



UNIVERSIDAD DE SONORA

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

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE
CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE PIGMENTOS
ANTIOXIDANTES DE LA MICROALGA *Dunaliella*
tertiolecta UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE
SUPERFICIE DE RESPUESTA.**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

JONATHAN GARCÍA MORALES

Hermosillo, Sonora, México

09 de diciembre de 2020

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Jonathan García Morales

Autor

Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE
PIGMENTOS ANTIOXIDANTES DE LA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta*
UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

TESIS

Que para obtener el grado de:

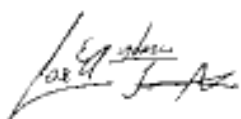
MAESTRO EN BIOCENCIAS

Presenta:

JONATHAN GARCÍA MORALES

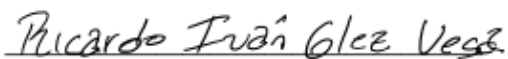
APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada Optimización de las Condiciones de Cultivo para la Obtención de Pigmentos Antioxidantes de la Microalga *Dunaliella tertiolecta* Utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta presentada por Jonathan García Morales, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dr. José Antonio López Elías

Director



M. C. Ricardo Iván González Vega

Sinodal interno



Dra. Diana Fimbres Olivarría

Secretaria



Dra. Norma García Lagunas

Sinodal interno



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova

Sinodal interno



Dr. Saúl Ruiz Cruz

Sinodal externo

AGRADECIMIENTOS

Al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS)** por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A mi sinodal secretaria, mentora, amiga y maestra, **Dra. Diana Fimbres Olivarría**. Gracias por toda la paciencia, conocimientos y consejos que me has dado. Gracias por permitirme ser tu estudiante de nuevo y pulir mis habilidades como profesionista. Gracias por todas las pláticas amenas en el trayecto diario hacia y del DICTUS y por prestarme un cachito de tu bonito cubículo. Pero sobre todo “ay no!”.

A mi sinodal interno, **M. C. Ricardo Iván González Vega**, gracias por todo tu tiempo dedicado a mí, por las dudas resueltas y por apoyarme incondicionalmente en mi estadía en el DIPA y los análisis antioxidantes y con el diseño de optimización. A mi director de tesis, **Dr. José Antonio López Elías**, por sus comentarios objetivos y consejos tanto profesionales como personales. A mi sinodal interna **Dra. Norma García Lagunas**, por su apoyo en el diseño de las gráficas y el análisis estadístico, así como su apoyo moral. Por último, a mis sinodales **Dr. Luis Rafael Martínez Córdova** y el **Dr. Saúl Ruiz Cruz**, por sus aportaciones y observaciones tan valiosas para este trabajo.

Gracias a mis amigos DICTUS: **Ana Lucía, Alcira Bobadilla y Dojaque** por brindarme apoyo moral, espiritual y escucharme cuando más lo necesitaba, aprecio su amistad y el haber hecho de mi estancia en el laboratorio y el posgrado toda una experiencia.

A mi amiga **Alejandra Bonillas**, por su constante apoyo moral y su apoyo en la redacción de mi artículo, ¡muchas gracias! A mis amigos **Martín Preciado y Flor Espinoza** por apoyarme cuando más lo necesité y por recordarme que hay más en la vida que unos microorganismos, se los agradezco eternamente.

A mi padre **Zahid García Fraijo** y mi madre **Alma Lorenia Morales Robles**, por darme su apoyo incondicional a través de toda esta etapa, gracias por aceptar mis decisiones y ayudarme a lograr lo que hasta hoy es mi mayor triunfo. **¡Los amo! ¡¡MUCHÍSIMAS GRACIAS!!**.

RESUMEN

Las microalgas tienen la habilidad de adaptarse a medios estresantes, lo que les confiere la capacidad de producir biocompuestos que son de alto valor biotecnológico. Se sabe que la concentración de nitrógeno y la salinidad del medio de cultivo son los factores más importantes para la producción de pigmentos antioxidantes a partir de microalgas como las del género *Dunaliella*; a pesar de ello, no se han establecido las condiciones óptimas de cultivo para su obtención. El objetivo de este estudio consistió en optimizar las condiciones de cultivo para la producción de pigmentos antioxidantes de *D. tertiolecta* utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). Para ello, se realizaron cinéticas de crecimiento evaluando distintas concentraciones de nitrógeno (0.22, 0.55 y 0.88 mol·L⁻¹ de NaNO₃), salinidades (25, 35 y 45 unidades prácticas de salinidad, UPS), y edad de cultivo (días 5, 10 y 15). Posteriormente, se aplicó un diseño central compuesto de tres factores (concentraciones de nitrógeno, salinidad y edad de cultivo) y la MSR para determinar los factores importantes que proporcionen los valores óptimos mínimos y máximos sobre la producción de pigmentos. La mayor densidad celular se encontró en el medio con 0.88 mol·L⁻¹ de NaNO₃ a 35 UPS con 2.71x10⁶ cél/mL. De acuerdo con la superposición de las gráficas de superficie de respuesta, las condiciones de cultivo óptimas para la obtención de clorofila y carotenoides totales fueron: concentración de nitrógeno = 0.22 mol·L⁻¹ de NaNO₃, salinidad = 25 UPS y edad de cultivo = día 15. Los valores obtenidos fueron de 23 y 13.26 mg/g *ps* para clorofila y carotenoides totales, respectivamente. Posteriormente, el tratamiento optimizado fue sometido a la evaluación de su capacidad antioxidante a través de la inhibición de radicales libres DPPH· y ABTS^{•+}, obteniendo 0 y 688.23 μmol ET/g *ps*, respectivamente. Más tarde, se analizó la actividad reductora por el método FRAP, obteniendo 1062.40 μmol ET/g *ps*. Finalmente, se determinó la actividad antihemolítica sobre eritrocitos humanos a través de la prueba AAPH obteniendo 66.75 % de inhibición de hemólisis. El estudio reveló que los pigmentos obtenidos por optimización a partir de *D. tertiolecta* cultivada en un medio con 0.22 mol·L⁻¹ de NaNO₃, 25 UPS y cosechada al día 15 poseen una alta capacidad antioxidante y antihemolítica. El estudio mostró que los pigmentos obtenidos por la MSR poseen una alta capacidad antioxidante y antihemolítica con potenciales aplicaciones biotecnológicas, que estimula el uso de recursos naturales para la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

ABSTRACT

Microalgae have the ability to adapt to stressful environments, which gives them the capacity to produce biocomposites of high biotechnological value. It is known that nitrogen concentration and salinity of the culture medium are the most important factors for the production of antioxidant pigments from microalgae of the *Dunaliella* genus; despite the above, the optimal culture conditions for their obtaining have not been established. The aim of this study consisted to optimize culture conditions to produce antioxidant pigment from *D. tertiolecta* using response surface methodology (RSM). Growth kinetics were performed evaluating different nitrogen concentrations (0.22, 0.55 y 0.88 mol·L⁻¹ of NaNO₃), salinities (25, 35 and 45 practical salinity units, PSU), and age of culture (days 5, 10 y 15). A central composite design of three factors (nitrogen concentrations, salinity, and age of culture) and the RSM was applied to determine the important factors that provide the minimum and maximum optimal values on pigment production. The highest cell density was found in the medium with 0.88 mol·L⁻¹ of NaNO₃ at 35 PSU with 2.71x10⁶ cell/mL. According to the overlay plots, the optimum growth conditions for total chlorophylls and total carotenoids obtention were: nitrogen concentration = 0.22 mol·L⁻¹ of NaNO₃, salinity = 25 PSU and age of culture = day 15. Obtaining values of 23 y 13.26 mg/g *dw* for total chlorophyll and total carotenoids, respectively. Subsequently, the optimized treatment was subjected to the evaluation of its antioxidant capacity through the inhibition of free radical DPPH· and ABTS⁺, obtaining 0 and 688.23 μmol TE/g *dw* for the optimized medium, respectively; the reducing activity was also carried out through FRAP technique, obtaining 1062.40 μmol TE/g *dw*. Finally, the antihemolytic activity in human erythrocytes was determined through the AAPH test, obtaining 66.75 % of hemolysis inhibition. In conclusion the pigments obtained from *D. tertiolecta* cultivated in the optimal medium shows high antioxidant and anti-hemolytic capacity. The study revealed that the pigments obtained by RSM have a high antioxidant and anti-hemolytic capacity with potential biotechnological applications, which stimulates the use of natural resources for the prevention of diseases related to oxidative stress.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
I.1. Generalidades de las microalgas	4
I.2. Cinéticas de crecimiento	4
I.3. Descripción del género <i>Dunaliella</i>	6
I.4. Pigmentos obtenidos de <i>Dunaliella</i>	6
I.5. Actividad biológica de los pigmentos obtenidos de <i>D. tertiolecta</i>	8
I.6. Metodología de superficie de respuesta (MSR)	11
II. HIPÓTESIS	14
III. OBJETIVOS	15
III.1. Objetivo general	15
III.2. Objetivos particulares	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	16
IV.1. Selección de la microalga y condiciones de cultivo	16
IV.2. Concentración celular y cinéticas de crecimiento	17
IV.3. Diseño de experimento y optimización estadística	17
IV.4. Metodología de superficie de respuesta (MSR)	18
IV.5. Extracción y cuantificación de los pigmentos	19
IV.6. Actividad antioxidante	20
IV.6.1. Actividad de inhibición del radical libre 1,1,-difeníl-2-picrilhidrazilo (DPPH•)	20
IV.6.2. Actividad de inhibición del radical libre ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS ⁺)	20
IV.6.3. Poder reductor antioxidante del ión férrico (FRAP)	21
IV.6.4. Actividad protectora sobre daño oxidativo en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) (AAPH)	21
IV.7. Análisis estadístico	22
V. RESULTADOS	23
V.1. Cinéticas de crecimiento	23
V.2. Optimización para la producción de pigmentos	26
V.2.1. Matriz del diseño central compuesto (DCC) para la optimización estadística y MSR para la producción de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> y clorofila <i>c</i>	26

V.2.1.1.	Efecto de la combinación de las variables independientes en la producción de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> y clorofila <i>c</i>	27
V.2.1.1.1.	Validación del modelo para la producción de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y <i>c</i>	27
V.2.1.2.	Superficie de respuesta para la producción de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y <i>c</i>	31
V.2.2.	Matriz del diseño central compuesto (DCC) para la optimización estadística y MSR para la producción de clorofila total, carotenoides totales y rendimiento	33
V.2.2.1.	Efecto de la combinación de las variables independientes en la producción de clorofila total, carotenoides totales y rendimiento	33
V.2.2.1.1.	Validación del modelo para la producción de clorofila total, carotenoides totales y rendimiento ...	33
V.2.2.2.	Superficie de respuesta para la producción de clorofila total, carotenoides totales y rendimiento	38
V.3.	Actividad antioxidante de los extractos de <i>D. tertiolecta</i>	40
V.3.1.	Actividad de inhibición del radical libre 1,1,-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•)	40
V.3.2.	Actividad de inhibición del radical libre ácido 2,2'-azobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS ⁺)	42
V.3.3.	Poder reductor antioxidante del ión férrico (FRAP)	42
V.3.4.	Actividad protectora sobre daño oxidativo en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) (AAPH)	43
VI.	DISCUSIONES	44
VI.1.	Cinéticas de crecimiento	44
VI.2.	Optimización para la producción de pigmentos de <i>D. tertiolecta</i>	46
VI.3.	Actividad antioxidante de los pigmentos extraídos de <i>D. tertiolecta</i>	48
VII.	CONCLUSIONES	53
VIII.	RECOMENDACIONES	54
IX.	LITERATURA CITADA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Cinética de crecimiento típica de microorganismos.	6
2	Cinética de crecimiento ($\text{Log}_2\text{cél/mL}$) de la microalga <i>D. tertiolecta</i> a salinidad de 25 UPS en diferentes concentraciones de nitrógeno (0.88, 0.44 y $0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3).	24
3	Cinética de crecimiento ($\text{Log}_2\text{cél/mL}$) de la microalga <i>D. tertiolecta</i> a salinidad de 35 UPS en diferentes concentraciones de nitrógeno (0.88, 0.44 y $0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3).	24
4	Cinética de crecimiento ($\text{Log}_2\text{cél/mL}$) de la microalga <i>D. tertiolecta</i> a salinidad de 45 UPS en diferentes concentraciones de nitrógeno (0.88, 0.44 y $0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3).	25
5	Superficie de respuesta tridimensional representando la producción de clorofila <i>a</i> (a), clorofila <i>b</i> (b) y clorofila <i>c</i> (c) de la microalga <i>D. tertiolecta</i> en función de la variación en la salinidad (UPS) y edad de cultivo (día de cosecha) con la concentración de nitrógeno ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3) como punto central.	32
6	Superficie de respuesta tridimensional representando la producción de clorofila total (a), carotenoides totales (b) y rendimiento (c) de la microalga <i>D. tertiolecta</i> en función de la variación en la salinidad (UPS) y edad de cultivo (día de cosecha) con la concentración de nitrógeno ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3) como punto central.	40
7	Regresión lineal de la actividad anti-radical libre ABTS^{++} y el poder reductor antioxidante del ión férrico (FRAP).	43

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Diseño factorial completamente al azar de los tratamientos (concentraciones de nitrógeno y diferentes salinidades) aplicadas en el cultivo de <i>D. tertiolecta</i>	16
2	Matriz de DCC para el crecimiento de <i>D. tertiolecta</i> en diferentes concentraciones de nitrógeno, diferentes salinidades y cosechada en diferentes días para la producción de clorofila <i>a</i> (Ca), clorofila <i>b</i> (Cb) y clorofila <i>c</i> (C _{c1+c2})	26
3a	ANOVA de la producción de clorofila <i>a</i> de <i>D. tertiolecta</i>	27
3b	ANOVA de la producción de clorofila <i>b</i> de <i>D. tertiolecta</i>	27
3c	ANOVA de la producción de clorofila <i>c</i> de <i>D. tertiolecta</i>	27
4a	Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de clorofila <i>a</i> de <i>D. tertiolecta</i>	28
4b	Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de clorofila <i>b</i> de <i>D. tertiolecta</i>	28
4c	Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de clorofila <i>c</i> de <i>D. tertiolecta</i>	28
5a	Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de clorofila <i>a</i> de <i>D. tertiolecta</i>	29
5b	Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de clorofila <i>b</i> de <i>D. tertiolecta</i>	29
5c	Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de clorofila <i>c</i> de <i>D. tertiolecta</i>	30
6	Matriz de DCC para el crecimiento de <i>D. tertiolecta</i> en diferentes concentraciones de nitrógeno, diferentes salinidades y cosechada en diferentes días para la producción de clorofila total (C _{total}), carotenoides totales (C _{x+c}) y rendimiento (g)	34
7a	ANOVA de la producción de clorofila total de <i>D. tertiolecta</i>	34
7b	ANOVA de la producción de carotenoides totales de <i>D. tertiolecta</i>	34
7c	ANOVA del rendimiento de <i>D. tertiolecta</i>	35
8a	Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de clorofila total de <i>D. tertiolecta</i>	35
8b	Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de carotenoides totales de <i>D. tertiolecta</i>	35
8c	Prueba de falta de ajuste del DCC para el rendimiento de <i>D. tertiolecta</i>	35
9a	Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de clorofila total de <i>D. tertiolecta</i>	36
9b	Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de carotenoides totales de <i>D. tertiolecta</i>	36
9c	Prueba de los efectos de los parámetros estimados en el rendimiento de <i>D. tertiolecta</i>	37

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son uno de los organismos acuáticos más usados en la acuicultura para la obtención de compuestos antioxidantes tales como carotenos y xantófilas. Las microalgas del género *Dunaliella* han sido utilizadas para la extracción de biocompuestos, principalmente carotenoides, debido a su alta capacidad de crecimiento y fácil adaptación a medios de cultivo con condiciones estresantes, lo que provoca una mayor concentración de pigmentos en la célula (Charioui *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016; Valencia-Yañez *et al.*, 2018).

Investigaciones recientes muestran que la manipulación de las condiciones del cultivo microalgal, tales como la intensidad de luz, dióxido de carbono, pH, temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes, impacta directamente en su desarrollo, reproducción y ciclos bioquímicos. Sin embargo, se ha observado que la concentración de salinidad y la deficiencia de nutrientes aumentan la producción de compuestos bioactivos de interés biológico (Gómez *et al.*, 2016; Guevara *et al.*, 2019; Pena *et al.*, 2020).

El género *Dunaliella* posee la capacidad de tolerar amplios rangos de temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes, como la baja concentración de nitrógeno. Particularmente para *Dunaliella tertiolecta* la modificación de la concentración de nitrógeno y salinidad han sido las condiciones de estrés más efectivas para la obtención de pigmentos.

Las microalgas son reconocidas por sintetizar productos de alto valor agregado (pigmentos, proteínas, polisacáridos y ácidos grasos omega-3), que además de tener utilidad como pigmentos de coloración, presentan propiedades antioxidantes, por lo cual son fácilmente comercializadas en industrias biotecnológicas y de salud humana. El género *Dunaliella* es conocido por producir pigmentos antioxidantes tales como β -caroteno, luteína y zeaxantina (Banskota *et al.*, 2019). Estos carotenoides pueden llegar a concentraciones de hasta el 14% de la biomasa microalgal (Hosseini y Shariati, 2014). La luteína y la zeaxantina son xantófilas del grupo de los carotenoides, con un alto potencial antioxidante utilizado en el tratamiento y prevención de enfermedades maculares relacionadas con la edad (Krinsky *et al.*, 2003; Richer *et al.*, 2004). Mientras que el β -caroteno y el α -caroteno son capaces de donar electrones,

característica relevante para la capacidad antioxidante relacionada con la prevención de distintos tipos de cáncer (Hosseini y Shariati, 2014).

Durante el metabolismo celular se generan radicales libres, incluyendo especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). Estos radicales libres son especies altamente reactivas y desempeñan un papel importante tanto en organismos unicelulares como pluricelulares como compuestos benéficos o tóxicos dependiendo de su concentración. A altas concentraciones producen estrés oxidativo, el cual puede llevar a la muerte celular a través de la oxidación proteica, lipídica y de ADN (Banskota *et al.*, 2019).

Los compuestos antioxidantes actúan como un medio de defensa crucial para combatir los radicales libres que provocan el daño oxidativo. Varios compuestos naturales como la vitamina C, tocoferoles y extractos de plantas y microalgas se han comercializado como antioxidantes naturales para combatir el estrés oxidativo asociado con diversas enfermedades crónicas como aterosclerosis, diabetes mellitus, desórdenes neurodegenerativos y diferentes tipos de cáncer (Sen y Chakraborty, 2011).

Existen diversos análisis para evaluar la capacidad antioxidante y antiradical libre de los biocompuestos producidos por las microalgas, cada uno con diferente enfoque y mecanismo de acción, entre ellos destacan el ensayo de inhibición de los radicales DPPH·(2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS⁺ (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), y el poder antioxidante reductor de iones hierro, $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$ (FRAP). Actualmente se utiliza la membrana eritrocitaria como modelo celular para evaluar la capacidad antioxidante *ex vivo* de compuestos bioactivos que inhiban la hemólisis de eritrocitos humanos inducida por radicales peróxido (ROO·). La inhibición de los ROO· generados por la molécula AAPH (2,2'-bis (2-metilpropionamida) diclorhidrato) se determina mediante el seguimiento de la liberación de hemoglobina al momento de la disrupción de la membrana plasmática por el proceso de hemólisis (Banskota *et al.*, 2019; Chisté *et al.*, 2014).

