



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

EVIDENCIA ESPECTROSCÓPICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS DE
NATURALEZA SAPONÍNICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA
MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum*.

ANDY ALEXANDER QUINTERO CATALÁN

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

CUMANÁ, 2022



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

EVIDENCIA ESPECTROSCÓPICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS DE
NATURALEZA SAPONÍNICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA
MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum*
(Modalidad: Tesis de grado)

ANDY ALEXANDER QUINTERO CATALÁN

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

CUMANÁ, 2022

EVIDENCIA ESPECTROSCÓPICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS DE
NATURALEZA SAPONÍNICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA
MICROALGA *Phaeodactylum tricornutum*.

APROBADO POR:

Willian Henríquez
Asesor Académico

Yvanovis Dasilva
Jurado principal

Hellen Bruzual
Jurado principal

DEDICATORIA

A:

Mi novia por estar ahí en todo momento.

Mi abuela, mi mamá, mi tía Dominga, mi papá por apoyarme, prepararme el desayuno y llevarme al colegio todos los días.

Mis compañeros que con su amistad y su apoyo pude ver a la universidad no sólo como un recinto educacional sino como una casa.

Todos que en algún momento de mi vida contribuyeron en mi crecimiento como persona.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Willian Henríquez, por guiarme, compartir sus conocimientos conmigo y por hacer de mí una mejor persona.

Al Dr. Miguel Guevara, quien supo asesorarme durante la investigación.

A la *M.Sc.* Hellen Bruzual por su acompañamiento durante todo el proceso de mi trabajo de grado.

A la Universidad de Antioquia, especialmente al Dr. Elkin Galeano J., quienes de forma desinteresada contribuyeron enormemente al realizar los análisis de Resonancia Magnética Nuclear.

Al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai" (IIBCA-UDO), especialmente al Laboratorio de Polímeros, por toda la ayuda para la realización de los espectros IR.

Al Instituto Oceanográfico de Venezuela, especialmente al personal del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, por toda la ayuda brindada en los cultivos microalgales.

A la Universidad de Oriente (UDO) y al Departamento de Química por brindar los espacios necesarios para mi desarrollo profesional.

A todos los profesores del Departamento de Química, quienes compartieron sus conocimientos conmigo de la mejor forma posible.

ÍNDICE

| | Pág. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| DEDICATORIA..... | III |
| AGRADECIMIENTOS..... | IV |
| LISTA DE TABLAS..... | VII |
| LISTA DE FIGURAS..... | VIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | IX |
| RESUMEN..... | X |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA DIATOMEA <i>P. tricornutum</i> | 4 |
| ANTECEDENTES..... | 5 |
| CULTIVO DE MICROALGAS..... | 6 |
| COMPUESTOS DE TIPO SAPONINA PRESENTES EN ORGANISMOS ...MARINOS..... | 8 |
| USO DE MICRALGAS EN EL BIOCONTROL DE ENFERMEDADES ...CAUSADAS POR BACTERIAS DEL GÉNERO <i>Vibrio</i> EN CULTIVOS DE ...CAMARONES..... | 11 |
| METODOLOGÍA..... | 14 |
| CULTIVO DE LA DIATOMEA <i>Phaeodactylum tricornutuum</i> | 14 |
| Cepa de microalga..... | 14 |
| Condiciones de cultivo..... | 14 |
| Muestras..... | 14 |
| OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LA DIATOMEA <i>Phaeodactylum</i> ... <i>tricornutuum</i> | 15 |
| Preparación de los extractos etanólicos..... | 15 |
| Preparación del extracto MeOH/HCl (1:1)..... | 15 |
| FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO MeOH/HCl (1:1) DE LA ...DIATOMEA <i>P. tricornutum</i> CULTIVADA A 2755 LUX Y COSECHADA ...EN FASE ESTACIONARIA..... | 15 |
| Fracción 1.3.2.1..... | 18 |
| Fracción 1.3.3.1..... | 18 |
| ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA..... | 18 |
| ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS..... | 19 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 21 |
| OBTENCIÓN DE LAS BIOMASAS PROVENIENTES DEL CULTIVO DE ... <i>P. tricornutum</i> Y RENDIMIENTO PORCENTUAL DE SUS EXTRACTOS ...ETANÓLICOS..... | 21 |
| ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS ...DE <i>P. tricornutum</i> | 22 |
| OBTENCIÓN DEL EXTRACTO MeOH/HCl (1:1) Y DE SUS ...FRACCIONES..... | 23 |
| ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO MeOH/HCl (1:1) Y ...DE SUS FRACCIONES..... | 25 |

| | |
|-------------------------------------------------------------|----|
| ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS..... | 25 |
| Análisis RMN de ^1H de la fracción 1.3.3.1..... | 25 |
| Análisis RMN de ^{13}C de la fracción 1.3.3.1..... | 31 |
| Análisis del espectro IR de la muestra 1.3.3.1..... | 34 |
| Análisis RMN de ^1H de la fracción 1.3.2.1..... | 36 |
| Análisis del espectro IR de la fracción 1.3.2.1..... | 38 |
| Análisis RMN de ^{13}C de la fracción 1.3.2.1..... | 40 |
| CONCLUSIONES..... | 43 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 44 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1 Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antibacteriana..... | 19 |
| 2 Masas de extractos etanólicos obtenidos a partir de las biomasas de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , cultivadas a 2755 y 3862,5 lux y cosechadas en fase de crecimiento exponencial y estacionaria | 21 |
| 3 Actividad antibacteriana de los diferentes extractos etanólicos sobre <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y <i>Vibrio alginolyticus</i> | 22 |
| 4 Cantidad del extracto MeOH/HCl (1:1) proveniente del cultivo de la diatomea <i>P. tricornutum</i> irradiado a 2755 lux y cosechado en fase estacionaria..... | 23 |
| 5 Fraccionamiento del extracto seco MeOH/HCl (1:1) por medio de bipartición en un embudo de separación..... | 23 |
| 6 Subfracciones obtenidas por medio de los diferentes procesos cromatográficos utilizados a partir de la fracción acuosa..... | 24 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 1 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de paredes celulares aisladas de diferentes especies de diatomeas..... | 3 |
| 2 Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los morfotipos de <i>P. tricornutum</i> | 4 |
| 3 Estructuras moleculares de los compuestos aislados de <i>P. tricornutum</i> responsables de la actividad disuaciva en la alimentación de <i>Tigriopus californicus</i> | 6 |
| 4 Estructura general de una saponina..... | 9 |
| 5 Estructuras de las aglliconas según su tipo..... | 10 |
| 6 Tipos de saponinas según el número de cadenas de carbohidratos unidas a la aglicona..... | 11 |
| 7 Diagrama de fraccionamiento inicial del extracto etanólico..... | 16 |
| 8 Diagrama de fraccionamiento de la fracción acuosa..... | 17 |
| 9 Cromatografías de capa fina de las fracciones 1.3.2.1 y 1.3.3.1, bajo el sistema de solventes CHCl ₃ /MeOH (3:2)..... | 24 |
| 10 Espectro RMN de ¹ H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1..... | 26 |
| 11 Ampliación del espectro RMN de ¹ H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 entre 0 y 2,4 ppm..... | 27 |
| 12 Comparación del espectro RMN de ¹ H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 con el espectro RMN de ¹ H (400 MHz; MeOD) de la mezcla entre β-sitoesterol y estigmasterol..... | 28 |
| 13 Comparación del espectro RMN de ¹ H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 con el espectro de RMN ¹ H (400 MHz; MeOD) del ligularósido B... .. | 29 |
| 14 Ampliación del espectro RMN de ¹ H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 entre 6,7 y 8,1 ppm..... | 30 |
| 15 Ampliación del espectro RMN de ¹ H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 entre 5,0 y 5,8 ppm..... | 31 |
| 16 Espectro RMN de ¹³ C (150 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1..... | 32 |
| 17 Espectro RMN de ¹³ C (100 MHz; MeOD) del ligularósido B..... | 33 |
| 18 Espectro IR (KBr) de la fracción 1.3.3.1..... | 35 |
| 19 Espectro RMN de ¹ H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.2.1..... | 36 |
| 20 Comparación de los espectros de RMN de ¹ H (600 MHz; MeOD) de las fracciones 1.3.3.1 y 1.3.2.1 | 37 |
| 21 Ampliación del espectro RMN de ¹ H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.2.1 entre 5,2 y 6,0 ppm..... | 37 |
| 22 Espectro IR (KBr) de la fracción 1.3.2.1..... | 38 |
| 23 Comparación de los espectros IR (KBr) de las fracción 1.3.3.1 y la 1.3.2.1.. | 39 |
| 24 Espectro RMN de ¹³ C (150 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.2.1..... | 41 |
| 25 Estructura molecular de la TYR-PRO-PHE-PRO-GLY-NH ₂ aislada a partir del extracto en acetato de etilo de la diatomea <i>P. tricornutum</i> | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS

UV: Ultravioleta.
PACL: Poliaminas de cadena larga.
IIBCA-UDO: Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas "Dra. Susan Tai"
FID: Free induction decay, por sus siglas en inglés.
EPA: ácido eicosapentanoico.
EE: Extracto etanólico.
BP: Biomasa de *Phaeodactylum tricornutum*
Extracto C: Extracto etanólico de la diatomea *P. tricornutum* irradiada a 2755 lux y cosechada en fase estacionaria.
MeOH: metanol.
MeOD: metanol deuterado.
EtOH: etanol.
MeOH/HCl: Sistema metanol-ácido clorhídrico.
CHCl₃/MeOH: Sistema metanol-ácido clorhídrico.
IR: Infrarrojo
Rf: Relación entre el desplazamiento químico del analito y el frente del solvente
RMN de ¹H: Resonancia magnética nuclear de protones
RMN de ¹³C: Resonancia magnética de carbono 13.
δ_C: Desplazamiento químico en ppm generado por átomos de carbono.
δ_H: Desplazamiento químico en ppm generado por átomos de hidrógeno.
KBr: bromuro de potasio.
sp.: Especie no identificada.
Rpm: Revoluciones por minuto.
CO₂: dióxido de carbono.
SiO₂: dióxido de silicio.
HF: ácido fluorhídrico.
NaNO₃: nitrato de sodio.
NH₄F: fluoruro de amonio.

RESUMEN

La diatomea *Phaeodactylum tricornutum* fue cultivada axénicamente y de forma unialgal en medio f/2 Guillard, exponiéndola a 2755 y 3862,5 lux. Las fases exponencial y estacionaria se alcanzaron a los 8 y 17 días respectivamente, obteniéndose 4 extractos etanólicos de los cuales sólo el irradiado a 2755 lux y cosechado en fase estacionaria presentó actividad antibacteriana frente a *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. El residuo orgánico proveniente de este último cultivo, se maceró en una mezcla MeOH/HCl (1:1) obteniéndose un nuevo extracto, del cual mediante biparticiones y cromatografías de columna se pudieron obtener diferentes fracciones a las cuales se les evaluó su actividad antibacteriana frente a varias cepas y se les realizaron análisis espectroscópicos de RMN e IR, lo que permitió identificar la presencia de una familia de compuestos dentro de las subfracciones 1.3.3.1 y 1.3.2.1. En ambas, el estudio de los análisis espectroscópicos establece la presencia de estructuras con esqueletos triterpénicos o esteroidales unidas a restos sacáridos de tipo saponina, y también a estructuras de tipo aminoácido como la TYR-PRO-PHE-PRO-GLY-NH₂.

INTRODUCCIÓN

La naturaleza ha sido siempre una fuente inagotable de compuestos bioactivos, también conocidos como metabolitos, y su empleo en el tratamiento de diversos tipos de enfermedades proviene desde tiempos inmemoriales (Rodríguez, 2003; Jaspars y Houssen, 2006).

El interés del hombre por las propiedades medicinales de los metabolitos aumentó a lo largo del tiempo, aislándose metabolitos de múltiples especies, en su mayoría de origen terrestre, un hecho curioso ya que el medio marino representa un 95% de la biosfera (Lenis *et al.*, 2007). Sin embargo, el estudio centrado en organismos marinos ha crecido década tras década, ya que se han reportado de manera progresiva especies marinas con diversidad de compuestos bioactivos, ligados a su metabolismo y que pueden ser utilizados en distintas aplicaciones (Blunt *et al.*, 2007).

