, apoyo y amistad en estos 3 años de convivencia.

A las profesoras Olosmira Correa y Lorena García por todo el apoyo e interés brindado durante mi carrera y la realización de mi memoria. Asimismo, a los profesores que dejaron una huella en mi corazón por su amor a la profesión Hernán Vergara y Hernán Pessoa.

A mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermana, que desde pequeña me impulsaron a seguir mis sueños y aprender jugando. Sin duda, sin su amor y compañía no lo habría logrado.

A mis amigos, aquellos que no te abandonan nunca y te están brindando su apoyo incondicional, por todos esos hermosos momentos compartidos: Macarena Cofré (makita), Fernando Serrano (gato), Alex Mella (gex), Alejandra Mac-Kay (aleka), por nombrar sólo algunos. También incluyo a mis queridos amigos de universidad: América Lizana (ame), Marcel Benoit (marcelix), Javier Figueroa (xabi), Alejandro Ortega (ale), Angel Lara (larix), Patricio Bustos (patín), Sebastián Díaz (sebita), Cristina Galvez (makiss) a cada uno, les agradezco por su simpatía, alegría y cariño, durante estos años de amistad.

A David Aravena, Pedro Villela, Julio Garmendia, Paola Guzmán, Isabel Morales, por su amistad, su invaluable apoyo y por el préstamo de materiales a lo largo de la estadía en la universidad.

A Movimiento Original, porque gracias a sus canciones, en especial a “Grandes pasos”, me dieron el coraje suficiente para seguir adelante en los momentos más difíciles de mi carrera. Así como también, a Bob Marley que cambió mi forma de ver la vida.

Y muy especialmente, quiero agradecer a quien día a día me llena de alegría, de amor y me impulsa a ser mejor persona, mi compañero de vida, Luis Mellado.

Muchísimas gracias, de todo corazón a quien se hizo presente de una u otra manera en esta memoria.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	7
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	7
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
4.1 Reactivos.....	8
4.2 Cultivos de la cianobacteria incorporando CO ₂	9
4.3 Determinación del crecimiento celular	12
4.3.1 Espectrofotometría	13
4.3.2 Número de células.....	13
4.4 Obtención de la biomasa	14
4.5 Preparación de los extractos	16
4.6 Monitoreo de los extractos mediante cromatografía en capa fina.....	16

4.7 Determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu	18
4.8 Análisis de los extractos mediante CLAE-DAD de los EET	19
4.8.1 Determinación de la presencia de compuestos fenólicos previamente descritos en <i>Arthrospira</i> ssp.....	20
4.9 Análisis de la inhibición de la enzima 15-lipoxigenasa de soya de los EET	20
4.9.1 Reactivos a preparar	21
4.9.2 Protocolo del ensayo	21
4.9.3 Expresión de resultados y análisis estadístico	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1 Determinación del crecimiento de los cultivos	24
5.2 Producción de biomasa seca de <i>A. platensis</i>	29
5.3 Obtención de extractos y sus rendimientos	30
5.4 Cromatografía en capa fina de extractos de <i>Arthrospira platensis</i>	32
5.5 Determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu de los EET de <i>A. platensis</i>	34
5.6 Análisis de los EET mediante CLAE-DAD	37
5.7 Determinación del comportamiento de los EET de <i>Arthrospira platensis</i> sobre 15- lipoxigenasa de soya	44
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	49
Anexo I.....	56
Anexo II.....	59

Anexo III..... 61

Anexo IV 62

Anexo V 64

Anexo VI 65

ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mM	Milimolar
ppm	Partes por millón
AA	Ácido araquidónico
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CLAE-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector UV con arreglo de fotodiodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDCM	Extracto de diclorometano de <i>Arthrospira platensis</i>
EET	Extracto etanólico de <i>Arthrospira platensis</i>
EHEX	Extracto hexánico de <i>Arthrospira platensis</i>
LB	Reactivo revelador Liebermann Burchard
NP/PEG	2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol/polietilenglicol 4000 al 5%
PAS	Reactivo revelador p-anisaldehído
Tris-HCl	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol-HCl
UA	Unidades de absorbancia
UV	Ultravioleta
15-LOXsoya	15-lipoxigenasa de soya

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Arthrospira platensis</i> vista del microscopio a 400x, en cultivos y como biomasa seca respectivamente.....	6
Figura 2: Principales ácidos fenólicos descritos previamente en <i>Arthrospira platensis</i>	6
Figura 3: Esquema general del diseño experimental.....	9
Figura 4: Monitoreo del % de CO ₂ a los cultivos (a) Válvula que regula el flujo de CO ₂ en una línea de cultivo; (b) Medición del % de CO ₂ desde los cultivos.....	12
Figura 5: Ejemplo de una toma de muestra de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i>	12
Figura 6: (a) Cámara de conteo Sedgewick-Rafter; (b) cuadrado con <i>A. platensis</i> a un aumento de 40X; (c) forma de llenado de la misma respectivamente.	13
Figura 7: Fases del desarrollo de un cultivo de microalgas.	15
Figura 8: Procedimiento de cosecha de <i>Arthrospira platensis</i> (a) Biomasa al pasar por los filtros; (b) Biomasa en bandejas al interior del secador.....	15
Figura 9: Crecimiento según densidad celular de los cultivos administrados con los distintos tipos de CO ₂ . (a) Cultivos a partir de CO ₂ de la viña; (b) Cultivos a partir de CO ₂ de Indura; (c) Cultivos en el día 23.	27
Figura 10: Crecimiento según absorbancia de los cultivos administrados con los distintos tipos de CO ₂ . (a) Cultivos a partir de CO ₂ de la viña; (b) Cultivos a partir de CO ₂ de Indura; (c) Cultivos en el día 23.....	28
Figura 11: Gráfico comparativo de los rendimientos de extracción según el solvente utilizado sobre los distintos cultivos de <i>A. platensis</i>	31

Figura 12: Cromatografía en capa fina de los extractos de <i>A. platensis</i> a $\lambda = 365$ nm. (a) EHEX; (b) EDCM; (c) EET; (d) Patrones de ácidos fenólicos y EET (fase móvil: metanol: acetato de etilo (50:50; v/v) 5 μ L de siembra y revelado con NP-PEG).....	33
Figura 13: Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	34
Figura 14: Contenido de fenoles totales expresados en (a) mg ácido gálico/g biomasa seca; (b) mg ácido gálico/g extracto de los extractos etanólicos de <i>A. platensis</i>	37
Figura 15: Cromatogramas por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de patrones de ácidos fenólicos a 100 ppm (a) Ácido gálico; (b) Ácido cafeico; (c) Ácido ferúlico.	40
Figura 16: Cromatogramas por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de EET, correspondientes a los cultivos (a) Bv (2,5% CO ₂ viña); (b) Bi (2,5% CO ₂ Indura).	41
Figura 17: Cromatogramas por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de EET, correspondientes a los cultivos (a) Cv (5% CO ₂ viña); (b) Ci (5% CO ₂ Indura).....	42
Figura 18: Cromatogramas por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de EET, correspondientes a los cultivos (a) Dv (7,5% CO ₂ viña); (b) Di (7,5% CO ₂ Indura).	43
Figura 19: Cromatograma por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de EET, correspondiente al cultivo Av (0% CO ₂).....	44
Figura 20: Efecto inhibitorio de la enzima 15-LOXsoya por ácido cafeico.	46
Figura 21: Procedimiento de extracción del gas de fermentación (a) Forma en que el gas de fermentación sale de la cuba; (b) Equipo completo más en detalle.	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Denominación y aportes de diferentes cantidades de CO ₂ de los cultivos de <i>Arthrospira platensis</i>	11
Tabla 2: Protocolo de la determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin- Ciocalteu.	19
Tabla 3: Protocolo del ensayo de inhibición de la enzima 15-lipoxigenasa de soya.	23
Tabla 4: Producción de biomasa de los distintos cultivos de <i>A.platensis</i>	29
Tabla 5: Rendimiento del proceso de extracción de la biomasa de <i>Arthrospira platensis</i> de los distintos cultivos en estudio.	31
Tabla 6: Contenido de fenoles presentes en los extractos etanólicos de los distintos cultivos de <i>A. platensis</i>	36
Tabla 7: Resultados de la evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima 15-LOXsoya de los EET de los distintos cultivos de <i>A. platensis</i> y del compuesto de referencia.	45

RESUMEN

Determinación de fenoles totales y actividad sobre la 15-lipoxigenasa de extractos de *Arthrospira platensis* producidos con captura de CO₂

La espirulina (*Arthrospira platensis*), es una microalga cuyos estudios han demostrado que posee actividad antioxidante, antiviral, antihistamínica, antiinflamatoria e inmunoestimulante, además de presentar efectos antianémicos, anticancerígenos, anticoagulantes, antigenotóxicos, antihepatotóxicos, antiparasitarios, hipoglicemiantes e hipolipidémicos. Dentro de los estudios de la actividad antiinflamatoria de esta microalga, no se encontró ningún antecedente que demuestre su efecto inhibitorio sobre la 15-lipoxigenasa.

En esta memoria se realizó un estudio comparativo entre distintos cultivos de *A. platensis* utilizando dos fuentes de CO₂ en distintas concentraciones. Las variables comparadas fueron: crecimiento y producción de biomasa de los cultivos, rendimiento y perfil cromatográfico por cromatografía en capa fina y por CLAE-DAD de los diferentes extractos, contenido total de fenoles, así como también la actividad inhibitoria de la 15-lipoxigenasa de soya de los extractos etanólicos que fueron los que presentaron una mayor cantidad de compuestos fenólicos.

El crecimiento y producción de biomasa resultó mayor para los cultivos a los que se le adicionaron CO₂, ya sea proveniente de Indura o de la viña Miguel Torres, respecto a los cultivos controles, que no recibieron aporte extra de CO₂.

El rendimiento de los extractos etanólicos de los cultivos que recibieron aporte de CO₂ fueron los que alcanzaron un mayor valor.

El CO₂ produjo un cambio en la cantidad de compuestos fenólicos, los cuales aumentaron hasta un 50%, lo cual se evidenció mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. Se comprobó la ausencia de ácido gálico, ácido cafeico y ácido ferúlico por CLAE-DAD, utilizando los patrones correspondientes.

Dos extractos etanólicos Bv y Cv (obtenidos desde la biomasa cultivada con 2,5 y 5,0 % de CO₂ provenientes del gas de fermentación de la viña Miguel Torres) presentaron un porcentaje significativo de inhibición de la 15-lipoxigenasa de soya de un $29,5 \pm 6,2$ y un $48,5 \pm 1,1$ µg/mL respectivamente. Dichos porcentajes de inhibición son menores a los obtenidos con el compuesto de referencia (ácido cafeico).

ABSTRACT

Determination of total phenols and activity on 15-lipoxygenase of extracts of *Arthrospira platensis* produced with CO₂ capture

Spiruline (*Arthrospira platensis*), is a microalgae whose studies shows that it has antioxidant, antiviral, antihistaminic, antiinflammatory and immunostimulant activity, further, effects such as antianemic, anticancerous, anticoagulant, antigenotoxic, antihepatotoxic, antiparasitic, hypoglycemic and hypolipidemic were also reported. Within the studies of the antiinflammatory activity of this microalgae, there are no antecedents of its inhibitory effect on 15-lipoxygenase.

On this work, a comparative study from distinct cultures of *A. platensis* using two sources of CO₂ in several concentrations was performed. The compared variables were: growth and production of biomass of the cultures, yield and chromatography profile by thin layer chromatography and for HPLC-DAD of the different extracts, total content of phenols, and inhibitory activity of soy 15-lipoxygenase of the ethanolic extracts that presented a higher content of phenolic compounds.

The cultures that presented a higher cellular growth rate and a higher production of biomass were the cultures with addition of CO₂, either from Indura or Miguel Torres vineyard, in regard of the control cultures that does not received additional CO₂. The yield of the ethanolic extracts of the cultures that received additional CO₂ showed the highest value.

CO₂ addition produced a change in the amount of phenolic compounds, increasing its concentration in 50%, which was evidenced through Folin-Ciocalteu test. The absence of gallic acid, caffeic acid and ferulic acid was proved by HPLC-DAD, using the corresponding patterns.

Two ethanolic extracts, Bv and Cv (extracted from biomass cultivated with 2,5 and 5,0 % of CO₂ from fermentation gas from Miguel Torres vineyard) exhibit a significant inhibition percentage of soy 15-lipoxygenase of 29,5 ± 6,2 and 48,5 ± 1,1 µg/mL respectively. These percentages of inhibition are smaller compared with the reference compound (caffeic acid).

1. INTRODUCCIÓN

Arthrospira platensis Gomont 1892 (sin. *Spirulina platensis* Geitler 1925), cuyo nombre vulgar es espirulina, al igual que todas las especies del género *Arthrospira*, se encuentran habitando tanto aguas alcalinas como aguas dulces tales como ríos y manantiales [Ramírez y Olvera, 2006; Gershwin y Belay, 2008; Grande *et al.*, 2009].

Respecto a su morfología, es una cianobacteria que forma colonias filamentosas en forma de espiral con una vaina externa mucilaginosa. Las dimensiones celulares, dependen del enrollamiento celular y del largo que pueden llegar a ser los filamentos, que regularmente son solitarios y flotan libremente (*Fig. 1*). La pared celular de estas microalgas tienen una estructura y composición característica de las bacterias Gram-negativas constituida por peptidoglicano [Rodríguez y Triana, 2006].

El interés inicial de espirulina se centró principalmente en la riqueza de su contenido de proteínas, vitaminas, aminoácidos esenciales, minerales y ácidos grasos esenciales (anexo I). Está compuesta en un 60-70% de proteínas de su peso, contiene aminoácidos esenciales, incluyendo la leucina, isoleucina y valina. Es una rica fuente de vitaminas, especialmente vitamina B₁₂ y provitamina A (β -caroteno), y minerales especialmente hierro [Belay, 2002]. También contiene pigmentos como carotenos, clorofila *a* y *b* y ficocianina; este último utilizado en industrias de alimentos y cosméticos [Loreto *et al.*, 2007; Abd El-Baky *et al.*, 2008; Licet, 2008].

Otro atributo nutricional de *A. platensis* incluye los ácidos grasos insaturados esenciales, uno de los más importantes es el ácido γ -linolénico (6,9,12-ácido-octadecatrienoico) del cual esta microalga tiene un alto contenido [Koru, 2012].

El uso de *A. platensis* como alimento de humanos data desde los tiempos precolombinos, donde los aztecas la utilizaron como alimento y actualmente es consumida en forma de pastas y sopas por tribus africanas [Licet, 2008].

Dentro de los trabajos más importantes que se han realizado con esta cianobacteria, pueden mencionarse los relacionados con su utilización como suplemento alimenticio en dietas para humanos y animales, reductor del apetito, acuicultura, biorremediación, y como indicadoras y/o depuradoras de aguas contaminadas [Licet, 2008]. Por lo tanto, buscar innovaciones en las condiciones de cultivo es necesario para obtener una óptima productividad de biomasa.

Los numerosos parámetros que pueden influir en el crecimiento de las microalgas son: luz, temperatura, salinidad, adición de dióxido de carbono (CO₂) y de nutrientes, tamaño del inóculo, agitación, pH, entre otros [Ravelonandro *et al.*, 2011].

Los diferentes estudios muestran que agregar CO₂ al medio de cultivo de *Arthrospira* spp. en reactores cerrados, podría mejorar su tasa de crecimiento, debido a que produce una disminución del pH evitando condiciones excesivamente alcalinas (para un óptimo crecimiento el pH debe ser inferior a 11) [Gordillo *et al.*, 1999; Ravelonandro *et al.*, 2011].

El uso del CO₂ que 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, que es producido, por ejemplo, por las industrias de fermentación [Ravelonandro *et al.*, 2011]. Este efecto invernadero es un problema que preocupa a la comunidad científica internacional, por las consecuencias negativas que tiene sobre el medio ambiente y el hombre, ya que no sólo produce un aumento de la temperatura de la tierra, sino que también está relacionado con fenómenos climáticos catastróficos o extremos como: tormentas atípicas o sequías prolongadas, entre otros cambios [Rojas, 2004].

Desde el punto de vista farmacológico, varios estudios han demostrado que los extractos etanólicos, hidroalcohólicos y acuosos de *A. platensis* podrían tener ventajas fisiológicas tales como antioxidante, antimicrobiano, propiedades antiinflamatorias, antivirales o antitumorales [Jaime *et al.*, 2005].

También, investigadores han reportado efectos terapéuticos de *Arthrospira* spp. como un probiótico y estimulador del sistema inmune en animales incluyendo los peces, ya que aumenta el crecimiento de varios tipos de leucocitos [Koru, 2012].

Varias de esas actividades se deben a algunos de sus constituyentes, entre los que destacan el ácido graso poliinsaturado ω -6, β -caroteno, α -tocoferol, ficocianina, compuestos fenólicos y un polisacárido llamado ca-spirulan (Ca-SP) [Chamorro, 2002].