Los pigmentos antioxidantes pueden ser producidos a mayor o menor escala por la microalga cuando se cultiva bajo condiciones específicas. A pesar de esto, no se han establecido las condiciones óptimas de cultivo para la obtención de pigmentos de *D. tertiolecta*. Por lo anterior, se realizaron distintos cultivos con bajas concentraciones de nitrógeno, diferentes

salinidades y cosechadas en diferentes días. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para maximizar la producción de pigmentos, principalmente para estimular la síntesis de carotenoides y clorofilas.

La MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas basadas en la evaluación del modelo y análisis de problemas en la cual la respuesta de interés es afectada por diversas variables. La MSR es aplicada en estudios en los cuales la calidad de un producto o la eficiencia de un proceso son analizadas a través del efecto de varios factores que influyen en mayor o menor medida (Lenth, 2009).

Comparado con los métodos utilizados convencionalmente para obtener una mayor cantidad de pigmentos en microalgas, la MSR es una herramienta práctica, efectiva y precisa, que no solo indica las condiciones óptimas para obtener un incremento en la concentración de algún compuesto de interés, sino que también ofrece una alternativa para minimizar el tiempo y esfuerzo aplicado, así como el costo de producción (Sharma *et al.*, 2016). Todas estas características se traducen en mayores beneficios si el producto o proceso está destinado a las industrias farmacéutica, cosmética, nutracéutica o de acuicultura.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación consistió en optimizar las condiciones de cultivo para la producción de pigmentos antioxidantes de la microalga *Dunaliella tertiolecta* bajo condiciones de déficit de nitrógeno y estrés salino utilizando la metodología de superficie de respuesta.

I. ANTECEDENTES

I.1. Generalidades de las microalgas

En las últimas décadas las microalgas han surgido como un grupo de organismos capaces de sintetizar algunas de las sustancias usadas en varios campos de la ciencia, principalmente en la biomedicina y acuicultura (Guedes *et al.*, 2011). Las microalgas generalmente se utilizan como alimento vivo para otros organismos en cultivo, aunque también se cultivan con el fin de obtener compuestos tales como polisacáridos, ficocianina, ácidos fenólicos, boroficina, criptoficina, vitamina E, precursores de vitamina A, clorofilas, carotenos y xantófilas (Christaki *et al.*, 2013; Ibáñez y Cifuentes, 2013; Markou y Nerantzis, 2013). Las especies mayormente utilizadas para la obtención de biocompuestos son las pertenecientes a las clases Bacillariophyceae, Chlorophyceae y Cyanophyceae (Borges *et al.*, 2013).

El costo para obtener los bioproductos deseados de las microalgas es elevado, por lo que se han explorado una gran variedad de especies con la finalidad de encontrar alguna que sea una gran fuente de compuestos de interés biotecnológico. La ruta que han tomado las investigaciones en años recientes es la estimulación del crecimiento y la modificación del comportamiento metabólico de estos microorganismos.

Entre los géneros más estudiados se encuentra *Dunaliella*, del cual se pueden extraer pigmentos con capacidad antioxidante tales como carotenos y xantofilas, polisacáridos e incluso para fines de producción de biodiesel a partir de sus ácidos grasos. Las distintas combinaciones de las condiciones estresantes que se aplican para la producción de pigmentos influyen de diversas maneras en el desarrollo de las microalgas, ya sea afectando su cinética de crecimiento y/o provocando un aumento o disminución de la concentración celular y de los días que dura el cultivo (Domonkos *et al.*, 2013).

I.2. Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento o curvas de crecimiento son la información gráfica que nos proporciona el comportamiento de la microalga cultivada en distintos tipos de medio de cultivo,

donde generalmente se utiliza el medio de cultivo inorgánico F/2 de Guillard y Ryther (1962), el cual está constituido por nitratos, fosfatos, silicatos, metales traza y algunas vitaminas; aunque este medio también se puede utilizar en mayor (F, 2F, 3F, etc.) o en menor concentración (F/4, F/8, F/12, etc.), dependiendo de la finalidad del cultivo.

Realizar una cinética de crecimiento le permite al investigador recopilar información acerca del número de células que se encuentran en el cultivo, la tasa de división, la concentración máxima y mínima que puede presentar la especie así como los días que puede permanecer activo el cultivo. Además de los nutrientes inorgánicos presentes en el medio de cultivo, existen otros factores que pueden influir en la concentración celular, tales como la salinidad, luz, aireación, pH, temperatura, etc (Abu-Rezq *et al.*, 2010).

La cinética de crecimiento de las microalgas consiste en cuatro fases de acuerdo a Solimeno *et al.* (2015) (Figura 1), las cuales se explican a continuación:

Fase de latencia o de adaptación: en esta fase las microalgas se adaptan a las nuevas condiciones ambientales del medio (nutrientes, luz, temperatura, entre otros) para poder iniciar el crecimiento exponencial. Esta fase puede tardar entre uno y tres días, dependiendo de la cantidad del inóculo y de la especie.

Fase exponencial o logarítmica: en esta fase la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Las microalgas consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. Esta fase puede presentarse alrededor del tercer día después de inocular el medio y prolongarse hasta cuatro días.

Fase estacionaria: En esta fase no hay incremento en el número de microalgas y se produce la acumulación y liberación de metabolitos secundarios. Durante esta fase se agotan algunos nutrientes esenciales del medio y los productos de desecho liberados durante la fase hacen que el medio sea inapropiado para su crecimiento.

Fase de declinación o muerte: Durante esta fase el crecimiento de microalgas cesa por completo, incrementando el número de células muertas. También aumentan las condiciones desfavorables como el desarrollo de bacterias, hongos, contaminación, etc., generando el colapso final del cultivo.

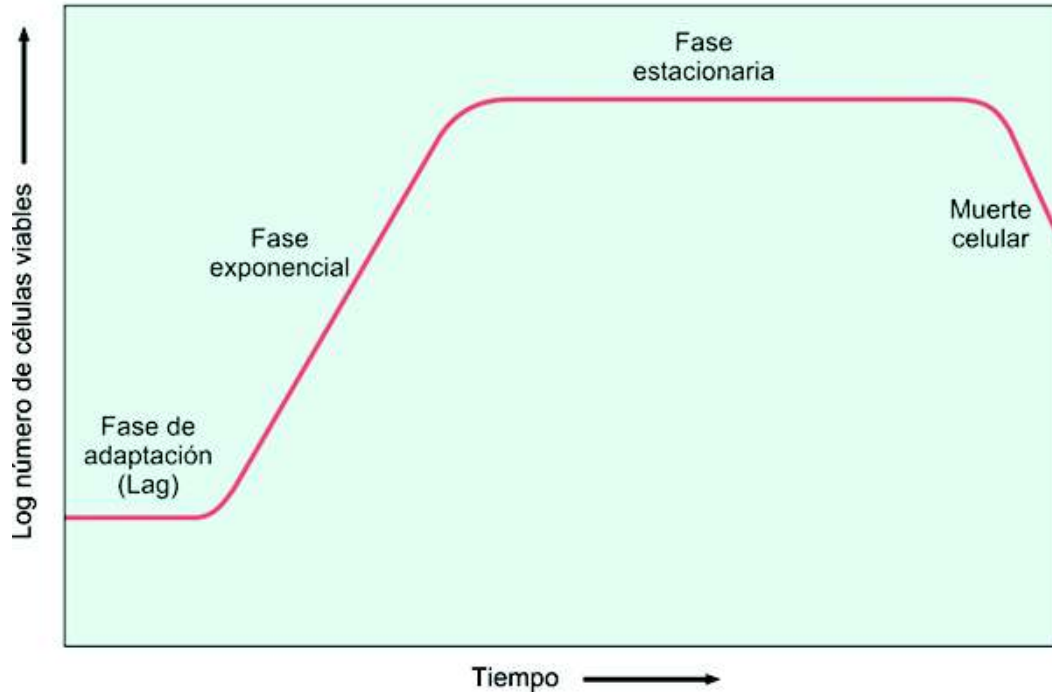


Figura 1. Cinética de crecimiento típica de microorganismos. Obtenida de <https://www.lifeder.com/curva-crecimiento-bacteriano/>

I.3. Descripción del género *Dunaliella*

El género *Dunaliella* pertenece a la clase Chlorophyceae y al orden Volvocales, estas microalgas se caracterizan por ser unicelulares, fotosintéticas, carecer de una pared celular rígida y poseer uno o más flagelos para locomoción. Las especies más conocidas son *D. acidophyla*, *D. bardawil*, *D. bioculata*, *D. media*, *D. parva*, *D. primolecta*, *D. salina*, *D. tertiolecta* y *D. viridis*. Las células de este género pueden ser de forma ovoide, esférica, piriforme, fusiformes e incluso elipsoide con un tamaño variable que puede ir de 5 a 25 μm en longitud y de 3 a 13 μm de amplitud (Fachet *et al.*, 2020; Soto, 2015; Polle *et al.*, 2020).

I.4. Pigmentos obtenidos de *Dunaliella*

Una ventaja de realizar el cultivo de estas microalgas es su habilidad de alcanzar altas concentraciones celulares a pesar de desarrollarse en condiciones desfavorables en comparación

con otras especies (Fachet *et al.*, 2020). La exposición a estos factores promueve cambios en el contenido de metabolitos y su eficiencia fotosintética. La salinidad y la baja concentración de nitrógeno en el medio de cultivo aumentan el contenido de pigmentos en todas las células microalgales (Liang *et al.*, 2020).

Las clorofilas, ficobilinas y los carotenoides se encuentran entre los biocompuestos más utilizados a nivel industrial y comercial. Estas moléculas se utilizan principalmente en las industrias farmacéutica, nutracéutica y cosmetológica por sus propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias y antiproliferativas, además de ser una fuente natural de pigmentos para diferentes organismos en cultivo (Aklakur, 2018) (Aklakur, 2018). La microalga *D. tertiolecta* posee clorofila *a* y *b*, además de carotenoides de gran interés para fines biotecnológicos, tales como α y β -caroteno, violaxantina, neoxantina, zeaxantina y luteína, entre otras xantofilas (Chagas *et al.*, 2015; Kadkhodaei *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2017; Pereira y Otero, 2019).

Las clorofilas son un grupo de pigmentos que se encuentran presentes en los cloroplastos de la célula. Se componen de dos partes: un anillo de porfirina que contiene un átomo de magnesio central, rodeado de cuatro átomos de nitrógeno cuya función es absorber luz, además de contar con una cadena hidrófoba de fitol, la cual mantiene integrada la clorofila a la membrana fotosintética. Típicamente, las clorofilas tienen dos tipos de absorción en el espectro visible, uno en el entorno de la luz azul (400-500 nm) y otro en la zona roja (600-700 nm), reflejando las longitudes entre 500 y 600 nm, correspondientes al color verde (Janka *et al.*, 2020; Nikolaou *et al.*, 2015; Viera y Roca, 2020).

Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales que pueden ser sintetizados por plantas, algas y bacterias fotosintéticas. Son de coloración amarillo, naranja y rojo. Su estructura química consiste en al menos 40 carbonos unidos a través de dobles enlaces (cromóforo), algunos carotenoides pueden contener anillos en sus extremos o grupos funcionales que incluyen al oxígeno (xantofilas). Desde el punto de vista químico, los carotenoides son tetraterpenos constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Existen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno en sus anillos terminales (con configuraciones α , β , γ o ϵ),

aunque también pueden presentarse acíclicos (como el licopeno), y las xantofilas que son derivados oxigenados de los carotenos (Hashimoto *et al.*, 2016; Wurtzel, 2019).

La inclusión de átomos de oxígeno en los anillos terminales de las xantofilas tienen como característica principal la formación de grupos funcionales hidroxilo (OH) y epoxi (epóxidos 5,6- o 5,8-). También se encuentran los grupos aldehído (CHO), ceto (C=O), carboxi (CO²H), carbometoxi (CO²Me) y metoxi (Ome). Actualmente se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides. Algunos de los carotenoides son precursores de vitamina A, principalmente el β-caroteno (Gong y Bassi, 2016; Novoveská *et al.*, 2019).

En organismos fotosintéticos los carotenoides desempeñan un papel vital en los centros de reacción, ya sea participando en el proceso de transferencia de energía o protegiendo el complejo antena contra la oxidación. En organismos no fotosintéticos, se les ha vinculado con mecanismos de prevención de la oxidación celular (Patias *et al.*, 2017). Para poder acceder a los carotenoides producidos por los organismos fotosintéticos tales como microalgas, se han desarrollado múltiples técnicas de extracción, utilizando uno o varios solventes, dependiendo del extracto de interés, ya que distintos solventes arrastran compuestos diferentes debido a la polaridad. Entre los más usados para este fin se encuentran el hexano, el metanol, la acetona y el etanol (Amorim-Carrilho *et al.*, 2014). Cabe destacar que la mayoría de los solventes solo están autorizados para estudios de identificación, aislamiento y caracterización estructural, ya que a pesar de ser evaporados, podrían arrastrar trazas de los mismos, que pudieran ser nocivos para la salud. Por otra parte, el solvente etanol es el único aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para la extracción de compuestos bioactivos y su inclusión en matrices alimentarias o su uso en el área farmacéutica. Las características estructurales permiten a los carotenoides tener distintas propiedades funcionales y actividades biológicas sobre la salud humana.

I.5. Actividad biológica de los pigmentos obtenidos de *D. tertiolecta*

Las distintas formas de la clorofila se encuentran distribuidas en todos los organismos fotosintéticos, pudiendo presentarse clorofila *a*, *b*, *c*, *d* y *f*, sin embargo, para microalgas se ha reportado la clorofila *a*, *b*, *c* y *d* (Janka *et al.*, 2020). El principal papel de las clorofilas en la

fotosíntesis es la absorción de fotones electrón. Ese electrón excitado cede su energía a algún pigmento auxiliar, volviendo al estado normal, donde se repite el fenómeno. Al final el electrón excitado facilita la reducción de una molécula, completando la conversión de energía luminosa en energía química (Song *et al.*, 2016; Ferreira y Sant'Anna, 2017).

Por otro lado, aunque los carotenoides son pigmentos accesorios, desempeñan un rol de vital importancia para la correcta función de la fotosíntesis, ya que se encuentran relacionados con el complejo antena, en forma de pigmentos antioxidantes, los cuales evitan la oxidación y futura degradación de las moléculas de la clorofila (Hashimoto *et al.*, 2016).

Actualmente a los compuestos antioxidantes presentes en la célula se le clasifican en dos sistemas: el enzimático y el no enzimático. El primero se basa en una defensa que incluye a la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, tioredoxina reductasa y glutatión reductasa. La superóxido dismutasa permite la disminución del ión superóxido en peróxido de hidrógeno y cuya acumulación se evita por el sistema de catalasa/glutatión peroxidasa, transformándolo en oxígeno no molecular, agua y glutatión oxidado. Cuando este sistema se sobrepasa, se presenta una sobreproducción de iones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dando lugar al radical hidroxilo ($\cdot OH$) que es una molécula altamente reactiva, alterando la estructura de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Gao *et al.*, 2017; Ismaiel *et al.*, 2018; Petruk *et al.*, 2018).

El segundo sistema es paralelo al primero y altamente efectivo cuando este se satura. Se encuentra formado por compuestos llamados depuradores de radicales libres; sin embargo, cuando se involucran a moléculas en las que el oxígeno o nitrógeno son el elemento de su estructura, se les denomina especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON) ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , NO), incluyendo en estas a moléculas precursoras de los radicales libres (H_2O_2 , $HONO$). Dentro de los depuradores de estas ERON más conocidos están los tocoferoles, ácido ascórbico, flavonoides (quercitina, luteolina, catequinas), antocianinas, ácidos fenólicos y carotenoides (Cao *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2017).

Por otro lado, el ser humano, entre otros organismos, es capaz de producir sus propios compuestos antioxidantes, llamados antioxidantes endógenos, los cuales son sintetizados *de novo* en el mismo cuerpo. Algunos ejemplos son la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza

la dismutación del O₂ para dar origen a la molécula de H₂O₂; la glutatión peroxidasa (GHX), que cataliza la reducción del H₂O₂; la glutatión (GHS) que ayuda a la reducción de H₂O₂ a H₂O (Olivares *et al.*, 2010). Por otra parte, los antioxidantes exógenos se encuentran en alimentos naturales, entre los cuales se pueden encontrar las vitaminas A, E y C, β-caroteno, luteína, flavonoides, licopenos, ácido tiólico o lipoico y cofactores de cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio, que son necesarios para la actividad enzimática endógena (Olivares *et al.*, 2010).

Los carotenoides producidos por las microalgas son ampliamente utilizados en la industria alimenticia y la farmacéutica debido a su efectividad como antioxidante y bajo costo de producción, aunado a la actividad antihemolítica, que se ha estudiado en años recientes. La medicina alternativa y complementaria es uno de los campos emergentes en la salud, especialmente en el tratamiento de enfermedades degenerativas como el cáncer y leucemia. Los metabolitos secundarios de organismos fotosintéticos tales como flavonoides, terpenos, alcaloides y carotenoides han sido utilizados en diversos estudios para evaluar su actividad antihemolítica (Renugadevi *et al.*, 2018).

La microalga *Dunaliella tertiolecta* es capaz de producir tanto clorofilas como carotenoides en su ambiente natural, sin embargo, si se ve sometida a condiciones estresantes, las concentraciones de estos pigmentos tienden a aumentar, como un mecanismo de defensa. Diversos estudios han llevado a cabo varias técnicas para determinar la actividad antioxidante de los pigmentos obtenidos de *D. tertiolecta*, entre las cuales destacan las actividades de inhibición de los radicales libres 1,1,-difeníl-2-picrihidrazilo (DPPH•) y del ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS⁺) que miden el atrapamiento de radicales libres, mientras que el poder reductor antioxidante del ión férrico (FRAP) mide la reducción de iones férrico.

López *et al* (2015) estresaron a *D. tertiolecta* con exceso de metales en los nutrientes y evaluaron la capacidad anti-radical libre por medio de la técnica DPPH•, mientras que Norzagaray-Valenzuela *et al* (2016) lo hicieron con los residuos de biomasa microalgal al extraer aceite para biocombustibles por medio de las técnicas DPPH• y ABTS⁺, encontrando en ambos estudios que *D. tertiolecta* es una gran fuente natural para la extracción de pigmentos antioxidantes, ya que sus resultados sobresalieron ante otras microalgas. El grado de protección se cuantifica utilizando el antioxidante Trolox como estándar (análogo a la vitamina E).

Diferentes concentraciones de Trolox se utilizan para hacer una curva estándar y las muestras de ensayo se comparan con esto (Afsar *et al.*, 2016; Hou y cui, 2018).

Por otro lado, estos mismos pigmentos tienen un gran interés en la industria médica, ya que se ha corroborado en diversos estudios que poseen actividad antihemolítica, la cual generalmente es evaluada a través del compuesto AAPH (2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)) debido a que es una molécula generadora de radicales libres. Debido a ello, la evaluación del efecto eritroprotector y antiradicalario de los pigmentos puede ser determinada con facilidad. Zamani y Moradshahi (2014) evaluaron la capacidad antihemolítica de *D. salina*, corroborando que el género *Dunaliella* posee pigmentos con capacidad eritroprotectora, sin embargo, esta capacidad no se ha evaluado para la especie *D. tertiolecta*, por lo que es importante conocer todo el rango de posibilidades que ofrecen los pigmentos extraídos.

I.6. Metodología de superficie de respuesta (MSR)

La MSR utiliza un conjunto de técnicas avanzadas de diseños de experimentos (DOE) que ayudan a entender las variables respuestas y optimizarlas. Es utilizada frecuentemente para refinar detalles de los modelos estadísticos después de determinar los factores más importantes a estudiar, especialmente si se sospecha que existe una curvatura en la superficie de respuesta en diseños cribados o factoriales. La diferencia más importante entre una ecuación de un diseño factorial y de una ecuación de superficie de respuesta es la adición de términos cuadráticos (n^2), permitiendo modelar la curvatura de la o las respuestas estudiadas (Lenth, 2009).