Uno de estos organismos marinos reportados como fuente potencial de compuestos bioactivos, son las algas. Estas han sido reconocidas así desde aproximadamente 50 años y su estudio es considerado como un terreno inexplorado en comparación con la flora terrestre (Burgess *et al.*, 1999).

Las algas son organismos que figuran entre los seres más antiguos del planeta, con aproximadamente 1 a 3 millones de años de antigüedad, existiendo actualmente 30 000 especies en todo el mundo (Bhakuni y Rawat, 2005). Estas conforman un conjunto de organismos acuáticos con una estructura morfológica menos compleja que la de las plantas terrestres, y son responsables de más de la mitad de la actividad fotosintética del mundo (Oraday, 1998).

Es importante resaltar que las algas marinas son organismos que viven en un hábitat complejo y están sometidas a condiciones a veces extremas (cambios bruscos de salinidad, variación en la irradiación, periodos de emersión por efecto de las mareas,

oleaje y predadores), por lo cual, para adaptarse a las nuevas circunstancias deben producir metabolitos que les permitan aprovechar al máximo los recursos disponibles en su entorno para poder sobrevivir (Patra *et al.*, 2009).

Estas especies poseen variadas formas, desde las más complejas, que llegan a 60 metros de longitud (macroalgas), hasta las más simples estructuras celulares de 1 a 15 micras (microalgas). Conociéndose al término “microalga” como aquellos microorganismos que contienen clorofila A y otros pigmentos fotosintéticos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, lo que incluye a las cianobacterias que tienen estructura celular procariota (Abalde *et al.*, 1995).

Las microalgas han sido utilizadas como biocombustible, biofertilizante e incluso en el tratamiento de aguas residuales. Además, los extractos microalgales son utilizados a menudo en el área cosmética, principalmente en los productos de protección solar y en los referentes al cuidado de la piel. Las especies más utilizadas son: *Arthrospira* (prevención de estrías y crema antiarrugas), *Ascophyllum nodosum* (crema antiedad), *Spirulina platensis* (crema hidratante y protección solar), *Nannochloropsis oculata* (blanqueamiento de la piel), *Chlorella vulgaris* (antiarrugas), *Dunaliella salina* (preservativo antimicrobial) y *Phaeodactylum tricornutum* (protección solar) (Priyadarshani y Rath, 2002).

Entre las microalgas se encuentran un grupo de algas llamadas diatomeas, las cuales son microorganismos eucariotas presentes en los ecosistemas marinos y de agua dulce. Estos organismos unicelulares dominan las comunidades de fitoplancton y se consideran los principales productores primarios de materia orgánica en la cadena trófica marina. (D’Ippolito *et al.*, 2004). Sus características fotosintéticas hacen que sean responsables de una proporción significativa de la producción mundial de oxígeno y la fijación de CO₂ en ambientes acuáticos (Lioudmila *et al.*, 2000). Las diatomeas se destacan particularmente por sus elaboradas paredes celulares nanoestructuradas o frústula (ver figura 1). Estas son consecuencia de la biomineralización de sílice y muestran en su

superficie una red de poros homogéneamente distribuidos y organizados que, en su mayoría, se disuelven en la columna de agua después de la muerte celular. Sin embargo, una fracción significativa de las frústulas se depositan en el fondo del mar donde pueden ser enterrados en sedimentos marinos, manteniendo sus estructuras porosas altamente organizadas (Bridoux e Ingalls, 2010).

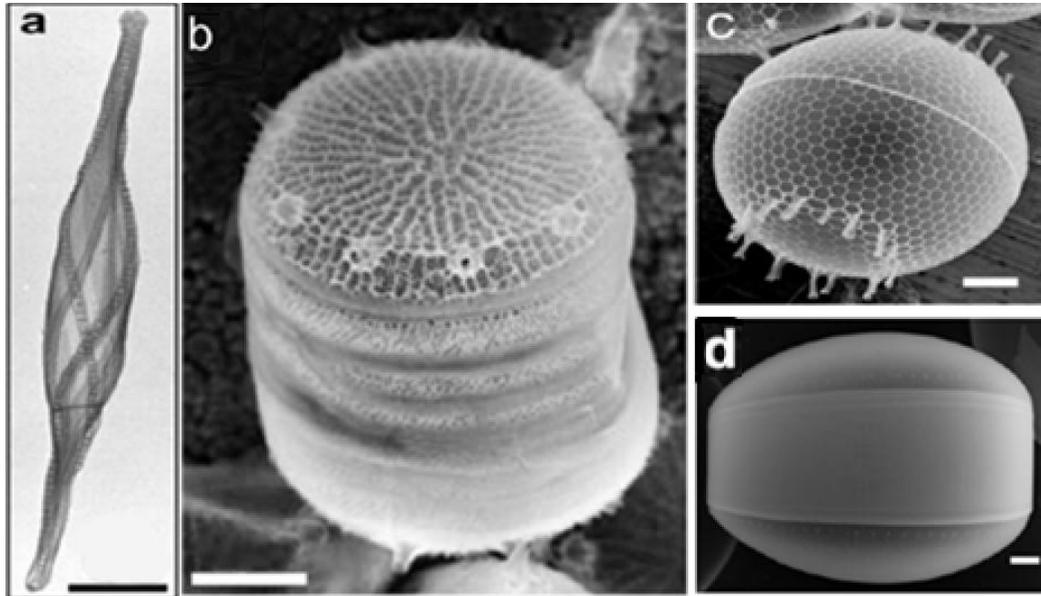


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de paredes celulares aisladas de diferentes especies de diatomeas: a) *Cylindrotheca fusiforme*, b) *Thalassiosira pseudonana* c) *Stephanopyxis turnis*, (escala de barrido 10 μm) d) *Coscinodiscus granii* (escala de barrido 20 μm), (Sumper y Kröger, 2004; Sumper y Brunner, 2006).

La morfología de la pared celular ha sido ampliamente examinada (Round *et al.*, 1990), sin embargo, los genes que codifican las proteínas directamente implicadas en la biogénesis de la pared celular no tanto (Hildebrand *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 1999; Kröger *et al.*, 1999). Se ha determinado que una de las posibles macromoléculas responsables de la biosilificación del SiO_2 son las *N*-metilpropilaminas o también llamadas poliaminas de cadena larga (PACL), las cuales han sido aisladas y caracterizadas a partir de las frústulas digeridas con HF y NH_4F de diversas especies de diatomeas marinas (Colin *et al.*, 2013; Kröger *et al.*, 2000; Sumper *et al.*, 2005; Sumper y Lehmann, 2006).

La razón principal por la cual la microalga *P. tricornutum* pertenece al grupo de las diatomeas es precisamente por la pared celular nanoestructurada de SiO_2 que posee, sin embargo, a lo largo del tiempo se puso en duda a *P. tricornutum* como una diatomea debido a la ausencia de esta frústula, por lo cual es importante conocer su historia y clasificación taxonómica.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA DIATOMEA *P. tricornutum*

La microalga polimórfica *Phaeodactylum tricornutum* (mostrada en figura 2), es una diatomea con cromatóforos de color amarillo-marrón, su forma trirradial fue descrita por Bohlin en 1897, y contaba hasta entonces de un solo género con una única especie, (Bohlin, 1897).

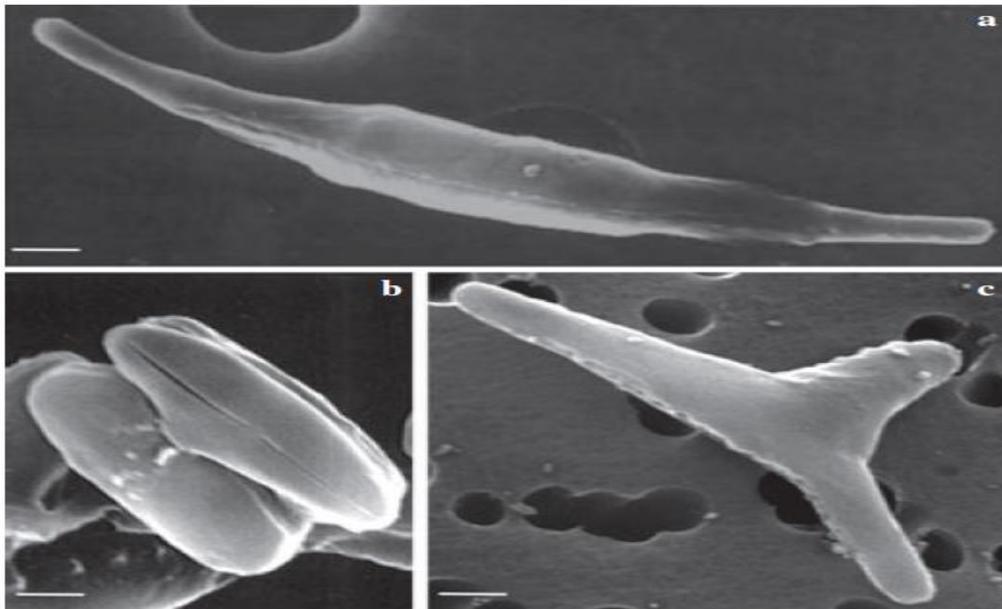


Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los morfotipos de *P. tricornutum*, las cuales son: a) Fusiforme, b) Ovalada y c) Trirradiada. (Escala de barrido = 1 μm) (De Martino *et al.*, 2007).

Su forma fusiforme fue aislada por primera vez por Ellen y Nelson en 1910, y fue descrita como *Nitzschia closterium* forma *minutissima*, siendo Wilson quién describe su naturaleza polimórfica en 1946. La ausencia de una estructura silificada en la pared

celular de *P. tricornutum* llevó a la conclusión que esta microalga no debería ser clasificada como diatomea, hasta que Lewin en 1958 observó una porción silificada en la forma ovalada de *P. tricornutum*, añadiéndole a su descripción taxonómica un nuevo orden, suborden y también a una familia única, perteneciendo entonces a la división *Heterokontophyta*, clase *Bacillariophyceae*, orden *Bacillariophyceae*, suborden *Phaeodactylinae*, familia *Phaeodactylaceae*, género *Phaeodactylum* y especie *P. tricornutum* (Lewin, 1958; De Martino *et al.*, 2007).

ANTECEDENTES

En reportes anteriores asociados a *P. tricornutum*, se detectó mediante pruebas químicas, la presencia de saponinas, compuestos fenólicos y alcaloides (Scholz y Liebezeit, 2006). Además, también se determinó la presencia de dos aminoácidos, estos fueron el diclorhidrato de ácido 2,4 diaminobutírico y el β -*N*-metilamino-L-alanina. Siendo este último, un aminoácido esencial para la producción de proteínas en diferentes organismos, el cual gracias a las interacciones típicas de la cadena trófica está disponible para los organismos pertenecientes al medio marino (Réveillon *et al.*, 2016).

En *P. tricornutum*, también ha sido determinada la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, y uno de los más importantes aislados de esta diatomea es el ácido eicosapentanoico (EPA por sus siglas en inglés), el cual se genera en mayor cantidad en cultivos a bajas temperaturas (Reis *et al.*, 1996; Jiang y Gao, 2004; Ramírez *et al.*, 2007). Además, este ácido es responsable de la actividad antibacteriana del extracto metanol/agua (5:1) de *P. tricornutum* frente a bacterias *Gram* positivas y *Gram* negativas, incluyendo a *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* y *Staphylococcus epidermidis* (Desbois *et al.*, 2008).

Además del EPA, la fucoxantina también ha sido aislada en extractos etanólicos de la microalga *P. tricornutum*, la cual fue cultivada a 20 °C y 2500 lux (Kim *et al.*, 2012). Por otro lado, se determinó que los extractos metanólicos de *P. tricornutum* producen un efecto disuasivo en la alimentación del copépodo *Tigriopus californicus* y, los

compuestos aislados responsables de esta actividad fueron los mostrados en la figura 3, identificados como apo-10'-fucoxantinal (1), apo-12'-fucoxantinal (2), apo-12'-fucoxantinal (3) y apo-13'-fucoxantinona (4) (Shaw *et al.*, 1995).