Arthrospira spp. contiene una variedad de antioxidantes, que incluyen al ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), caroteno y compuestos fenólicos.

Los polifenoles constituyen uno de los más numerosos y representativos grupos de metabolitos secundarios de las plantas [Vidal *et al.*, 2001]. Son antioxidantes activos que corresponden a un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos, sustituidos por funciones hidroxílicas [Ortiz, 2011].

Los mecanismos de acción por los cuales los distintos polifenoles cumplen sus funciones antioxidantes, pueden ser variados, sus formas más comunes de actuar son:

- Como antioxidante propiamente tal, neutralizan los radicales libres; evitando que su electrón desapareado sustraiga electrones de otras moléculas constituyentes del medio donde se encuentra. Esta acción impide que se genere una reacción en cadena, conocida como estrés oxidativo [Ortiz, 2011].
- En forma indirecta, actúan como agentes quelantes de iones metales de transición; es decir, se unen a estos iones reduciendo su capacidad de formar radicales libres [Casares, 2010].
- Debido a sus propiedades de solubilidad, pueden localizarse sobre las partículas de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), disminuyendo el consumo de antioxidantes propios de las LDL, como vitamina E y carotenoides, y en algunos casos regenerando la vitamina E oxidada en la partícula de LDL [Casares, 2010].

- Preservan la actividad de la paraoxonasa, enzima asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), permitiendo que se hidrolicen y regeneren los lípidos oxidados presentes en las LDL, estabilizando estas moléculas [Ortiz, 2011].
- Algunos polifenoles inhiben oxigenasas celulares y por tanto la producción de especies oxidantes del oxígeno y del nitrógeno dentro del cuerpo humano [Ortiz, 2011].

Diversos extractos acuosos o alcohólicos de esta microalga pueden neutralizar una variedad de radicales *in vitro* y exhibir una actividad antioxidante *in vivo* [Gershwin y Belay, 2008].

Miranda *et al.*, 1998, determinaron la actividad antioxidante de un extracto metanólico de *Arthrospira*. spp. tanto *in vitro* como *in vivo*. El ensayo *in vitro* de la peroxidación lipídica producida en cerebro homogenizado de rata fue inhibida casi un 95% con 0,5 mg de extracto. El IC₅₀ del extracto metanólico en este sistema fue de 180 µg. Mientras que en el ensayo *in vivo* para determinar las sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), la actividad antioxidante del plasma, expresada como porcentaje de inhibición de TBARS producido en homogenado de cerebro de rata, fue de un 97% y 71% para el grupo experimental (que recibía diariamente una dosis de 5 mg de extracto metanólico de espirulina y de un 74% y 54% para el grupo control (sin extracto agregado) después de 2 y 7 semanas respectivamente. El efecto antioxidante fue atribuido al trabajo individual o en sinergia de los compuestos fenólicos tales como: el ácido cafeico, salicílico, clorogénico, entre otros; además de β caroteno y tocoferol, los cuales se encuentran en el extracto metanólico de *Arthrospira*. spp.

Abd El-Baky *et al.*, 2009, observaron que los extractos etanólicos ricos en compuestos fenólicos de *Arthrospira* spp. tienen la capacidad de decolorar el radical DPPH.

El rango de valores de IC₅₀ del extracto etanólico de *Arthrospira* spp. fue de 23,22 a 35,62 µg/mL, los que comparados con 18,8, 16,6 y 14,80 mg/mL del α-tocoferol, butil hidroxitolueno (BHT) y butil hidroxianisol (BHA) respectivamente, resulta una actividad de apagamiento del radical 2,2 difenilpicrilhidrazil (DPPH) por esta microalga comparable a estos antioxidantes comerciales. Además postularon que el extracto etanólico podría proteger el hígado contra la peroxidación lipídica inducida por CCl₄ *in vitro*.

Estudios químicos previos realizados sobre esta microalga describen la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos a partir de extractos etanólicos [Abd El-Baky *et al.*, 2009]; identificándose además los principales ácidos fenólicos: gálico, cafeico, salicílico, cinámico, clorogénico, cumárico y ferúlico, todos con actividad antioxidante [Miranda *et al.*, 1998] y antiinflamatoria [Vidal *et al.*, 2001; Fernández y Torres, 2005] (*Fig.2*).

Se ha postulado que los mecanismos moleculares que explican la propiedad antioxidante de esta microalga son la capacidad que muestran sus compuestos fenólicos de neutralizar los radicales libres donando hidrógenos o electrones y por su potencial como agentes reductores, y agentes quelantes [Vidal *et al.*, 2001]. Mientras que su actividad antiinflamatoria se debe a que estos compuestos ejercen su acción farmacológica interfiriendo la producción de diferentes mediadores químicos del proceso inflamatorio, donde destaca el ácido cafeico por su propiedad antioxidante, asimismo inhibe la producción de óxido nítrico (NO), inhibe la 5-lipoxigenasa (5-LOX) reduciendo la producción de leucotrieno B₄ (LTB₄) [Fernández y Torres, 2005].

Los objetivos de esta memoria son: realizar un estudio comparativo entre distintos cultivos de *Arthrospira platensis* sometidos a diferentes concentraciones y fuentes de CO₂ (de la viña Miguel Torres y de Indura), evaluando en forma comparativa el porcentaje de crecimiento y producción de biomasa, rendimientos y contenido de fenoles totales de los extractos.

Además de analizar comparativamente por cromatografía en capa fina y por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector UV con arreglo de fotodiodos (CLAE-DAD) el perfil de compuestos fenólicos de los diferentes extractos. Los extractos etanólicos fueron evaluados para determinar su actividad inhibitoria sobre la 15-LOX de soya ya que presentaron un mayor contenido de fenoles totales.



Figura 1: *Arthrospira platensis* vista del microscopio a 400x, en cultivos y como biomasa seca respectivamente.
(Fuente: <http://en.wikipedia.org/wiki/Microphyte>, 2014)

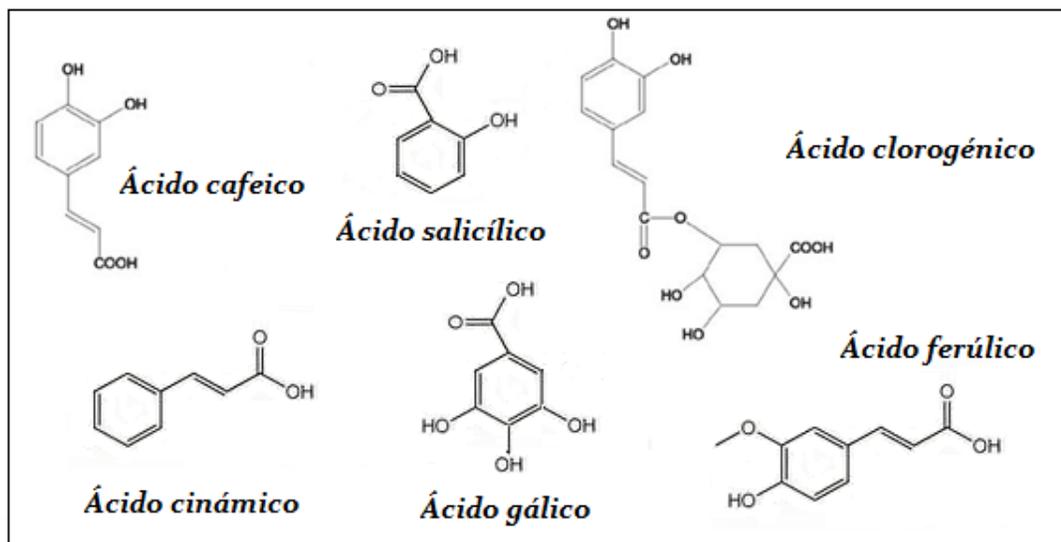


Figura 2: Principales ácidos fenólicos descritos previamente en *Arthrospira platensis*.

2. HIPÓTESIS

- *Arthrospira platensis* cultivada con distintas concentraciones de CO₂ de dos orígenes, presenta diferencias en el crecimiento y producción de biomasa, en los rendimientos, contenido de fenoles totales y perfil de compuestos fenólicos de los diferentes extractos.
- La actividad inhibitoria de la 15-lipoxigenasa de soya de los extractos etanólicos se debe a la presencia de compuestos fenólicos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si existen diferencias en cuanto a la composición química y el comportamiento entre los extractos obtenidos de cultivos de *Arthrospira platensis* producidos con CO₂ en distintas concentraciones y proveniente de dos orígenes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar en forma comparativa la cantidad de biomasa producida por los diferentes cultivos de *Arthrospira platensis* con distintas concentraciones y distintos orígenes de CO₂.
- II. Demostrar si los aportes de CO₂ producen un cambio tanto en el rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos a partir de las biomásas provenientes de los distintos cultivos de *Arthrospira platensis*, como también en el contenido de fenoles.
- III. Demostrar si los aportes de CO₂ producen un cambio en el perfil de compuestos fenólicos de los distintos extractos obtenidos desde diferentes cultivos de esta microalga.
- IV. Determinar la inhibición de la enzima 15-lipoxigenasa de soya de los extractos con mayor contenido de fenoles totales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental se realizó de acuerdo al siguiente esquema (*Fig.3*).

4.1 Reactivos

Los cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄, el reactivo de Folin-Ciocalteu, así como también los solventes de grado de laboratorio rectificadas utilizados para realizar las extracciones (hexano, diclorometano y etanol), el agua y metanol grado HPLC usados en los experimentos fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

El patrón de ácido cafeico, ácido gálico y ácido ferúlico fueron adquiridos desde Sigma-Aldrich, USA.

Kit de inhibición de la enzima lipoxigenasa “Lipoxygenase inhibitor screening assay kit” (Item N° 760700), 15-lipoxigenasa soya ítem N° 60700, Cayman Chemical Company, USA. Cualquier otro reactivo fue de grado analítico.

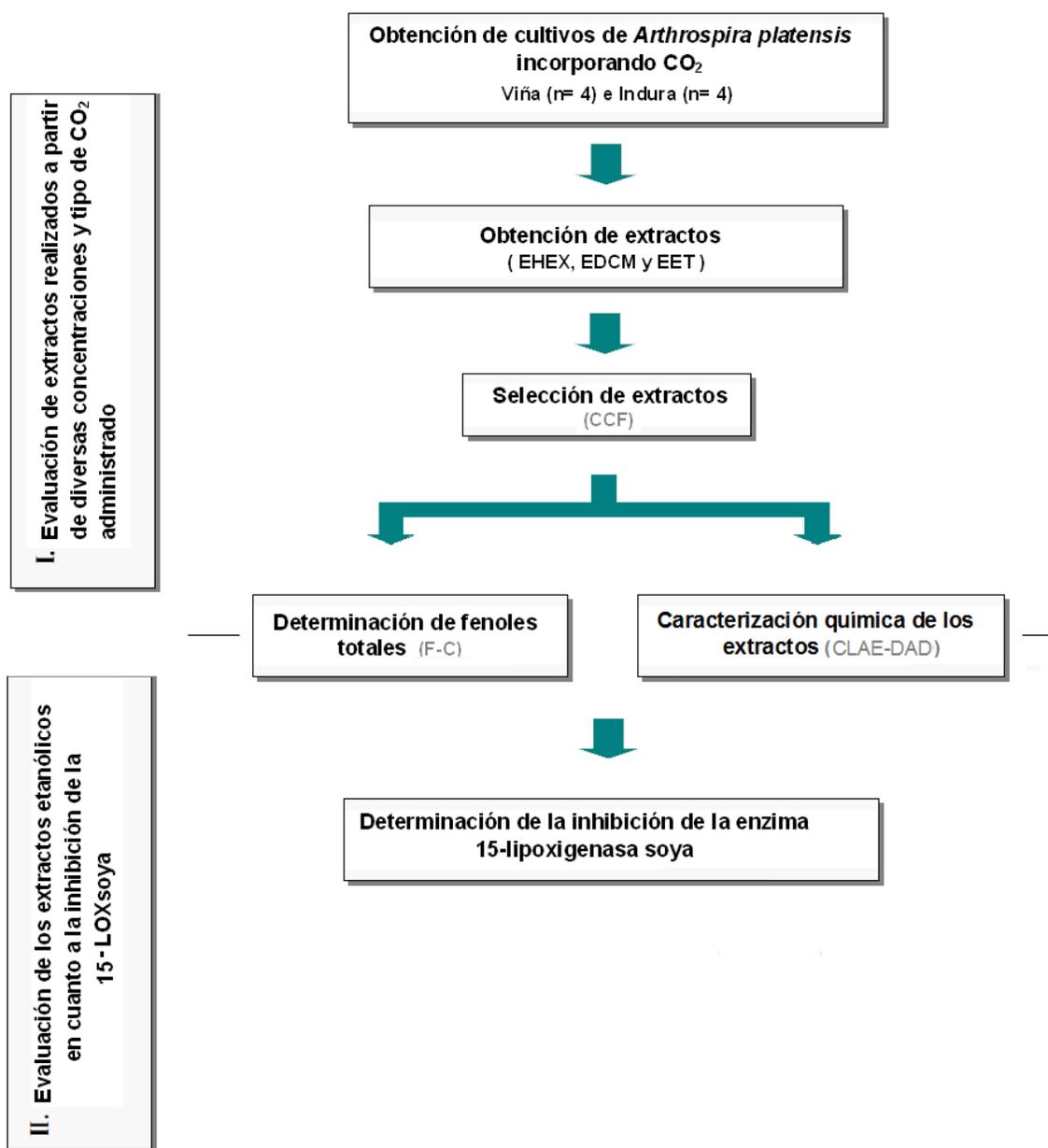


Figura 3: Esquema general del diseño experimental.

EHEX= extracto hexánico de *A. platensis*; EDCM= extracto de diclorometano de *A. platensis*; EET= extracto etanólico de *A. platensis*; CCF= cromatografía en capa fina; F-C= Folin-Ciocalteu; CLAE-DAD= cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector UV con arreglo de fotodiodos.

4.2 Cultivos de la cianobacteria incorporando CO₂

Los cultivos se realizaron con la cepa de *Arthrospira platensis*, que se obtuvo de la colección de microalgas de la Universidad de Coimbra (UCO), Portugal, en el año 2009 (PCO-20090605). Tanto el desarrollo de los cultivos, así como la obtención de la biomasa de esta microalga se realizaron en las dependencias del Laboratorio de AeonBiogroup.

Los cultivos se iniciaron con un tamaño de inóculo de 157 mL correspondiente a 0,4 UA a $\lambda=584$ nm, en matraces erlenmeyer de 1 L de capacidad, empleando el medio Zarrouk al 20% (anexo II). La mezcla de reactivos más el agua destilada para la preparación de este medio de cultivo, se esterilizó en autoclave (20 minutos a 15 lb pgl^2) para volúmenes menores a 3 L [Castro y Navarro, 2009]. Así mismo, todos los recipientes utilizados para el cultivo de microalgas así como todo material que entró en contacto con el cultivo fue autoclavado previamente [Martínez, 2008].

En total se montaron 8 tipos de cultivos de la microalga *Arthrospira platensis* en quintuplicado. Las diferencias entre ellos corresponden a la concentración de CO₂ incorporado (0; 2,5; 5 y 7,5% de CO₂) más el tipo de fuente del cual proviene este gas. Uno de los tipos de CO₂ suministrado se obtuvo mediante la fermentación del vino de la viña Miguel Torres (anexo III), mientras que el otro se trata de CO₂ grado alimenticio (Indura) (Tabla 1).

La línea A estuvo a una concentración aproximada de CO₂ de 0%, la B a 2,5%, la C a 5% y la D a 7,5%. Por ejemplo, para la línea A cada matraz estaba etiquetado con su denominación, A1, A2, A3, A4, A5.

Nombre cultivo	% de CO ₂ + aire	Fuente de CO ₂
Av	0	viña
Bv	2,5	viña
Cv	5	viña
Dv	7,5	viña
Ai	0	Indura
Bi	2,5	Indura
Ci	5	Indura
Di	7,5	Indura

Tabla 1: Denominación y aportes de diferentes cantidades de CO₂ de los cultivos de *Arthrospira platensis*.

Las condiciones de cultivo que se utilizaron para favorecer su crecimiento fueron: fotoperíodo 9:15 horas (luz: oscuridad) para lo cual se ocuparon lámparas fluorescentes acopladas a un temporizador, aireación constante, pH entre 9-10 y temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ [Santiago, 2004; Rodríguez y Triana, 2006].

Estos factores influyeron en el crecimiento de *A. platensis* y en la composición de su biomasa producida por cambios en su metabolismo, los cuales modificaron considerablemente la producción de sus principales componentes [Vieira *et al.*, 2003; Licet, 2008].

El suministro diario de CO₂ fue de 4 horas continuas y el porcentaje de CO₂ entregado en cada línea de cultivo, se estableció gracias a un medidor de concentración de CO₂ (CO₂ meter), con el fin de que se conserven los valores (en %) señalados anteriormente (Fig. 4). Cada línea de cultivo tuvo 6 salidas con mangueras que llevaron el aire y el CO₂, los cuales fueron mezclados previamente gracias a un “blower”. Una de estas salidas estuvo libre y se conectó el medidor de CO₂ para medir la concentración de este.