La ecuación polinomial de segundo orden o cuadrática puede ser útil para mapear una región de la superficie de respuesta, que modelan las variables que afectan una respuesta de interés. Además, es útil para encontrar los niveles de las variables independientes que optimizan una variable respuesta.

La MSR es utilizada en situaciones donde varios factores influyen potencialmente en la medida de desempeño de cierto proceso. Esta medida de desempeño es llamada respuesta. Los factores de entrada son llamados variables independientes y están sujetos a los propósitos de un experimento. Generalmente, cuando la MSR es aplicada en investigaciones, la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Debido a esto, el primer paso de la

MSR es encontrar una aproximación adecuada de las funciones entre la respuesta (y) y el conjunto de variables independientes (Lenth, 2009).

Si se requiere maximizar el rendimiento de un proceso (y) con dos variables independientes (X_1 y X_2), se debe entender que y es una función de los niveles de X_1 y X_2 :

$$y = f(X_1, X_2) + \varepsilon$$

donde ε representa el error observado en la respuesta y . Si la respuesta esperada se denota por $E(y) = f(X_1, X_2) = n$, entonces a la superficie representada por

$$n = f(X_1, X_2)$$

se le llama superficie de respuesta. Generalmente la superficie de respuesta se representa gráficamente por medio de una figura tridimensional, donde n se grafica contra los niveles de X_1 y X_2 , empleando un polinomio de orden superior. Algunas veces, cuando se está en un punto de la superficie de respuesta que se encuentra apartado del óptimo, el sistema presenta una curvatura moderada y el modelo de primer orden sería una mejor aproximación. El objetivo de la MSR es llevar al investigador de una manera rápida y eficiente por la trayectoria del mejoramiento hasta la vecindad general del óptimo. Una vez que se ha encontrado la región del óptimo, puede emplearse un modelo más elaborado, como el de segundo orden y llevarse a cabo un análisis para localizar esta región. El último objetivo de la MSR es determinar las condiciones óptimas de producción del compuesto de interés o de mejoramiento de un proceso (Myers *et al.*, 2016).

En estudios previos se ha observado que las modificaciones del medio de cultivo impactan directamente en la producción de pigmentos en microalgas. Sin embargo, estos trabajos utilizan diseños factoriales diferenciados para analizar los datos obtenidos por las diferentes variables estudiadas. De este modo, las respuestas no son maximizadas ni indican la combinación más efectiva de las variables, solamente regresa como resultado el valor obtenido más alto. Por otro lado, usando una ecuación polinomial de segundo orden se obtiene una curvatura de la variable respuesta, culminando en una gráfica de contorno tridimensional con una superficie de respuesta (Sharma *et al.*, 2016).

Por todo lo anterior, es evidente que los pigmentos antioxidantes tienen un gran interés en la industria biotecnológica, especialmente en el área de actividad antioxidante, anti-radical libre

y antihemolítica. Se ha demostrado que las microalgas son una fuente natural y abundante de obtención de pigmentos antioxidantes y dentro de estas, el género *Dunaliella* ha sido ampliamente estudiado en este campo. Particularmente, *Dunaliella tertiolecta* ha demostrado ser capaz de producir una mayor cantidad de pigmentos antioxidantes cuando es expuesta a una deficiencia de nitrógeno y variaciones en la salinidad, es por ello que el objetivo de esta investigación consistió en encontrar un medio óptimo para la obtención de pigmentos antioxidantes a partir de *D. tertiolecta* mediante la implementación de la metodología de superficie de respuesta.

II. HIPÓTESIS

La metodología de superficie de respuesta permite establecer las condiciones óptimas de cultivo de la microalga *D. tertiolecta*, para producir biomasa con un máximo contenido de clorofilas y carotenoides con capacidad antioxidante (anti-radical libre, poder reductor y antihemolítica).

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Optimizar las condiciones de cultivo para la obtención de pigmentos antioxidantes de la microalga *D. tertiolecta* utilizando la metodología de superficie de respuesta.

III.2. Objetivos particulares

1. Determinar la concentración celular de la microalga *D. tertiolecta* cultivada en medios limitantes en nitrógeno y distintas salinidades.
2. Optimizar la producción de pigmentos de la microalga *D. tertiolecta* cultivada en medios limitantes en nitrógeno y distintas salinidades.
3. Determinar la capacidad antioxidantes (poder antioxidante reductor del ion férrico, anti-radical libre y antihemolítica) de los pigmentos obtenidos a partir del medio optimizado de *D. tertiolecta*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Selección de la microalga y condiciones de cultivo

La microalga marina *Dunaliella tertiolecta* fue obtenida de la colección de cepas del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). El bioensayo se llevó a cabo en matraces de 1 L, conteniendo 700 mL de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura (20 ± 1 °C) e iluminación constante (274 ± 52.5 $\mu\text{mol fotón m}^2 \text{ seg}^{-1}$). Se utilizó luz blanca (a una longitud de onda 400-750 nm) mediante lámparas de neón. Para el cultivo se utilizó el medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962) compuesto por nitratos, fosfatos, silicatos, metales traza y vitaminas.

La Tabla 1 muestra los diferentes medios de cultivo utilizados para analizar su comportamiento y adaptación a las diferentes condiciones de estrés celular, debido a la deficiencia de nitrógeno y distintas salinidades. El medio F/2 ($0.88 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaNO}_3$) a 35 unidades prácticas de salinidad (UPS) es por excelencia el más utilizado para el cultivo de microalgas en investigaciones de acuicultura. Vale la pena mencionar que los siguientes tratamientos fueron utilizados solamente para realizar las cinéticas de crecimiento.

Tabla 1. Diseño factorial completamente al azar de los tratamientos (concentraciones de nitrógeno y diferentes salinidades) aplicados en el cultivo de *D. tertiolecta*.

Concentración de nitrógeno	Salinidad (UPS)
$0.88 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (1)*	25
	35
	45
$0.44 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.5)*	25
	35
	45
$0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.25)*	25
	35
	45

* mL de NaNO_3 por cada litro de agua marina por cultivo.

IV.2. Concentración celular y cinéticas de crecimiento

El cultivo microalgal fue monitoreado durante 21 días a través de todas sus fases de crecimiento. Con la finalidad de obtener las cinéticas de crecimiento, diariamente se tomó 1 mL de cada tratamiento y se le agregó solución de lugol (I₂ 1% y KI 2% en agua destilada) para fijar la muestra y facilitar el conteo. Subsecuentemente, la muestra fue colocada en una cámara de Neubauer de 0.1 mm. El conteo se realizó utilizando un microscopio óptico compuesto (Olympus CX43 microscopy Europe), estableciendo la densidad celular con la Ec. 1 (Andersen, 2005).

$$Ec. 1 \frac{\#Cél}{mL} = \left(\# \frac{cél}{8} \right) * 10000$$

IV.3. Diseño de experimento y optimización estadística

Para optimizar la producción de pigmentos se aplicó un diseño central compuesto (DCC) con al menos tres réplicas por tratamiento ($n \geq 3$). Se evaluó la interacción entre las diferentes variables y sus diferentes niveles. Las variables independientes fueron: medios deficientes en nitrógeno (0.22 y 0.44 mol·L⁻¹), diferentes salinidades (25, 35 y 45 UPS) y edad de cultivo (día de cosecha). El DCC está basado en una ecuación polinomial de segundo orden (Ec. 2) donde Y es la variable respuesta, β_0 representa la constante, β_{ki} es el coeficiente de regresión lineal, β_{kii} es el coeficiente de regresión cuadrático, β_{kji} es el efecto de la interacción de las variables y ϵ es el error experimental. Las condiciones de cultivo fueron optimizadas con la finalidad de obtener pigmentos, realizar su cuantificación y evaluar su actividad antioxidante. Los resultados se basaron en la Ec. 2 utilizada para cada variable respuesta (Clorofila a , b , c , clorofila total, carotenoides totales y rendimiento):

$$Ec 2. Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_j^k \beta_{ij} X_i X_j$$

La optimización de las condiciones de cultivo para la producción de pigmentos fue evaluada por promedios del DCC. Para crear la matriz de optimización, se utilizó el programa estadístico JMP v11, donde las variables independientes que afectaron a la producción de pigmentos en la microalga fueron añadidas manualmente a través de un diseño de experimentos (DDE).

Los rangos de las variables independientes fueron adjuntados como se muestra a continuación: X_1 representando la concentración de nitrógeno (0.22, 0.55 y 0.88 mol·L⁻¹ de NaNO₃), X_2 representando la salinidad (25, 35 y 45 UPS) y X_3 representando el día de cosecha (día 5, día 10 y día 15). La matriz de optimización fue generada con un ANOVA integrado por el programa JMP v11 con una $p < 0.05$. Después de que la matriz de optimización fuera generada, una prueba de falta de ajuste ($p > 0.05$) fue realizada con la finalidad de asegurar que los valores de predicción se ajustaran adecuadamente al modelo, por lo cual se concluye que para el modelo de optimización utilizado, no existe una falta de ajuste.

IV.4. Metodología de superficie de respuesta (MSR)

Se aplicó un DCC de tres variables con tres niveles para evaluar el efecto de la concentración de nitrógeno, diferentes salinidades y edad de cultivo en seis respuestas (clorofila *a*, *b*, *c*, clorofila total, carotenoides totales y rendimiento), así como para su actividad anti-radical libre, antioxidante y antihemolítica. La Ec. 2 fue aplicada para evaluar cada variable respuesta.

El número de experimentos (N) necesarios para el desarrollo de la matriz de optimización se define como $N = 2K(k-1) + C_0$, donde k es el número de factores y C_0 es el número de réplicas del punto central para cada variable independiente. El DCC fue especialmente seleccionado debido a que requiere menos corridas en casos donde existen más de 2 variables. Basado en el análisis de varianza, se determinaron los coeficientes de regresión individuales de los términos lineales, cuadráticos y de interacción.

Con la finalidad de visualizar la relación entre las respuestas y los niveles experimentales de cada factor y deducir las condiciones óptimas, se utilizaron los coeficientes de regresión para llevar a cabo los cálculos estadísticos con el fin de generar las gráficas de superficie tridimensionales de la ecuación polinomial ajustada. Se usó el paquete estadístico JMP v11 para

realizar el análisis de los datos obtenidos, así como la generación de las gráficas tridimensionales.

IV.5. Extracción y cuantificación de los pigmentos

Se cosecharon y centrifugaron 200 mL de cultivo a 3200 x g por 10 minutos en una centrífuga (Thermo Scientific™, Heraeus™ modelo Multifuge™ X1R). Posteriormente se retiró el sobrenadante y se congeló la muestra (-80 °C), después, la biomasa fue liofilizada (Yamato Scientific Co. LTD lyophilizer, modelo DC401). Una vez que la microalga se secó totalmente, se añadieron 5 mL de metanol (99%) para dejar reposar las muestras en refrigeración y en oscuridad por 24 horas. Después se realizó una extracción asistida por pulsos ultrasónicos (Generator ultrasonic pulses Branson Digital Sonifier Osonica, LLC. E.U.A.) de los pigmentos por tres intervalos de 15 segundos (amplitud de 30%, 400 w y 500 mHz). Esto con el fin de lisar la pared celular y provocar que los pigmentos sean liberados. Una vez aplicados los pulsos, se dejó reposar en refrigeración y oscuridad por 24 horas. Finalmente, se centrifugó a 3200 x g durante 10 minutos y cada pigmento se leyó de acuerdo a su espectro de absorción.

La clorofila *a*, *b*, *c*, total y los carotenoides totales se determinaron en conjunto de acuerdo a Lichtendthaler & Wellburn (1983) y Wellburn (1994). Previamente a la extracción de los pigmentos, se estandarizó la técnica utilizando metanol al 99%. La concentración de clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b), clorofila *c* (C_{c1+c2}), clorofila total (C_{total}) y carotenoides totales (C_{x+c}) fue calculada a través de distintas densidades ópticas de acuerdo a las siguientes ecuaciones, usando 300 µL de extracto metanólico a partir de 0.1 mg de muestra, en un espectrofotómetro de microplacas de 96 pocillos (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). El rendimiento fue determinado por medio del peso de la microalga liofilizada.

$$C_a = 11.85A_{664} - 1.54A_{647} + 0.08A_{630}$$

$$C_b = -5.43A_{664} + 21.03A_{647} - 2.66A_{630}$$

$$C_{c1+c2} = -1.67A_{664} - 7.6A_{647} + 21.52A_{630}$$

$$C_{total} = 21.3877A_{630} + 10.3739A_{647} + 10.3739A_{664} + 5.5309A_{691}$$

$$C_{x+c} = (1000.65A_{470} - 2.86C_a - 129.2C_b)/221$$

IV.6. Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante de los pigmentos se llevó a cabo a través de tres métodos de actividad anti-radical libre (DPPH• y ABTS^{•+}), poder antioxidante del ión férrico ($\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$) (FRAP) y finalmente se analizó la capacidad de inhibición de hemólisis inducida por radicales libres generados por AAPH sobre eritrocitos humanos.

IV.6.1. Actividad de inhibición del radical libre 1,1,-difetil-2-picrilhidrazilo (DPPH•)

Para analizar la actividad anti-radical libre DPPH• se llevó a cabo la metodología presentada por Molineux (2004). Se preparó una solución de DPPH• disuelto en metanol, presentando una absorbancia ajustada de 0.7 ± 0.01 a 515 nm, esto con la finalidad de obtener una buena precisión de las lecturas del espectrofotómetro incluyendo la decadencia esperada de la absorbancia durante el ensayo de DPPH•, ya los radicales son más estables cuando se encuentran en ese punto de la curva.

Una vez ajustada la absorbancia, se preparó un control y una muestra problema; el primero se preparó mezclando 20 μL de metanol + 200 μL de DPPH•, mientras que la muestra problema ($n \geq 3$) estuvo constituida por 20 μL de extracto metanólico de *D. tertiolecta* + 200 μL de DPPH•. La reacción se llevó a cabo por 30 minutos en oscuridad y una vez transcurrido este tiempo, se leyó por triplicado a 515 nm en un espectrofotómetro de microplacas de 96 pocillos (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol ET}$ (equivalentes Trolox)/g *ps*.

IV.6.2. Actividad de inhibición del radical libre ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+})

Se siguió la metodología propuesta por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Se activó el radical catiónico ABTS^{•+} por medio de la adición de persulfato de potasio, el cual oxidó al agente ABTS, produciendo un antioxidante con capacidad de donación de protones. La solución de ABTS^{•+} fue diluida con metanol para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.01 a 734 nm. Se preparó una muestra control con 20 μL de metanol + 270 μL de ABTS^{•+}, mientras que la muestra

problema ($n \geq 3$) estuvo compuesta por 20 μL de extracto de *D. tertiolecta* + 270 μL de ABTS⁺. Se permitió reposar las muestras durante 30 minutos en oscuridad para después realizar lecturas por triplicado a 734 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Una vez obtenidas los datos, se reportaron como $\mu\text{mol ET/g ps}$ por medio de la ecuación de la curva: $0.5107x-0.6476$.

IV.6.3. Poder reductor antioxidante del ión férrico (FRAP)

El poder reductor del extracto fue determinado utilizando el ensayo de FRAP descrito por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. Las soluciones madre fueron búfer de acetato de sodio (300 mM, pH 3.6), cloruro férrico (FeCl_3) (20 mM) y solución de TPTZ (2,4,6-tripidil-s-triazina) (10 mM) en HCl (40 mM). La solución de trabajo de FRAP se preparó en una relación 10:1:1 (búfer: FeCl_3 :TPTZ).

Se preparó una muestra control con 20 μL de metanol + 280 μL de FRAP, mientras que la muestra problema ($n \geq 3$) consistió de 20 μL de extracto de *D. tertiolecta* + 280 μL de FRAP. Se dejó reaccionar por 30 minutos en oscuridad para después leerlo por triplicado a 638 nm en un espectrofotómetro de microplacas de 96 pocillos (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Una vez obtenidas las lecturas, se reportaron como $\mu\text{mol ET/g ps}$ por medio de la ecuación de la curva: $0.4592x-0.0583$.

IV.6.4. Actividad protectora sobre daño oxidativo en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) (AAPH)

Se llevó a cabo el método descrito por Lu *et al.* (2010). Se extrajeron 5 mL de sangre tipo O RhD+vo a tres individuos distintos ($n \geq 3$). Se mezcló 1 mL de sangre + 3 mL de solución salina para después homogeneizar la solución por medio de inversión. Una vez totalmente mezclados, se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos a 25 °C. Se retiró el plasma y se repitió el proceso de inversión y centrifugación dos veces más. Se tomaron 5 mL de solución salina y se mezclaron con 100 μL de sangre lavada sin coagular. Se prepararon las soluciones control + (300 μL de eritrocitos), control – (150 μL de eritrocitos + 150 μL de AAPH) y la muestra problema (100 μL de eritrocitos + 100 μL de APPH + 100 μL de extracto de *D. tertiolecta*) en microtubos de

1.7 mL (tipo Eppendorf). Las muestras fueron incubadas en agitación por 3 horas a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se resuspendieron en 1 mL de solución salina y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos a 25 °C. Se colocaron 300 µL de muestra por triplicado en una microplaca de 96 pocillos para leerlas a 540 nm en un lector de microplacas (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición de hemólisis (PIH) por medio de la Ec. 3.

$$Ec. 3 \text{ PIH} = \frac{AAPH1 - HM}{AAPH1} \times 100$$

donde *AAPH1* es la absorbancia de la hemólisis completa y *HM* es la hemólisis del extracto.

IV.7. Análisis estadístico

La información de la concentración celular se analizó con estadística descriptiva, además, se realizó un análisis de varianza de dos vías (medios de cultivo y salinidad) para determinar las diferencias entre los tratamientos en cuanto a la concentración celular, contenido de pigmentos y actividad antioxidante. En los casos donde se encontraron diferencias significativas en las variables medidas se empleó la prueba “*a posteriori*” de Tukey ($p \leq 0.05$). Para el análisis estadístico se utilizaron los programas estadísticos JMP v11 y Minitab 18 y los resultados se expresaron como medias \pm desviación estándar ($n \geq 3$).

V. RESULTADOS

V.1. Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento se han agrupado con base en la salinidad, mostrando las diferencias en el crecimiento entre los medios modificados. En la Figura 2 se muestran las cinéticas (Log_2 cél/mL) resultantes de los medios con 0.88, 0.44 y 0.22 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 a 25 UPS. La etapa estacionaria de estos cultivos se observó entre los días 5 y 15, con excepción del tratamiento con 0.88 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, que se extendió hasta el día 18. Respecto a las concentraciones celulares, los tratamientos con 0.88 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y 0.44 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mostraron las mayores densidades celulares con 21.33 Log_2 cél/mL ($2.64 \times 10^6 \pm 3.88 \times 10^4$ cél/mL) y 21.28 Log_2 cél/mL ($2.56 \times 10^6 \pm 2.63 \times 10^5$ cél/mL) en el día 15, respectivamente, mientras que para el tratamiento con 0.22 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ fue de 20.43 Log_2 cél/mL ($1.17 \times 10^6 \pm 7.39 \times 10^4$ cél/mL) en el día 10. Se aplicó un ANOVA en el día de la cosecha para cada tratamiento. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tratamiento con 0.22 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 respecto a los tratamientos con 0.44 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y 0.88 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 , los cuales no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos. En los tres tratamientos se observó una fluctuación en la concentración celular a partir del día 5 hasta la fase de declive.