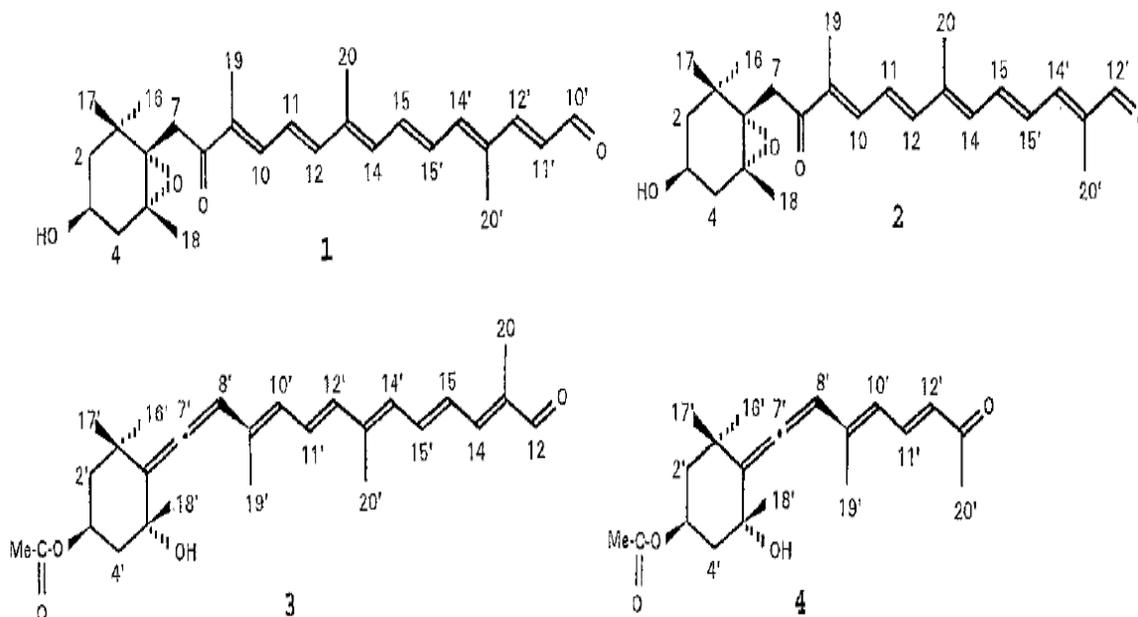


Figura 3. Estructuras moleculares de los compuestos aislados de *P. tricorutum* responsables de la actividad disuasiva en la alimentación de *Tigriopus californicus* (Shaw *et al.*, 1995).

El extracto acuoso de *P. tricorutum* tiene un efecto depresor del sistema nervioso central y actúa como relajante muscular (Villard *et al.*, 1992; Rodríguez y Guild, 2008). Además, estos extractos acuosos han presentado actividad antioxidante, analgésica, inmonoestimuladora, y antiinflamatoria, llegando a representar esta última actividad hasta un 30 % del efecto antiinflamatorio de la indometacina, una droga no esteroide (Guzman *et al.*, 2001; Guzman *et al.*, 2003).

CULTIVO DE MICROALGAS

La reproducción de las microalgas ocurre por división celular, la cual es binaria en la mayoría de los casos, por lo que tienen un crecimiento rápido cuando se inoculan en un

medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones ambientales adecuadas (Abalde *et al.*, 1995). La rapidez de crecimiento poblacional, es limitada por el factor ambiental que se encuentre en los niveles mínimos necesarios para que la microalga pueda desarrollarse. Sin embargo, conforme la edad del cultivo avanza, las condiciones ambientales varían, y esto modifica a su vez la velocidad de crecimiento poblacional. Por ende, es importante conocer las condiciones óptimas para aumentar la producción de la biomasa de una microalga. Pero, también existen ciertas especies que pueden crecer en condiciones no óptimas gracias a la flexibilidad en sus requerimientos, factor de mucha importancia ya que, por lo general, cuando un parámetro ambiental cambia, afecta a otro (Montes, 2014).

Durante el desarrollo de la microalga, existen diferentes fases de crecimiento que describen la forma en la cual varía la concentración celular, la composición bioquímica y la biomasa de las microalgas (Arredondo y Votolina, 2007). Además, teniendo en cuenta el tipo de población, el cultivo puede ser axénico, unialgal o mixto y, según sea el tipo de cosecha, los cultivos se pueden clasificar como cultivos discontinuos, continuos y semicontinuos (Abalde *et al.*, 1995; Montes, 2014).

Particularmente, en el caso de *P. tricornutum*, la tasa de crecimiento puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo. Así, su fase exponencial y estacionaria se alcanzan a los 6 y 16 días respectivamente (Ruivo *et al.*, 2011), aunque esta última puede alcanzar los 21 días (Réveillon *et al.*, 2016).

Existen factores que determinan el crecimiento y la producción de metabolitos en el cultivo de microalgas, estos son: pH, salinidad, temperatura, nutrientes, agitación y luz (Gómez, 1997; Koller *et al.*, 2012).

La temperatura óptima para el crecimiento de *P. tricornutum* es de 20 °C y el pH de 7,8 (Bitaubé *et al.*, 2008; Leyva, 2013) y, a pesar de pertenecer a un género con una única especie, las cepas de esta diatomea provenientes de diferentes zonas geográficas,

presentan comportamientos diferentes en sus tasas de crecimiento y contenido de pigmentos al igual que su tolerancia frente a los diferentes rangos de salinidad y temperatura (Kräbs y Büchel, 2011).

El rango de salinidad soportado por *P. tricornutum* es amplio, este va de 1 UPS a 90 UPS (Unidades Prácticas de Salinidad), y puede adaptarse a la variación de la densidad de flujo de fotones, desde $7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ hasta $230 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Geider *et al.*, 1985; Sapriel *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2014).

Es importante resaltar que la luz constituye un factor fundamental en todo cultivo de microalgas, tanto por sí misma como por sus interrelaciones con otros parámetros. La radiación utilizable fotosintéticamente, que cae dentro del rango del espectro visible (400 nm a 700 nm), representa la fuente de energía para la fotosíntesis, y tanto la intensidad luminosa como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y el metabolismo de la microalga (Abalde *et al.*, 1995).

Durante variaciones extremas de luz, las microalgas son capaces de adaptarse presentando cambios biofísicos, bioquímicos y fisiológicos con el fin de optimizar el uso de la luz disponible para la fotosíntesis (Sukenik *et al.*, 1990). Dicha cantidad de luz utilizada depende de los pigmentos fotosintéticos, así como también del tamaño y la distribución de las células algales. Es por esto que, con el aumento de la densidad celular de los cultivos, la disponibilidad de luz por célula decrece, implicando que la razón de crecimiento específico también disminuya (Raven y Geider, 1988), debido a que las características del campo de luz dentro del agua están determinadas, en parte, por las propiedades de absorción y dispersión de las microalgas en sí (Abalde *et al.*, 1995; Gómez, 1997).

COMPUESTOS DE TIPO SAPONINAS PRESENTES EN ORGANISMOS MARINOS

Los organismos marinos han desarrollado la habilidad de reproducir metabolitos

secundarios como mecanismos de defensa que les ayuden a sobrevivir en ecosistemas hostiles y uno de estos metabolitos son las saponinas (figura 4). Tal es el caso de las especies *Anasterias minuta* (estrella de mar) y *Holothuria floridana* (pepino de mar), a las cuales se les determinó que las estructuras responsables de la actividad citotóxica y antifúngica en cada caso eran estructuras glicosídicas de tipo esteroidal (Santafé *et al.*, 2014).

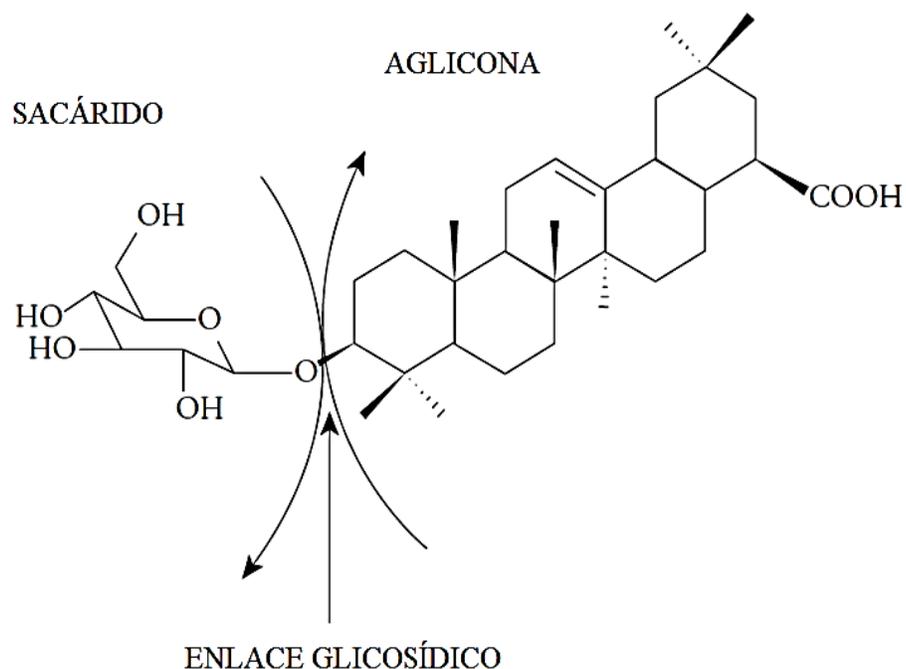


Figura 4. Estructura general de una saponina.

Las saponinas son metabolitos secundarios polares de naturaleza glicosídica, su nombre proviene del latín *sapo* y hace alusión a sus propiedades surfactantes. Estas se encuentran constituidas por un anillo terpenoidal, esteroidal o esteroidal alcaloide (ver figura 5), conocido como sapogenina o aglicona, que está sustituido por oligosacáridos a través de enlaces glicosídicos, lo cual les confieren un carácter anfifílico (Ahumada *et al.*, 2016).

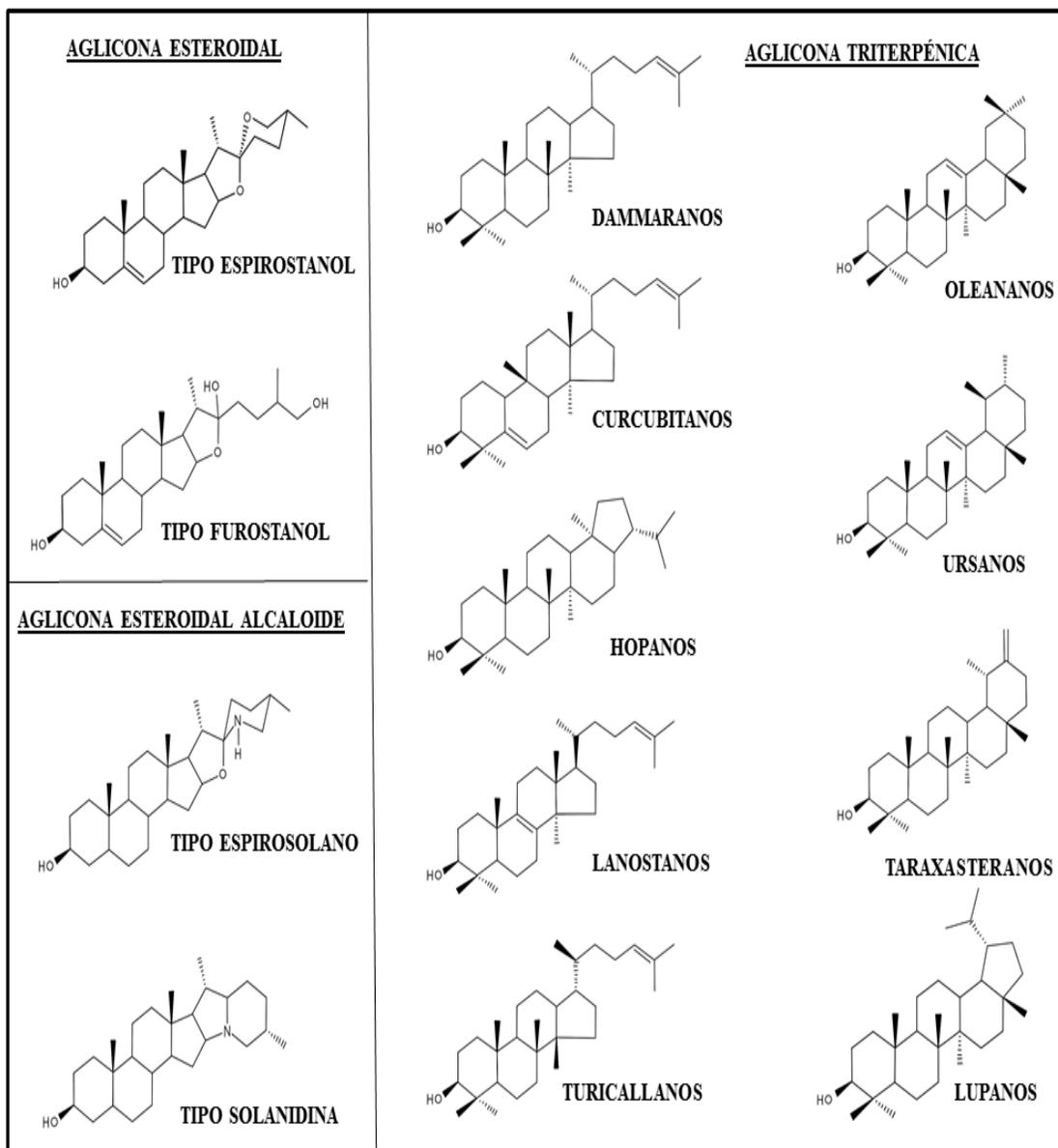


Figura 5. Estructuras de las agliconas según su tipo.