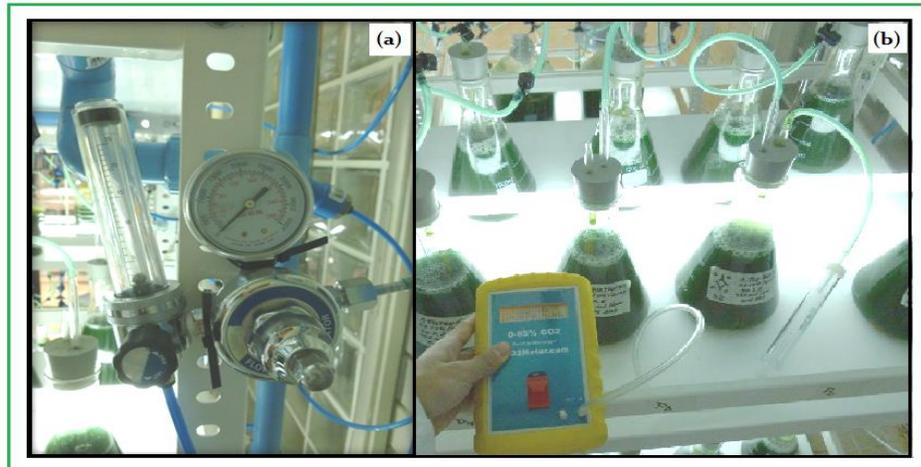


Figura 4: Monitoreo del % de CO₂ a los cultivos (a) Válvula que regula el flujo de CO₂ en una línea de cultivo; (b) Medición del % de CO₂ desde los cultivos.

4.3 Determinación del crecimiento celular

El crecimiento de los cultivos de *Arthrospira* spp., se monitoreó diariamente utilizando los métodos de espectrofotometría y recuento al microscopio [Santiago, 2004]. Para esto, se esperó que se cumpliera el periodo establecido de aporte de CO₂ y una vez cerrado éste, se procedió a aforar cada matraz con agua destilada y se obtuvieron las muestras. Estas fueron de 1,5 mL tomadas con una pipeta plástica por cada matraz y se almacenaban en un tubo Eppendorf para su posterior análisis, sin ser expuestas a la luz o al aire (Fig. 5).



Figura 5: Ejemplo de una toma de muestra de los cultivos de *Arthrospira platensis*.

4.3.1 Espectrofotometría

El crecimiento de los cultivos se midió diariamente registrando los cambios de absorbancia por el crecimiento poblacional.

En el caso de las muestras de *Arthrospira platensis*, estas fueron diluidas a 1/8, es decir, 0,5 mL de muestra diluida en 3,5 mL de agua destilada (cada cubeta tenía una capacidad de 4 mL), y medidas a una $\lambda = 584$ nm con un espectrofotómetro uv-visible Jenway 6320D.

El valor de absorbancia no fue una medida real de biomasa, pero sí permitió observar los cambios de concentración de un cultivo con el tiempo [Martínez, 2008]. Además, la exactitud de esta metodología es alta y confiable [Rodríguez y Triana, 2006].

4.3.2 Número de células

La densidad celular se calculó diariamente mediante el recuento al microscopio Quimis de alícuotas de 1 mL de muestra en una cámara de Sedgewick-Rafter (este tipo de cámara es específica para el conteo de microalgas y permitió seguir el crecimiento del cultivo), se realizaron diluciones en caso necesario (Fig. 6).

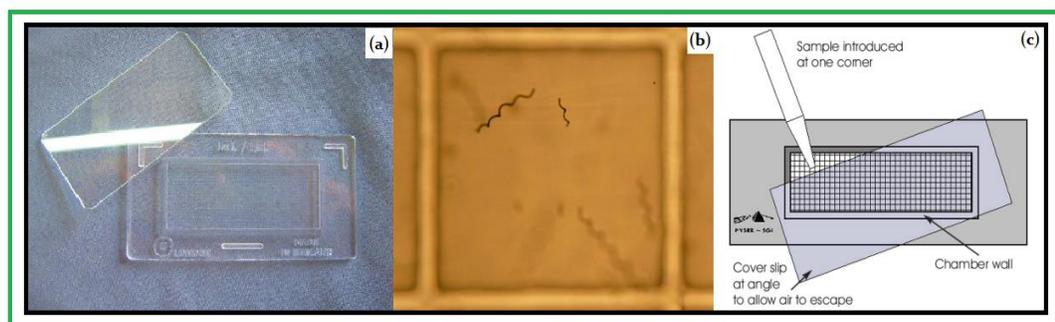


Figura 6: (a) Cámara de conteo Sedgewick-Rafter; (b) cuadrado con *A. platensis* a un aumento de 40X; (c) forma de llenado de la misma respectivamente. (Fuente: Technical Notes, Counting Chambers, Sedgewick-Rafter Counting Chamber. Pyser-SGI Limited. United Kingdom, 2010)

La densidad celular se calculó considerando el promedio de células (C) cada 15 cuadrantes (una fila al azar de 10 cuadrados y una columna al azar de 5 cuadrados) y la dilución realizada (dil) (*Ecuación 1*):

$$\text{Densidad celular (cel} \times \text{mL}^{-1}) = C \times 10^3 \times \text{dil}$$

Ecuación 1: Determinación de la densidad celular de los cultivos

4.4 Obtención de la biomasa

Los cultivos mencionados anteriormente fueron cosechados cuando cada uno de estos alcanzó un volumen de 5 litros en la etapa de crecimiento celular correspondiente al término de la fase exponencial (*Fig.7, 9 y 10*), a los 23 días de cultivo [Binaghi, 2003]. Se escogió esta fase, ya que en las próximas no hay un incremento neto de la población celular y luego viene la etapa de decaimiento del cultivo. Después de pasar los cultivos por un sistema de filtrado con tamices se obtuvo una masa semisólida moldeable (*Fig.8*), la que posteriormente fue llevada al estante de secado que consta de un calefactor, un termómetro y varios pisos, donde fueron ubicadas las bandejas con biomasa húmeda a no más de 40°C. Cada línea cosechada (A, B, C, D) se agrupó en una sola biomasa, las cuales se relacionan a cada concentración y tipo de CO₂ administrado, así se obtuvieron 8 biomosas distintas. Una vez seca la biomasa (en forma de hojuelas) se transfirió a una bandeja de aluminio. De esta forma, fue pesada y etiquetada con el nombre de la línea (A, B, C, D) y tipo de CO₂. Además, se almacenaron protegidas de la luz y de la humedad para realizar los extractos.

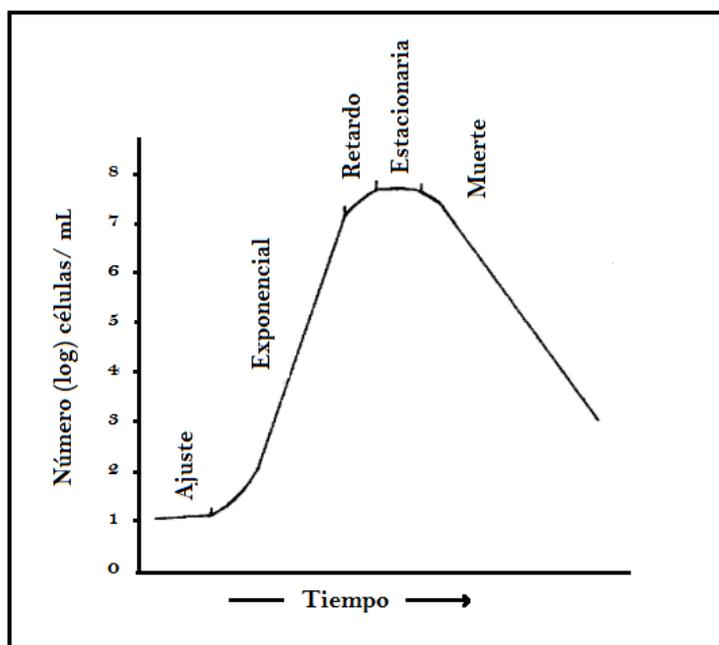


Figura 7: Fases del desarrollo de un cultivo de microalgas.

(Fuente: Manual ficológico algas para la vida, 2009)



Figura 8: Procedimiento de cosecha de *Arthrospira platensis* (a) Biomasa al pasar por los filtros; (b) Biomasa en bandejas al interior del secador.

4.5 Preparación de los extractos

Los diferentes extractos fueron obtenidos en el laboratorio de productos naturales de la Universidad de Chile, así como también se realizaron todos los ensayos químicos posteriores.

La biomasa seca y molida, correspondiente a 2,00 g por cada tipo de cultivo, se maceró con distintos solventes crecientes en polaridad (utilizando 200 mL de cada uno), partiendo con hexano, siguiendo con diclorometano y terminando con etanol. El extracto se filtró usando papel filtro Whatman No. 1, al filtrado se le eliminó completamente cada solvente por evaporación a presión reducida y secado utilizando un rotavapor Büchner, obteniéndose extractos concentrados secos. El procedimiento de cambio de solvente, se realizó después de 24 horas de agitación continua y bajo condiciones de oscuridad, con la finalidad de obtener los compuestos polares, presentes en el último solvente [Valle *et al.*, 2009; Viveros, 2009].

Se obtuvieron 8 extractos secos por cada solvente, correspondientes a las distintas concentraciones de CO₂ administradas (0; 2,5; 5 y 7,5% de CO₂) tanto del gas proveniente de Indura y de la viña Miguel Torres. Luego todos los extractos fueron analizados por CCF y sólo los EET por CLAE-DAD. Además, los EET de los distintos cultivos fueron evaluados frente al ensayo de inhibición de la 15-LOXsoya. Se prepararon soluciones madres de 5 mg/mL para los análisis cromatográficos y de 200 µg/mL para los ensayos de inhibición de 15-LOXsoya.

4.6 Monitoreo de los extractos mediante cromatografía en capa fina

Los extractos obtenidos de hexano, diclorometano y etanol fueron sometidos a la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) conocida por ser eficaz y versátil en la identificación de posibles familias de compuestos [Mendiola, 2008].

En el presente estudio se empleó para comparar y determinar en forma cualitativa grupos de compuestos descritos previamente en *Arthrospira* spp. como ácidos fenólicos y flavonoides, y como éstos variaban de un cultivo a otro. Con este fin los cromatofolios fueron visualizados a 365 nm antes y después de revelarlos con el reactivo NP/PEG.

Para llevar a cabo el análisis se sembró 6 veces cada extracto a 5000 ppm sobre el cromatofolio. Una vez seca la muestra, se introdujo el cromatofolio en una cámara que contenía la fase móvil, la cual se seleccionó previamente, y es la siguiente: hexano y acetona (60:40, v/v) [Abd El-Baky *et al.*, 2008]. La fase móvil subió por capilaridad en el cromatofolio arrastró y separó los distintos componentes de la muestra en función de su polaridad. Cuando la fase móvil alcanzó el borde superior del cromatofolio (0,5 cm), éste fue retirado de la cámara y secado a temperatura ambiente hasta total evaporación de los solventes [Queupil, 2011].

Las placas fueron observadas al visible y a luz ultravioleta a longitudes de onda de 254 y 365 nm antes y después de revelar.

Los reactivos reveladores utilizados fueron: p- anisaldehído (PAS) (0,5 mL de anisaldehído, 10 mL ácido de acético glacial, 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado), Liebermann- Burchard (LB) (5 mL de anhídrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 50 mL de etanol absoluto) o NP/PEG (2-aminoetil difenilborinato al 1% en metanol y posterior aplicación de polietilen glicol). Liebermann- Burchard al visible detecta saponinas, esteroides y triterpenoides, de igual manera p-anisaldehído detecta este último grupo, y NP/PEG a 365 nm fenoles en general (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, entre otros).

Según Wagner y Bladt, 1996, los compuestos fenólicos presentaron fluorescencias amarilla, anaranjada o rojiza para flavonoides y blanco-azulada para ácidos fenólicos al UV-365 nm después de revelar con NP/PEG. Así mismo, fueron guardados registros fotográficos de cada cromatofolio.

4.7 Determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu

Como el objetivo de esta investigación fue determinar los posibles flavonoides y ácidos fenólicos presentes en los cultivos de *Arthrospira platensis* cultivados con distintas inyecciones de CO₂ se cuantificó el contenido de fenoles totales solo de los EET. Dichos extractos fueron los que presentaron mayores indicios de poseer estos compuestos tras la realización del análisis químico por CCF. Se sabe además que los compuestos fenólicos están presentes en forma mayoritaria en los extractos etanólicos debido a su naturaleza polar.

Para la determinación de la cantidad de fenoles totales presente en los EET de *A. platensis* se utilizó el ensayo colorimétrico de micro Folin-Ciocalteu, el cual se fundamentó en la reacción de óxido-reducción entre compuestos reductores y el reactivo de Folin-Ciocalteu, en la cual ocurrió una transferencia alcalina de electrones reduciendo el complejo fosfomolibdico/fosfotúngstico a un cromógeno azul el cual fue medido por colorimetría [Piña, 2011].

Se prepararon soluciones etanólicas a partir de los 8 EET de *A. platensis* a una concentración de [1,25 mg/mL]. Luego se tomó 100 µL de cada solución en tubos eppendorf ámbar, las que fueron mezcladas con 100 µL del reactivo de Folin Ciocalteu, se dejó reposar las muestras por 2 minutos. A continuación se añadió 800 µL de una solución 5% p/v de carbonato de sodio y se dejó reposar los 8 tubos por 20 minutos en un baño termorregulado a 40°C, los que posteriormente fueron enfriados en un baño con hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia de las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro Unicam UV-VIS [Cicco *et al.*, 2009] (*Tabla 2*).

El valor de fenoles totales fue expresado en µg/mL de ácido gálico, para lo cual se estableció una curva de calibración en un rango de 2-8 µg/mL (*Fig.14*) [Abd El-Baky *et al.*, 2009].

El contenido de fenoles totales se determinó por triplicado mediante el análisis de las ecuaciones obtenidas utilizando el programa Statgraphics Centurion.

Los resultados se presentaron como mg ácido gálico/ g de biomasa seca \pm SD y como mg ácido gálico/ g de extracto \pm SD. La significancia de los resultados fue determinada por el método ANOVA de una vía y análisis de comparaciones múltiples de Tukey para no paramétricos.

	Análisis	Blanco
1. Solución de extracto etanólico	100 μ L	—
2. Etanol	—	100 μ L
3. Reactivo de Folin-Ciocalteu	100 μ L	100 μ L
Agitar y esperar por 2 min		
4. Na ₂ CO ₃ (5%)	800 μ L	800 μ L
Agitar y se llevar a un baño termostático a 40°C por 20 min		
Enfriar y rápidamente leer su absorbancia a 765 nm		

Tabla 2: Protocolo de la determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu.

4.8 Análisis de los extractos mediante CLAE-DAD de los EET

El CLAE es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en los tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

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

El perfil de los compuestos fenólicos determinado en forma comparativa de los EET se evaluó empleando un equipo de CLAE Waters 600 C acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos Waters 996 y equipado con un inyector automatizado Waters 717 plus.

Antes de analizar las muestras fue necesario utilizar dos tipos de filtros:

1. Filtro de microfibras de vidrio GF/F 47 mm diámetro que retuvo la clorofila.

2. Filtro de membrana de PVDF 0,22 μm de poro/13 mm de diámetro 1000/CX que retuvo impurezas de la muestra y del solvente.

El método que se empleó es una modificación del desarrollado por Liang *et al.*, 2009. La separación se realizó a temperatura ambiente en una columna Hibar Purospher Star Merck RP-18 (250 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula), se utilizó como mezcla la fase móvil isocrática compuesta por acetonitrilo y ácido fórmico 0,1% (12:88, v/v). El caudal de fase móvil se mantuvo constante a 1,0 mL/min y se utilizó una $\lambda = 280$ nm. El volumen de inyección fue de 20 μL de una disolución de 5 mg de extracto en 1 mL de etanol.

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

4.8.1 Determinación de la presencia de compuestos fenólicos previamente descritos en *Arthrospira ssp.*

La determinación de la presencia de los ácidos gálico, cafeico y ferúlico en los EET se realizó por CLAE-DAD bajo las siguientes condiciones: columna Hibar Purospher Star Merck RP-18 (250 mm x 4 mm de diámetro interno; tamaño de partículas: 5 μm), fase móvil isocrática acetonitrilo y ácido fórmico 0,1% (12:88, v/v), flujo 1 mL/min a $\lambda = 280$ nm. Se emplearon estándares primarios de los ácidos fenólicos mencionados anteriormente.

4.9 Análisis de la inhibición de la enzima 15-lipoxigenasa de soya de los EET

Para evaluar la capacidad inhibitoria de la 15-LOXsoya y la IC_{50} de los extractos etanólicos obtenidos, se utilizó el kit de inhibición de la enzima lipoxigenasa “Lipoxygenase inhibitor screening assay kit” (Cayman Chemical Item N° 760700).