La Figura 3 muestra las cinéticas (Log_2 cél/mL) resultantes de los tratamientos con 0.88, 0.44 y 0.22 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 a 35 UPS. Al igual que en la Figura 2, la etapa estacionaria fue observada en el intervalo de los días 5-15, con excepción del medio con 0.88 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ el cual mostró la mayor densidad celular con 21.37 Log_2 cél/mL ($2.71 \times 10^6 \pm 7.79 \times 10^4$ cél/mL) en el día 17. Los tratamientos con 0.44 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y 0.22 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ mostraron una disminución en su densidad celular máxima, con 21.28 Log_2 cél/mL ($2.45 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$ cél/mL) en el día 15 y 20.25 ($1.26 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^5$ cél/mL) en el día 13, respectivamente. El ANOVA realizado arrojó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres tratamientos.

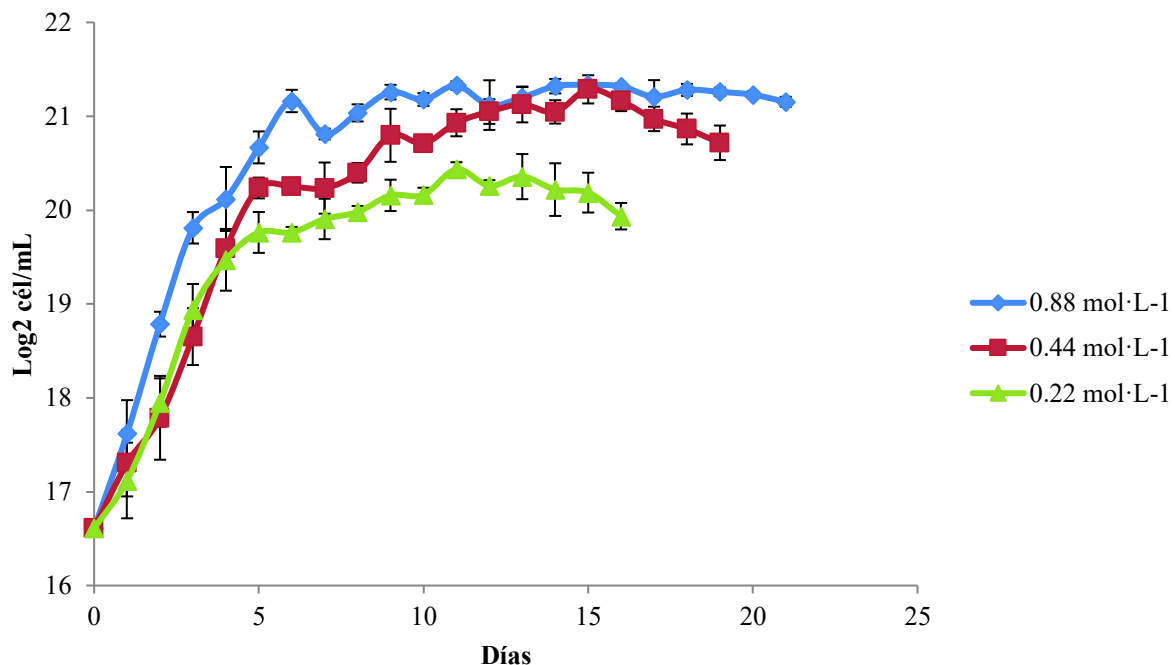


Figura 2. Cinéticas de crecimiento (Log_2 cél/mL) de la microalga *D. tertiolecta* a salinidad de 25 UPS en diferentes concentraciones de nitrógeno (0.88, 0.44 y 0.22 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3).

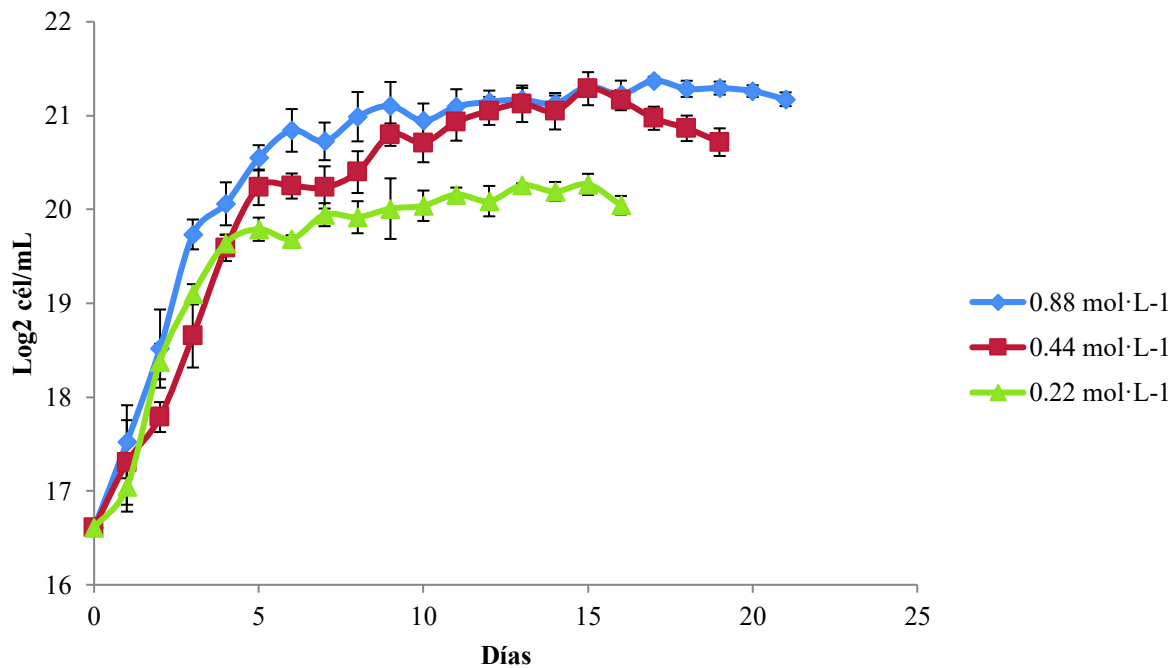


Figura 3. Cinéticas de crecimiento (Log_2 cél/mL) de la microalga *D. tertiolecta* a salinidad de 35 UPS en diferentes concentraciones de nitrógeno (0.88, 0.44 y 0.22 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3).

Los tratamientos con deficiencia de nitrógeno (0.44 y $0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) en combinación con una salinidad de 45 UPS (Figura 4) mostraron un incremento en la densidad celular tanto en el día de cosecha como en el desarrollo de la cinética en comparación con los agrupados en la Figura 4. El comportamiento de la microalga confirma que su fase estacionaria se encuentra entre el día 5 y el día 15 con deficiencia de nitrógeno, mientras que para una concentración de nitrógeno comúnmente utilizada ($0.88 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), llega hasta el día 18. Los valores obtenidos en los tratamientos con $0.44 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (con $21.07 \text{ Log}_2\text{cél}/\text{mL}$ ($2.21 \times 10^6 \pm 1.21 \text{ cél}/\text{mL}$)) y $0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (con $20.66 \text{ Log}_2\text{cél}/\text{mL}$ ($1.66 \times 10^6 \pm 7.62 \times 10^5 \text{ cél}/\text{mL}$)) permanecen por debajo de aquellos obtenidos con $0.88 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (con $21.34 \text{ Log}_2\text{cél}/\text{mL}$ ($2.68 \times 10^6 \pm 1.25 \times 10^4 \text{ cél}/\text{mL}$)). Lo anterior puede indicar que *D. tertiolecta* tolera la deficiencia de nitrógeno de manera más eficiente a bajas o altas salinidades. Debido a esto, puede ser inferido que *D. tertiolecta* compensa el estrés por nitrógeno con algún mecanismo que le permita ahorrar energía en el proceso de ósmosis y canalizarlo hacia una reproducción efectiva para compensar la falta de nitrógeno en el medio (Sui *et al.*, 2019).

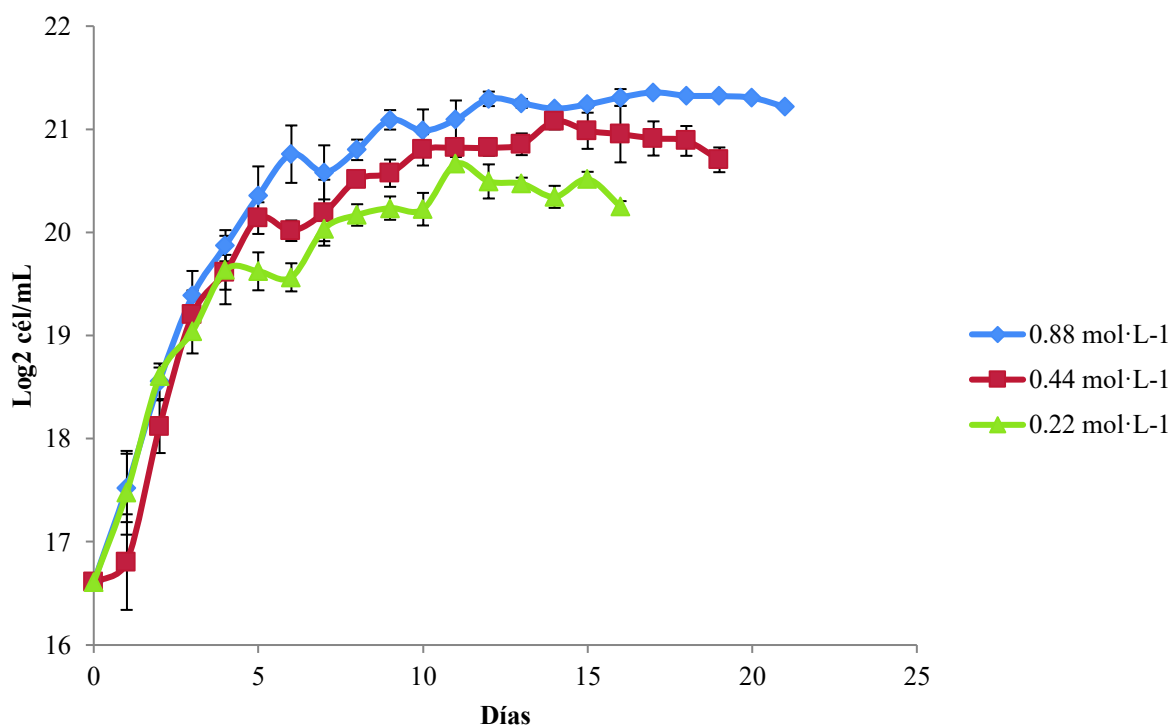


Figura 4. Cinéticas de crecimiento ($\text{Log}_2 \text{cél}/\text{mL}$) de la microalga *D. tertiolecta* a salinidad de 45 UPS en diferentes concentraciones de nitrógeno (0.88 , 0.44 y $0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3).

V.2. Optimización para la producción de pigmentos

V.2.1 Matriz del diseño central compuesto (DCC) para la optimización estadística y MSR para la producción de clorofila *a*, clorofila *b* y clorofila *c*

En la Tabla 2 se muestra la matriz de DCC utilizada para optimizar la producción de pigmentos de *D. tertiolecta*. Este diseño puede ajustarse a un modelo cuadrático completo a través de una ecuación polinomial de segundo orden (Ec. 2), es decir, se aplica un diseño experimental secuencial que incluye información de un experimento factorial planificado para modelar una curva de la variable respuesta mediante una estimación eficiente del primer orden (X^1) y del orden cuadrático (X^2). Subsecuentemente, la MSR fue utilizada para determinar los factores que tuvieron un mayor efecto en las variables respuestas para obtener la curvatura y la superposición de las gráficas usando el diseño establecido. El efecto de la combinación de las tres variables independientes (concentración de nitrógeno, salinidad y edad de cultivo) se muestra a continuación:

Tabla 2. Matriz de DCC para el crecimiento de *D. tertiolecta* en diferentes concentraciones de nitrógeno, diferentes salinidades y cosechada en diferentes días para la producción de clorofila *a* (C_a), clorofila *b* (C_b) y clorofila *c* (C_{c1+c2})

Corrida	Experimental							Predicción		
	Patrón	Niveles			C_a	C_b	C_{c1+c2}	C_a	C_b	C_{c1+c2}
		X_1	X_2	X_3	(mg/g ps)	(mg/g ps)	(mg/g ps)	(mg/g ps)	(mg/g ps)	(mg/g ps)
1	0A0	0.55	45	10	1.73	0.78	0.46	0.71	0.66	0.09
2	00a	0.55	35	5	1	0.73	0.12	1.17	0.95	0.23
3	a00	0.22	35	10	1.85	1.42	0.52	2.48	1.17	0.93
4	+++	0.22	45	15	0.66	0.39	0.18	1.61	0.48	0.3
5	0a0	0.55	25	10	1.95	1.3	0.45	3.83	1.69	0.98
6	00A	0.55	35	15	0.72	0.48	0.23	0.71	0.53	0.27
7	000	0.55	35	10	1.25	0.73	0.31	0.4	0.45	0.15
8	++-	0.88	45	5	6.52	4.6	1.93	2.32	1.29	0.65
9	+ - +	0.88	25	15	2.38	1.77	0.77	2.71	1.54	0.83
10	--+	0.22	25	15	13.68	4.85	3.71	12.29	4.92	3.41
11	+--	0.88	25	5	4.41	2.24	1.02	3.25	2.08	0.86
12	+++	0.88	45	15	2.88	1.28	0.56	2.32	1.29	0.65
13	---	0.22	25	5	6.11	2.66	1.9	6.46	2.58	1.78
14	A00	0.88	35	10	10	1.01	0.63	1.23	1.32	0.65
15	-+-	0.22	45	5	1.15	0.63	0.28	0.61	0.79	0.18

V.2.1.1. Efecto de la combinación de las variables independientes en la producción de clorofila *a*, clorofila *b* y clorofila *c*

V.2.1.1.1. Validación del modelo para la producción de clorofila *a*, *b* y *c*

Se llevaron a cabo un total de 15 corridas para la producción de clorofila *a*, *b* y *c*, en las cuales se aplicó un ANOVA para determinar si existían diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada tratamiento (Tablas 3a, 3b y 3c). Se realizó una regresión lineal múltiple para identificar qué variables independientes afectan en mayor o menor medida una respuesta, obteniendo $R^2 > 0.90$. Este valor (cuando es cercano a 1, $R^2 = 1$) indica que existe una alta dependencia de los resultados experimentales con los predichos por las ecuaciones derivadas del modelo de optimización, lo que implica que el modelo es confiable.

Tabla 3a. ANOVA de la producción de clorofila *a* de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	9	157.35764	17.4842	7.8553
Error	6	13.35476	2.2258	Prob > F
C. Total	15	170.71239		0.0104*

* Indica $p < 0.05$.

Tabla 3b. ANOVA de la producción de clorofila *b* de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	9	27.739508	3.08217	21.7658
Error	6	0.849636	0.14161	Prob > F
C. Total	15	28.589144		0.0007*

* Indica $p < 0.05$.

Tabla 3c. ANOVA de la producción de clorofila *c* de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	9	12.315753	1.36842	8.6445
Error	6	0.949791	0.15830	Prob > F
C. Total	15	13.265544		0.0081*

* Indica $p < 0.05$.

Asimismo, se realizó la prueba de falta de ajuste, con el fin de evaluar si los datos podrían ajustarse mejor en una relación curvilínea, obteniendo un valor de $p < 0.05$. Este valor indica que el modelo se ajusta adecuadamente al diseño experimental (Tablas 4a, 4b y 4c).

Tabla 4a. Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de clorofila *a* de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	R cuadrado máximo
Falta de ajuste	5	13.354756	2.67095	-	1.0000
Error puro	1	0.000000	0.00000	Prob > F	
Error total	6	13.354756		-	

Tabla 4b. Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de clorofila *b* de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	R cuadrado máximo
Falta de ajuste	5	0.84963552	0.169927	-	1.0000
Error puro	1	0.000000	0.00000	Prob > F	
Error total	6	0.84963552		-	

Tabla 4c. Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de clorofila *c* de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	R cuadrado máximo
Falta de ajuste	5	0.94979078	0.189958	-	1.0000
Error puro	1	0.000000	0.00000	Prob > F	
Error total	6	0.94979078		-	

Para conocer los efectos que tuvieron una mayor relevancia en la producción de clorofila *a*, *b* y *c*, fue necesario verificar que la relación de las variables era categórica-continua, debido a que se compararon los promedios de múltiples variables. Una vez que la relación fue determinada, se llevó a cabo una prueba de los efectos a través de los parámetros estimados (deficiencia de nitrógeno, salinidad, día de cosecha y sus interacciones). Las Tablas 5a, 5b y 5c muestran los efectos que tuvieron las variables independientes en la producción de los pigmentos.

Se encontraron tres parámetros significativos para la producción de clorofila *a* (salinidad, interacción concentración de nitrógeno-salinidad e interacción concentración de nitrógeno-edad

de cultivo), seis para clorofila *b* (salinidad, concentración de nitrógeno, interacción concentración de nitrógeno-salinidad, interacción concentración de nitrógeno-edad de cultivo e interacción salinidad-edad de cultivo) y cinco para clorofila *c* (salinidad, concentración de nitrógeno, interacción concentración de nitrógeno-salinidad, interacción concentración de nitrógeno-edad de cultivo e interacción salinidad-edad de cultivo).

Tabla 5a. Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de clorofila *a* de *D. tertiolecta*

Fuente	Parámetros N	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
X ₁	1	1	3.906250	1.7550	0.2335
X ₂	1	1	24.304810	10.9196	0.0163**
X ₃	1	1	0.127690	0.0574	0.8187
X ₁ * X ₁	1	1	5.621000	2.5254	0.1631
X ₁ * X ₂	1	1	52.993513	23.8088	0.0028*
X ₂ * X ₂	1	1	9.220800	4.4127	0.0880
X ₁ * X ₃	1	1	20.320312	9.1295	0.0234**
X ₂ * X ₃	1	1	11.688613	5.2514	0.0618
X ₃ * X ₃	1	1	2.089073	0.9386	0.3701

* Indica interacción muy significativa (p<0.01). ** Indica interacción significativa.

Tabla 5b. Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de clorofila *b* de *D. tertiolecta*

Fuente	Parámetros N	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
X ₁	1	1	0.0547600	0.3867	0.5569
X ₂	1	1	2.6419600	18.6571	0.0050*
X ₃	1	1	0.4368100	3.0847	0.1296
X ₁ * X ₁	1	1	1.6742072	11.8230	0.0138**
X ₁ * X ₂	1	1	8.7362000	61.6937	0.0002*
X ₂ * X ₂	1	1	1.3929981	9.8371	0.0202**
X ₁ * X ₃	1	1	4.1184500	29.0839	0.0017*
X ₂ * X ₃	1	1	3.4848000	24.6091	0.0026*
X ₃ * X ₃	1	1	0.2246277	1.5863	0.2546

* Indica interacción muy significativa (p<0.01). ** Indica interacción significativa.

Tabla 5c. Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de clorofila *c* de *D. tertiolecta*

Fuente	Parámetros N	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
X ₁	1	1	0.0547600	0.3867	0.5569
X ₂	1	1	2.6419600	18.6571	0.0050*
X ₃	1	1	0.4368100	3.0847	0.1296
X ₁ * X ₁	1	1	1.6742072	11.8230	0.0138**
X ₁ * X ₂	1	1	8.7362000	61.6937	0.0002*
X ₂ * X ₂	1	1	1.3929981	9.8371	0.0202**
X ₁ * X ₃	1	1	4.1184500	29.0839	0.0017*
X ₂ * X ₃	1	1	3.4848000	24.6091	0.0026*
X ₃ * X ₃	1	1	0.2246277	1.5863	0.2546

* Indica interacción muy significativa (p<0.01). ** Indica interacción significativa.