De acuerdo al número de sustituciones, se pueden encontrar agliconas mono, di o triglicosidadas como se puede observar en la figura 6. Además, la alta masa molecular de las saponinas (contienen de 30 a 45 átomos de carbono) hace que su elucidación estructural sea muy compleja, por lo cual es necesario utilizar técnicas espectroscópicas específicas (Valencia *et al.*, 2005; Díaz, 2009).

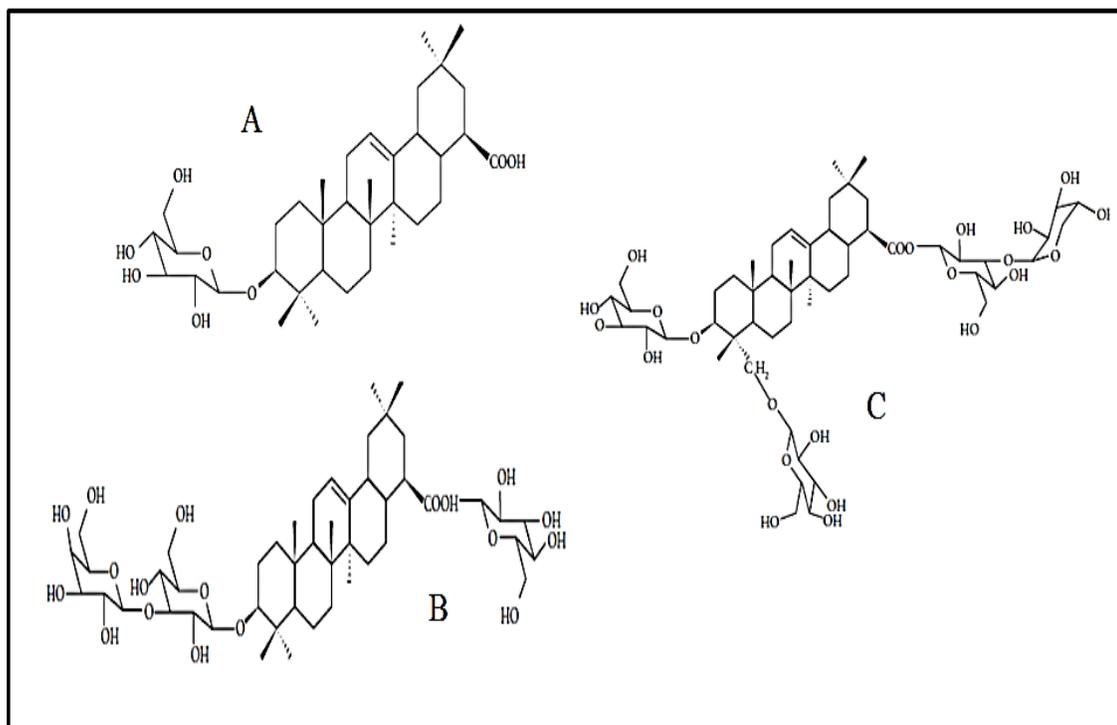


Figura 6. Tipos de saponinas según el número de cadenas de carbohidratos unidas a la aglicona: A) Monoglicosidada, B) Diglicosidada y C) Triglicosidada.

USO DE MICROALGAS EN EL BIOCONTROL DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR BACTERIAS DEL GÉNERO *VIBRIO* EN CULTIVOS DE CAMARONES.

En el campo de la acuicultura las enfermedades aparecen en todas las etapas de desarrollo de los organismos cultivados, y mayormente son ocasionadas por la presencia de comunidades bacterianas en el agua y en el sedimento de piscinas camaroneras, promovidas por el aumento de la materia orgánica asociada a la acumulación de heces y residuos del alimento que no es ingerido por los organismos en el cultivo (Borbor, 2006; López *et al.*, 2013).

El control de estas patologías se puede realizar mediante el uso de antibióticos, pero tienen limitaciones, además su uso indiscriminado puede ocasionar el desarrollo de resistencia bacteriana, contaminación ambiental y acumulación de residuos en los tejidos de la especie cultivada (Mioso *et al.*, 2014).

El género bacteriano con más especies patógenas perjudiciales para el cultivo de camarones es el *Vibrio* (Viteri, 2016). Estas bacterias forman parte de la flora natural de estos crustáceos y se localizan en el tracto digestivo, branquias, cutículas y hemolinfa del camarón a través del consumo de sedimento, agua y alimentos (Maeda *et al.*, 1997; Villamil *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2013). Su alto contenido en los tejidos del camarón provoca diferentes enfermedades en las larvas y juveniles, entre las cuales la más importante es la vibriosis (Suárez *et al.*, 2015, Cuéllar, 2013; Peña y Valera, 2015). Esta enfermedad, dependiendo de su severidad, disminuye el tiempo de coagulación en camarones, provoca nado errático, promueve la anorexia y en ocasiones, puede alcanzar mortalidades de hasta un 100 % de todo un cultivo acuícola (Yamazaki y Esiobu, 2012).

El género *Vibrio* es un grupo de bacterias Gram negativas de tipo facultativo anaeróbico con forma de bastón curvilíneo y uno o varios flagelos polares. Pertenecen a la familia *Vibrionaceae*, abarcando diversos grupos de bacterias marinas heterótrofas (Pacini, 1854). Las especies asociadas a este género toleran un alto rango de salinidad y concentraciones bajas de oxígeno, siendo las que más causan infecciones en camarones: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbelli*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. penaeicida*, *V. parahaemolyticus*, *V. penaeicida*, *V. vulnificus* y *V. splendidus* (Gómez *et al.*, 2004; Argüello, 2014).

Una alternativa de los antibióticos para el control de las bacterias del género *Vibrio* es la aplicación de probióticos tanto en el camarón como en el alimento vivo (Sotomayor y Balcázar, 2003; Herrera *et al.*, 2014). Además, la introducción de microalgas en los estanques acuícolas, también ha generado un aumento en la tasa de supervivencia de larvas y juveniles (Lio *et al.*, 2005). Esto viene relacionado directamente por la disminución en la concentración de bacterias del tipo *Vibrio* en el agua debido a propiedades antagónicas y alelopáticas de las microalgas (Salvesen *et al.*, 2000; Tendencia y De la Peña, 2003; Marques *et al.*, 2006).

Algunas especies de microalgas que han disminuido satisfactoriamente la carga

bacteriana del tipo *Vibrio* en cultivos acuícolas han sido *I. galbana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *Chaetoceros calcitrans*, *Nitzschia* sp., *Skeletonema costatum* y *Chlorella* sp., (Molina *et al.*, 2013; Molina y Sánchez, 2017). De esta forma, se puede observar la importancia que tienen las microalgas en el biocontrol de cultivos, siendo *P. tricornutum* una de las especies capaces de inhibir el crecimiento de bacterias del género *Vibrio* como *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*.

METODOLOGÍA

CULTIVO DE LA DIATOMEA *Phaeodactylum tricornutum*

Cepa de microalga

La diatomea *P. tricornutum* utilizada en esta investigación fue suministrada por el Banco de Germoplasma de algas de la Universidad de Oriente, Venezuela, registrada con los códigos BGAUDO-160, la cual fue mantenida bajo condiciones controladas de laboratorio (23 ± 1 °C, 100 lux, fotoperiodo 12/12) en medio f/2 Guillard (Guillard, 1975) a 37 UPS.

Condiciones de cultivo

La diatomea *P. tricornutum* fue cultivada axénicamente, por duplicado, durante 17 días en matraces con 1500 ml de medio f/2 Guillard ($0,88 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de nitrógeno en forma de NaNO_3) a 23 ± 1 °C, pH de 7,8; fotoperiodo 12/12 y bajo dos intensidades de luz, 2755 lux y 3862,5 lux). Los cultivos se realizaron de forma unialgal con agitación manual dos veces al día durante 30 segundos.

Muestras

Siguiendo las recomendaciones aplicadas en 1992 por Lopez-Muñoz *et al*, pero a una diferente temperatura, los cultivos de *P. tricornutum* fueron cosechados, para ambas intensidades, a los 8 días tras alcanzar la fase exponencial, mientras que la fase estacionaria fue cosechada 9 días después.

Ambas fases de crecimiento fueron centrifugadas a 4000 rpm/10 min para obtener las biomásas. Dichas biomásas obtenidas fueron preservadas mediante refrigeración por congelamiento hasta el proceso de maceración para la obtención de los extractos etanólicos y la evaluación de la actividad antimicrobiana.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LA DIATOMEA *Phaeodactylum tricornutum*

Preparación de los extractos etanólicos

Las biomásas de *P. tricornutum*, cultivadas a 2755 lux y 3862,5 lux y cosechadas en diferentes fases de crecimiento, se sometieron a extracción separadamente con etanol como solvente. Dichas soluciones se dejaron homogenizar y reposar durante 24 horas, para permitir la extracción de los metabolitos secundarios. Dicho material de extracción fue filtrado por gravedad, luego rotoevaporado y por último, se colocó en una estufa a 37 °C para eliminar el solvente, obteniéndose así los diferentes extractos de cada una de las biomásas.

Preparación del extracto MeOH/HCl (1:1)

El residuo orgánico proveniente del cultivo irradiado a 2755 lux y cosechado en fase estacionaria (1,6325 g), se sometió a una extracción hasta agotamiento del color con una mezcla MeOH/HCl (1:1). El material de extracción fue filtrado por gravedad y se centrifugó con el objetivo de decantar la mayoría del solvente posible, colocándola luego en una estufa a 37 °C para eliminar el resto del solvente remanente, obteniéndose 1,1297 g del extracto MeOH/HCl (1:1).

FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO MeOH/HCl (1:1) DE LA DIATOMEA *P. tricornutum* CULTIVADA A 2755 LUX Y COSECHADA EN FASE ESTACIONARIA

El extracto MeOH/HCl (1:1) obtenido previamente, fue disuelto inicialmente con 20 ml de agua y biparticionado empleando un embudo de separación con solventes orgánicos mediante extracción sucesiva, obteniéndose fracciones en cloroformo, acetato de etilo y una fracción acuosa (figura 7). La cantidad obtenida tanto de la fracción clorofórmica como la de acetato de etilo fueron muy pequeñas, por lo que se descartaron. Por otro lado, la fracción acuosa, quién tenía un color amarillo-marrón y un aspecto pastoso, se corrió en una cromatografía de capa fina sobre sílica-gel 60 con indicador fluorescente UV₂₅₄ (ALUGRAM, SIL G/UV) como adsorbente y una mezcla CHCl₃/MeOH (1:1)

como eluyente. Al exponerla a luz UV, se observó una mancha que se extiende desde el origen hasta el frente del solvente, dejando múltiples rastros. Esto permitió visualizar mejor la complejidad de la muestra por lo que se procedió a fraccionar por cromatografía de columna.