El ensayo de inhibición de la enzima purificada 15-LOXsoya detectó y midió los hidroperóxidos producidos en las reacciones de lipoxigenación.

4.9.1 Reactivos a preparar

Se requirió preparar antes del ensayo: un tampón de ensayo (buffer) (Item N° 760710), el cual se diluyó con 3 mL de tampón en 27 mL de agua grado HPLC (0,1 M Tris- HCL, pH 7,4) y se almacenó a 4°C. Cromógeno, se mezcló volúmenes iguales del Reactivo de revelado 1 (Item N°767011) y el Reactivo de revelado 2 (Item N°767012). El volumen de cromógeno fue preparado dependiendo de la cantidad de pocillos ensayados (100 µL por cada pocillo). Estándar 15-LOXsoya, en un vial se transfirió 10 µL de la enzima, se diluyó con 990 µL del tampón de ensayo diluido y se almacenó en hielo. Enzima 15-lipoxigenasa de soya (Item N° 60700) se diluyó 1:2000 µL de tampón de ensayo diluido. Sustrato: ácido linoléico (Item N° 760716), en un vial se agregó 25 µL del sustrato y 25 µL hidróxido de potasio (Item N° 760713), esta mezcla se diluyó con 950 µL de agua grado HPLC (1 mM) y se almacenó a -20 °C.

4.9.2 Protocolo del ensayo

El ensayo se realizó en triplicado y en distintas concentraciones para determinar la concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀) del compuesto de referencia el ácido cafeico. Para los EET obtenidos desde la biomasa de los distintos cultivos de *A. platensis*, el ensayo se realizó a una concentración de 200 µg/mL [Szymanowska *et al.*, 2009].

En una placa de 96 pocillos se agregó lo siguiente (*Tabla 3*): el pocillo blanco (A) 100 µL de tampón, en otro se adicionó 90 µL de enzima LOX + 10 µL de ácido cafeico para realizar el control positivo (pocillo B), luego en los pocillos (C) se determinó el 100% de actividad, con 10 µL del solvente de las muestras (etanol) + 90 µL de 15-LOXsoya. Los pocillos (D) se utilizaron para las muestras, donde se agregaron 10 µL de los extractos etanólicos de *Arthrospira platensis* (200 µg/mL) o de ácido cafeico en concentración ascendente (25-150 µg/mL) + 90 µL de 15-LOXsoya [Szymanowska *et al.*, 2009].

Para comenzar la reacción se agregaron 10 μL de sustrato (ácido linoléico), luego se agitó por 5 min para que la reacción ocurra. Para detener la catálisis de la enzima y desarrollar la reacción, se agregaron 100 μL de cromógeno a cada pocillo, luego se agitó por otros 3 min y finalmente se leyó a $\lambda = 490 \text{ nm}$ [Yamamoto, 1992; Gaffney, 1996].

El análisis de datos se determinó restando la absorbancia del blanco con respecto a la absorbancia del 100% de actividad inicial, y de las muestras, con la absorbancia del blanco. El porcentaje de inhibición (%I) se determinó con la Ecuación 2 [Yamamoto, 1992; Gaffney, 1996]. De la curva dosis-respuesta se obtuvo la concentración inhibitoria cincuenta IC_{50} (concentración en la que hay una inhibición del 50%).

$$\%I = [(AC-AA) - (AD-AA) / (AC-AA)] \times 100$$

Ecuación 2: Porcentaje de inhibición de la enzima 15-lipoxigenasa de soya.

Dónde:

- AA/AC/AD= absorbancia de los pocillos A, C y D respectivamente
- AC-AA= Absorbancia inicial
- AD-AA= Absorbancia en presencia de las muestras

MICROPLACAS	A	B	C	D
1. Tampón de ensayo	100 µL	—	—	—
2. 15-LOXsoya	—	90 µL	90 µL	90 µL
3. Ácido cafeico	—	10 µL	—	—
4. Solvente inhibidores	—	—	10 µL	—
5. Muestras	—	—	—	10 µL
Inicio de la reacción				
6. Sustrato	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Agitar y esperar por 5 min				
7. Cromógeno	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar y esperar por 3 min				
Lector de ELISA a 490 nm				
Volumen total	210 µL	210 µL	210 µL	210 µL

Tabla 3: Protocolo del ensayo de inhibición de la enzima 15-lipoxigenasa de soya. A= Blanco; B= Control positivo; C=100% de actividad; D= Muestras

4.9.3 Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio de tres determinaciones independientes $\%I \pm S.D.$, los cuales fueron sometidos a análisis de varianza de una vía ANOVA y test de Tukey mediante el software GraphPad Prism 5.0, considerándose estadísticamente significativos para un $p \leq 0,05$ (anexo VI).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación del crecimiento de los cultivos

Como todos los organismos fotosintéticos, *A. platensis* fue capaz de usar el CO₂ como una fuente de carbono más la energía luminosa para su crecimiento, como lo confirmaron algunos autores [Martínez, 2008; Ravendrolandro *et al.*, 2011].

El crecimiento poblacional, se demostró midiendo los cambios del número de células por mL así como la absorbancia de los cultivos de *Arthrospira platensis* con diferentes concentraciones y fuentes de CO₂ (Fig. 9 y 10) [Benoit, 2013; Lizana, 2013]. Se aprecia, que después del montaje de los cultivos, el crecimiento de esta cianobacteria en todos los tratamientos ensayados se mantuvo sin cambios significativos durante los primeros días, la tasa de crecimiento específico fue baja y se incrementó paulatinamente con el tiempo de desarrollo del cultivo y la capacidad biológica de adaptación de la cepa, lo cual es indicativo de una fase de adaptación o ajuste (Fig. 7) [Rodríguez y Triana, 2006; Licet, 2008]. A partir de allí, se observó un aumento del crecimiento, la fase exponencial, que se extiende a lo largo del primer tramo lineal de mayor pendiente, comprobándose que los cultivos de *A. platensis* se han adaptado a las condiciones de crecimiento. La intensidad lumínica no fue una limitante, y los cambios en la concentración de nutrientes causada por la adaptación fueron tan bajos que el efecto en el crecimiento del cultivo no fue significativo.

En un cultivo, sin luz ni nutrientes limitados, el incremento en la biomasa de la microalga (expresada como peso seco, número de células, densidad óptica, etc.) por unidad de tiempo, fue proporcional a la biomasa inicial del cultivo [Rodríguez y Triana, 2006]. El crecimiento continua hasta la tercera fase o de retardo, el cual es más lento porque el aumento de la densidad celular impide la penetración de la luz al interior del cultivo por el llamado efecto de autoensombrecimiento.

Esta fase de crecimiento lento no debe considerarse como una fase estacionaria, puesto que no hay escasez de nutrientes y los cultivos están aumentando su población celular, sino como una fase de crecimiento exponencial lento por limitación de luz [Martínez, 2008].

Durante la cuarta fase (fase estacionaria), con una disminución de la tasa de crecimiento, el metabolismo oxidativo de síntesis de sustancias llega a reducir el constante aumento de biomasa. En este punto del crecimiento, la curva presenta el valor aproximado máximo de concentración de biomasa, aquí se alcanza el equilibrio entre la concentración máxima de biomasa y la pérdida debida a los procesos de degradación [Rodríguez y Triana, 2006]. Finalmente, en la fase de muerte, las células liberan materia orgánica. Esta fase ocurre por las condiciones desfavorables del ambiente sobre el cultivo y el limitado suplemento de luz y nutrientes [Rodríguez y Triana, 2006]. En este estudio, estas tres últimas fases no se alcanzaron, ya que se realizó la cosecha de los cultivos, en la fase exponencial a los 23 días de cultivo (*Fig.9 y 10*).

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 éstos, sin embargo, se observó como tendencia que el crecimiento óptimo se logró 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. Este comportamiento indicó que, con la misma concentración de bicarbonato inicial, se pudo obtener una mayor productividad al adicionar CO₂, lo cual resultó muy ventajoso si se piensa en una producción a gran escala.

Esta diferencia implicó un mejor desempeño de *Arthrospira* spp. bajo la adición de CO₂, ya que éste fue asimilado del medio durante su crecimiento, el cual se recupera rápidamente por la adición de CO₂ artificial, de manera que la fuente de carbono fue abundante. Sin embargo no todo el CO₂ fue retenido en el medio sino que fue liberado a la atmósfera debido a su gran presión parcial [Rodríguez y Triana, 2006]. Este comportamiento fue también descrito en *Arthrospira platensis* por Ravelonandro, 2011 y en otras microalgas por Martínez, 2008, quienes observaron que el crecimiento poblacional en las microalgas aumentó a medida que se aumentó el porcentaje de CO₂ en los cultivos. Sin embargo, en los nuestros el incremento a un 7,5% de CO₂ no ocasionó una mayor producción de biomasa, lo que nos indicó que existiría una concentración de CO₂ límite para aumentar la productividad de las microalgas.

Las diferencias entre Ci (5% CO₂ Indura) y Cv (5% CO₂ viña) y el resto de los cultivos fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) (anexo V), mediante la prueba de Anova seguido de test de Tukey.

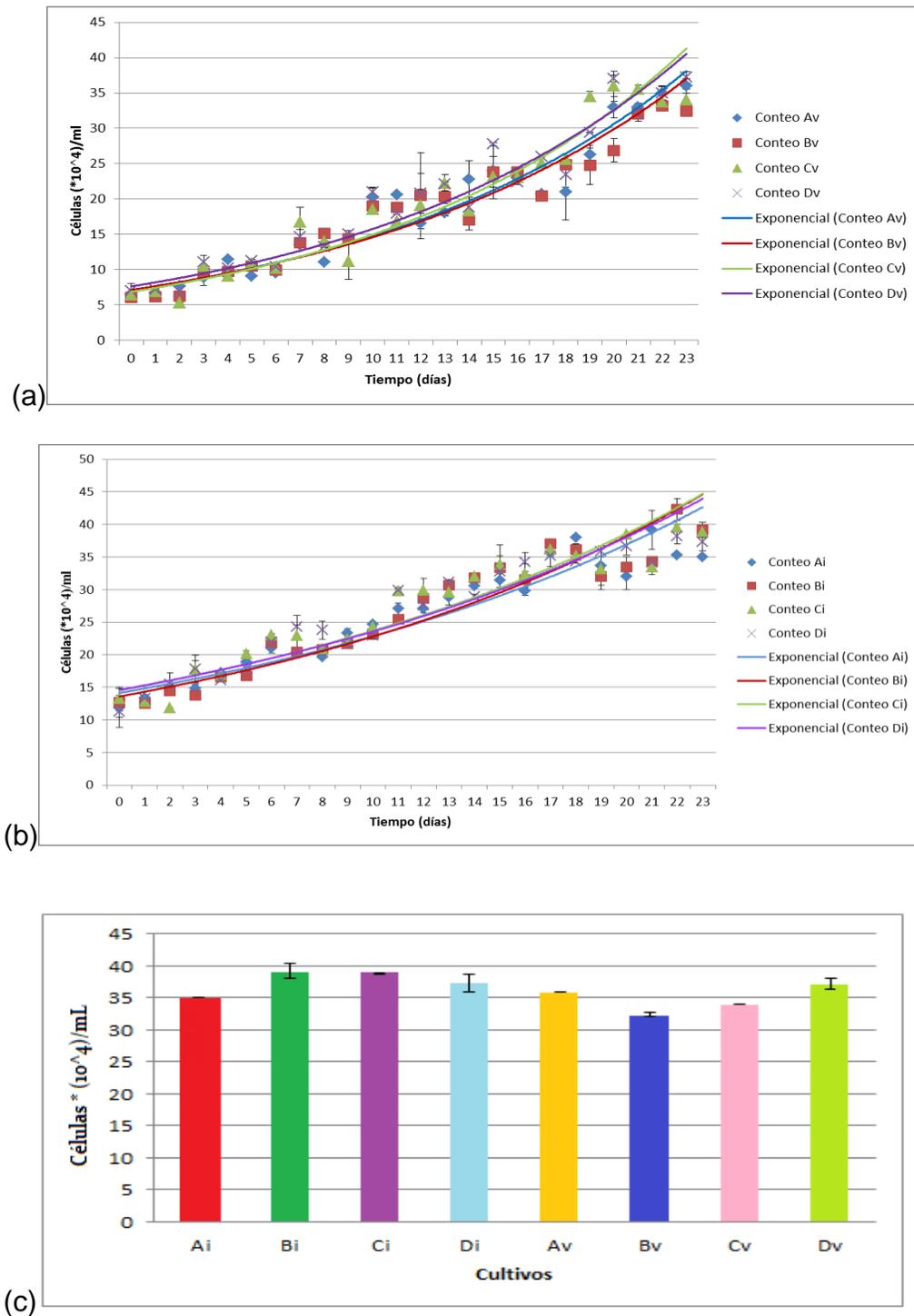


Figura 9: Crecimiento según densidad celular de los cultivos administrados con los distintos tipos de CO₂. (a) Cultivos a partir de CO₂ de la viña; (b) Cultivos a partir de CO₂ de Indura; (c) Cultivos en el día 23.

Ai= cultivo Indura 0% CO₂; Bi= cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci= cultivo Indura 5% CO₂; Di= cultivo Indura 7,5% CO₂; Av= cultivo viña 0% CO₂; Bv= cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv= cultivo viña 5% CO₂; Dv= cultivo viña 7,5% CO₂.

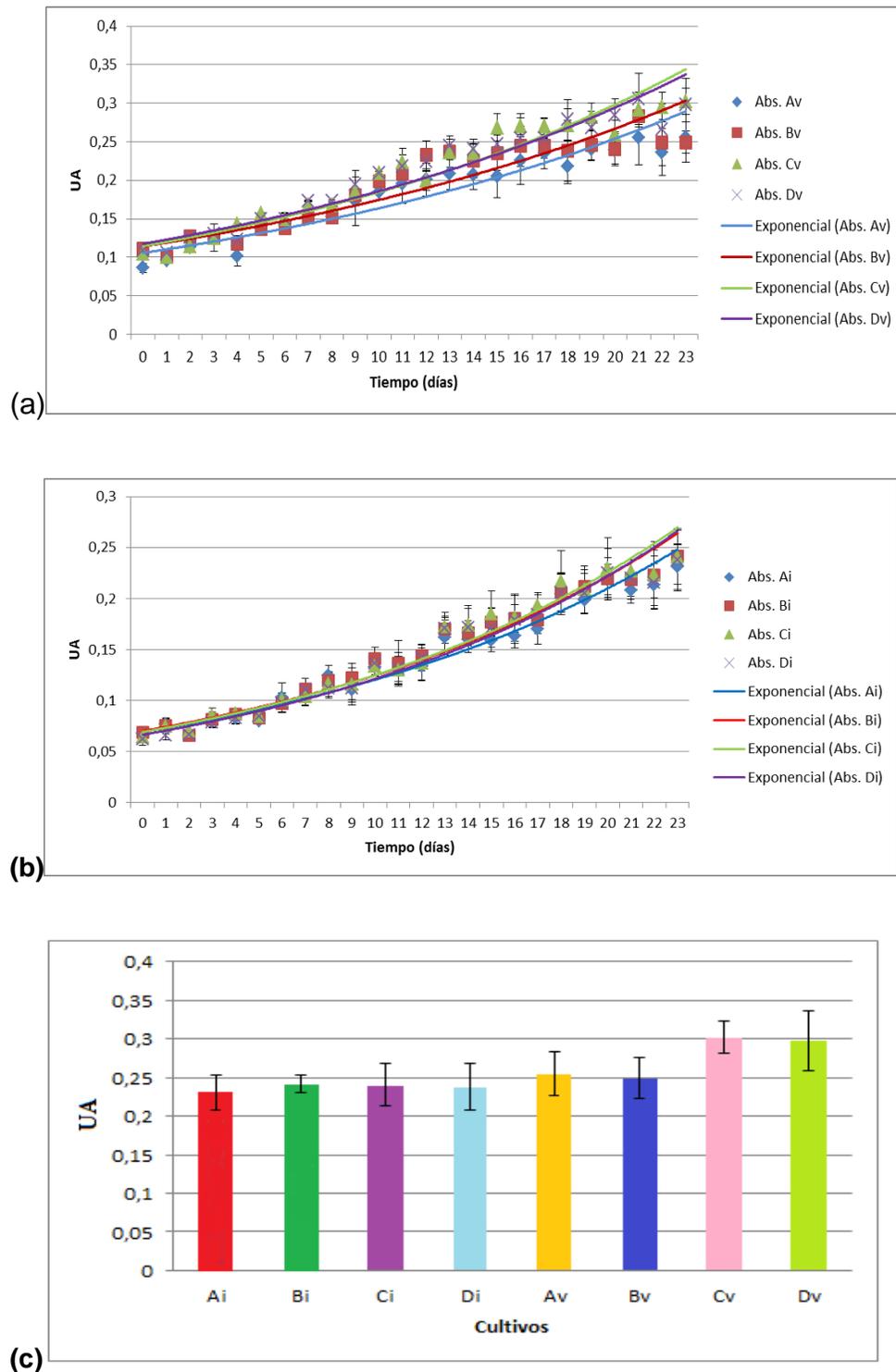


Figura 10: Crecimiento según absorbancia de los cultivos administrados con los distintos tipos de CO₂. (a) Cultivos a partir de CO₂ de la viña; (b) Cultivos a partir de CO₂ de Indura; (c) Cultivos en el día 23.