Las ecuaciones polinomiales de segundo orden para la producción de clorofila *a*, *b* y *c* (Ec. 4, Ec. 5 y Ec. 6, respectivamente) fueron obtenidas a través del programa estadístico JPM v11, con la finalidad de determinar los valores de producción de pigmentos así como la creación de las gráficas de superficie de respuesta con sus respectivas interacciones. Los valores obtenidos de este modelo se encontraron entre 0.66 y 13 mg/g *ps* (Ec. 4), 0.48 y 4.85 mg/g *ps* (Ec. 5) y 0.12 y 3.71 mg/g *ps* (Ec. 6).

$$\begin{aligned} \text{Ec. 4} = & 6.6687183908046 + (-1.8939393939394 * X_1) + (-0.1559 * X_2) + (0.0226 * X_3) \\ & + ((X_1-0.55) * ((X_1-0.55) * 13.4083784554004)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_2 - 35) * \\ & 0.77992424242424)) + ((X_2 - 35) * ((X_2 - 35) * 0.01870172413793)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_3 - 10) \\ & * -0.9659090909091)) + ((X_2 - 35) * ((X_3 - 10) * -0.024175)) + ((X_3 - 10) * ((X_3 - 10) * \\ & 0.03560689655172)) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ec. 5} = & 2.54573563218391 + (0.22424242424242 * X_1) + (-0.0514 * X_2) + (-0.0418 * \\ & X_3) + ((X_1 - 0.55) * ((X_1 - 0.55) * 7.317691016675058)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_2 - 35) * \\ & 0.316666666666667)) + ((X_2 - 35) * ((X_2 - 35) * 0.00726896551724)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_3 - \\ & 10) * -0.4348484848485)) + ((X_2 - 35) * ((X_3 - 10) * -0.0132)) + ((X_3 - 10) * ((X_3 - 10) * \\ & 0.01167586206897)) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ec. 6} = & 1.90072413793104 + (-0.4272727272727 * X_1) + (-0.0444 * X_2) + (0.004 * X_3) \\ & + ((X_1 - 0.55) * ((X_1 - 0.55) * 5.85320287514645)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_2 - 35) * \\ & 0.22159090909091)) + ((X_2 - 35) * ((X_2 - 35) * 0.00382413793103)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_3 - \\ & 10) * -0.2522727272727)) + ((X_2 - 35) * ((X_3 - 10) * -0.007575)) + ((X_3 - 10) * ((X_3 - 10) * \\ & 0.00409655172414)) \end{aligned}$$

V.2.1.2. Superficie de respuesta para la producción de clorofila *a*, *b* y *c*

En este estudio los experimentos del DCC revelaron que los bajos niveles de salinidad en combinación con un día de cosecha tardío con una concentración de nitrógeno en el punto medio, tiene un efecto positivo en la producción de clorofila *a*, *b* y *c* de *D. tertiolecta* (Figura 5). De acuerdo a la Ec. 5, se predijo que la producción más alta de clorofila *a* sería de 16 mg/g *ps* (Figura 5a) con las siguientes condiciones: 25 UPS, cosechada en el día 15 con 0.22 mol·L⁻¹ de NaNO₃, mientras que para clorofila *b* y clorofila *c* fue de 6 mg/g *ps* (Figura 5b) y 4.2 mg/g *ps* (Figura 5c) con las mismas condiciones.

Los principales parámetros tales como salinidad (*X*₂) y edad de cultivo (*X*₃) mejoraron la producción de pigmentos cuando su concentración disminuyó y se aumentó el día de cosecha. Las gráficas de superficie de respuesta muestran las interacciones de las variables en la producción microalgal de clorofila *a*, *b* y *c* durante 16 días. La producción óptima de pigmentos fue obtenida cuando se añadieron las variables “edad de cultivo” en un día tardío y “salinidad” a bajas concentraciones al punto central con 0.22 mol·L⁻¹ of NaNO₃

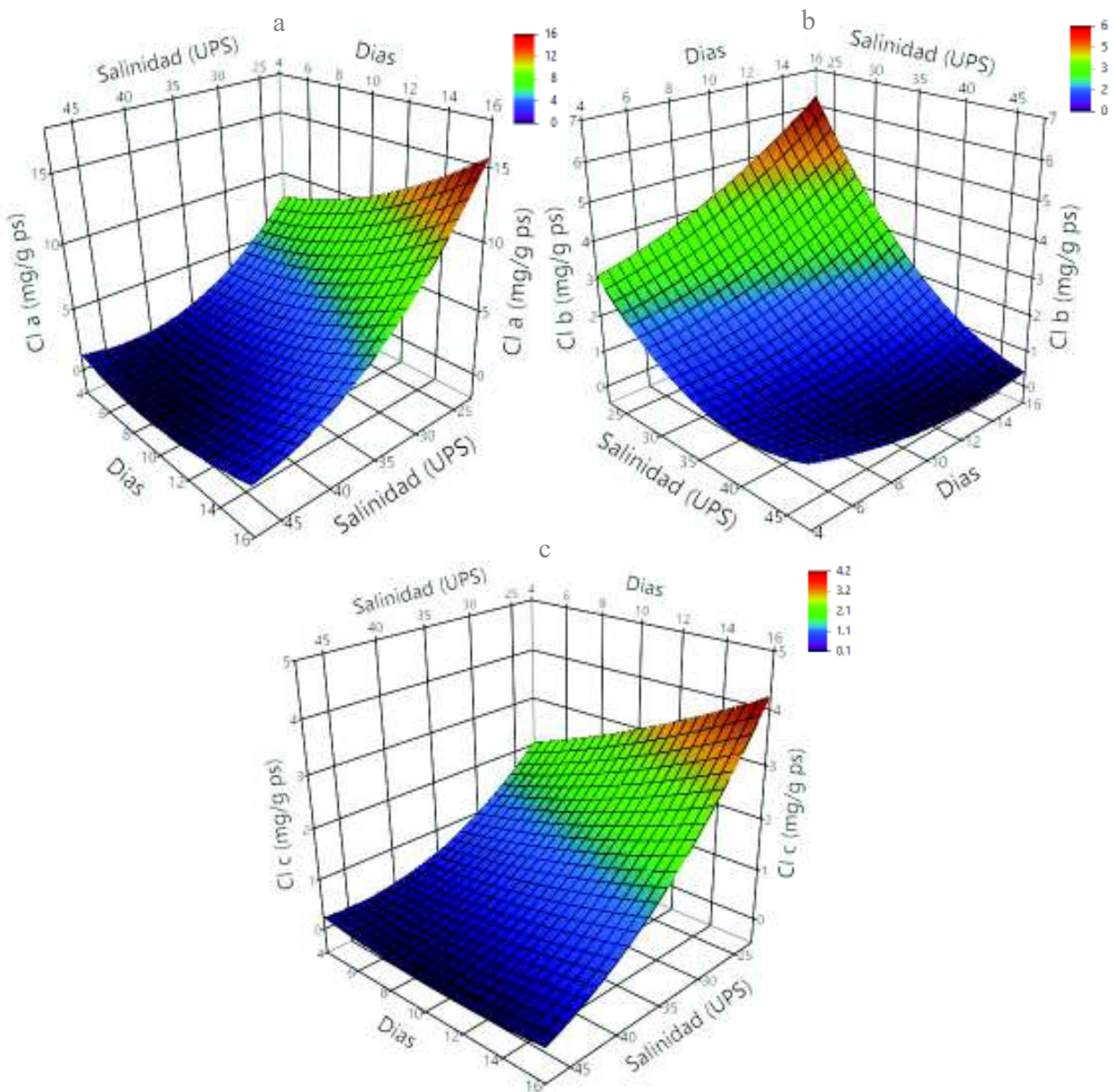


Figura 5. Superficie de respuesta tridimensional representando la producción de clorofila *a* (a), clorofila *b* (b) y clorofila *c* (c) de la microalga *D. tertiolecta* en función de la variación en la salinidad (UPS) y edad de cultivo (día de cosecha) con la concentración de nitrógeno ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3) como punto central.

V.2.2 Matriz del diseño central compuesto (DCC) para la optimización estadística y MSR para la producción de clorofila total, carotenoides totales y rendimiento

De la misma manera en que se llevó a cabo el DCC para las primeras tres variables respuestas, un segundo análisis se realizó para la optimización de clorofila total, carotenoides totales y rendimiento (*ps*) (Tabla 6), incluyendo los datos experimentales y de predicción.

V.2.2.1. Efecto de la combinación de las variables independientes en la producción de clorofila total, carotenoides totales y rendimiento

V.2.2.1.1. Validación del modelo para la producción de clorofila total, carotenoides totales y rendimiento

Se llevaron a cabo un total de 15 corridas para la producción de clorofila total, carotenoides totales y rendimiento, para las cuales se aplicó un ANOVA, encontrando que cada tratamiento es significativamente diferente de los otros ($p < 0.05$) (Tablas 7a, 7b y 7c). Además, se realizó una regresión lineal múltiple, obteniendo una $R^2 > 0.90$ para clorofila total y rendimiento, mientras que para carotenoides totales fue de $R^2 > 0.85$, implicando que el modelo es confiable. De igual manera, se realizó una prueba de falta de ajuste del DCC, en el cual se encontró un valor de $p > 0.05$ (Tablas 8a, 8b y 8c), indicando que el modelo se ajusta adecuadamente al diseño experimental.

Tabla 6. Matriz de DCC para el crecimiento de *D. tertiolecta* en diferentes concentraciones de nitrógeno, diferentes salinidades y cosechada en diferentes días para la producción de clorofila total (Cl_{total}), carotenoides totales (C_{x+c}) y rendimiento (g)

Corrida	Experimental					Predicción				
	Patrón	Niveles			Cl_{total} (mg/g <i>ps</i>)	C_{x+c} (mg/g <i>ps</i>)	Rend. (g)	C (mg/g <i>ps</i>)	C_b (mg/g <i>ps</i>)	Rend. (g)
		X_1	X_2	X_3						
1	0A0	0.55	45	10	3.07	0.99	0.133	2.10	0	0.13
2	00a	0.55	35	5	1.89	0.11	0.1	2.91	0	0.10
3	a00	0.22	35	10	3.83	1.19	0.065	6.72	2.43	0.05
4	+++	0.22	45	15	1.26	0.72	0.108	3.6	1.73	0.12
5	0a0	0.55	25	10	3.74	0.86	0.1	7.66	2.68	0.10
6	00A	0.55	35	15	1.48	0.53	0.166	3.42	1.38	0.16
7	000	0.55	35	10	2.34	0.76	0.101	2.43	0.07	0.11
8	++-	0.88	45	5	13.35	2.78	0.023	15.35	4.59	0.02
9	+ - +	0.88	25	15	4.96	0.72	0.127	6.78	1.45	0.13
10	--+	0.22	25	15	23	13.26	0.06	22.8	11.37	0.06
11	+--	0.88	25	5	7.8	1.77	0.038	7.26	0.58	0.03
12	+++	0.88	45	15	2.96	0.89	0.101	4.69	0.18	0.1
13	---	0.22	25	5	11.04	3.55	0.018	11.11	4.08	0.02
14	A00	0.88	35	10	5.28	0.46	0.028	5.34	0	0.04
15	-+-	0.22	45	5	2.12	0.62	0.1	2.1	0	0.1

Tabla 7a. ANOVA de la producción de clorofila total de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	9	474.13184	52.6813	11.9311
Error	6	26.49273	4.4155	Prob > F
C. Total	15	500.62458		0.0035*

* Indica que $p < 0.05$.

Tabla 7b. ANOVA de la producción de carotenoides totales de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	9	131.10842	14.5676	4.5464
Error	6	19.22516	3.2042	Prob > F
C. Total	15	150.33358		0.0395*

* Indica que $p < 0.05$.

Tabla 7c. ANOVA del rendimiento de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F
Modelo	9	0.02653930	0.002949	20.2751
Error	6	0.00087264	0.000145	Prob > F
C. Total	15	0.02741194		0.0008*

* Indica que $p < 0.05$.

Tabla 8a. Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de clorofila total de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	R cuadrado máximo
Falta de ajuste	5	26.492735	5.29855	-	1.0000
Error puro	1	0.000000	0.00000	Prob > F	
Error total	6	26.492735		-	

Tabla 8b. Prueba de falta de ajuste del DCC para la producción de carotenoides totales de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	R cuadrado máximo
Falta de ajuste	5	19.225158	3.84503	-	1.0000
Error puro	1	0.000000	0.00000	Prob > F	
Error total	6	19.225158		-	

Tabla 8c. Prueba de falta de ajuste del DCC para el rendimiento de *D. tertiolecta*

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Razón F	R cuadrado máximo
Falta de ajuste	5	0.00087264	0.000175	-	1.000
Error puro	1	0.00000000	0.000000	Prob > F	
Error total	6	0.00087264		-	

Se llevó a cabo una prueba de los efectos a través de los parámetros estimados para determinar las variables independientes que tuvieron una mayor influencia en la producción de clorofila total, carotenoides totales y el rendimiento. Los resultados se muestran en las Tablas 9a, 9b y 9c.

Se encontraron cinco parámetros significativos para la producción de clorofila total (salinidad, concentración de nitrógeno, interacción concentración de nitrógeno-salinidad, interacción concentración de nitrógeno-edad de cultivo e interacción salinidad-edad de cultivo),

tres para carotenoides totales (salinidad, interacción concentración de nitrógeno-salinidad e interacción concentración de nitrógeno-edad de cultivo) y cinco para rendimiento (salinidad, concentración de nitrógeno, edad de cultivo, interacción concentración de nitrógeno-salinidad e interacción concentración de nitrógeno-edad de cultivo).

Tabla 9a. Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de clorofila total de *D. tertiolecta*.

Fuente	Parámetros N	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
X ₁	1	1	4.76100	1.0783	0.3391
X ₂	1	1	77.17284	17.4779	0.0058*
X ₃	1	1	0.64516	0.1461	0.7155
X ₁ * X ₁	1	1	34.16073	7.7366	0.0319**
X ₁ * X ₂	1	1	146.29051	33.1315	0.0012*
X ₂ * X ₂	1	1	15.82032	3.5829	0.1072
X ₁ * X ₃	1	1	73.99361	16.7579	0.0064*
X ₂ * X ₃	1	1	51.86711	11.7467	0.0140**
X ₃ * X ₃	1	1	1.40359	0.3179	0.5933

* Indica interacción muy significativa (p<0.01). ** Indica interacción significativa.

Tabla 9b. Prueba de los efectos de los parámetros estimados en la producción de carotenoides totales de *D. tertiolecta*

Fuente	Parámetros N	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
X ₁	1	1	15.951690	4.9784	0.0672
X ₂	1	1	19.796490	6.1783	0.0474**
X ₃	1	1	5.184000	1.6179	0.2505
X ₁ * X ₁	1	1	3.187001	0.9946	0.3571
X ₁ * X ₂	1	1	35.028450	10.9321	0.0163**
X ₂ * X ₂	1	1	3.793092	1.1838	0.3183
X ₁ * X ₃	1	1	20.608200	6.4316	0.0443**
X ₂ * X ₃	1	1	13.886450	4.3338	0.0825
X ₃ * X ₃	1	1	0.931717	0.2908	0.6091

* Indica interacción muy significativa (p<0.01). ** Indica interacción significativa.

Tabla 9c. Prueba de los efectos de los parámetros estimados el rendimiento de *D. tertiolecta*

Fuente	Parámetros N	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Razón F	Prob > F
X ₁	1	1	0.00011560	0.7948	0.4070
X ₂	1	1	0.00148840	10.2338	0.0186**
X ₃	1	1	0.00800890	55.0668	0.0003*
X ₁ * X ₁	1	1	0.01068250	73.4496	0.0001*
X ₁ * X ₂	1	1	0.00365513	25.1315	0.0024*
X ₂ * X ₂	1	1	0.00010613	0.7297	0.4258
X ₁ * X ₃	1	1	0.00171113	11.7652	0.0140**
X ₂ * X ₃	1	1	0.00025313	1.7404	0.2352
X ₃ * X ₃	1	1	0.00137588	9.4601	0.0218**

* Indica interacción muy significativa (p<0.01). ** Indica interacción significativa.

Las ecuaciones polinomiales de segundo orden para la producción de clorofila total, carotenoides totales y del rendimiento (Ec. 7, Ec. 8 y Ec. 9, respectivamente) fueron obtenidas a través del programa estadístico JMP v11. La creación de las gráficas de superficie de respuesta con sus respectivas interacciones también se realizó con este programa. Los valores obtenidos de este modelo se encuentran entre 1.26 y 23 mg/g *ps* (Ec. 7), 0.11 y 13.26 mg/g *ps* (Ec. 8) y 0.018 y 0.133 g (Ec. 9).

$$\text{Ec. 7} = 12.7978965517241 + (-2.0909090909091 * X_1) + (-0.2778 * X_2) + (0.0508 * X_3) + ((X_1 - 0.55) * ((X_1 - 0.55) * 33.0546847788227)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_2 - 35) * 1.29583333333333)) + ((X_2 - 35) * ((X_2 - 35) * 0.02449655172414)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_3 - 10) * -1.8431818181818)) + ((X_2 - 35) * ((X_3 - 10) * -0.050925)) + ((X_3 - 10) * ((X_3 - 10) * 0.02918620689655))$$

$$\text{Ec. 8} = 5.65984482758621 + (-3.8272727272727 * X_1) + (-0.1407 * X_2) + (0.144 * X_3) + ((X_1 - 0.55) * ((X_1 - 0.55) * 10.09626040974)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_2 - 35) * 0.63409090909091)) + ((X_2 - 35) * ((X_2 - 35) * 0.01199482758621)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_3 - 10) * -0.9727272727273)) + ((X_2 - 35) * ((X_3 - 10) * -0.02635)) + ((X_3 - 10) * ((X_3 - 10) * 0.02377931034483))$$

$$\text{Ec. 9} = 0.01347011494253 + (-0.010303030303 * X_1) + (0.00122 * X_2) + (0.00566 * X_3) + ((X_1 - 0.55) * ((X_1 - 0.55) * -0.584528672303)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_2 - 35) * -0.0064772727273)) + ((X_2 - 35) * ((X_2 - 35) * 0.00006344827586)) + ((X_1 - 0.55) * ((X_3 - 10) * 0.00886363636364)) + ((X_2 - 35) * ((X_3 - 10) * -0.0001125)) + ((X_3 - 10) * ((X_3 - 10) * 0.00091379310345))$$

V.2.2.2. Superficie de respuesta para la producción de clorofila total, carotenoides totales y del rendimiento

Los experimentos del DCC revelaron que bajos niveles de salinidad en combinación con un día de cosecha tardío con una concentración de nitrógeno en el punto medio, tiene un efecto positivo en la producción de clorofila total (Figura 6a). Acorde al modelo matemático, se predijo que la producción más alta de clorofila total es de 27 mg/g *ps* con las siguientes condiciones: 25 UPS, cosechada en el día 15 con 0.22 mol·L⁻¹ de NaNO₃. Los parámetros principales tales como salinidad (X₂) y edad de cultivo (X₃) mejoraron la producción de clorofila total cuando la salinidad disminuía y el día de cosecha aumentaba.

La gráfica de superficie de respuesta mostró la interacción de estas dos variables independientes en la producción de clorofila total de la microalga durante 16 días. Los resultados óptimos en la concentración de clorofila total se obtuvieron cuando se añadieron el día de cosecha tardío (día 16) y la salinidad disminuida (25 UPS) al punto central de concentración de nitrógeno con 0.22 mol·L⁻¹ de NaNO₃.