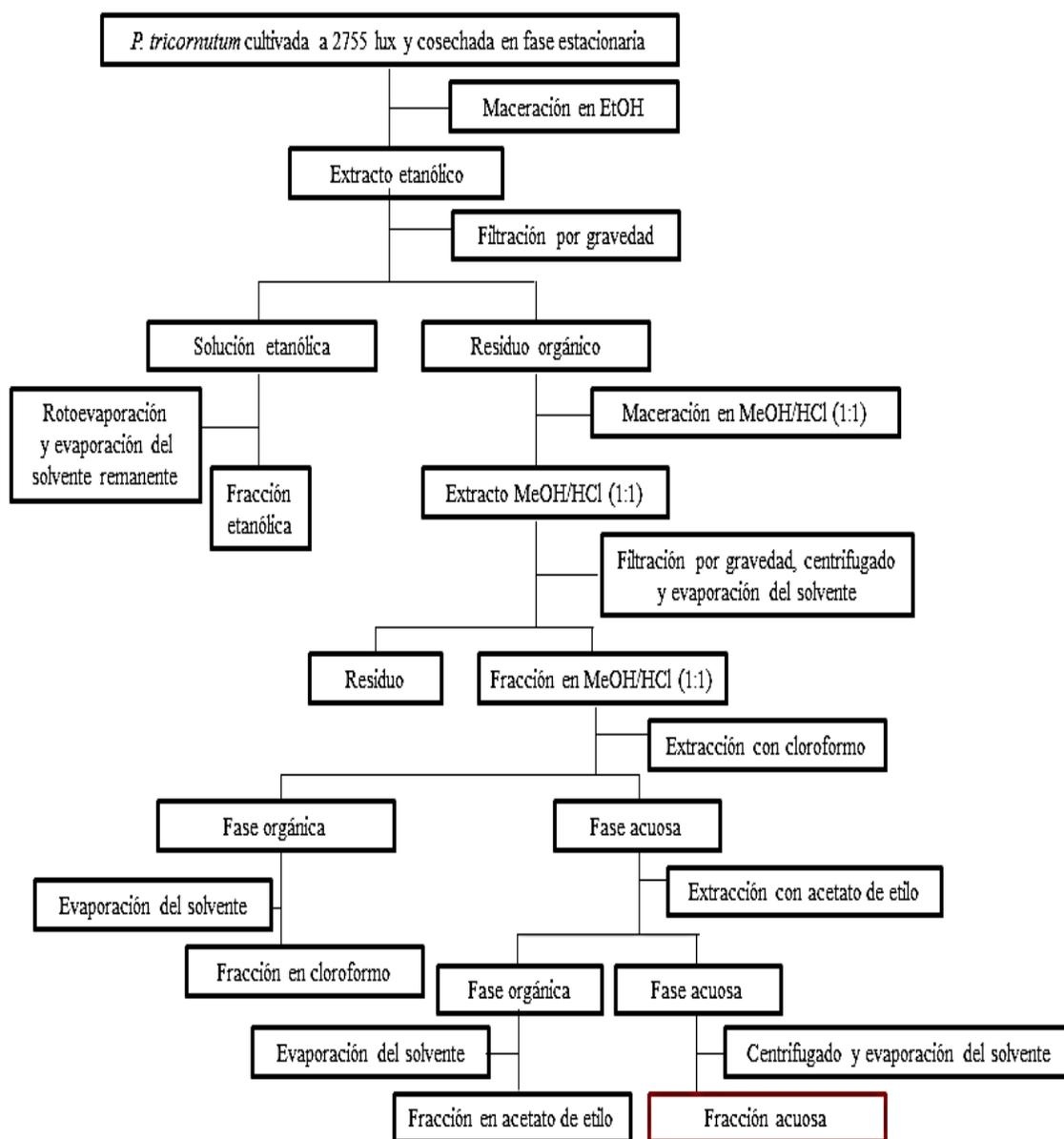


Figura 7. Diagrama de fraccionamiento inicial del extracto etanólico de la diatomea *P. tricornutum* cultivada a 2755 lux y cosechada en fase estacionaria.

Luego de la corrida cromatográfica, la fracción acuosa fue sometida a un proceso de cromatografía de columna (4,0 cm x 22,0 cm) usando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y se eluyó empleando mezclas de los solventes cloroformo, metanol y agua, aumentando gradualmente la polaridad; $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1), MeOH y $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1); de esta forma, se obtuvieron 14 eluatos de 15 ml cada uno, los cuales fueron agrupados en 3 fracciones conforme al comportamiento observado en corridas de cromatografía de capa fina, denotándolas como 1.1, 1.2 y 1.3 y cada una de las fracciones obtenidas fueron procesadas de forma similar a la fracción acuosa, tal y como se muestra en el esquema ilustrado en la figura 8.

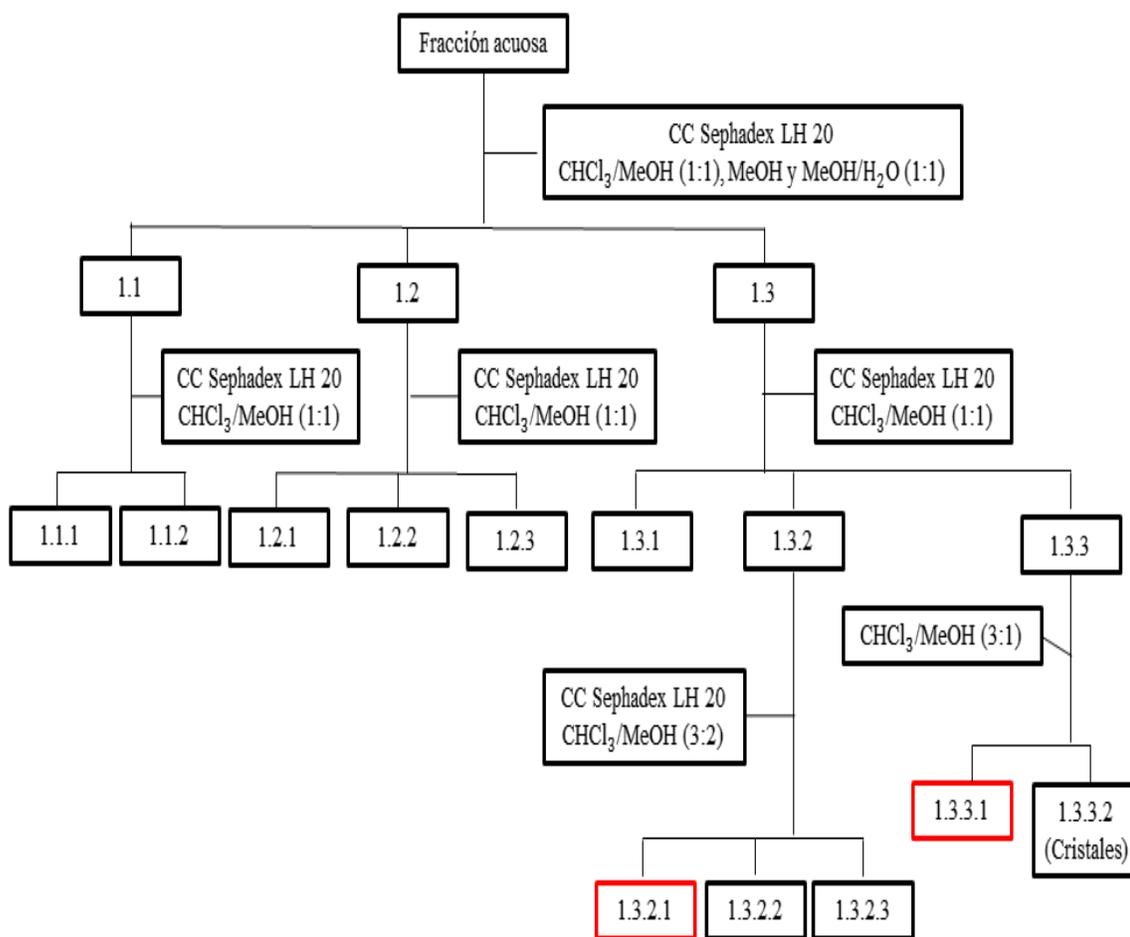


Figura 8. Diagrama de fraccionamiento de la fracción acuosa proveniente del extracto MeOH/HCl (1:1) de la diatomea *P. tricorutum* cultivada a 2755 lux y cosechada en fase estacionaria.

En la cromatografía de columna (2,0 cm x 9,0 cm) se utilizó como fase estacionaria Sephadex LH-20 y se eluyó con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1). Cada una de las fracciones fueron corridas en cromatografías de capa fina analítica de sílica-gel 60 con indicador fluorescente UV_{254} (ALUGRAM, SIL G/UV) como adsorbente y una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) como eluyente a excepción de las subfracciones 1.3.2.1 y 1.3.3.1, en las cuales el eluyente fue una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:2).

Fracción 1.3.2.1

La fracción 1.3.2 fue corrida en una cromatografía de capa fina analítica $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1), en la cual se determinó que dicha fracción no era lo suficientemente pura para considerarla para análisis espectrales. Es por esto que se procedió a fraccionarla nuevamente mediante cromatografía de columna (2,0 cm x 9,0 cm) utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y se eluyó con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:2), obteniéndose 12 eluatos de 5 ml cada uno, los cuales fueron agrupados en 3 fracciones según el comportamiento observado en corridas cromatografías de capa fina, denotándolas como 1.3.2.1, 1.3.2.2 y 1.3.2.3, de las cuales sólo la fracción 1.3.2.1, que era un sólido de aspecto gelatinoso de color amarillo-marrón se destinó para análisis de RMN e IR.

Fracción 1.3.3.1

La fracción 1.3.3 era un sólido de aspecto pastoso color marrón con pequeños cristales en forma de aguja depositados en el fondo y solubles en metanol. Para separar a estos cristales de la solución, se procedió a añadir pequeñas cantidades de la mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:1) y fueron extraídos usando una pipeta Pasteur, dando lugar a dos nuevas subfracciones denominadas como fracción 1.3.3.2 y 1.3.3.1. Esta última subfracción fue corrida en una cromatografía de capa fina analítica $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:2) y, debido a la pureza observada se destinó para análisis de RMN e IR.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El efecto antibacteriano de los diferentes extractos fue evaluado utilizando como

organismos reveladores las cepas bacterianas *Gram* negativas y *Gram* positivas mostradas en la tabla 1, mediante la técnica de difusión en agar o método del antibiograma, descrito por Bauer *et al.*, 1966, en la cual discos estériles de papel de filtro Whatman N°3 de 10 mm de diámetro se impregnaron con 25 µl del extracto en prueba (40 mg/ml), lo cual proporcionó una concentración final de 1 mg de extracto/disco. Seguidamente, estos discos se colocaron sobre placas de Petri, previamente servidas con 12 ml de agar Mueller Hinton (HIMEDIA, Laboratorios Pvt. Limited, Bombay-India) e inoculadas, utilizando un hisopo de algodón estéril, con una suspensión bacteriana de concentración conocida (1×10^8 células/ml) estandarizada por comparación con un patrón comercial McFarlan 0,5. Posteriormente, las placas de Petri se incubaron a 29 ± 1 °C por 24 y 48 horas para permitir el crecimiento bacteriano. El extracto que presentó principios antibacterianos frente a las bacterias de tipo *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* produjo un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco, el cual fue medido utilizando una regla graduada. En cada caso fueron colocados en las placas, discos impregnados con el solvente de extracción como control negativo.

Tabla 1. Microorganismos empleados en las pruebas de actividad antibacteriana.

| Microorganismos | Origen | Tinción de Gram |
|--------------------------------|--------------|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC (27853) | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC 10031 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | IBE Doc-19 | + |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | ATCC 17802 | - |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | ATCC 17749 | - |

ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS

Las fracciones obtenidas a partir de la biomasa de la diatomea *P. tricornutum*, se analizaron, mediante el uso de técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectroscopia Infrarrojo (IR). Los análisis de RMN en ambos casos (^1H y ^{13}C), se realizaron en el departamento de farmacia de la Universidad de Antioquia ubicada en la ciudad de Medellín, República de Colombia, haciendo uso de un espectrómetro Bruker Advance de 600 MHz. Las muestras en estudio se disolvieron en metanol deuterado y

los espectros fueron tomados con supresión de agua y con una sonda Prodigy TCI. Los FID (Free Induction Decay, por sus siglas en inglés), fueron procesados por medio del software TOPSPIN 4.0.8 desarrollado por la empresa Bruker y descargado gracias a la licencia académica del servidor Bruker a través del enlace descrito a continuación, el cual permite la instalación directa del software por medio del sistema operativo Windows 10 de 64 bits: <https://www.bruker.com/nc/service/support-upgrades/software-downloads/nmr/pc/pc-topspin.html>.