Ai= cultivo Indura 0% CO₂; Bi= cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci= cultivo Indura 5% CO₂; Di= cultivo Indura 7,5% CO₂; Av= cultivo viña 0% CO₂; Bv= cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv= cultivo viña 5% CO₂; Dv= cultivo viña 7,5% CO₂.

5.2 Producción de biomasa seca de *A. platensis*

El sistema de cosecha propuesto consistió en que la biomasa algal que se desarrolló en los cultivos, realice un proceso de separación del agua presente en ellos, mediante un sistema de filtros, tal como se explicó en el punto 4.4.

La productividad alcanzada en sistemas de cultivo cerrados es mayor, por lo que requieren mucho menos espacio que los sistemas abiertos y por otro lado disminuyen los costos de recolección de la biomasa generada. La mayor productividad es debida a desventajas importantes de los sistemas abiertos de cultivo, que son, entre otras, una baja eficiencia de mezclado y bajas eficacias fotosintéticas y de consumo de CO₂ [Ruiz, 2011].

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

Tabla 4: Producción de biomasa de los distintos cultivos de *A.platensis*.

Se observó que la producción de biomasa de los cultivos de *A. platensis* (Tabla 4), fue equilibrada, sin embargo, los cultivos que tuvieron la mayor producción, fueron los pertenecientes a Indura, siendo el más elevado Ai con 12,42 g, a partir de 25 L de cultivo.

5.3 Obtención de extractos y sus rendimientos

En esta memoria se empleó el sistema de extracción por agitación constante y cambio de solvente cada 24 horas, el cual fue muy útil para la obtención de los extractos en los cuales, es importante la protección de compuestos que tienden a oxidarse rápidamente por la acción de la luz o por la exposición al aire [Viveros, 2009]. Este método tiene la ventaja de economizar tiempo, dinero y genera además un antecedente para su utilización comercial.

El rendimiento de la obtención de los extractos se detalla a continuación (*Tabla 5* y *Fig. 11*), se pudo observar que los EET que tuvieron los mejores rendimientos fueron Bv (12,5%), Bi (10,5%) y Dv (10,5%).

El porcentaje de rendimiento determinado en los cultivos de EET fueron menores a los estimados por Viveros, 2009, quien estudió extractos metanólicos de *Arthrospira maxima* en México y obtuvo un porcentaje de un 20%.

Se observó que en general los cultivos con CO₂ de la viña obtuvieron rendimientos más altos que los cultivos con CO₂ Indura, además los cultivos control (sin CO₂ extra) Ai y Av dieron los rendimientos más bajos en todos los extractos.

Un factor adicional de importancia, al suministrar CO₂ a los cultivos, fue el aumento de rendimiento, ya que aunque conlleva un valor adicional, éste puede generar beneficios en la producción lo que se refleja en los costos [Rodríguez y Triana, 2006].

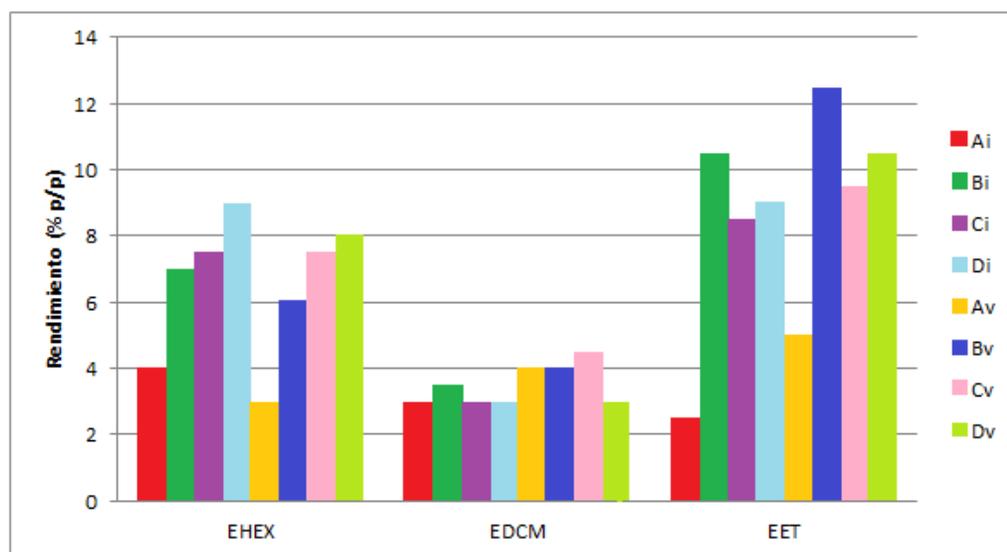


Figura 11: Gráfico comparativo de los rendimientos de extracción según el solvente utilizado sobre los distintos cultivos de *A. platensis*.

Ai= cultivo Indura 0% CO₂; Bi= cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci= cultivo Indura 5% CO₂; Di= cultivo Indura 7,5% CO₂; Av= cultivo viña 0% CO₂; Bv= cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv= cultivo viña 5% CO₂; Dv= cultivo viña 7,5% CO₂; EHEX= extracto hexánico de *A. platensis*; EDCM= extracto de diclorometano de *A. platensis*; EET= extracto etanólico de *A. platensis*.

Cultivo	Rendimiento EHEX		Rendimiento EDCM		Rendimiento EET	
	(g)	%	(g)	%	(g)	%
Ai	0,08	4	0,06	3	0,05	2,5
Bi	0,14	7	0,07	3,5	0,21	10,5
Ci	0,15	7,5	0,06	3	0,17	8,5
Di	0,18	9	0,06	3	0,16	8
Av	0,06	3	0,08	4	0,1	5
Bv	0,12	6	0,08	4	0,25	12,5
Cv	0,15	7,5	0,09	4,5	0,19	9,5
Dv	0,16	8	0,06	3	0,21	10,5

Tabla 5: Rendimiento del proceso de extracción de la biomasa de *Arthrospira platensis* de los distintos cultivos en estudio.

Ai= cultivo Indura 0% CO₂; Bi= cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci= cultivo Indura 5% CO₂; Di= cultivo Indura 7,5% CO₂; Av= cultivo viña 0% CO₂; Bv= cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv= cultivo viña 5% CO₂; Dv= cultivo viña 7,5% CO₂; EHEX= extracto hexánico de *A. platensis*; EDCM= extracto de diclorometano de *A. platensis*; EET= extracto etanólico de *A. platensis*.

5.4 Cromatografía en capa fina de extractos de *Arthrospira platensis*

El estudio en 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. Además no se observaron resultados considerables a $\lambda=254$ nm. Los cromatofolios revelados con NP/PEG mostraron que los extractos etanólicos tienen presencia de flavonoides (colores anaranjados y rojos) y ácidos fenólicos (coloración azulada) en todos los cultivos, tal como se indica en la figura 12 (a, b y c) [Abd El-Baky *et al.*, 2008; Mendiola, 2008].

Es importante destacar que las diferencias en los perfiles cromatográficos entre los distintos extractos demostraron la diversidad en la composición química, lo que puede ser explicado en parte, por los distintos orígenes del CO₂.

En la Fig.12 (d), se muestra la CCF de los EET junto a los ácidos gálico, cafeico y ferúlico (compuestos fenólicos previamente descritos para espirulina). Como observamos, dichos compuestos no están presentes en los distintos extractos, lo que se confirmó posteriormente a través de CLAE-DAD.

Los datos que obtuvo Viveros, 2009, del tamizaje preliminar realizado al extracto metanólico de *A. maxima*, mostró un bajo contenido de ácidos fenólicos y solo trazas de flavonoides, por lo que dichos resultados coinciden con los nuestros.

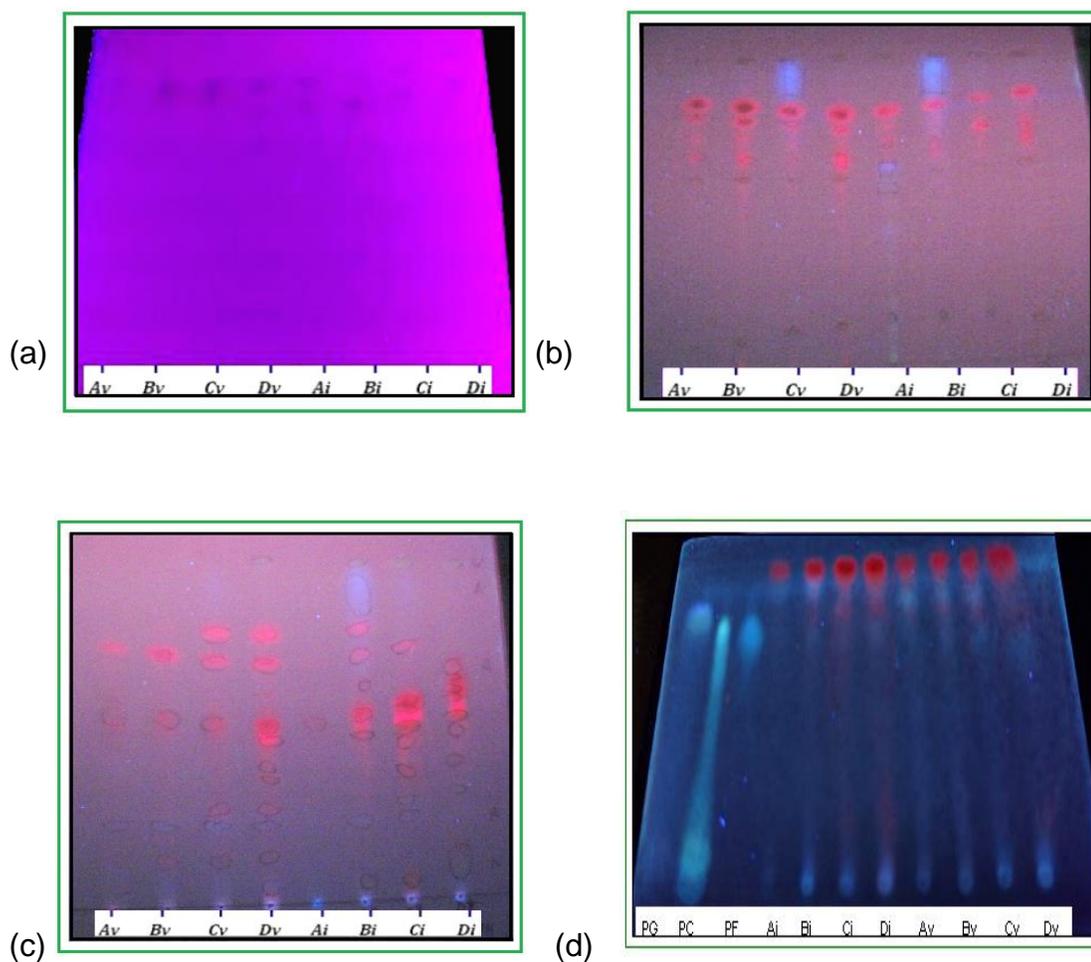


Figura 12: Cromatografía en capa fina de los extractos de *A. platensis* a $\lambda = 365$ nm. (a) EHEX; (b) EDCM; (c) EET; (d) Patrones de ácidos fenólicos y EET (fase móvil: metanol: acetato de etilo (50:50; v/v) 5 μ L de siembra y revelado con NP-PEG).

Ai= cultivo Indura 0% CO₂; Bi= cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci= cultivo Indura 5% CO₂; Di= cultivo Indura 7,5% CO₂; Av= cultivo viña 0% CO₂; Bv= cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv= cultivo viña 5% CO₂; Dv= cultivo viña 7,5% CO₂; PG= patrón ácido gálico; PC: patrón ácido cafeico y PF: patrón ácido ferúlico.

5.5 Determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu de los EET de *A. platensis*

Para determinar la cantidad de fenoles totales en los extractos etanólicos de *A. platensis* se obtuvo una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentración 2 a 8 µg/mL (Fig. 13).

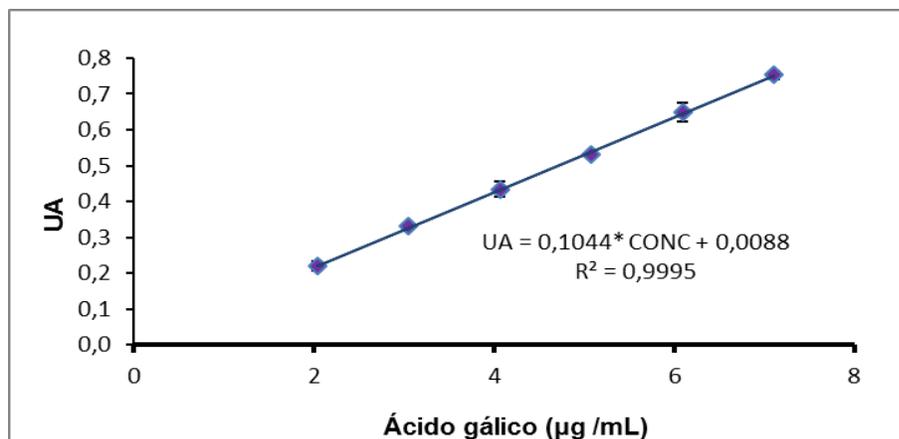


Figura 13: Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Cada muestra se realizó en triplicado. Los valores de absorbancia obtenidos (medidos a 765 nm), se interpolaron en la curva de calibración y se obtuvieron las concentraciones de compuestos fenólicos totales, expresadas en µg de ácido gálico por mL (Ecuación 3).

$$X = (Y - 0,0088) / 0,1044$$

Ecuación 3: Determinación de fenoles totales expresados en ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu.

La significancia de los resultados fue determinada por el método ANOVA de una vía con un ensayo de comparaciones múltiples de Tukey para no paramétricos, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todos los cultivos.

En relación a los cultivos que se les administró CO_2 proveniente de la fermentación de vino, éstos presentaron un menor contenido de fenoles totales, en comparación a los resultados obtenidos para los cultivos de *A. platensis* con CO_2 proveniente de Indura, destacándose el cultivo Ci con 35,9 mg de ácido gálico/g extracto seco (Fig. 14).

Sin embargo, el cultivo Bv alcanzó los 22,1 mg de ácido gálico/g extracto seco convirtiéndose en el valor más alto de su grupo. Esto se relacionó con los cromatofolios observados en el punto 5.4, ya que se observó que los cultivos que mostraron una mayor cantidad de compuestos fenólicos fueron con 2,5 y 5% de CO_2 administrado. Además, todos los extractos mostraron un contenido promedio mayor de fenoles que los extractos controles (cultivos Av y Ai) (Fig. 14), lo que nos indicó que la administración extra de CO_2 aumentó la cantidad de fenoles totales. Sin embargo, a la concentración de 7,5% de CO_2 , ya sea proveniente de viña o Indura, no mostró el efecto esperado, que sería a mayor concentración de CO_2 , mayor cantidad de fenoles totales. Concluimos que, existe un porcentaje de CO_2 en el cual los fenoles totales de la microalga dejan de aumentar su valor progresivamente, debido a una posible saturación de las vías metabólicas.

La cantidad de compuestos fenólicos determinados en los cultivos controles de EET fueron mayores a los estimados por ABD-El Baky *et al.* 2008, quienes estudiaron *Arthrospira maxima* en Egipto encontrando una concentración de 3,08 mg de ácido gálico por gramo de extracto orgánico. Así mismo, Viveros, 2009 encontró una concentración de 0,15 mg de ácido gálico por gramo de extracto metanólico de *A. maxima*, lo que resultó una menor cantidad al compararlo con nuestros resultados, ya que el cultivo control Ai fue el más bajo con 14,5 mg de ácido gálico por gramo de extracto.

Se sabe, además que el reactivo Folin-Ciocalteu no reacciona sólo con los fenoles, sino que también con una variedad de otros tipos de compuestos reductores. Entre los agentes que pueden interferir con folin se encuentran proteínas, ácido úrico, azúcares, aminas aromáticas y sales inorgánicas [Prior *et al.*, 2005]. Algunos de los componentes mencionados anteriormente se han descrito en *Arthrospira*, tales como proteínas y azúcares reductores como glucosa [Ramírez y Olvera, 2006].