La Figura 6b muestra las interacciones que tuvieron mayor relevancia en la producción de carotenoides totales de *D. tertiolecta*, así como el máximo contenido encontrado en el modelo de predicción. El diseño experimental permite concluir que niveles bajos de salinidad en combinación con una deficiencia de nitrógeno con la edad de cultivo en el punto medio es el tratamiento más efectivo para la producción de carotenoides totales. De acuerdo con el modelo matemático, se predijo que la producción máxima es de 14 mg/g *ps* con las siguientes condiciones: 0.22 mol·L⁻¹ de NaNO₃, 25 UPS cosechada en el día 15.

De acuerdo a las gráficas de superficie de respuesta y la prueba de los efectos, parece ser que la limitación de nitrógeno y la disminución de la salinidad activa el mecanismo de defensa

antioxidante de la microalga, produciendo una mayor cantidad de carotenoides con la finalidad de evitar la degradación de la clorofila. Probablemente, la microalga esté sobreproduciendo estos biocompuestos para protegerse a sí misma de la oxidación celular. Vale la pena mencionar que *D. tertiolecta* produce carotenoides en su ambiente natural y no exclusivamente cuando se encuentra bajo estrés (Sui *et al.*, 2019).

El rendimiento se refiere a los gramos de microalga liofilizada; este indica la cantidad de muestra de donde se pueden extraer los pigmentos. Todos los tratamientos se pesaron individualmente para poder ingresarlos a la matriz de DCC y aplicar la Ec. 10 con la finalidad de crear la gráfica de superficie de respuesta para el rendimiento (Figura 6c). Se puede observar que la gráfica de superficie de respuesta para el rendimiento posee una forma diferente a las otras presentadas, se le conoce como forma de silla de montar. Esta forma indica que las interacciones de las variables independientes afectan de manera similar en bajas o altas concentraciones, sin embargo, los resultados muestran una tendencia a causar un mayor rendimiento con una concentración de nitrógeno reducida y una alta salinidad. De acuerdo al modelo estadístico, se predijo que el máximo rendimiento que se puede obtener es de 0.19 g de peso seco con las siguientes condiciones: $0.55 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 , 25 UPS cosechada en el día 15.

Finalmente, teniendo en consideración todas las variables independientes, sus interacciones y la influencia de estas sobre la producción de pigmentos y el desarrollo de la microalga, se decidió elegir el tratamiento 10 ($0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 , 25 UPS y cosechada en el día 15) como medio óptimo para la producción de pigmentos antioxidantes de la microalga *D. tertiolecta*. Esta decisión fue basada en la alta producción de pigmentos por parte de la microalga en comparación con otros medios. En adición a esto, la actividad antioxidante, anti-radical libre y antihemolítica de los pigmentos puede haber sido afectada de manera positiva debido al estrés en el que se encontraba la microalga *D. tertiolecta*.

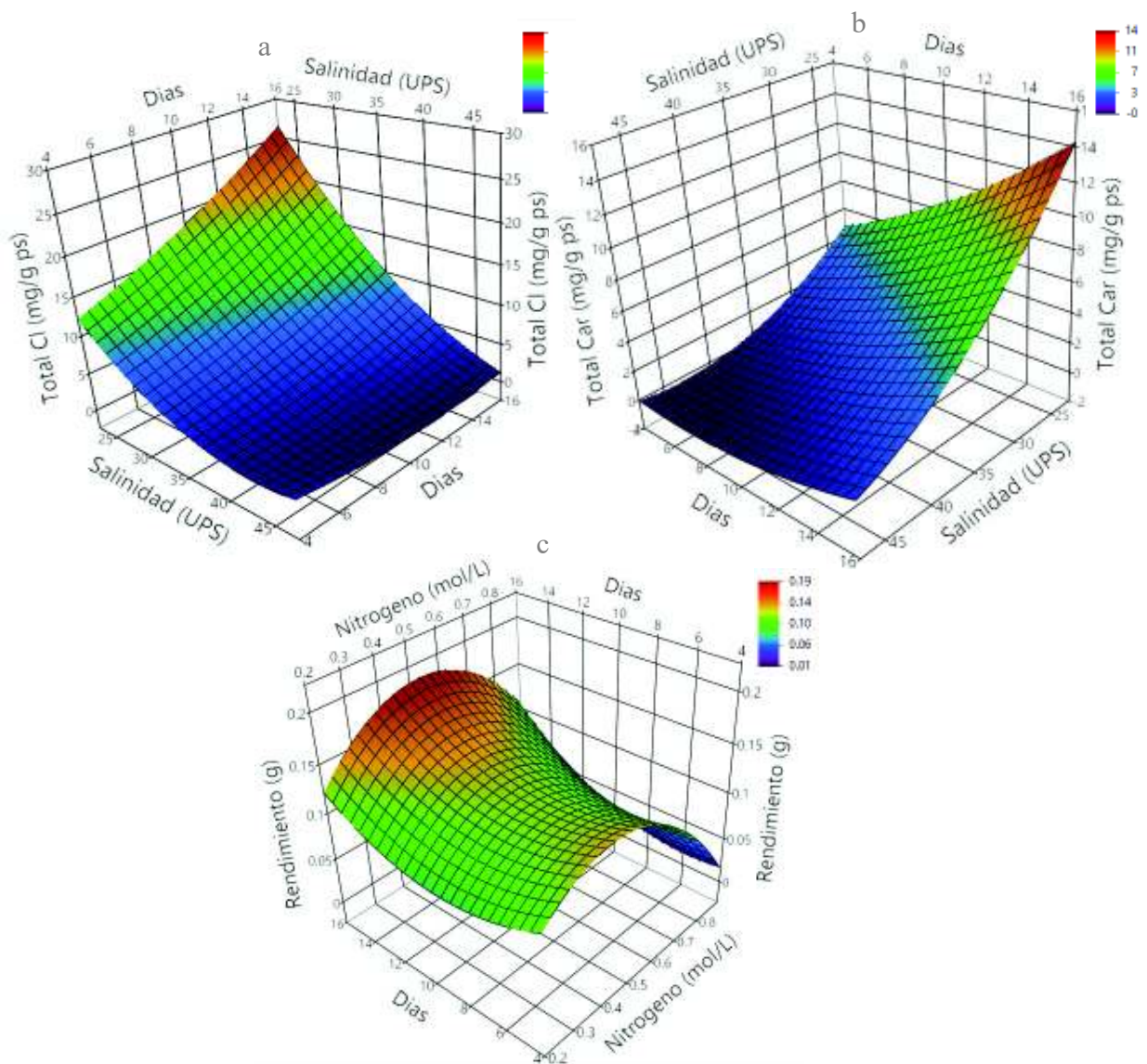


Figura 6. Superficie de respuesta tridimensional representando la producción de clorofila total (a), carotenoides totales (b) y rendimiento (c) de la microalga *D. tertiolecta* en función de la variación en la salinidad (UPS) y edad de cultivo (día de cosecha) con la concentración de nitrógeno ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3) como punto central.

V.3. Actividad antioxidante de los extractos de *D. tertiolecta*

V.3.1. Actividad de inhibición del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•)

Con la finalidad de tener una comparativa en cuestiones de investigación y producción, se llevó a cabo la prueba DPPH• en los extractos de la microalga *D. tertiolecta* cultivada en el medio

óptimo (tratamiento 10) y en el medio comúnmente utilizado (tratamiento 14 o medio F/2) ya que este último simula las condiciones naturales para la microalga, por ende, el estrés aplicado técnicamente es el del mar. Para ambos análisis, los resultados mostraron valores nulos, esto se puede deber a que el extracto presenta un mecanismo de acción incompatible con la prueba. La actividad anti-radical libre y antioxidante se mide en relación al compuesto de referencia Trolox (análogo a la vitamina E hidrosoluble), la medición combina tanto tiempo de inhibición como porcentaje de inhibición de la acción de radicales libres por los antioxidantes usando un área bajo la curva para la cuantificación, la cual después por medio de la ecuación de la curva, se puede transformar a micromoles de equivalentes trolox por gramo de peso seco ($\mu\text{mol ET/g ps}$). Tanto en el extracto del medio óptimo como el medio control, las pruebas arrojaron 0 $\mu\text{mol ET/g ps}$.

La inhibición de DPPH• puede ser llevada a cabo por dos tipos de mecanismos de defensa. El primero es el SET (Single Electron Transfer, por sus siglas en inglés), el cual consiste en la donación de un electrón (e^-) por parte del compuesto antioxidante al radical libre, estabilizándolo a la par que el antioxidante se convierte en un radical menos reactivo. Para poder donar el e^- al radical, el antioxidante responde al potencial de ionización (PI), que es la energía mínima requerida para separar un electrón en su estado fundamental de un compuesto. Debido a esto, mientras más bajo sea el PI, más fácil es la entrega del e^-

Por otro lado, también puede ser inhibida por el mecanismo HAT (Hydrogen Atom Transfer, por sus siglas en inglés), el cual consiste en la remoción de un átomo de hidrógeno del compuesto antioxidante (extracto microalgal) por parte del radical libre, llevando a cabo dos procesos simultáneos: la estabilización del radical libre y la conversión del antioxidante en un radical libre menos reactivo ($\text{ROO}\cdot + \text{AOX-H} \rightarrow \text{ROO-H} + \text{AOX}\cdot$). En este proceso se ve involucrada la entalpía de disociación del enlace (EDL), que es la medida de la fuerza de enlace de un enlace químico, la cual entre más baja sea más fácil será la inactivación del radical. Por otra parte, la literatura menciona que el radical DPPH• tiende a ser inhibido con más frecuencia por medio del mecanismo HAT (Lee *et al.*, 2004; Hamlaoui *et al.*, 2018).

V.3.2. Actividad de inhibición del radical libre ácido 2,2'-azobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS^{•+})

La prueba de inhibición de ABTS^{•+} se realizó en los extractos de *D. tertiolecta* cultivada en el medio óptimo y en el tratamiento 14, para las cuales se encontraron $688.23 \pm 31.86 \mu\text{mol ET/g ps}$ y $899.29 \pm 55.62 \mu\text{mol ET/g ps}$, respectivamente. Se llevó a cabo un ANOVA y se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre estos tratamientos.

De igual manera que con DPPH[•], ABTS^{•+} puede ser inhibido por SET o HAT, dependiendo del compuesto antioxidante evaluado, por lo que la realización de la prueba FRAP, además de ayudar a la presente investigación a dar una evaluación más completa, ayudó a determinar el mecanismo por el cual actúa el extracto metanólico de *D. tertiolecta*.

V.3.3. Poder reductor antioxidante del ión férrico (FRAP)

La prueba FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo en los extractos de *D. tertiolecta* cultivada en el medio óptimo y en el medio control, arrojando los siguientes resultados: $1062.40 \pm 39.85 \mu\text{mol ET/g ps}$ y $0 \mu\text{mol ET/g ps}$, respectivamente. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos valores con el ANOVA aplicado.

La técnica FRAP está fuertemente asociada con el mecanismo de transferencia SET, debido a las propiedades de óxido-reducción, que indica una donación exclusiva de electrones ($\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$), por lo que se realizó una regresión lineal entre los resultados de ABTS^{•+} y de FRAP para corroborar si el mecanismo aplicado por el extracto de *D. tertiolecta* es por SET o HAT (Figura 7). Se encontró una $R^2=0.82$, por lo que se puede inferir que el mecanismo que presenta el extracto de *D. tertiolecta* es SET.

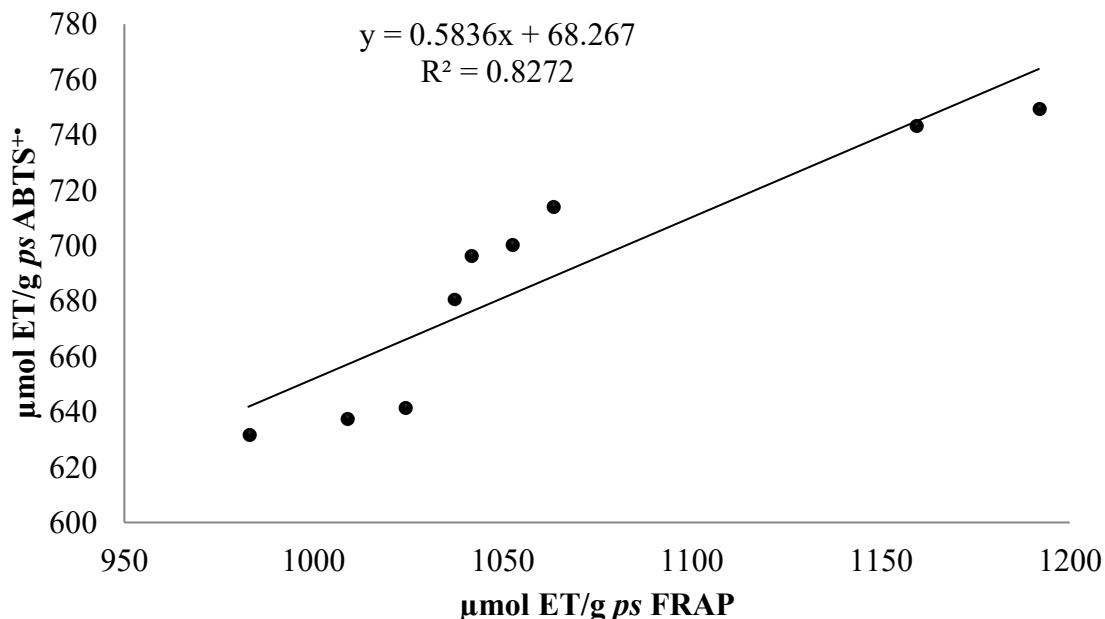


Figura 7. Regresión lineal de la actividad anti-radical libre ABTS⁺ y el poder reductor antioxidante del ión férrico (FRAP).

V.3.4. Actividad protectora sobre daño oxidativo en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) (AAPH)

La actividad antihemolítica de los extractos (1 mg/mL) de *D. tertiolecta* cultivada en el medio óptimo fue analizada a través de la técnica AAPH, en la cual se midió el porcentaje de inhibición de hemólisis de 3 muestras de sangre de 3 personas distintas con sangre del grupo O con RhD+vo (n=9). Se midieron por triplicado cada una de las muestras, obteniendo un promedio de 63.3 % para la primera, 64.62 % para la segunda y 72.32 % para la tercera, obteniendo así un promedio general de 66.75± 4.36 % de inhibición de hemólisis.

El AAPH es un azocompuesto que se utiliza como radical iniciador, que por descomposición térmica origina radicales peróxido que causan daño a las células sanguíneas. Es por ello que en los controles negativos (eritrocitos + AAPH), se reportaron porcentajes nulos de inhibición, ya que no se contaba con algún agente protector.

Con estos resultados se puede inferir que el extracto metanólico de *D. tertiolecta* es capaz de proteger a los eritrocitos humanos ante la peroxidación lipídica por parte de radicales peróxido con una eficacia del 66.75± 4.36 %.

VI. DISCUSIONES

VI.1. Cinéticas de crecimiento

Dunaliella tertiolecta es cultivada a escala de laboratorio para incrementar la producción de pigmentos usando diferentes tratamientos (concentración de nitrógeno, salinidad y edad de cultivo, entre otros); sin embargo, estas condiciones afectan la concentración celular del cultivo, causando un incremento o disminución en la densidad celular. Como se puede observar en las Figuras 1, 2 y 3, el factor de mayor influencia fue la concentración de nitrógeno, no obstante, la salinidad también juega un rol importante en las cinéticas de crecimiento del género *Dunaliella*.

Jesus y Filho (2010) estudiaron el efecto de la salinidad en el crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* a través de un diseño factorial y un análisis por ANOVA para determinar las diferencias significativas ($p < 0.05$). Estos investigadores encontraron que al incrementar la salinidad de 20 UPS a 35 UPS en el medio de cultivo, aumenta la densidad celular desde 1.2×10^5 a 5.6×10^5 cél/mL, sin embargo no analizaron el efecto de la falta de nutrientes, por lo tanto tampoco lo hicieron con las interacciones.

Por otro lado, Fré *et al.* (2016), llevaron a cabo cultivos de *D. tertiolecta* en un fotobioreactor de panel plano, estresándola con deficiencia de nitrógeno para determinar cómo es la cinética de crecimiento de la microalga. En este estudio utilizaron concentraciones de nitrógeno de 0.35, 0.7, 0.8 y $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaNO_3 tratando de predecir cómo se desarrollaría la cinética de crecimiento a través del modelo estadístico Droop, el cual predice las concentraciones celulares de la microalga partiendo de la concentración inicial de nitrógeno. Por otro lado, al incrementar la concentración de nitrógeno de 0.35 a $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ la densidad celular aumentó de 4.5×10^5 a 5.6×10^5 cél/mL, mientras que un incremento de 0.8 a $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$). De manera similar, Chen *et al.* (2011) realizaron un estudio sobre el crecimiento celular de *D. tertiolecta*, cultivándola en condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno, disminuyendo la concentración de 0.046 a $0.023 \text{ Mol} \cdot \text{L}^{-1}$, alcanzando densidades celulares de 2.5×10^4 y 2.7×10^4 cél/mL, respectivamente.

Comparado con los valores obtenidos en este trabajo, se puede observar que la combinación de la variación de la salinidad con la deficiencia de nitrógeno puede afectar positivamente la densidad celular en la especie *D. tertiolecta* debido a que presentó valores más

altos incluso a salinidades más bajas (25 UPS) en combinación con una deficiencia de nitrógeno ($0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaNO}_3$). Es importante señalar que las concentraciones celulares más altas se encontraron a altas salinidades (45 UPS) en combinación con una concentración de nitrógeno de $0.88 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaNO}_3$. Los resultados de las cinéticas de crecimiento sugieren que los efectos de una alta o baja salinidad pueden ser disminuidos a través del proceso de osmorregulación de *D. tertiolecta*, como lo han demostrado varios autores, en comparación con otros géneros de microalgas tales como *Navicula*, *Nitzschia*, *Scenedesmus*, *Tetraselmis*, entre otros (Ayache *et al.* 2020; Suescún-Bolívar y Thomé, 2015).

Una de las mayores desventajas de trabajar con modelos estadísticos no multivariados es la falta de análisis de la interacción de las variables, por lo cual se generan una gran cantidad de experimentos a realizar debido a que se desconoce si los efectos de las variables son enteramente por el factor analizado o alguna sinergia entre dos o más variables. En los experimentos de optimización con cultivos de microalgas son muy útiles los métodos multivariados como lo es el modelo de superficie de respuesta, debido a que así se puede llegar a establecer el óptimo de las variables a estudiar. Asimismo la de conocer las interacciones que se presentan entre las mismas variables (González-Vega *et al* 2020).

Los valores tan bajos obtenidos en los estudios mencionados anteriormente y las diferencias entre las cinéticas presentadas en el presente estudio pueden deberse a la falta de átomos de nitrógeno necesarios para llevar a cabo el proceso de oogamia, el cual es el método de reproducción de las clorofitas tales como *Dunaliella*. Bioquímicamente, la célula sufre de una falta de átomos de nitrógeno para completar las bases nitrogenadas necesarias para llevar a cabo la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), debido a esto, el crecimiento celular sufre una caída considerable cuando las microalgas se enfrentan a un ambiente deficiente en nitrógeno. En adición a esto, se ha reportado que la fluctuación en la concentración celular a través de las distintas etapas de la cinética de *D. tertiolecta* es una característica única en esta especie, tal como se observa en las Figuras 2, 3 y 4 (Lai *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2016).

Por otro lado, al momento de realizar la cinética de crecimiento con las condiciones óptimas de cultivo para la producción de pigmentos, se encontró una concentración máxima de $1.26 \times 10^6 \pm 1.13 \times 10^5 \text{ cél/mL}$, la cual es mayor a las obtenidas en estudios donde no se aplicó un DCC.