Los análisis IR fueron realizados en el laboratorio de Espectroscopia FT-IR del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas “Dra. Susan Tai” (IIBCA-UDO) de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, haciendo uso de un equipo de espectroscopia FT-IR marca Perkin Elmer modelo Frontier. Para su tratamiento, las muestras fueron compactadas en pastillas transparentes de KBr.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos tras la variación en la intensidad de luz a la cual fue expuesto el cultivo de *P. tricornutum*, así como la obtención de los diferentes extractos, su fraccionamiento, actividad antibacteriana y análisis espectroscópicos de las fracciones con mayor pureza.

OBTENCIÓN DE BIOMASAS PROVENIENTES DEL CULTIVO DE *P. tricornutum* Y RENDIMIENTO PORCENTUAL DE SUS EXTRACTOS ETANÓLICOS

En la tabla 2, se muestra la relación entre biomاسas cosechadas de *P. tricornutum* y las masas del extracto seco, obteniéndose para el caso de la fase exponencial que el cultivo que generó mayor cantidad de biomasa y de extracto seco fue el cosechado a partir de la microalga irradiada a 2755 lux. De igual forma, en el caso de la fase estacionaria, la mayor cantidad de biomasa cosechada fue a partir del cultivo irradiado a 2755 lux sin embargo, la mayor cantidad de extracto seco fue para el cultivo irradiado a 3862,5 lux.

Tabla 2. Masas de extractos etanólicos (EE) obtenidos a partir de las biomاسas de *Phaeodactylum tricornutum* (BP), cultivadas a 2755 lux y 3862,5 lux y cosechadas en fase de crecimiento exponencial y estacionaria.

| Irradiancias Promedio | Fase exponencial | | | Fase estacionaria | | |
|--------------------------|------------------|--------|-------|-------------------|--------|-------|
| | BP (g) | EE (g) | % m/m | BP (g) | EE (g) | % m/m |
| 2755 lux | 1,3397 | 0,3182 | 23,75 | 1,9877 | 0,3461 | 17,41 |
| 3862,5 lux | 1,2946 | 0,2938 | 22,69 | 1,8761 | 0,3808 | 20,28 |

*Para cada caso, el volumen medio de cultivo fue de 3 litros.

De forma general, las cantidades de extractos crudos obtenidos a partir de las biomاسas cosechadas en la fase estacionaria fueron mayores que los obtenidos en la fase exponencial, sin embargo; es diferente si se plantea en términos de rendimiento. Esto se debe al hecho de que en la fase estacionaria existe mayor densidad celular que en la fase exponencial y este factor ocasiona que la disponibilidad de luz por célula decrezca,

dando lugar a la generación de unidades fotosintéticas con el objetivo de optimizar el uso de la luz disponible. Estas unidades fotosintéticas están conformadas por pigmentos carotenoides que al ser liposolubles no pueden ser extraídos por solventes polares como es el caso del etanol, de ahí el hecho de que los rendimientos porcentuales en la fase estacionaria sean menores que los de la fase exponencial.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *P. tricorutum*

De los extractos obtenidos, solo el extracto irradiado a 2755 lux y cosechado en fase estacionaria, identificado como extracto C (ver tabla 3), presentó actividad antibacteriana sobre las dos especies de *Vibrios*, con halos de inhibición de 19 mm para *V. alginolyticus* y 18 mm para *V. parahaemolyticus*. Al comparar este resultado con el generado por el sulfato de estreptomycin, se puede observar claramente que la actividad ejercida es similar, por lo cual se puede deducir que el extracto etanólico de *P. tricorutum* cultivado y cosechado en las condiciones antes mencionadas, posee una actividad antibacteriana considerable, ya que se compara con el halo de inhibición generado del sulfato de estreptomycin (40 mg/ml).

Tabla 3. Actividad antibacteriana de los diferentes extractos etanólicos sobre *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus*.

| Cepa bacteriana | Extracto C | | Sulfato de estreptomycin | |
|-------------------------------------------|------------|-------|--------------------------|-------|
| | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749 | 19 mm | 19 mm | 20 mm | 20 mm |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802 | 18 mm | 18 mm | 19 mm | 20 mm |

De igual forma, la razón por la que los extractos obtenidos a partir de los cultivos cosechados durante la fase exponencial no hayan presentado actividad antibacteriana se explica en lo mencionado por Terekhova *et al.* (2009), y es que en las etapas donde el crecimiento de los cultivos es más lento, es decir, en la fase estacionaria es cuando se produce la mayor cantidad de metabolitos, esto en comparación con la fase exponencial.

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO MeOH/HCl (1:1) Y SU FRACCIONAMIENTO

La cantidad del extracto C era muy pequeña para fraccionarla por ende, se siguió una vía alterna en la cual se usó una mezcla de MeOH/HCl (1:1) como solventes de extracción. Esto con la intención de lavar el material orgánico asociado a la frústula silíceo de *P. tricornutum*, ya que las diatomeas incorporan compuestos orgánicos en sus frústulas. Así, al usar esta mezcla de solventes es posible extraer los compuestos orgánicos asociados a la frústula como las silafinas y las PACL, según Ingalls *et al.* (2010).

Al aplicar esta vía alterna, se obtuvieron los datos mostrados en la tabla 4. En ella se muestra la cantidad del extracto crudo MeOH/HCl (1:1) obtenido a partir de la maceración en MeOH/HCl (1:1) del residuo orgánico proveniente del extracto etanólico así como su rendimiento, el cual representa un 69,09 % de la biomasa. Cabe destacar que este residuo orgánico es el que se origina del cultivo de *P. tricornutum* irradiado a 2755 lux y cosechado en fase estacionaria.

Tabla 4. Cantidad del extracto MeOH/HCl (1:1) proveniente del cultivo de la diatomea *P. tricornutum* irradiado a 2755 lux y cosechado en fase estacionaria.

| Solventes | Masa de <i>P. tricornutum</i> | Masa del extracto crudo | % m/m |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------|
| MeOH/HCl (1:1) | 1,6325 g | 1,1297 g | 69,09 |

Luego de obtener el extracto crudo de MeOH/HCl (1:1), y las fracciones mostradas en la tabla 5, solo se decidió seguir fraccionando el remanente acuoso, ya que este presentó un rendimiento de 92,62 %, dando lugar a las fracciones obtenidas mediante los diferentes procesos cromatográficos y que son presentadas en la tabla 6.

Tabla 5. Fraccionamiento del extracto seco MeOH/HCl (1:1) por medio de bipartición en un embudo de separación.

| Fracción clorofórmica | | Fracción en acetato de etilo | | Fracción acuosa | |
|------------------------------|--------------|-------------------------------------|--------------|------------------------|--------------|
| Masa | % m/m | Masa | % m/m | Masa | % m/m |
| 0,0026 g | 0,23 | 0,0112 g | 0,99 | 1,0463 g | 92,62 |

Tabla 6. Subfracciones obtenidas por medio de los diferentes procesos cromatográficos utilizados a partir de la fracción acuosa.

| Subfracciones obtenidas | | | | | |
|--------------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| Número de fracción | Masa (g) | Número de fracción | Masa (g) | Número de fracción | Masa (g) |
| 1.1.1 | 0,0235 | 1.2.3 | 0,0296 | 1.3.2.3 | 0,0217 |
| 1.1.2 | 0,0253 | 1.3.1 | 0,0567 | 1.3.3.1 | 0,0928 |
| 1.2.1 | 0,0492 | 1.3.2.1 | 0,3118 | 1.3.3.2 | 0,0146 |
| 1.2.2 | 0,0761 | 1.3.2.2 | 0,0366 | - | - |

De todas las fracciones obtenidas, sólo las subfracciones 1.3.2.1 (0,3118 g) y 1.3.3.2 (0,0928 g) se seleccionaron como las fracciones con menos impurezas, esto según el comportamiento observado en la cromatografía de capa fina analítica $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:2), en donde el R_f resultante fue de 0,30 y 0,36 respectivamente (ver figura 9).

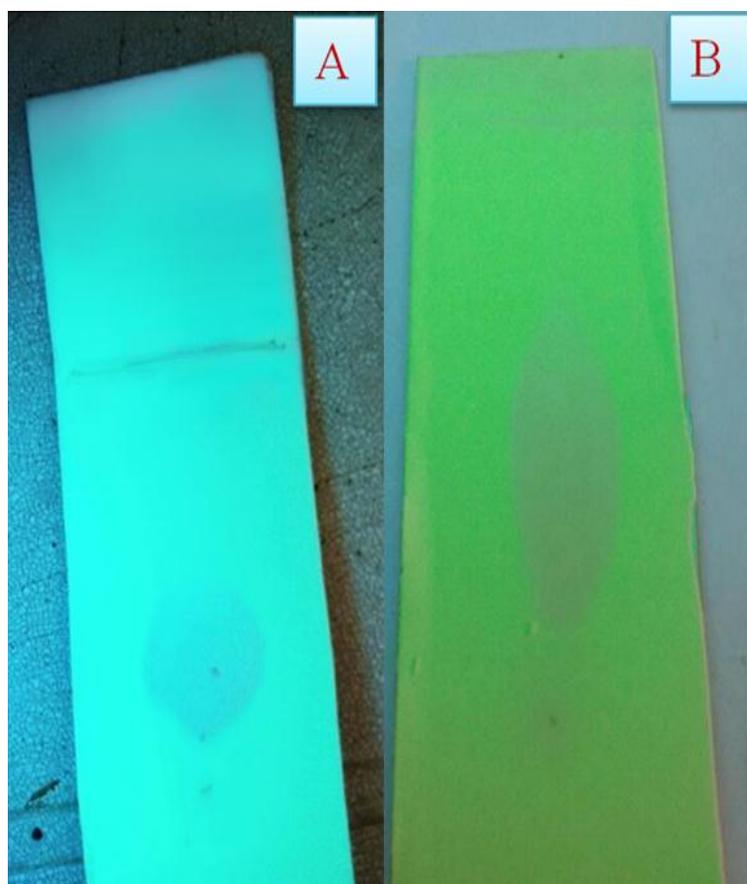


Figura 9. Cromatografías de capa fina de las fracciones 1.3.2.1 (A) y 1.3.3.1 (B), bajo el sistema de solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (3:2).

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO MeOH/HCl (1:1) Y DE SUS FRACCIONES

Con la finalidad de probar la actividad biológica de las fracciones y subfracciones provenientes del extracto crudo MeOH/HCl (1:1), se procedió a medir la actividad antibacteriana de las muestras frente a las diferentes cepas bacterianas. Esta prueba se realizó en todas las fracciones obtenidas, con excepción de la fracción 1.3.3.2 y de las particiones en cloroformo y acetato de etilo, debido a que la cantidad de cada una de las muestras era muy pequeña. Cabe destacar que ninguna de las fracciones ni el extracto crudo (MeOH/HCl) exhibieron actividad antibacteriana, lo cual implica a su vez que los metabolitos presentes en dicho extracto no generan actividad antibacteriana, esto al menos frente a las cepas bacterianas utilizadas en los bioensayos.

ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICOS

En esta sección se presentan los resultados de los análisis espectroscópicos realizados, las muestras seleccionadas para ser procesadas fueron las que se consideraron como mezclas menos complejas según lo observado en las cromatografías de capa fina analítica de cada fracción.

Análisis RMN de ^1H de la fracción 1.3.3.1

En el espectro RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 presentado en la figura 10, se puede observar que los diferentes solapamientos entre las señales demuestran la complejidad de la fracción y esto viene dado por la similitud entre los desplazamientos químicos generados por los componentes de la mezcla.

Por ende, con la finalidad de simplificar el análisis del espectro, este fue dividido en tres zonas: Una alifática (A), otra glicosídica (B) y por último una aromática (C). Cabe destacar que las señales observadas a 3,33 ppm y 4,92 ppm corresponden a los desplazamientos químicos de los solventes metanol y agua, respectivamente.