Cultivo	mg ácido gálico/g biomasa seca \pm S.D	mg ácido gálico/g extracto \pm S.D
Ai	0,7 \pm 0,1	14,5 \pm 1,0
Bi	3,0 \pm 0,1	28,4 \pm 0,3
Ci	3,1 \pm 0,1	36,0 \pm 1,4
Di	2,6 \pm 0,1	31,9 \pm 1,2
Av	0,8 \pm 0,1	15,8 \pm 1,2
Bv	3,2 \pm 0,2	22,1 \pm 1,0
Cv	1,8 \pm 0,4	19,3 \pm 4,2
Dv	2,1 \pm 0,3	20,4 \pm 2,4

Tabla 6: Contenido de fenoles presentes en los extractos etanólicos de los distintos cultivos de *A. platensis*.

S.D= desviación estándar; Ai= cultivo Indura 0% CO₂; Bi= cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci= cultivo Indura 5% CO₂; Di= cultivo Indura 7,5% CO₂; Av= cultivo viña 0% CO₂; Bv= cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv= cultivo viña 5% CO₂; Dv= cultivo viña 7,5% CO₂.

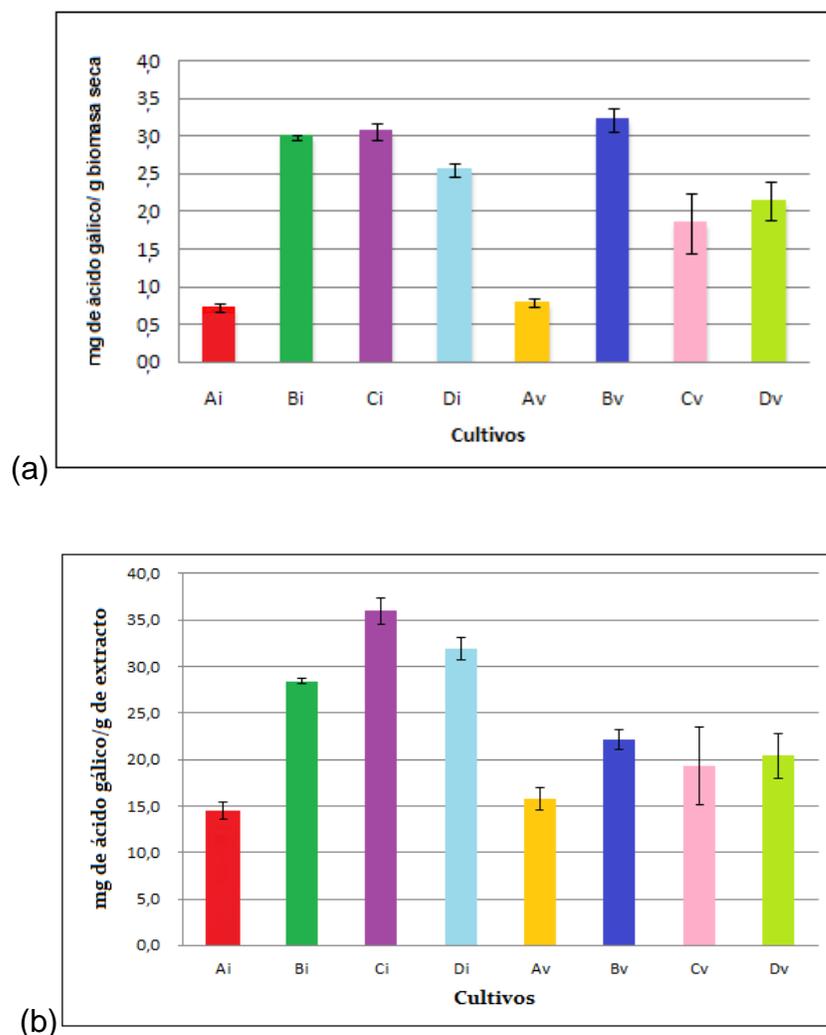


Figura 14: Contenido de fenoles totales expresados en (a) mg ácido gálico/g biomasa seca; (b) mg ácido gálico/g extracto de los extractos etanólicos de *A. platensis*. Ai= cultivo Indura 0% CO₂; Bi= cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci= cultivo Indura 5% CO₂; Di= cultivo Indura 7,5% CO₂; Av= cultivo viña 0% CO₂; Bv= cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv= cultivo viña 5% CO₂; Dv= cultivo viña 7,5% CO₂

5.6 Análisis de los EET mediante CLAE-DAD

El objetivo del trabajo con CLAE fue determinar en forma comparativa el perfil de los compuestos fenólicos presentes en los EET, y además detectar los ácidos fenólicos previamente descritos para esta especie. Con este fin se inyectaron patrones de los ácidos gálico, cafeico y ferúlico (Fig.15) además de los EET a 5000 ppm (Fig.16-19).

Cabe destacar que se logró establecer en este estudio las mejores condiciones para el trabajo en el CLAE, probando diferentes fases móviles, tipos de filtros para la muestra, flujos y longitudes de onda.

Se pudo constatar que la fase móvil, así como la utilización de filtros para inyectar el EET adquirieron notable importancia en la resolución de los picos, mejorando considerablemente la apariencia de éstos.

Como conclusión se determinó que las mejores condiciones fueron al utilizar 3 filtros de CLAE y 2 filtros para eliminar restos de clorofila, fase móvil la mezcla acetonitrilo- ácido fórmico 0,1% isocrática a un flujo de 1mL/min en una columna de gel de sílice octadecil- silanizada (250 mm x 4 mm).

Los patrones de ácidos estudiados mostraron un tiempo de retención de 2,5 min para el ácido gálico, 2,3 min ácido cafeico y 8,9 min para el ácido ferúlico y en los cromatogramas se pudo observar su espectro UV.

Con los resultados obtenidos podemos decir que en los EET, no se encontraron los ácidos gálico, cafeico y ferúlico. Se compararon los cromatogramas de los EET con los de los compuestos de referencia y no se encontraron picos cuyo tiempo de retención y espectro UV coincidieran con los de los picos de los patrones. Se confirman de esta forma los resultados obtenidos en el punto 5.4, donde se demostró a través de CCF de los EET la ausencia de los ácido fenólicos mencionados.

Con respecto a otros picos presentes en los cromatogramas destacaron dos principales a los tiempos de retención de 2,5 y 7 minutos, estos se observaron en todos los cultivos de Indura, pero sólo en Dv de los de la viña. La altura de estos picos varió de cultivo a cultivo, y la altura máxima para el pico de tiempo de retención de 7 minutos se observó en los EET de 2,5% de CO₂ Indura.

También se observó un pico con un tiempo de retención aproximado de 3 minutos, de altura menor a los anteriores, en todos los cromatogramas a excepción del cultivo Cv y Di. Al respecto, Mendiola, 2008 en un estudio con *A. platensis* mediante CLAE-DAD, indicó que varios picos antes de los 5 minutos a una $\lambda=280$ nm pueden pertenecer a la familia de los polifenoles.

Los cromatogramas de EET mostraron menos picos al aumentar el % de CO₂ administrado, sin importar el origen de éste. Los EET que más señales dieron fueron los cultivos Av (control) y Bv (2,5% de CO₂ de la viña).

De forma general se concluyó que los cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD a 280 nm, fueron diferentes entre los distintos cultivos. Estos resultados demostraron que los aportes de CO₂ generaron cambios en el perfil de compuestos fenólicos.

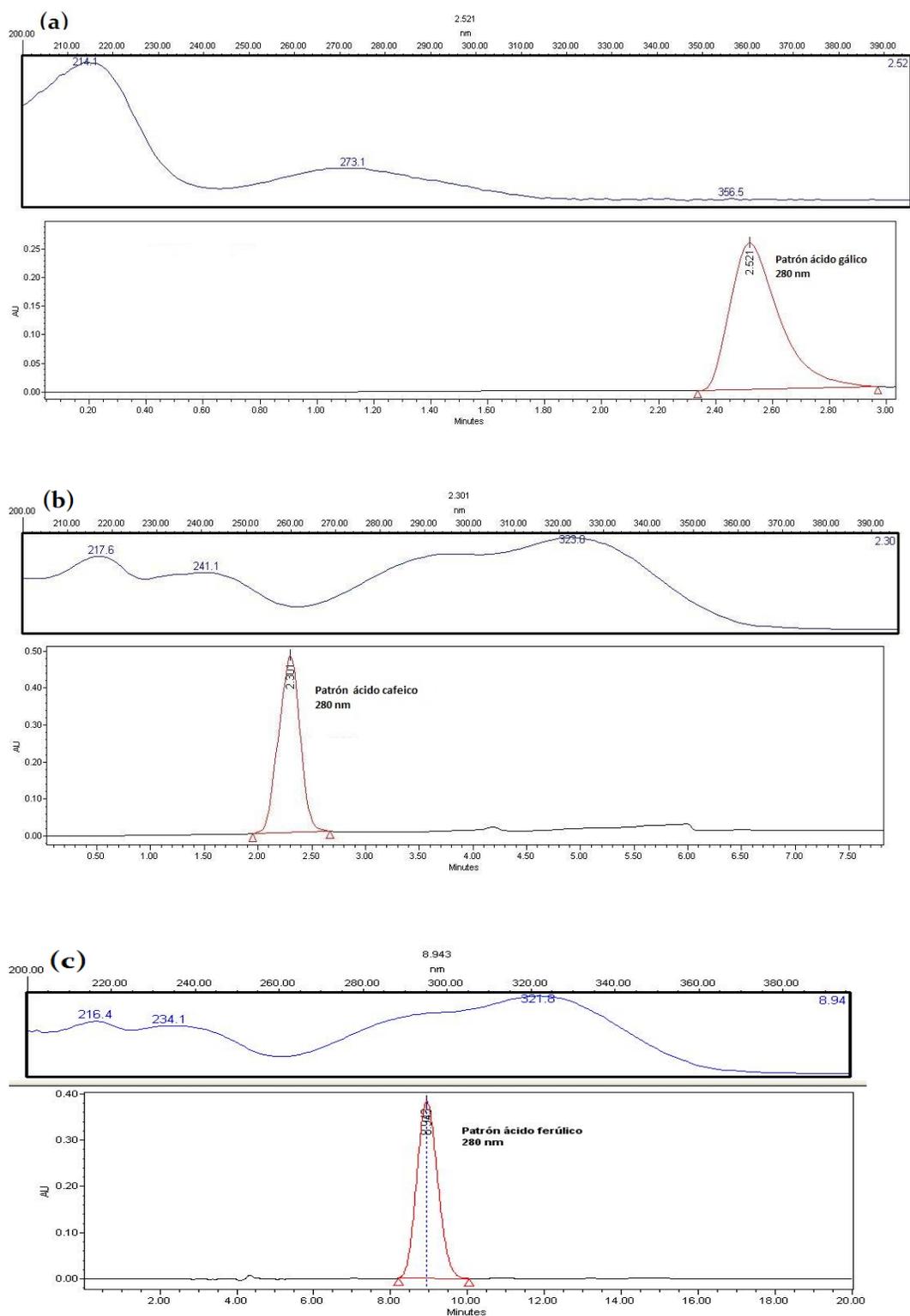
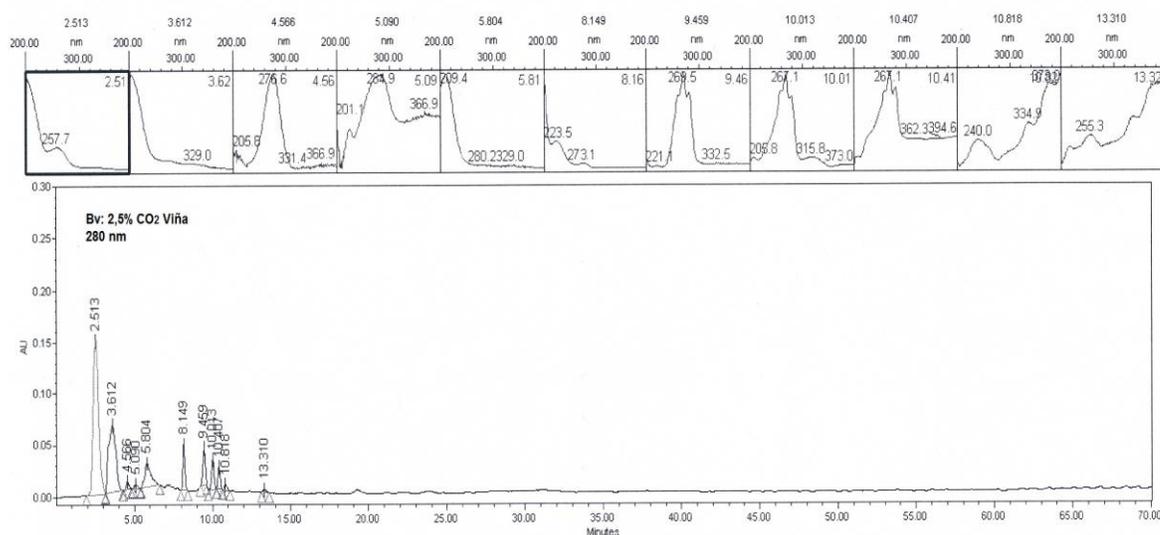


Figura 15: Cromatogramas por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de patrones de ácidos fenólicos a 100 ppm (a) Ácido gálico; (b) Ácido cafeico; (c) Ácido ferúlico.

(a)



(b)

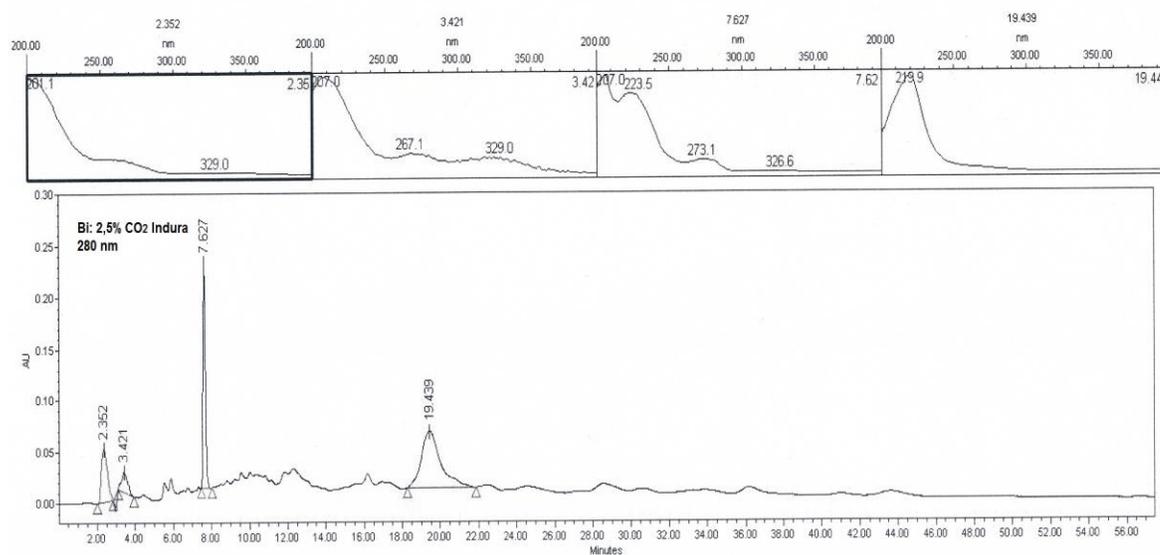
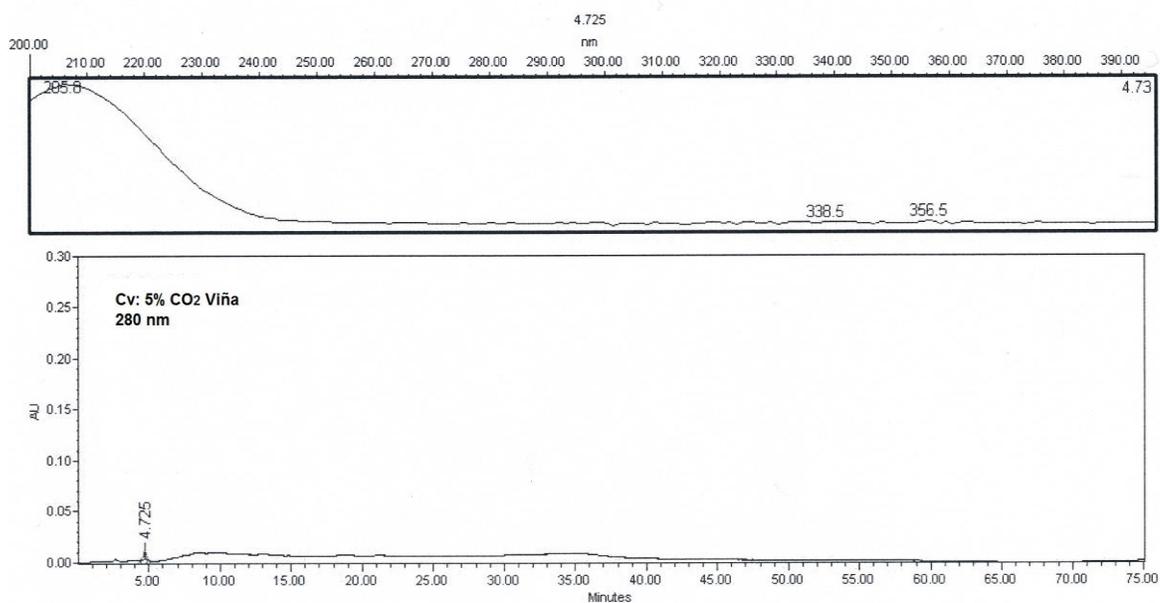


Figura 16: Cromatogramas por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de EET, correspondientes a los cultivos (a) Bv (2,5% CO₂ viña); (b) Bi (2,5% CO₂ Indura).