Por todo lo anterior se puede deducir que la aplicación de la metodología de superficie de respuesta para modelar los efectos de las variables y su interacción en las distintas condiciones de cultivo de *D. tertiolecta* para aumentar la producción de pigmentos no compromete de manera significativa la concentración celular, en comparación con otras especies de microalgas.

VI.2. Optimización para la producción de pigmentos de *D. tertiolecta*

El género *Dunaliella* presenta clorofila *a*, *b* y *c*, por lo tanto, se discutirá solamente el contenido de estos pigmentos además de carotenoides totales y el rendimiento en el apartado de diseño de optimización.

Abubakar (2016) estudió el efecto del estrés salino en varias cepas de *Dunaliella* a la par que desarrollaba un medio óptimo de cultivo con el medio de cultivo de Johnson a través de un diseño experimental de una vía. Los pigmentos fueron extraídos en cada etapa de cultivo (lag, exponencial, estacionaria y declive). Al igual que en esta investigación, se aplicó una variación en la salinidad (35, 50, 70 y 90 UPS), encontrando que el contenido de clorofila disminuyó conforme se aumentaba la salinidad. El mayor contenido de clorofila que encontraron en su estudio fue de 1.2 mg/g *ps* en el día 10 (etapa estacionaria) con una salinidad de 50 UPS, sin modificar otras variables como concentración de nutrientes, temperatura, pH, etc.

De acuerdo a Moradi e Ismail (2007), el bajo contenido de clorofila en altas salinidades es debido a que la tasa fotosintética disminuye por el estrés osmótico producido por la salinidad y el consecuente estrés iónico tóxico, sin embargo, no se toma en consideración la interacción de las variables cuando la microalga se encuentra en un medio estresante. Por lo tanto, la determinación de la concentración de clorofila puede ser utilizada para estimar la producción fotosintética en las células.

Varios autores reportan bajos contenidos de pigmentos para el género *Dunaliella* cuando es estresada por un incremento en la salinidad o una disminución en la concentración de NaNO_3 (Barghini *et al.*, 2018; Gallego-Cartagena *et al.*, 2019; Mofeed, 2015; Tan *et al.*, 2016). En adición a esto, realizaron un DCC para verificar que existiera una relación entre estas variables. Barghini *et al.* (2018) reportaron valores de carotenoides totales de 0.45 mg/g *ps* en *D. salina* cosechada en el día 5 y cultivada en el medio F/2. Estos estudios han demostrado los efectos de

la deficiencia de nitrógeno en el crecimiento y la actividad carotenogénica del género *Dunaliella* (Barghini *et al.*, 2018; Gallego-Cartagena *et al.*, 2019; Mofeed, 2015; Tan *et al.*, 2016).

La estimulación y acumulación de carotenoides puede ser explicada por el consumo acelerado de nutrientes y la presencia de fluctuaciones en la fase estacionaria de *D. tertiolecta* en los días 5-15. La implementación de estas condiciones de estrés sugiere un método alternativo para aumentar la producción de carotenoides basado en la estimulación del estrés en condiciones naturales (López-Elías *et al.*, 2013; Pisal y Lele, 2005).

Bioquímicamente, las microalgas son capaces de desestabilizar la molécula de porfirina presente en las clorofilas con la finalidad de extraer los átomos de nitrógeno necesarios para su crecimiento y división celular, esto causa un aumento en la producción de pigmentos antioxidantes (carotenos y xantófilas, principalmente) cuya función es proteger a los pigmentos fotosintéticos (complejo antena) de la oxidación y subsecuente degradación (Pereira y Otero, 2019; Pisal y Lele, 2005; Sánchez-Estudillo *et al.*, 2006).

El término optimización en química analítica se refiere al descubrimiento de las condiciones que se deben aplicar a un proceso para que produzca la mejor respuesta posible (Araujo y Janagap, 2012). En este caso, se obtuvieron las condiciones de cultivo óptimas a través del DCC para *D. tertiolecta* con la finalidad de producir la mayor cantidad de clorofilas y carotenoides totales para después modelar las interacciones a través de la superficie de respuesta. Otros estudios con el género *Dunaliella* se han enfocado en la producción de pigmentos, sin embargo, lo han hecho utilizando modelos factoriales, en los cuales no hay una elevación de los términos al cuadrado, por lo cual no se analiza la interacción de las variables. A este tipo de optimizaciones se les conoce como las de “una variable a la vez”, su mayor desventaja es que no incluye las interacciones de las variables estudiadas; como consecuencia no genera una respuesta que abarque todas las posibles combinaciones (Lundstedt *et al.*, 1998).

En la investigación realizada por Hosseini *et al.* (2017) se llevó a cabo una optimización estadística para la extracción de carotenoides de *D. tertiolecta* a través de la metodología de superficie de respuesta, evaluando las variables de presión (100-500 bar) y temperatura (30-60 °C), encontrando que las mejores condiciones para la extracción de carotenoides es de 300 bar a 30 °C con un rendimiento de 101.835 µg/g *ps* de carotenoides. Bajwa *et al.* (2019) utilizaron

la MSR para optimizar la producción de lípidos, proteínas, carbohidratos y clorofila total de la microalga *Chlorella pyrenoidosa* para la producción de biodiesel, valorando los siguientes factores: concentración de nitrógeno (0.11, 0.44 y 0.88 mol·L⁻¹), concentración de fosfatos y amonio. Al aplicar la MSR en la investigación de Bajwa *et al.* (2019) se encontró la mayor cantidad de clorofila total (20.16 µg/mL) en el medio óptimo (0.44 mol·L⁻¹ NaNO₃).

La comparación entre los resultados obtenidos de estudios que utilizaron un diseño factorial contra los que utilizaron un diseño central compuesto y la metodología de superficie de respuesta permiten resaltar que la interacción de las variables independientes es un factor de gran importancia en el cultivo de microalgas, debido a que el análisis correcto de las interacciones resulta en una alta producción de clorofilas y carotenoides totales en comparación con los obtenidos con los factoriales. Aunado a esto, la MSR permite reducir el número de experimentos, al contrario que los factoriales, ya que se eliminan incógnitas que se generan al modificar solamente una variable.

VI.3. Actividad antioxidante de los pigmentos extraídos de *D. tertiolecta*

Banskota *et al.* (2019) analizaron en su estudio la actividad anti-radical libre por medio de la técnica DPPH• en varias cepas de microalgas, entre ellas incluidas *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis granulata*, *Scenedesmus* sp. y *Tetraselmis chui*. Estas microalgas fueron cultivadas en el medio F/2, sin algún tipo de estrés y cosechadas en la etapa estacionaria. La cosecha se realizó por medio de centrifugación con un posterior proceso de congelamiento y secado para culminar con la extracción de los pigmentos por medio de metanol.

Cabe mencionar dentro que de las microalgas listadas anteriormente, *Scenedesmus* sp. es la más cercana a *D. tertiolecta* debido a que forma parte de la familia Chlorophyceae, las microalgas restantes forman parte de familias distintas. La prueba de DPPH• arrojó resultados de 12, 15, 13 y 25 % de inhibición para *C. sorokiniana*, *N. granulata*, *Scenedesmus* sp. y *T. chui*, respectivamente. Otros autores también trabajaron con varias cepas de microalgas, evaluando la capacidad antioxidante por medio de DPPH•, encontrando valores similares a los presentados por Banskota *et al.* (2019), llegando a la conclusión de que el contenido de compuestos fenólicos presentes en las células son los responsable de las propiedades antioxidantes de estas microalgas

(Ayaz *et al.*, 2014; Crozier *et al.*, 2006; Safafar *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020). Estos estudios permiten corroborar que *D. tertiolecta* presenta un mecanismo de acción distinto al requerido para inhibir al radical DPPH•.

Por otro lado, Belghith *et al.* (2016) y Belhaj *et al.* (2017) llevaron a cabo cultivos de *D. salina* con la finalidad de evaluar su capacidad antioxidante a través de la inhibición del radical ABTS^{•+}, estresándola con la presencia de cadmio o compuestos disruptores-endocrinos tales como el 17 α -Ethinilestradiol (EE2), respectivamente. Tanto el primero como el segundo son compuestos que afectan directamente la división celular de la microalga, así como su proceso fotosintético, por ende, producen biocompuestos como antioxidantes. En el caso de Belghith *et al.* (2016) el valor máximo obtenido fue de $0.44 \pm 0.011 \mu\text{mol ET/g}$, mientras que Belhaj *et al.* (2017) encontró un máximo de $0.237 \pm 0.015 \mu\text{mol ET/g}$ con una concentración de 0.001 mg L^{-1} de EE2.

Varios autores señalan que el estrés en diversas microalgas puede ocasionar la producción de pigmentos accesorios tales como α -caroteno, β -caroteno, luteína, zeaxantina, astaxantina y licopeno, entre otros, que pueden emerger como una respuesta de defensa contra ciertos tipos específicos de oxidación y daño celular. Entre los argumentos mayormente debatidos se encuentra la producción específica de biocompuestos y la especificidad de estos con el agente oxidante, donde se observa que el efecto antioxidante depende mayormente del agente reductor y del oxidante, es decir, tanto del compuesto antioxidante como de los radicales libres (Álvarez *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2008; Sheu *et al.*, 2008).

Es por ello que en diversos estudios se ha analizado la capacidad anti-radical libre sobre ABTS^{•+} de distintos extractos de microalgas, entre ellas *Porphyridium cruentum*, *Nitzschia closterium*, *Platymonas subcordiformis*, *Isochrysis zhangijangensis* y *Synechocystis pevalekii*, arrojando resultados muy por debajo de los obtenidos en el presente estudio, alcanzando un máximo de 4.21, 7.32, 17, 18.04 y 28.43 $\mu\text{mol ET/g ps}$, respectivamente, mientras que *D. tertiolecta* alcanzó valores de 688.23 ± 31.86 (muestra optimizada) y 899.29 $\mu\text{mol ET/g ps}$ (control) (Ayaz *et al.*, 2014; Hajimahmoodi *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2016).

En el presente estudio los valores de FRAP en los extractos de *D. tertiolecta* fueron estadísticamente distintos, presentando valores nulos en el medio control, indicando que esta

microalga no sufre el estrés suficiente para producir los compuestos necesarios con un potente efecto reductor sobre iones férricos, el cual está basado en el principio de donación de electrones por acción de los antioxidantes del extracto hacia el complejo tripiridialtriazina-férrico (Fe^{3+} -TPTZ), reduciéndose a tripiridialtriazina ferroso (Fe^{2+} -TPTZ). Huang *et al.* (2016) y Hajimahmoodi *et al.* (2010) llevaron a cabo la prueba FRAP en extractos etanólicos de diversas microalgas, obteniendo un máximo de 161.2 $\mu\text{mol ET/g ps}$ (*P. cruentum*), 193.93 $\mu\text{mol ET/g ps}$ (*N. closterium*), 542.15 $\mu\text{mol ET/g ps}$ (*P. subcordiformis*), 630.71 $\mu\text{mol ET/g ps}$ (*I. zhangijangensis*) y 820.43 $\mu\text{mol ET/g ps}$ (*S. pevalekii*), los cuales son inferiores a los obtenidos en el medio óptimo (1062.4 $\mu\text{mol ET/g ps}$) del presente estudio. Esto puede indicar que la capacidad antioxidante de *D. tertiolecta* es mayor que las estudiadas por estos autores, lo cual puede ser explicado por la presencia de carotenos tales como β -caroteno, α -caroteno, γ -caroteno, licopeno, entre otros, así como la cantidad de pigmentos producidos por las microalgas.

Zamani y Moradshahi (2014) midieron la capacidad reductora por medio de la técnica FRAP en tres cepas de *D. salina*, cosechadas en las etapas logarítmica y estacionaria. En este estudio se sugiere que en la etapa estacionaria se encuentran presentes otros compuestos con capacidad reductora además de los carotenoides. Utilizaron etil-acetato como solvente para el extracto, obteniendo un máximo de 773.57 $\mu\text{mol ET/g ps}$ en la etapa estacionaria y 262 $\mu\text{mol ET/g ps}$ en la etapa logarítmica, corroborando de esta manera lo mencionado anteriormente.

Autores como Goiris *et al.* (2012), Hajimahmoodi *et al.* (2010) y Kang *et al.* (2013) reportaron un aumento en la capacidad reductora de diversas algas expuestas a estrés salino, observándose un incremento de 3.3 a 69 ET/g ps en 32 microalgas, 1.33 a 74.34 $\mu\text{mol ET/g ps}$ en 12 microalgas con cambio de solvente etanol a metanol y de 2.2 a 70.54 $\mu\text{mol ET/g ps}$ cosechada en la etapa estacionaria, respectivamente. En el presente estudio el extracto metanólico mostró una alta actividad reductora (1062.4 $\mu\text{mol ET/g ps}$) cuando la microalga se enfrentó a un estrés salino (25 UPS) en el medio optimizado, por lo que se puede inferir que el proceso de ósmosis está fuertemente vinculado con la producción de pigmentos antioxidantes y su capacidad antioxidante

El presente estudio reveló que las condiciones en las que se encuentra cultivada *D. tertiolecta* influye en la producción de pigmentos y en su actividad anti-radical libre y capacidad reductora, puesto que en los resultados de ABTS^{*+} el tratamiento 14 resultó ser estadísticamente

diferente ($p < 0.05$) del medio optimizado, con 899.29 ± 55.62 y 688.23 ± 31.86 $\mu\text{mol ET/g ps}$, respectivamente, a pesar de que en el DCC la producción de carotenoides totales para el tratamiento 14 se predice que sea de 5.28 mg/g ps , mientras que para el medio optimizado es de 23 mg/g ps . Para FRAP se observó lo contrario, obteniendo 0 $\mu\text{mol ET/g ps}$ para el tratamiento 14 y 1062.40 ± 39.85 $\mu\text{mol ET/g ps}$ para el medio optimizado, siendo estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

La inhibición de ABTS^{*+} está dada por pigmentos antioxidantes tales como flavonoides, hidroxycinamatos o carotenoides, por lo cual es probable que *D. tertiolecta* presente estos pigmentos cuando es cultivada en medios convencionales (tratamiento 14), sin embargo, al verse expuesta a condiciones estresantes por nitrógeno y salinidad, produce una mayor cantidad de carotenoides a expensas de reducir la producción de otros pigmentos antioxidantes (Re *et al.*, 1999). Lo anterior podría explicar la diferencia de valores entre el tratamiento 14 y el medio optimizado.

Por otro lado, FRAP es una técnica que mide la capacidad reductora de los iones férricos a un pH bajo. Puede reducir diferentes antioxidantes no enzimáticos como es el caso de vitamina C (ácido ascórbico) ácido úrico, entre otros, pero no mide los antioxidantes que contienen grupos tiol, tal como el glutatión, ácido lipoico y algunos aminoácidos, ya que estos no reducen de forma efectiva el $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ (Cao y Priori, 1998). Debido a lo anterior, se puede inferir que en el tratamiento 14 la microalga contenía una gran variedad de pigmentos que no reducían de forma efectiva el complejo Fe^{3+} -TPTZ, mientras que en el medio optimizado, la producción de carotenoides se incrementó y con ellos los pigmentos con capacidad reductora (Aragón y Ospina, 2009; Fernández-Pachón *et al.*, 2006)

El AAPH es un compuesto que genera radicales libres por descomposición térmica, los cuales atacan a la membrana plasmática de los glóbulos rojos y producen una cadena de hidroxidación lipídica y proteólisis, comprometiendo la integridad de la membrana, llevando eventualmente la célula a la hemólisis (Miki *et al.*, 1987). La eficiencia de los extractos contra la hidroxidación lipídica y proteólisis se mide por la cantidad de eritrocitos intactos, es decir, aquellos protegidos contra especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) a través de un intervalo de tiempo definido.

En el presente estudio se obtuvo un porcentaje de inhibición de 66.75 %, por lo que se puede aseverar que el extracto metanólico de *D. tertiolecta* tiene la capacidad de proteger a los eritrocitos humanos. Kim *et al.* (2006) reportó que algunos compuestos producidos por algas marinas tienen la capacidad de incrementar los niveles de catalasa, la cual es una enzima localizada en los peroxisomas de algunas células, lo que les confiere la capacidad de convertir al AAPH en oxígeno molecular y H₂O. Por lo anterior, es posible que los extractos metanólicos de *D. tertiolecta* sean capaces de actuar de manera similar además de adherirse a la bicapa lipídica de las células, bloqueando la entrada de los radicales libres.

Generalmente se asocia un porcentaje de inhibición al efecto del extracto contra las EROs y las ERNs, donde lo ideal sería obtener un 100 % de eficacia, sin embargo, con la falta de estudios de optimización, los porcentajes de inhibición en la literatura siguen manteniéndose bajos, hecho que se puede observar en el estudio de Benedetti *et al.* (2004), donde cultivaron la microalga *Aphanizomenon flosaqueae* y realizaron la extracción con solución buffer salina de fosfato y centrifugación, obteniendo 13 % de inhibición de hemólisis. Por otro lado, Lim *et al.*, (2002) analizaron la capacidad de inhibición del extracto metanólico de *Sargassum siliquastrum*, obteniendo hasta un 42.9 % de inhibición. Se hace evidente que las condiciones de extracción y el solvente utilizado juegan un papel importante en la eficacia del extracto.

VII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que la optimización del medio de cultivo de *Dunaliella tertiolecta* por medio de la metodología de superficie de respuesta con un diseño central compuesto puede mejorar de manera significativa la producción de pigmentos antioxidantes. Asimismo, se puede concluir que la combinación de la deficiencia de nitrógeno y una variación en la salinidad tienen una gran influencia en la producción de pigmentos así como el crecimiento de la microalga en el medio optimizado con las siguientes condiciones: $0.22 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaNO_3 a 25 UPS cosechada en el día 15.

Por otro lado, el solvente utilizado y la aplicación de pulsos ultrasónicos resultaron ser muy efectivos para la liberación de los biocompuestos. De esta manera, la evaluación de las capacidades anti-radical libre, antioxidante y antihemolítica puede ser medida con mayor facilidad. Los extractos metanólicos de *D. tertiolecta* parecen presentar el mecanismo SET ante los agentes oxidantes, ya que presentaron altas actividades para $\text{ABTS}^{*\cdot}$ y FRAP, así como la actividad antihemolítica con una gran capacidad protectora de eritrocitos humanos, lo cual es de gran interés biotecnológico en las industrias farmacéuticas, nutracéuticas y médicas.

VIII. RECOMENDACIONES

- ❖ Es recomendable cuantificar y cualificar el contenido de carotenoides totales presentes en la microalga *Dunaliella tertiolecta*, ya que presentan una alta actividad antioxidante.
- ❖ Se recomienda analizar otras variables en la optimización, tales como pH, temperatura, iluminación, concentración de fosfatos, vitaminas y/u otros nutrientes del medio de cultivo.
- ❖ Es conveniente comparar la producción de pigmentos en distintos volúmenes de producción (garrafones, tinas o columnas).
- ❖ Se recomienda evaluar la producción de pigmentos y la capacidad antioxidante de otras especies de microalgas.
- ❖ Se recomienda realizar un screening antioxidante completo.
- ❖ Se recomienda caracterizar el extracto optimizado para identificar los principales compuestos que pudieran estar involucrados en la actividad antioxidante.
- ❖ Determinar otras alternativas en el área farmacéutica, ya que la capacidad antioxidante también es aplicada en el área biomédica.