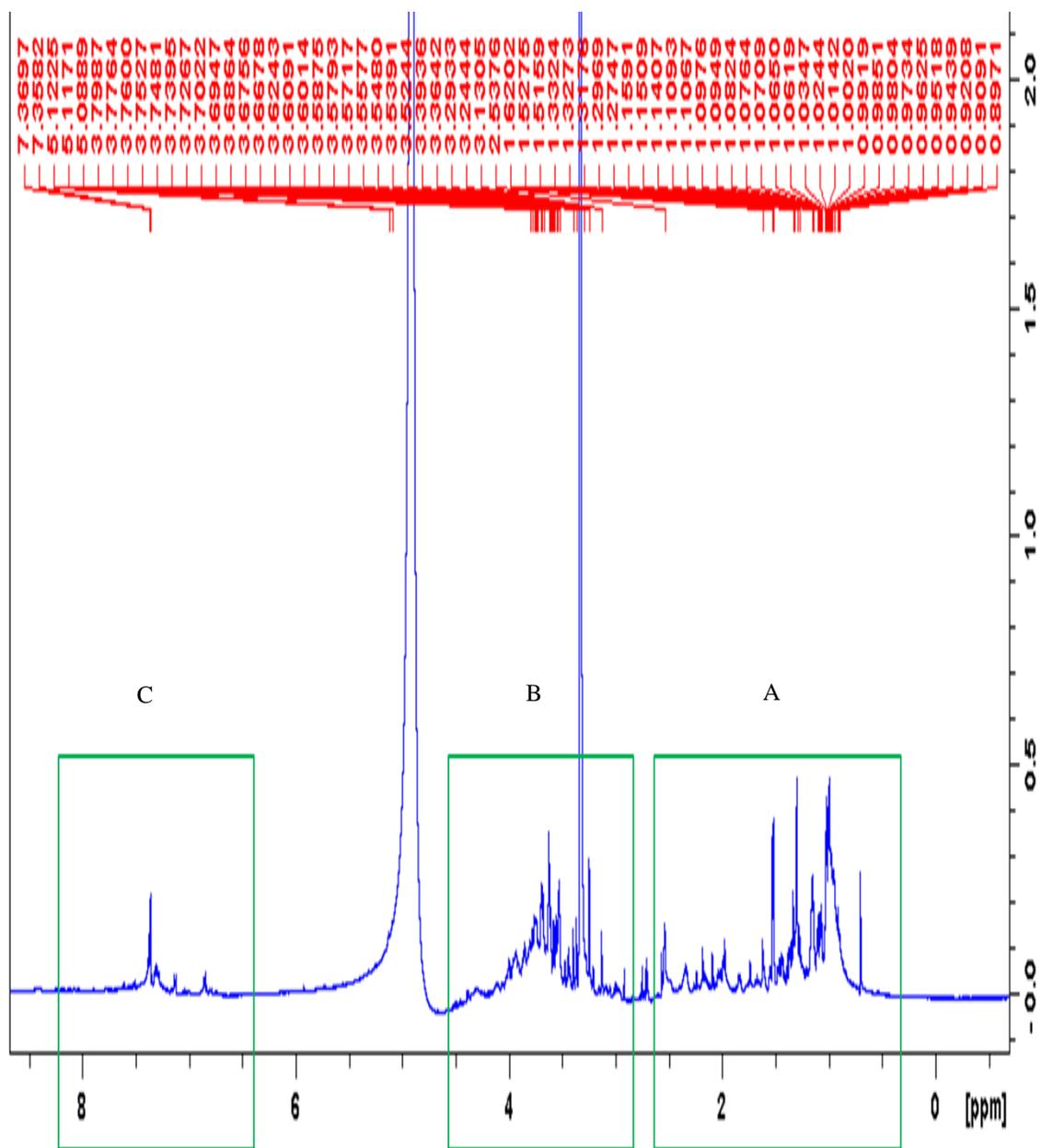


Figura 10. Espectro RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1.

Los desplazamientos químicos generados en la zona alifática, que va de 0 ppm a 2,5 ppm (ampliada en la figura 11), se asocian a estructuras con esqueletos triterpénicos o de tipo esteroidal.

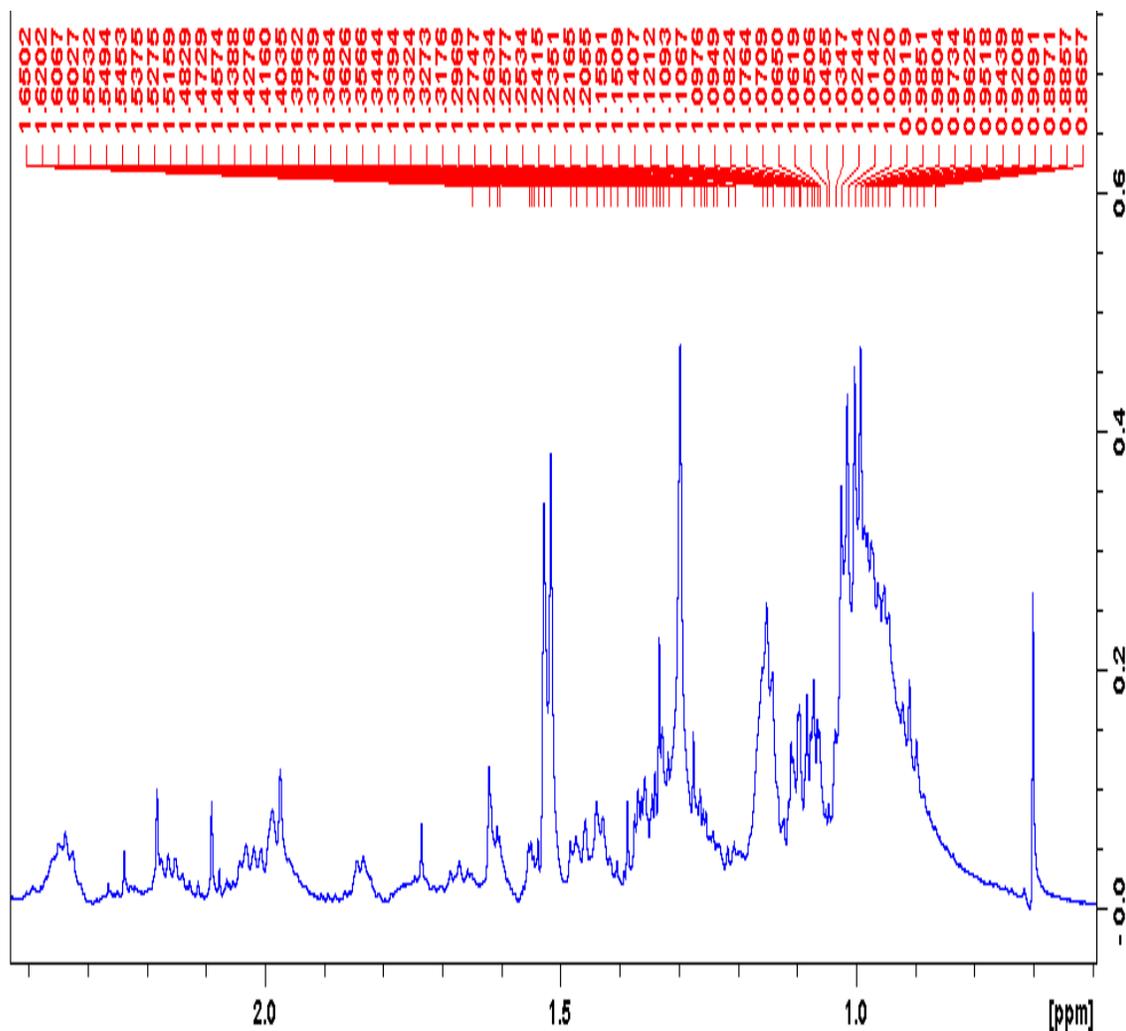


Figura 11. Ampliación del espectro RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 entre 0 ppm y 2,4 ppm, obtenida mediante el uso del programa TOPSPIN versión 4.0.8 descargado del servidor Bruker.

Esta afirmación se sustenta al comparar y estudiar el espectro de RMN de ^1H (400 MHz; MeOD) de una mezcla de β -sitoesterol y estigmasterol (Blandon, 2015), con el espectro de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 (en la figura 12 se puede observar la similitud entre dichos espectros). Ambos poseen singletes de alta intensidad como el ubicado a δ_{H} 0,70 ppm y señales con desplazamientos químicos similares solapadas unas con otras, las cuales aparecen en forma de multipletes, como es el caso del grupo de señales entre 1,05 ppm y 0,85 ppm.

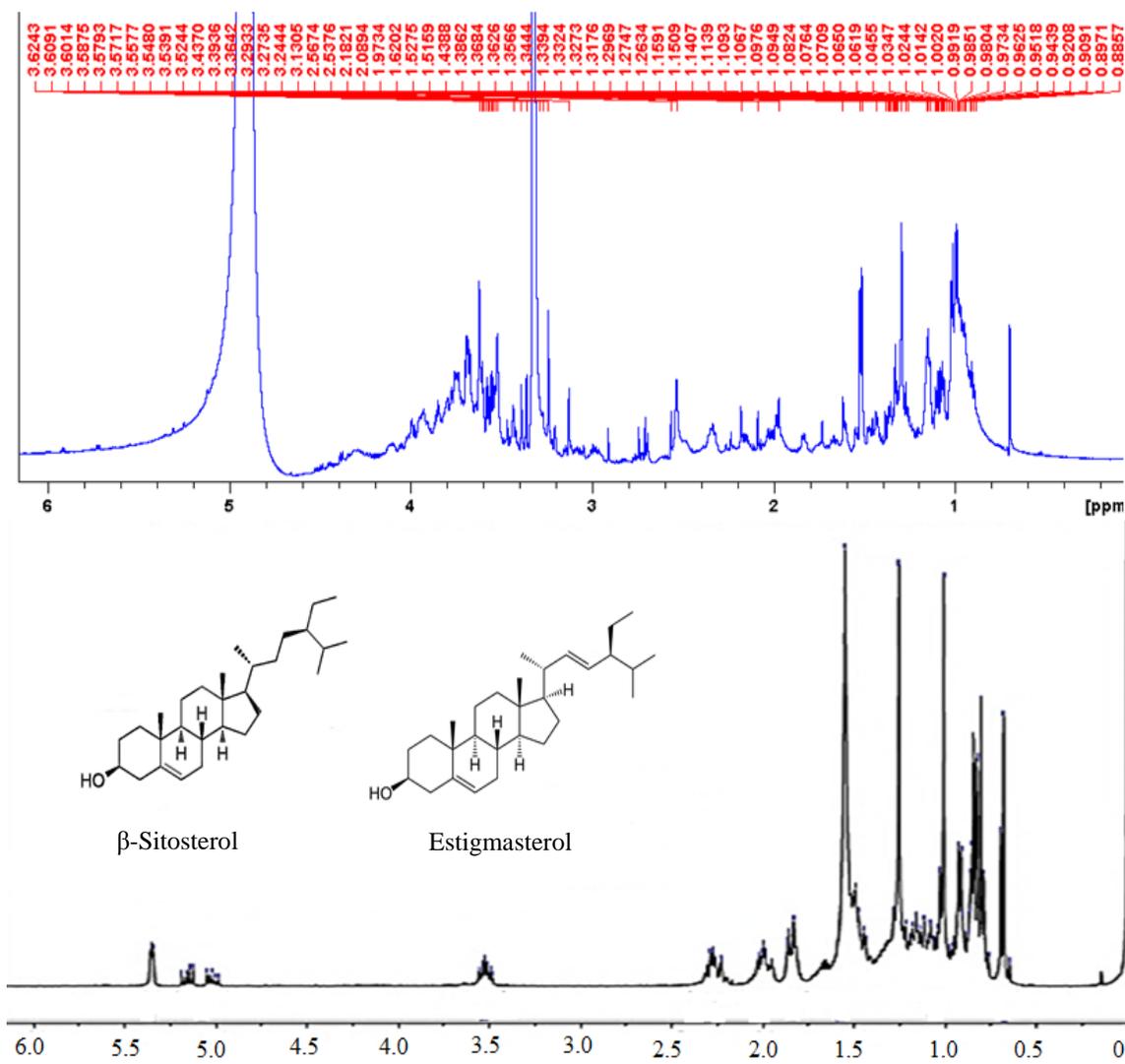


Figura 12. Comparación del espectro RMN de ¹H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 (parte superior) con el espectro RMN de ¹H (400 MHz; MeOD) de la mezcla β-sitosterol y Estigmasterol, reportado por Blandon, 2015 (parte inferior).