(a)



(b)

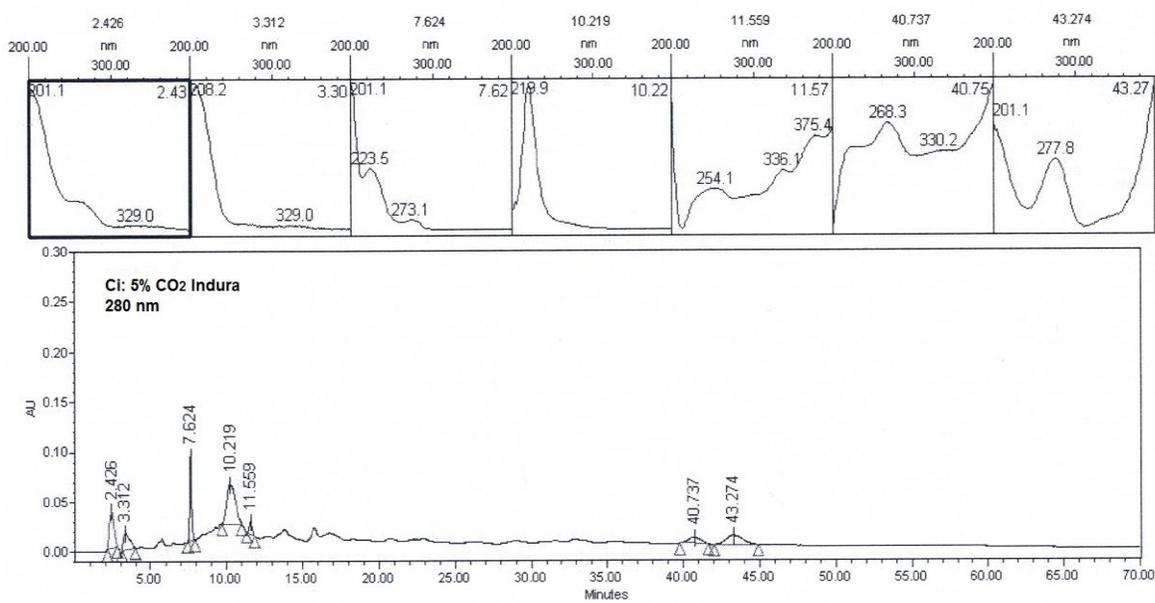
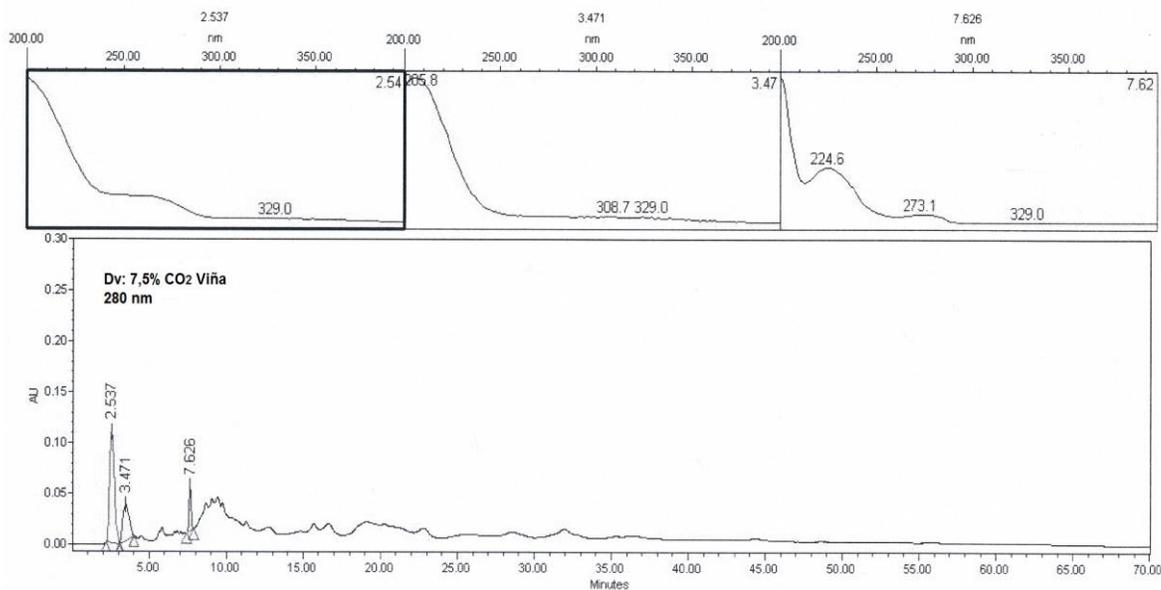


Figura 17: Cromatogramas por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de EET, correspondientes a los cultivos (a) Cv (5% CO₂ viña); (b) Ci (5% CO₂ Indura).

(a)



(b)

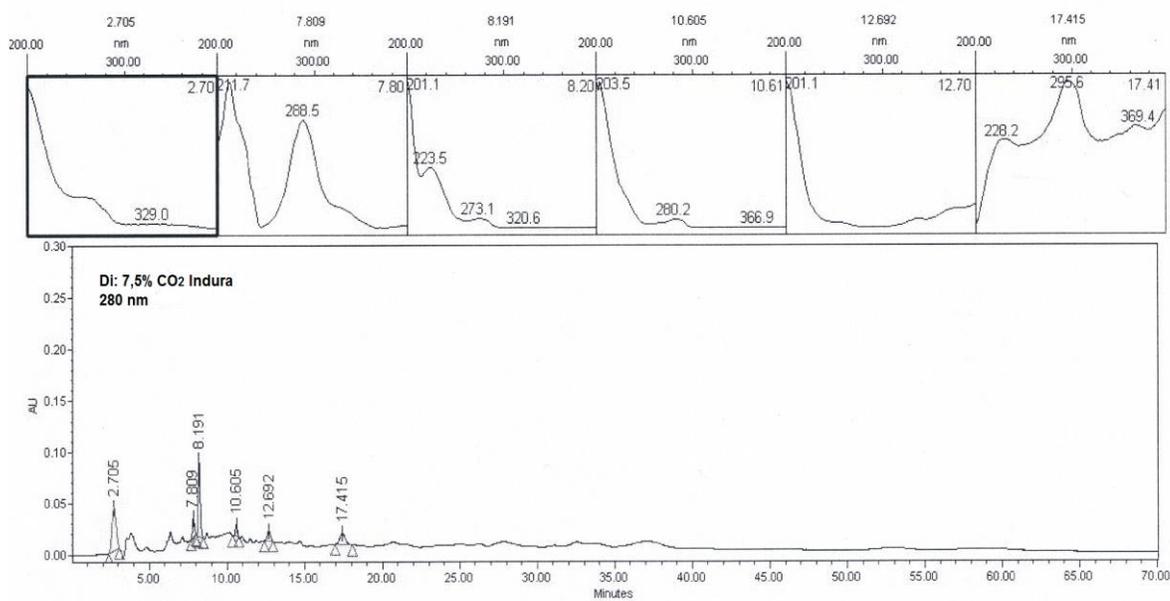


Figura 18: Cromatogramas por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de EET, correspondientes a los cultivos (a) Dv (7,5% CO₂ viña); (b) Di (7,5% CO₂ Indura).

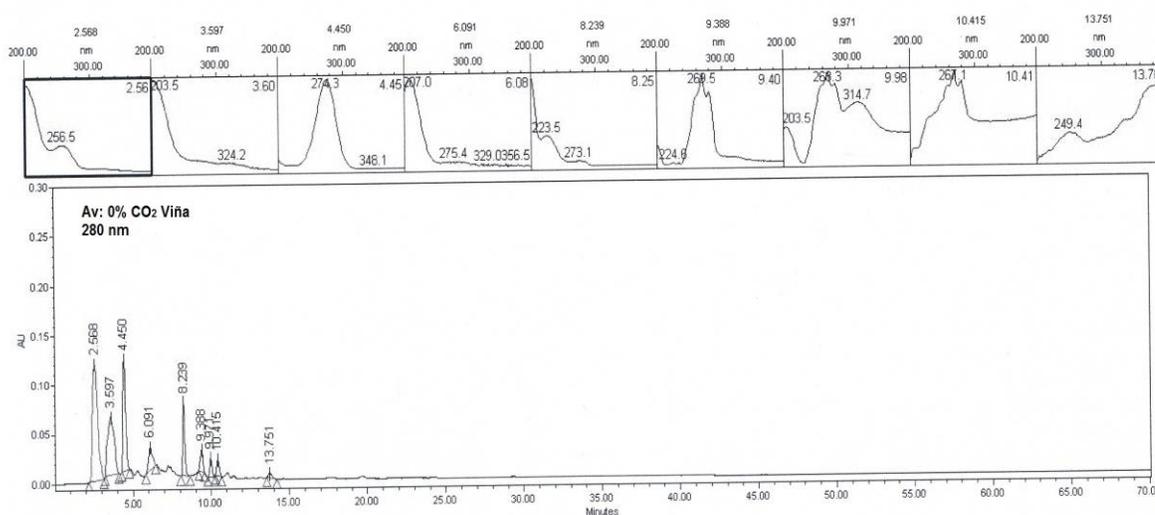


Figura 19: Cromatograma por CLAE-DAD a $\lambda = 280$ nm de EET, correspondiente al cultivo Av (0% CO₂).

5.7 Determinación del comportamiento de los EET de *Arthrospira platensis* sobre 15- lipoxigenasa de soya

Las LOXs son un grupo de dioxigenasas que catalizan la adición de oxígeno molecular a los ácidos grasos que contienen un sistema cis,cis 1,4 pentadieno. El producto inicial de esta reacción es un 4-hidroperoxi cis, trans- 1,3-pentadienil [Sanda y Jisaka, 2011].

Las LOXs son generalmente clasificadas dentro de 5, 12 y 15-LOX dependiendo de la posición de la incorporación del oxígeno molecular dentro del ácido graso. Por ejemplo, la 15-LOX introduce un oxígeno molecular al átomo de carbono número 15 del ácido araquidónico (AA) para dar lugar al ácido 15-hidroperoxieicosatetraenoico (15-HPETE) [Madhava, 2001].

En estudios realizados por Szymanowska *et al.*, 2009, sobre la actividad de la enzima LOX de las semillas de arveja demostraron que puede ser efectivamente inhibida por compuestos fenólicos. Los inhibidores en cuanto a efectividad mostraron lo siguiente: ácido cafeico > quercetina > catequina > ácido benzoico > ácido ferulico > kaempferol [Sanda y Jisaka, 2011].

Teniendo en cuenta que parte de los componentes de estos extractos son ácidos fenólicos y en literatura está descrito que estos compuestos poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, inhiben la producción de NO e inhiben la enzima 5-LOX [Miranda *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 2001; Fernández y Torres, 2005; Abd El-Baky *et al.*, 2009], se decidió estudiar el efecto sobre la 15-LOXsoya para determinar si existe una relación entre sus propiedades antioxidantes y/o antiinflamatorias por parte de los EET de *Arthrospira platensis*.

Antes de realizar los ensayos con los EET se realizó un ensayo con el ácido cafeico, por ser el más efectivo inhibidor de lipoxigenasa de las semillas de arveja (con alrededor de un 57% de inhibición) en comparación con otros compuestos fenólicos [Szymanowska *et al.*, 2009].

Los resultados de la inhibición de la actividad de la enzima 15-LOXsoya por parte del ácido cafeico y de los EET de *Arthrospira platensis* se observan en la Tabla 7 y Figura 20.

Muestras	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	%I Promedio \pm S.D	IC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Av	25	0 \pm 37,6	
Bv	200	29,5 \pm 6,2	
Cv	200	48,5 \pm 1,1	
Dv	200	0 \pm 11,8	
Bi	200	0 \pm 8,3	
Ci	200	0 \pm 17,4	
Di	200	0 \pm 9,6	
Ácido cafeico	150	\uparrow 53,5 \pm 4,5	145,7
	100	38,7 \pm 3,5	
	50	30,8 \pm 8,3	
	25	25,2 \pm 1,1	

Tabla 7: Resultados de la evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima 15-LOXsoya de los EET de los distintos cultivos de *A. platensis* y del compuesto de referencia.

S.D, desviación estándar; I, inhibición; IC50, Concentración inhibitoria 50; Av, cultivo viña 0% CO₂; Bv, cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv, cultivo viña 5% CO₂; Dv, cultivo viña 7,5% CO₂; Bi, cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci, cultivo Indura 5% CO₂; Di, cultivo Indura 7,5% CO₂; \uparrow máximo efecto.

Los efectos de la inhibición de la actividad de la enzima 15-LOXsoya de los EET obtenidos desde los cultivos Bv y Cv fueron significativos respecto del control positivo, sin embargo, ninguno logró inhibir a la enzima en más de un 50% a la concentración ensayada siendo menos potentes que el control positivo, es decir al ácido cafeico ($IC_{50} = 145,7 \mu\text{g/mL}$). Mediante Anova y test de Tukey se demostró que hubo diferencias significativas entre los EET de Bv y Cv.

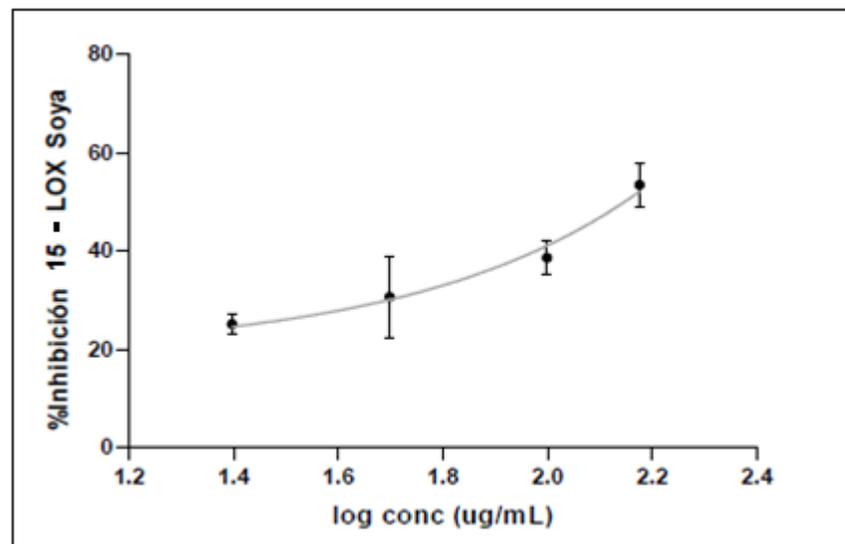


Figura 20: Efecto inhibitorio de la enzima 15-LOXsoya por ácido cafeico.

Cabe destacar que las diferencias observadas en este ensayo pueden ser explicadas por las distintas concentraciones CO_2 y también por el origen de este gas. Además, la variación de los resultados pudieron deberse a un error de pipeteo, alteración de la enzima (por cambio de temperatura brusco, mucho tiempo expuesto en el tampón previo al uso en el ensayo), o tiempo de agitación al agregar el sustrato [Orellana, 2011].

Los únicos EET activos como inhibidores de la actividad de la 15-LOXsoya fueron los obtenidos desde cultivos desarrollados con aportes de CO_2 proveniente del gas de fermentación y que se diferenciaron en el porcentaje de CO_2 inyectado los cultivos Cv (5%) y Bv (2,5%).

Los EET provenientes de los cultivos obtenidos con aportes de CO₂ provenientes de Indura fueron inactivos frente a la 15-LOXsoya.

Respecto de las actividades inhibitorias de la LOX (tanto 5 LOX como 15-LOX), éstas no han sido evaluadas anteriormente en extractos etanólicos de *A. platensis*, sin embargo se han estudiado diversos compuestos fenólicos que están presentes en dicha microalga. En un estudio realizado por Sadik *et al.*, 2003, donde utilizaron la enzima 15-LOX y flavonoides encontrados en el chocolate, la quercetina, determinaron que efectivamente muestra una actividad inhibitoria mediante distintos modos de acción. Sin embargo, otros estudios de *A. platensis* que involucran otros compuestos presentes en esta microalga como inhibidores de la 5 y 15-LOX, Madhava, 2001, determinó que la ficocianina-c no mostró actividad inhibitoria de la 5-LOX recombinante humana ni sobre la 15-LOX de reticulocito de conejo, incluso hasta concentraciones de 100 µM.