IX. LITERATURA CITADA

- Abu-Rezq, T. S., Al-Hooti, S. y Jacob, D. A. 2010. Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. Journal of Algal Biomass Utilization 1(2): 12-19.
- Abubakar, A. L. 2016. Effect os salinity in the growth parameters of halotolerant microalgae *Dunaliella* spp. Nigerian Journal of Basic and Applied Sciencies 24(2): 85-91.
- Afsar, T., Razak, S., Khan, M. R., Mawash, S., Almajwal, A., Shabir, M. y Haq, I. U. 2016. Evaluation of antioxidants, anti-hemolytic and anticancer activity of various solvent extracts of *Acacia hydaspica* R. Parker aerial parts. BMC Complementary and Alternative Medicine 16(1): 258.
- Aklakur, M. 2018. Natural antioxidants from sea: a potential industrial perspective in aquafeed formulation. Reviews in Aquaculture 10(2): 385-399.
- Álvarez, E., Thoms, S., Bracher, A., Liu, Y. y Volker, C. 2019. Modeling photoprotection at global scale: The relative role of nonphotosynthetic pigments, physiological state and species composition. Global Biogeochemical Cycles 33(7): 904-926.
- Amorim-Carrilho. K. T., Cepeda, A., Fente, C., y Regal, P. 2014. Review of methods for analysis of carotenoids. TrAC Trends in Analytical Chemistry 56: 49-73.
- Andersen, R. A. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier. Ed. 2005.
- Aragón, D. M. y Ospina, L. F. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. Vitae 16(3): 311-319.
- Araujo, P. y Janagap, S. 2012. Doehlert uniform Shell designs and chromatography. Journal of Chromatography B 910: 14-21.
- Ayache, N., Hervé, F., Lundholm, N., Amzil, A. y Caruana, A. M. 2020. Acclimation of the marine diatom pseudo-*Nitzschia australis* to different salinity conditions: effect on growth, photosynthetic activity, and domoic acid content. Journal of Phycology 56(1): 97-109.
- Ayaz, M., Junaid, M., Ahmed, J., Ullah, F., Sadiq, A., Ahmad, S. e Imran, M. 2014. Phenolic contents, antioxidant and anticholinesterase potentials of crude extract, subsequent fractions and crude saponins from *Polygonum hydropiper* L. BMC Complementary and Alternative Medicine 14(1): 145.
- Banskota, A. H., Spenger, S., Stefanova, R., McGinn, P. J. y O'Leary, S. J. 2019. Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. Journal of Applied Phycology 31(1): 309-318.
- Barghini, P., Giovannini, V., Fenice, M., Gorrasi, S. y Pasqualetti, M. 2018. High lutein production by a halo-tolerant strain of *Dunaliella* sp. (Chlorophyceae) isolated from solar salterns in Central Italy. Journal of Environmental Protection and Ecology 19(2): 704-712.
- Belhaj, D., Athmouni, K., Frikha, D., Kallel, M., El Feki, A., Maalej, S. y Ayadi, H. 2017, Biochemical and physiological responses of halophilic nanophytoplankton (*Dunaliella*

- salina*) from exposure to xeno-estrogen 17 α -ethinylestradiol. Environmental Science and Pollution Research 24(8):7392-7402.
- Belghith, T., Athmouni, K., Bellassoued, K., El Feki, A. y Ayadi, H. 2016. Physiological and biochemical response of *Dunaliella salina* to cadmium pollution. Journal of Applied Phycology 28(2): 991-999.
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S. y Canestrari, F. 2004. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. Life Sciences 75(9): 2353-2362.
- Benzie, I. F. y Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry 239(1): 70-76.
- Borges, J. A., Rosa, G. M. D., Meza, L. H. R., Henrard, A. A. y Costa, J. A. V. 2013. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestión. Brazilian Journal of Chemical Engineering 30(2): 277-288.
- Cao, G. y Prior, R. L. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. Clinical Chemistry 44(6): 1309-1315.
- Cao, G., Alessio, H. M. y Cutler, R. G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. Free Radical Biology and Medicine 14(3): 303-311.
- Chagas, A. L., Rios, A. O., Jarenkow, A. Marcílio, N. R., Ayub, M. A. Z. y Rech, R. 2015. Production of carotenoids and lipids by *Dunaliella tertiolecta* using CO₂ from beer fermentation. Process Biochemistry 50(6): 981-988.
- Charioui, I., Chikhaoui, M., Banaoui, A., Abbassi, M., El Filali, F. y Kaaya, A. 2016. Growth and carotenoid production in *Dunaliella* spp. isolated from hypersaline habitats in the region of Essaouira (Morocco): Effect of NaNO₃ concentration. Journal of Pharmacy and Pharmacology 4: 649-657.
- Chen, M. Tang, H., Ma, H., Holland, T. C. Ng, K. S. y Salley, S. O. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. Bioresource Technology 102(2): 1649-1655.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I. y Florou-Paneri, P. 2013. Functional properties of carotenoids originating from algae. Journal of the Science of Food and Agriculture 93: 5-11.
- Chisté, R. C., Freitas, M., Mercadante, A. Z. y Fernandes, E. 2014. Carotenoids are effective inhibitors of *in vitro* hemolysis of human erythrocytes, as determined by a practical and optimized celular antioxidant assay. Journal of Food Science 79(9): 1841-1847.
- da Silva Ferreira, V. y Sant'Anna, C. 2017. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33(1): 20.
- Crozier, A., Jaganath, I. B. y Clifford, M. N. 2006. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet 1.

- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z. y Ughy, B. 2013. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research* 52(4): 539-561.
- Fachet, M., Witte, C., Flassing, R. J., Rihko-Struckmann, L. K., McKie-Krisberg, Z., Polle, J. E. y Sundmacher, K. 2020. Reconstruction and analysis of a carbon-core metabolic network for *Dunaliella salina*. *BMC Bioinformatics* 21(1): 1-9.
- Fernández-Pachón, M., Villaño, D., Troncoso, A. M. y García-Parrilla, M. 2006. Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 56(2): 110-122.
- Fré, N. C. D., Chagas, A. L. D., Rech, R. y Marcílio, N. R. 2016. Kinetic modeling of *Dunaliella tertiolecta* growth under different nitrogen concentrations. *Chemical Engineering & Technology* 39(9): 1716-1722.
- Gallego-Cartagena, E., Castillo-Ramírez, M. y Martínez-Burgos, W. 2019. Effect of stressful conditions on the carotenogenic activity of a Colombian strain of *Dunaliella salina*. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(7): 1325-1330.
- Gao, Q. T., Wong, Y. S. y Tam, N. F. 2017. Antioxidant responses of different microalgal species to nonylphenol-induced oxidative stress. *Journal of Applied Phycology* 29(3): 1317-1329.
- Goiris, K. Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J. y De Cooman, L. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology* 24(6): 1477-1486.
- Gómez, A. L., López, J. A., Rodríguez, A., Fortiz, J., Martínez, L. R., Apolinar, A. y Enríquez, L. F. 2016. Producción de compuestos fenólicos por cuatro especies de microalgas marinas sometidas a diferentes condiciones de iluminación. *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(1): 137-143.
- Gong, M. y Bassi, A. 2016. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances* 34(8): 1396-1412.
- González-Vega, R. I., Cárdenas-López, J. L., López-Elías, J. A., Ruiz-Cruz, S., Reyes-Díaz, A., Perez-Perez, L. M., Cinco-Moroyoqui, J. F., Robles-Zepeda, R. E., Borboa-Flores, J. y Del-Toro-Sánchez, C. L. 2020. Optimization of growing conditions for pigments production from microalga *Navicula incerta* using response surface methodology and its antioxidant capacity. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D. y Malcata, F. X. 2011. Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International* 44(9): 2721-2729.
- Guevara, M., Vivenes, E. Z., León, M. y Acosta, M. 2019. Actividad antioxidante de un aceite vegetal enriquecido con la microalga cultivada *Dunaliella salina* (Chlorophyceae). *AquaTechnica: Revista Iberoamericana de Acuicultura* 1(1): 40-46.

- Guillard, R. R. y Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology 8(2): 229-239.
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M. R. y Nafissi-Varcheh, N. 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. Journal of Applied Phycology 22(1): 43-50.
- Hamlaoui, I., Bencheraiet, R., Bensegueni, R. y Bencharif, M. 2018. Experimental and theoretical study on DPPH radical scavenging mechanism of some chalcone quinolone derivatives. Journal of Molecular Structure 1156: 385-389.
- Hashimoto, H., Uragami, C. y Cogdell, R. J. 2016. Carotenoids and photosynthesis. En Carotenoids in Nature (pp.111-139). Springer, Cham.
- Hosseini, T. A. y Shariate, M. 2009. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology 107(1): 14-35.
- Hosseini, S. R. P., Tavakoli, O. y Sarrafzadeh, M. H. 2017. Experimental optimization of SC-CO₂ extraction of carotenoids from *Dunaliella salina*. The Journal of Supercritical Fluids 121: 89-95.
- Hou, J. y Cui, H. L. 2018. *In vitro* antioxidant, antihemolytic and anticancer activity of the carotenoids from halophilic archaea. Current Microbiology 75(3): 266-271.
- Hu, C. C., Lin, J. T., Lu, F. J., Chou, F. P. e Yang, D. J. 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. Food Chemistry 109(2): 439-446.
- Huang, J. J. H., Xu, W. W., Lin, S. L. y Cheung, P. C. K. 2016. Phytochemical profiles of marine phytoplanktons: an evaluation of their *in vitro* antioxidant and anti-proliferative activities. Food & Function 7(12): 5002-5017.
- Ibáñez, E. y Cifuentes, A. 2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. Journal of the Science of Food and Agriculture 93(4):703-709.
- Ismail, M. M., El-Ayouty, Y. M., Said, A. A. y Fathey, H. A. 2018. Transformation of *Dunaliella parva* with PSY gene: carotenoids show enhanced antioxidant activity under polyethylene glycol and calcium treatments. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 16: 378-384.
- Janka, E., Umetani, I., Sposob, M. y Bakke, R. 2020. Photosynthesis response of microalgae (*Tetrademus wisconsinensis*) to different inorganic carbon sources probed with chlorophyll fluorescence analysis. Photosynthetica 58(2): 236-244.
- Jesus, S. S. y Filho, M. R. 2010. Modeling growth of microalgae *Dunaliella salina* under different nutritional conditions. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 6(4): 279-283.
- Kadkhodaei, S., Abbasiliasi, S., Shun. T. J., Masoumi, H. F., Mohamed, M. S., Movahedi, A. y Ariff, A. B. 2015. Enhancement of protein production by microalgae *Dunaliella salina* under mixotrophic conditions using response surface methodology. RSC Advances 5(48): 38141-38151.

- Kang, M. C., Cha, S. H., Wijesinghe, W. A. J. P., Kang, S. M., Lee, S. H., Kim, E. A. y Jeon, Y. J. 2013. Protective effect of marine algae phlorotannins against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish embryo. *Food Chemistry* 138(2-3): 950-955.
- Kim, K. N., Heo, S. J., Song, C. B., Lee, J., Heo, M. S., Yeo, I, K. y Jeon, Y. J. 2006. Protective effect of *Ecklonia cava* enzymatic extracts on hydrogen peroxide-induced cell damage. *Process Biochemistry* 41(12): 2393-2401.
- Kim, M., Ahn, J., Jeon, H. y Jin, E. 2017. Development of a *Dunaliella tertiolecta* strain with increased zeaxanthin content random mutagenesis. *Marine Drugs* 15(6): 189.
- Krinsky, N. I., Landrum, J. T. y Bone, R. A. 2003. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annual Review of Nutrition* 23(1): 1717-201.
- Lai, Y. C., Karam, A. L., Sederoff, H. W., Ducoste, J. J. y Francis, L. 2019. Relating nitrogen concentration and light intensity to the growth and lipid accumulation of *Dunaliella viridis* in a photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 31(6): 3397-3409.
- Lee, J., Koo, N. y Min, D. B. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3(1): 21-33.
- Liang, M. H., Wu, F. C., Liang, Z. C., Chen, H. H. y Jiang, J. G. 2020. Induction of carotenoid cleavage by salt stress and the effect of their products on cell growth and pigment accumulation in *Dunaliella* sp. FACHB-847. *Algal Research* 48: 101901.
- Lichtenthaler, H. K. y Wellburn, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents.
- Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C. y Ang, P. O. 2002. Evaluation of antioxidant activity of extracts from a brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(1): 3862-3866.
- Lenth, R. V. 2009. Response-surface methods in R, using RSM. *Journal of Statistical Software* 32(7): 1-17.
- López, A., Rico, M., Santana-Casiano, J., González, A. G. y González-Dávila, M. 2015. Phenolic profile of *Dunaliella tertiolecta* growing under high levels of copper and iron. *Environmental Science and Pollution Research* 22(19): 14820-14828.
- López-Elías, J. A., Fimbres-Olivarria, D., Medina-Juárez, L. A., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, M. L. y Molina-Quijada, D. M. A. 2013. Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitantes en nitrógeno. *Phyton (Buenos Aires)* 82(1): 23-30.
- Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B. Nyström, A., Pettersen, J. y Bergman, R. 1998. Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42(1-2): 3-40.
- Markou, G. y Nerantzis, E. 2013. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances* 31(8):1532-1542.

- Miki, M. Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y. y Niki, E. 1987. Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 258(2): 373-380.
- Mofeed, J. 2015. Effects of salinity and light intensity on production of β -carotene and glycerol from the halotolerant alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta) isolated from Zaranik nature reserve, North Sinai (Egypt). *Journal of Experimental Biology (Botanic)* 11: 21-29.
- Molineux, P. 2004. El uso del radical libre estable diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) para la estimación de capacidad antioxidante. *Journal of Science and Technology* 26: 211-219.
- Moradi, F. e Ismail, A. M. 2007. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany* 99(6): 1161-1173.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C. y Anderson-Cook, C. M. 2016. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons.
- Nikolaou, A., Bernardi, A., Meneghesso, A., Bezzo, F., Morosinotto, T. y Chachuat, B. 2015. A model of chlorophyll fluorescence in microalgae integrating photoproduction, photoinhibition and photoregulation. *Journal of Biotechnology* 194: 91-99.
- Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V. y Sassi, J. F. 2019. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations and future direction. *Marine Drugs* 17(11): 640.
- Olivares, L. D., Cabrera, G. B. y Martínez, M. T. S. 2010. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia* 18(50): 10-15.
- Patias, L. D., Fernandez, A. S., Petry, F. C., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E. y Zepka, L. Q. 2017. Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. *Food Research International* 100: 260-266.
- Pena, A. C., Agustini, C. B., Trierweiler, L. F. y Gutterres, M. 2020. Influence of period light on cultivation of microalgae consortium for the treatment of tannery wastewaters from leather finishing stage. *Journal of Cleaner Production*. 121618.
- Pereira, S. y Otero, A. 2019. Effect of light quality on carotenogenic and non-carotenogenic species of the genus *Dunaliella* under nitrogen deficiency. *Algal Research* 44: 101725.
- Petruk, G., Gifuni, I., Illiano, A., Roxo, M. Pinto, G., Amoresano, A. y Monti, D. M. 2018. Simultaneous production of antioxidants and starch from the microalga *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research* 34: 164-174.
- Pisal, D. S. y Lele, S. S. 2005. Carotenoid production from microalga *Dunaliella salina*.
- Polle, J. E., Jin, E. y Ben-Amotz, A. 2020. The alga *Dunaliella* revisited: Looking back and moving forward with model and production organisms. *Algal Research* 49: 101948.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant capacity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10): 1231-1237.

- Renugadevi, K., Nachiyar, C. V., Sowmiya, P. y Sunkar, S. 2018. Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TVR57. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16: 237-242.
- Richer, S., Stiles, W., Statkute, L., Pulido, J., Frankowski, J., Rudy, D. y Nyland, J. 2004. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the veterans LAST study (Lutein antioxidant supplementation trial). *Optometry-Journal of the American Optometric Association* 75(4): 216-229.
- Safar, H., Van Wagenen, J., Moller, P. y Jacobsen, C. 2015. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalga species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs* 13(12): 7339-7356.
- Sánchez-Estudillo, L., Freile-Pelegrin, Y., Rivera-Madrid, R., Robledo, D. y Narváez-Zapata, J. A. 2006. Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga *Dunaliella salina*. *Biotechnology Letters* 28(11): 787-791.
- Sen, S. y Chakraborty, R. 2011. The role of antioxidants in human health. En *Oxidative stress: diagnostics, prevention and therapy* (pp. 1-37). American Chemical Society.
- Sharma, J., Pruthi, V., Anand, P. Chaddha, A. P. S., Bhatia, J. y Kaith. B. S. (2016). Surface response methodology-central composite design screening for the fabrication of a Gx-psy-g-polyacrylicacid adsorbent and sequestration of auramine-O dye from a textile effluent. *RSC Advances* 6(78): 74300-74313.
- Sheu, M. J., Huang, G. J., Wu, C. H., Chen, J. S., Chang, H. Y., Chang, S. J. y Chung, J. G. 2008. Ethanol extract of *Dunaliella salina* induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. *In vivo* 22(3): 369-378.
- Singh, P., Baranwal, M. y Reddy, S. M. 2016. Antioxidant and cytotoxic activity of carotenes produced by *Dunaliella salina* under stress. *Pharmaceutical Biology* 54(10): 2269-2275.
- Solimeno, A., Samsó, R., Uggetti, E., Sialve, B., Steyer, J. P., Gabarró, A. y García, J. 2015. New mechanistic model to simulate microalgae growth. *Algal Research* 12: 350-358.
- Song, D., Xi, B. y Sun, J. 2016. Characterization of the growth, chlorophyll content and lipid accumulation in a marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* under different nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Ocean University of China* 15(1): 124-130.
- Soto, J. O. 2015. *Dunaliella* identification using DNA fingerprinting intron-sizing method and species-specific oligonucleotides: new insights of *Dunaliella* molecular identification. En *Handbook of Marine Microalgae* (pp. 559-568). Academic Press.
- Suescuín-Bolívar, L. P. y Thomé, P. E. 2015. Osmosensing and osmoregulation in unicellular eukaryotes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(3): 435-443.
- Sui, Y., Muys, M., Van de Waal, D. B., D'Adamo, S., Vermeir, P., Fernandes, T. V. y Vlaeminck, S. E. 2019. Enhancement of co-production of nutritional protein and carotenoids in *Dunaliella salina* using a two-phase cultivation assisted by nitrogen level and light intensity. *Bioresource Technology* 287: 121398.

- Tan, K. W. M., Lin, H., Shen, H. y Lee, Y. K. 2016. Nitrogen-induced metabolic changes and molecular determinations of carbón allocation in *Dunaliella tertiolecta*. Scientific Reports 6: 37235.
- Valencia-Yañez, R., Giffard-Mena, I., Cruz-López, R., García-Mendoza, E. y Stephano-Hornedo, J. L. 2018. Characterization of a new *Dunaliella salina* strain isolated from San Quintin, Baja California (México) producer of lipids, pigments and micronutrients. CICIMAR Oceánides 33(2): 1-10.
- Viera, I. y Roca, M. 2020. Analytical protocols in chlorophyll analysis. En Pigments from Microalgae Handbook (pp. 127-149). Springer, Cham.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology 144:307-313.
- Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N. y Ma, C. 2016. The effects of light, temperature and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. Jundishapur Journal of Microbiology 9(1).
- Wurtzel, E. T. 2019. Changing and function through carotenoids and synthetic biology. Plant Physiology 179(3): 830-843.
- Zamani, H. y Moradshahi, A. 2014. Evaluation of total reducing capacity in three *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco isolates. Journal of Applied Phycology 26(1): 369-376.
- Zhang, C., Wang, X., Ma, Z., Luan, Z., Wang, Y., Wang, Z. y Wang. L.2020. Removal of phenolic substances from wastewater by algae. A review. Environmental Chemistry Letters 18(2): 377-392.