Estos resultados nos demuestran que en general los extractos etanólicos de *A. platensis* no actúan a nivel de 15-LOXsoya, con la excepción de Cv y Bv, lo que nos indicaría que su efecto antiinflamatorio se puede deber a otros mecanismos o a la presencia de otros compuestos que se encuentran en esta microalga y que no están presentes en los EET.

CONCLUSIONES

- Se comprobó exitosamente que el CO₂ de la viña o gas de fermentación puede ser utilizado para cultivar microalgas, incrementando el crecimiento de los cultivos en un porcentaje similar al registrado con el CO₂ de Indura. Además dichos cultivos exhibieron un crecimiento mayor que los controles sin CO₂ adicional.
- Los extractos con mayor rendimiento fueron los EET, mientras que los de menor rendimiento fueron los EDCM. Además, los cultivos controles Ai y Av fueron los que exhibieron menor rendimiento en cada tipo de extracto.
- Los cultivos de *A. platensis* mostraron diferencias significativas en cuanto al contenido de fenoles totales. Estas diferencias pudieron deberse a las variables utilizadas para realizar los cultivos (concentración y fuente de CO₂). Destacándose los cultivos Ci y Bv con 35,9 y 22,1 mg de ácido gálico/g extracto seco respectivamente.
- Existieron diferencias entre la composición química de los EET de *A. platensis* provenientes de los diferentes cultivos, evidenciadas mediante ensayos cualitativos por CCF y CLAE-DAD, donde se comprobó la ausencia de ácidos fenólicos tales como el gálico, cafeico y ferúlico. Estas diferencias pueden ser atribuidas, en parte, a los orígenes del CO₂ que representan el principal factor de variación controlado así como también sus porcentajes administrados.
- Los EET provenientes de los cultivos Cv junto con Bv fueron los únicos extractos que inhibieron la actividad de la 15-LOX de soya con (% I=48,5) y (% I=29,5) respectivamente. Sin embargo al compararlos con el compuesto de referencia, el ácido cafeico fueron menos potentes.
- Los resultados demuestran que la producción de *A. platensis* con CO₂ proveniente del gas de fermentación del vino o de Indura, es útil para aumentar la cantidad de biomasa así como también para contrarrestar el efecto negativo de este producto de desecho en el medio ambiente.

REFERENCIAS

ABD EL-BAKY, H., El Baz, F., El Baroty, G. 2008. Characterization of nutraceutical compounds in blue green alga *Spirulina maxima*. *J. Med. Plant. Res.* 2 (10): 292–300.

ABD EL-BAKY, H., El Baz, F., El Baroty, G. 2009. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects *in vitro* toward hepatotoxicity model. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 3 (4): 133–139.

BELAY, A. 2002. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J. Ame. Nutra. Assoc.* 5 (2): 27-48.

BENOIT, M. 2013. 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. Tesis (Química y Farmacia). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

BINAGHI, L., Del Borghi, A., Lodi, A., Converti, A., Del Borghi, M. 2003. Batch and fed batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry.* 38: 1341-1346.

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

CASTRO, G., Navarro, A. 2009. Manual ficológico algas para la vida. Unidad de Investigación Biotecnología en Cultivos de Microalgas. Santiago, Chile.

- CHAMORRO, G., Salazar, M., Araújo, K., Pereira, C., Ceballos, G., Castillo, L. 2002. Actualización en la farmacología de *Spirulina (Arthrospira)*, un alimento no convencional. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 52 (3): 232-240.
- CICCO, N., Lanorte, M., Paraggio, M., Viggiano, M., Lattanzio V. 2009. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91: 107–110.
- FERNÁNDEZ, F., Torres, M. 2005. *Inflamación y plantas medicinales*. Facultad de Ciencias Médicas de Matanzas. Universidad de Matanzas.
- GAFFNEY, B. 1996. Lipoxygenases: structural principles and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 25: 431–459.
- GERSHWIN, M., Belay, A. 2008. *Spirulina in Human Nutrition and Health*. Ediciones CRC Press Taylor & Francis group Boca Raton, FL.
- GORDILLO, F., Jiménez, C., Figueroa, F., Niell, F. 1999. Effects of increased atmospheric CO₂ and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis (Arthrospira)*. *Journal of Applied Phycology*. 10: 461–469.
- GRANDE, T., Capelli, B., Cysewski, G. 2009. *The medical research of Spirulina*. Cyanotech Corporation, Hawaii, USA.
- JAIME, L., Mendiola, J., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Señorans, F., Cifuentes, A., Ibáñez, E. 2005. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. *J. Sep. Sci.* 28: 2111–2119.

KORU, E. 2012. Earth Food *Spirulina (Arthrospira)*: Production and Quality Standarts, Food Additive, Prof. Yehia El-Samragy (Ed.), ISBN: 978-953-51-0067-6, InTech.

LIANG, X., Zhang, X., Dai, W., Lv, Y., Yan, S., Zhang, W. 2009. A combined HPLC-PDA and HPLC-MS method for quantitative and qualitative analysis of 10 major constituents in the traditional Chinese medicine Zuo Gui Wan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49: 931-936.

LICET, B. 2008. Cultivo de *Arthrospira platensis* (división cyanophita) a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno como estrategia para cambiar su composición bioquímica. Tesis posgrado. Cumaná, Venezuela. Universidad de Oriente.

LIZANA, A. 2013. Determinación de actividad antioxidante en *Arthrospira platensis* sometida a diversas concentraciones de CO₂ obtenido del proceso de fermentación del vino e INDURA. Evaluación sensorial de una barrita de cereal elaborada con la microalga. Tesis (Química y Farmacia). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

LORETO, C., Fuenmayor, G., Briceño, B., Rosales, N., Morales, E. 2007. Calidad microbiológica y bioquímica de derivados comerciales de la cianobacteria *Spirulina*. *Bol. Centro Invest. Biol.* 41 (1): 107–113.

MADHAVA, C. 2001. C-phycocyanin and arachidonic acid cascade: role in apoptosis of lipopolysaccharide stimulated mouse macrophage cell line, raw 264.7. Tesis doctorado. University of hyderabad, Department of animal science.

MARTÍNEZ, L. 2008. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Tesis posgrado (Ingeniería química). Universidad de León, Instituto de Recursos Naturales.

MENDIOLA, J. 2008. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos. Tesis doctoral. Universidad autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias.

MIRANDA, M., Cintra, R., Barros, S., Mancini-Filho, J. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J. Med. Biol. Res.* 31: 1075–1079.

ORELLANA, A. 2011. Efecto de murtila (*Ugni molinae*) en células tumorales y frente a 15-lipoxigenasa. Tesis (Química y Farmacia). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

ORTIZ, J. 2011. Monografía. Composición Nutricional y Funcional de Algas Pardas Chilenas: *Macrocystis pyrifira* y *Durvillaea antarctica*. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

PIÑA, Y. 2011. Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de ecotipos de *Ugni molinae* Turcz. Tesis (Química y Farmacia). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

PRIOR, R., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53 (10): 4290-4302.

QUEUPIL, M. 2011. Actividad inhibitoria de glicógeno fosforilasa A de los extractos obtenidos desde las hojas de *Ugni molinae* Turcz (murtila) Myrtaceae: identificación de los principios activos. Tesis (Química y Farmacia). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

RAMÍREZ-MORENO, L., Olvera-Ramírez, R. 2006. Uso tradicional y actual de *Spirulina sp.* (*Arthrospira sp.*). *Interciencia*. 31 (9): 657-663.

RAVELONANDRO, P., Ratianarivo, D., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., Raherimandimby, M. 2011. 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.

RODRÍGUEZ, A., Triana, F. 2006. Evaluación del pH en el cultivo de *Spirulina spp.* (= *Arthrospira*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis (Microbiología industrial). Bogotá, D.C. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias.

ROJAS, A. 2004. El mercado internacional del carbono y sus expectativas para el sector forestal chileno. Tesis (Ingeniería forestal). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales.

RUIZ, A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Universidad politécnica de Valencia.

SADIK C., Helmut S., Tankred S. 2003. Inhibition of 15-lipoxygenase by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochemical Pharmacology*. 65: 773-781.

SANDA, V., Jisaka, M. 2011. Inhibition of Soybean Lipoxygenases –Structural and Activity Models for the Lipoxygenase Isoenzymes Family. *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*. 6: 109-130.

- SANTIAGO, I. 2004. Evaluación del contenido de superóxido dismutasa, tocoferoles, y pigmentos en microalgas y determinación de su actividad antioxidante. Tesis posgrado (Biotecnología marina). Ensenada, Baja California. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada.
- SZYMANOWSKA, U., Jakubczyk, A., Baraniak, B., Kur, A. 2009. Characterisation of lipoxygenase from pea seeds (*Pisum sativum*, var. *Telephone* L.). *Food Chemistry*. 116: 906-910.
- VALLE, H., Opsina, S., Galeano, E., Martínez, A., Márquez, M., López, J. 2009. Obtención de una fracción antimutagénica del extracto etanólico de la macroalga *Digenia simplex*. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 38 (2): 109-117.
- VIDAL, A., Motidome, M., Mancini-Filho, J., Fallarero, A., Midori, M., Brandao, L., Jose, A. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 37 (3): 373-382.
- VIEIRA, J., Colla, L., Duarte, P. 2003. *Spirulina platensis* Growth in Open Raceway Ponds Using Fresh Water Supplemented with Carbon, Nitrogen and Metal. *Z. Naturforsch.* 58 c: 76-80.
- VIVEROS, J. 2009. Aislamiento dirigido a la identificación de compuestos antirradicales y/o quimiopreventivos de *Hedeoma drummondii* y *Spirulina maxima*. Tesis posgrado. Universidad autónoma de nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.
- WAGNER H., Bladt S. 1996. PLANT DRUG ANALYSIS, A Thin Layer Chromatography Atlas. Segunda Edición. Springer.

YAMAMOTO, S. 1992. Mammalian lipoxygenases: Molecular structures and functions. *Biochim. Biophys.* 1128: 117-131.

Anexo I

Perfil nutricional *Arthrospira platensis*

Característica nutricional general	%
Proteínas	53-68
Carbohidratos	17-25
Grasas	4-6
Minerales	8-13
Humedad	3-7

Aminoácidos esenciales	mg/Kg
Fenilalanina	26
Histidina	15
Isoleucina	33
Leucina	49
Lisina	26
Metionina	13
Treonina	28
Triptófano	9
Valina	37

Aminoácidos no esenciales	mg/Kg
Ácido aspártico	73
Ácido glutámico	84
Alanina	47
Arginina	48
Cisteína	6
Glicina	32
Prolina	25
Serina	27
Tirosina	24

Pigmentos	g/Kg
Ficocianina	120
Clorofila	8
Carotenoides	4

Vitaminas	mg/Kg
Betacaroteno	2250
E (tocoferol)	15
B1 (tiamina)	25
B2 (riboflavina)	37
B3 (niacina)	150
B5 (ácido pantoténico)	2
B6 (piridoxina)	5
B12 activo (cobalamina)	0,7
Ácido fólico	2
Biotina	0,4

Minerales	mg/Kg
Potasio	19000
Sodio	14000
Fósforo	10000
Magnesio	7670
Calcio	4670
Hierro	500
Zinc	27
Cobre	7
Selenio	0,3

Ácidos grasos esenciales	g/kg
Ácido linoleico	11
Ácido gama linolénico	10

Ácidos grasos no esenciales	g/Kg
Ácido palmítico	20
Ácido palmitoleico	2

Anexo II

Protocolo PM Zarrouk-2012

Materiales: Reactivos, matraces, agua destilada, agitador magnético, autoclave.

Solución de macronutrientes

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

Solución de micronutrientes

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

Es fundamental respetar el orden y las cantidades que se agregan de cada uno de los reactivos que conforman un determinado caldo de cultivo, ya que cualquier alteración o procedimiento incorrecto podría ocasionar la precipitación de los nutrientes especialmente nitratos y fosfatos. En el laboratorio se trabajó con la solución pH (NaHCO_3) y la del resto de macronutrientes concentradas al 10X, es decir, cada uno de sus componentes fue multiplicado por 10 y disuelto igualmente en un litro de agua destilada. Todas estas soluciones se prepararon en matraces y se almacenaron como soluciones stock en el refrigerador.

Anexo III

Obtención del gas de fermentación de la viña Miguel Torres

El proceso comenzó cuando los cilindros vacíos fueron trasladados desde el laboratorio de AeonBiogroup a la viña Miguel Torres, la cual está ubicada en Longitudinal Sur Km 195, Curicó. Allí, los cilindros fueron conectados uno a uno a un equipo y éste a su vez a la cuba que almacena el vino para extraer el gas de fermentación. Se obtuvo un gas libre de alcoholes, de partículas, humedad y aroma, gracias al compresor de membrana y a los filtros presentes en el equipo, así el gas de fermentación tuvo aproximadamente un 35,1% de CO_2 y una mezcla de otros gases tales como el NO_2 con un 50,9% y el O_2 12,5%. El equipo se ubicó a ras de suelo y fue conectado a través de una manguera a la tapa de la cuba, la cual tuvo que ser modificada para extraer el gas de forma eficiente (*Fig.21*).

El llenado procedió hasta que la presión al interior del cilindro fue de 8 bar, tomó aproximadamente 10 minutos capturar en promedio 735 g del gas. Cada cilindro fue pesado, etiquetado, registrado y devuelto al laboratorio.

Dicho procedimiento se realizó 5 veces a 5 cubas distintas de las cuales se capturó 73,5 Kg de gas total en la primera vendimia del año 2012.

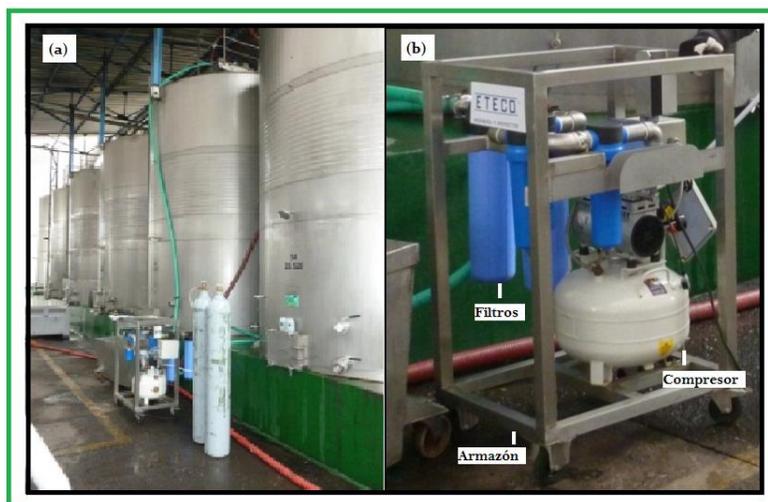


Figura 21: Procedimiento de extracción del gas de fermentación (a) Forma en que el gas de fermentación sale de la cuba; (b) Equipo completo más en detalle.

Anexo IV

Resumen del análisis estadístico Tukey del crecimiento de los cultivos

Crecimiento por conteo celular de los cultivos viña e Indura:

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

Nota: * indica diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

Ai, cultivo Indura 0% CO₂; Bi, cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci, cultivo Indura 5% CO₂; Di, cultivo Indura 7,5% CO₂ Av, cultivo viña 0% CO₂; Bv, cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv, cultivo viña 5% CO₂; Dv, cultivo viña 7,5% CO₂.

Crecimiento por absorbancia de los cultivos viña e Indura:

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

Nota: * indica diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

Ai, cultivo Indura 0% CO₂; Bi, cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci, cultivo Indura 5% CO₂; Di, cultivo Indura 7,5% CO₂ Av, cultivo viña 0% CO₂; Bv, cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv, cultivo viña 5% CO₂; Dv, cultivo viña 7,5% CO₂.

Anexo V
Resumen del análisis estadístico Tukey de fenoles totales

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

Nota: * indica diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

Ai, cultivo Indura 0% CO₂; Bi, cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci, cultivo Indura 5% CO₂; Di, cultivo Indura 7,5% CO₂ Av, cultivo viña 0% CO₂; Bv, cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv, cultivo viña 5% CO₂; Dv, cultivo viña 7,5% CO₂.

Anexo VI
Resumen del análisis estadístico Tukey % de inhibición 15-LOXsoya

Muestra	CR	Bi	Ci	Di	Av	Bv	Cv	Dv
CR		*	*	*	*	*	*	*
Bi	*		*	-	-	*	*	-
Ci	*	*		*	-	*	*	*
Di	*	-	*		-	*	*	*
Av	*	-	-	-		*	*	*
Bv	*	*	*	*	*		*	*
Cv	*	*	*	*	*	*		*
Dv	*	-	*	*	*	*	*	

Nota: * indica diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

CR, compuesto de referencia ácido cafeico 150 µg/mL; Bi, cultivo Indura 2,5 % CO₂; Ci, cultivo Indura 5% CO₂; Di, cultivo Indura 7,5% CO₂ Av, cultivo viña 0% CO₂; Bv, cultivo viña 2,5 % CO₂; Cv, cultivo viña 5% CO₂; Dv, cultivo viña 7,5% CO₂.