La zona glicosídica se refiere a la presencia de unidades sacáridas en su estructura. Esto se puede confirmar cuando se observa el espectro RMN de ¹H (400 MHz; MeOD) de estructuras glicosídicas como el ligularósido B y se compara con el de la fracción 1.3.3.1. En la figura 13 se puede notar la similitud entre estos espectros, particularmente entre 3,0 ppm y 4,2 ppm, zona en la que se manifiestan múltiples señales solapadas unas con otras (multipletes). Estas señales, son características de un grupo de metabolitos denominados glicósidos y los desplazamientos químicos δ_H son generados por los

protones de residuos sacáridos (Agrawal, 1992).

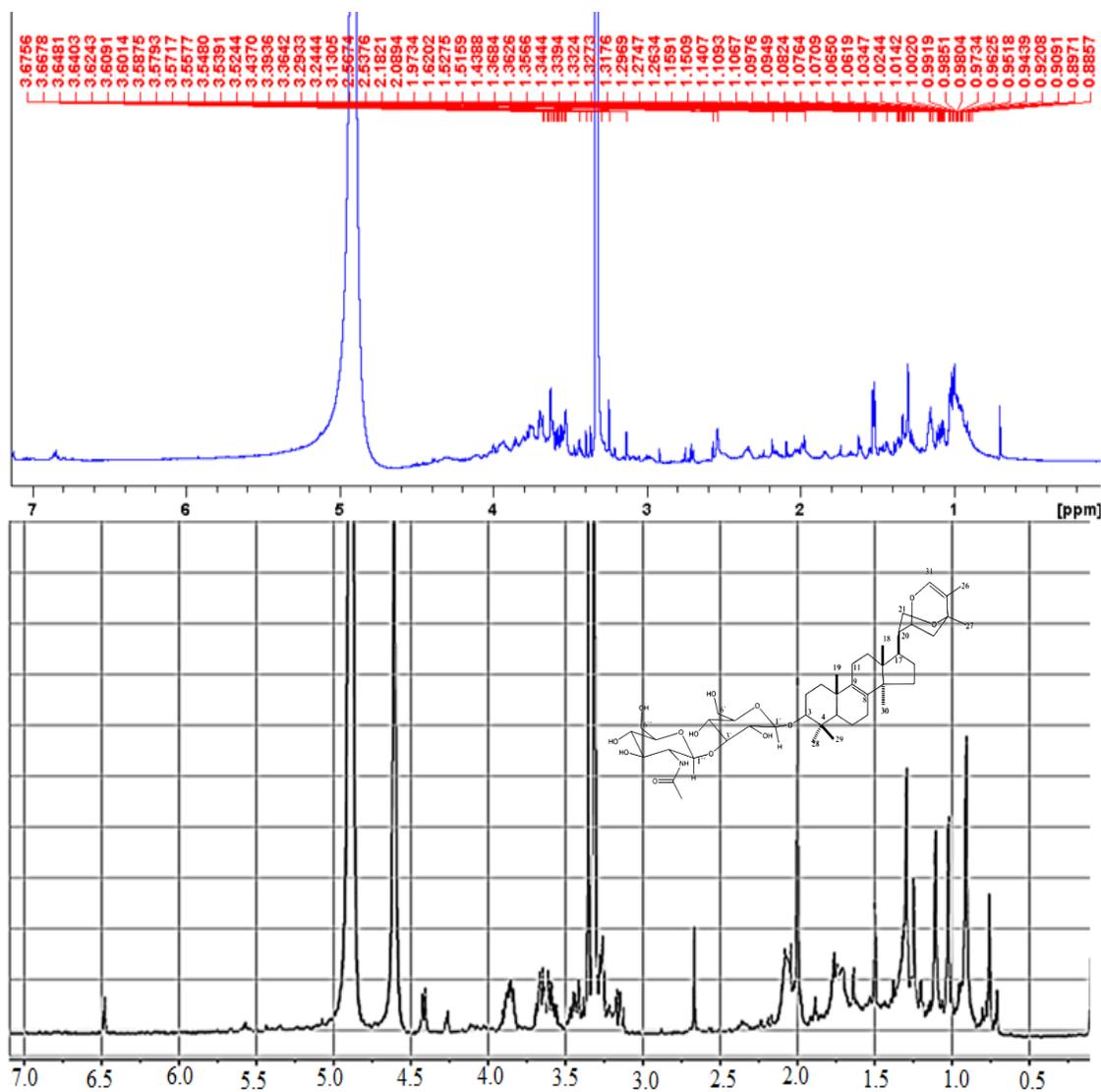


Figura 13. Comparación del espectro RMN de ¹H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 (parte superior) con el espectro de RMN de ¹H (400 MHz; MeOD) del ligularósido B (Meneses, 2015) (parte inferior).

Los δ_H ubicados a campo bajo o zona aromática (ver figura 14), también brindan información acerca de la naturaleza de las estructuras que componen la mezcla, ya que este grupo de señales son características de protones aromáticos que se asocian a anillos bencénicos, pero también se pueden asociar a posibles insaturaciones en el esqueleto

esteroidal de una aglicona (Menezes, 2011; Roulard *et al*, 2017).

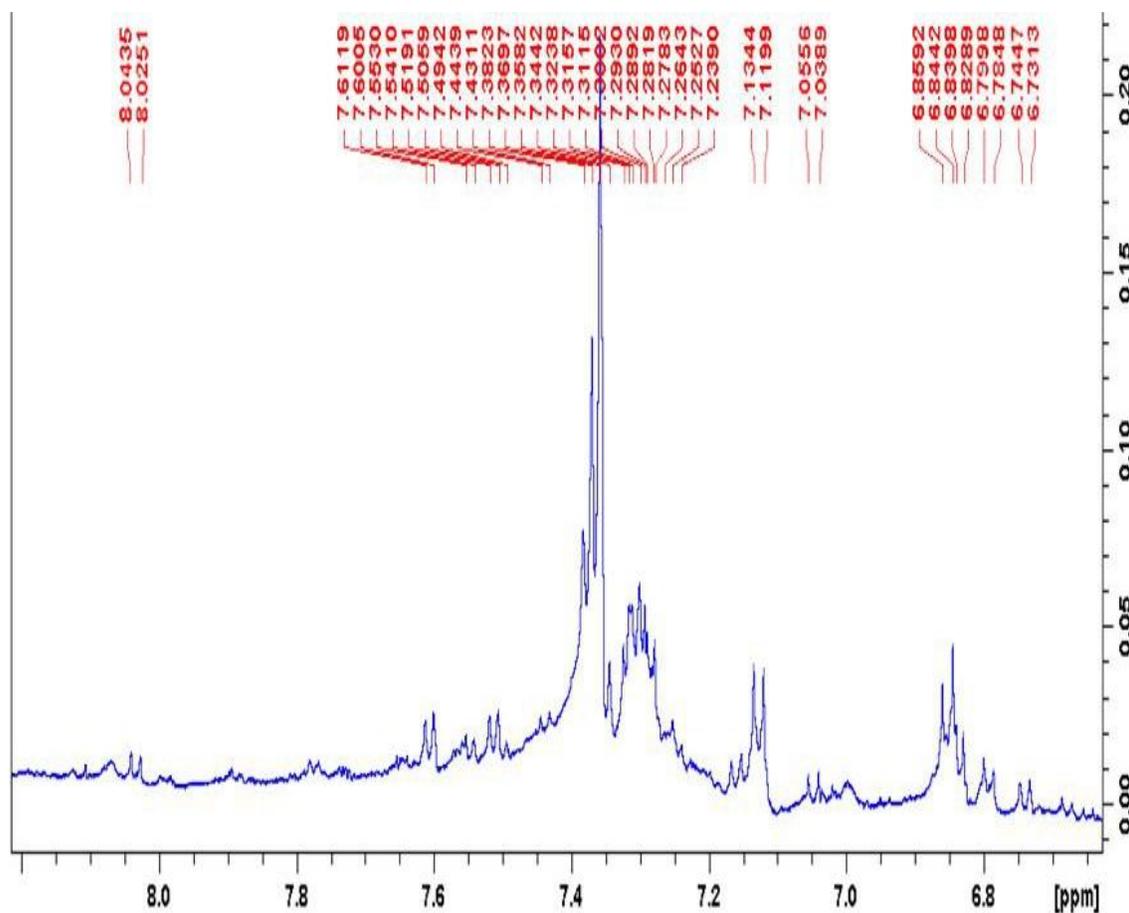


Figura 14. Ampliación del espectro RMN de ¹H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 entre 6,7 ppm y 8,1 ppm, obtenida mediante el uso del programa TOPSPIN versión 4.0.8 descargado del servidor Bruker.

Cabe destacar que los δ_H de protones olefínicos y de amidas pueden generarse entre 5,0 ppm y 8,0 ppm, zona compartida parcialmente por las señales δ_H generadas por los protones anoméricos del glicósido (4,3 ppm a 5,9 ppm), siendo posibles señales correspondientes a protones anoméricos las señales con δ_H 5,1225 ppm, δ_H 5,3116 ppm, δ_H 5,6307 ppm y δ_H 5,7185 ppm (figura 15), ya que generalmente este tipo de señales se expresan en forma de doblete (Agrawal, 1992; Ghisalberty, 2006; Abouzid *et al*, 2008).

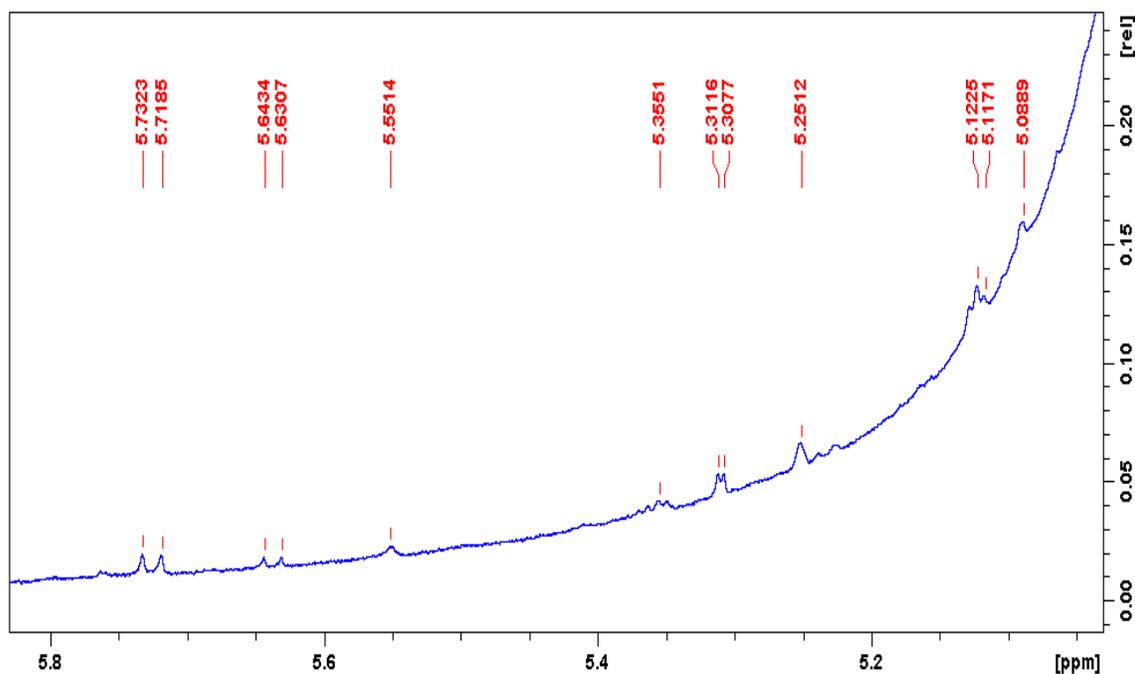


Figura 15. Ampliación del espectro RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 entre 5,0 ppm y 5,8 ppm, obtenida mediante el uso del programa TOPSPIN versión 4.0.8 descargado del servidor Bruker.

Análisis RMN de ^{13}C de la fracción 1.3.3.1

La información analizada a partir del espectro RMN de ^{13}C (150 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 mostrado en la figura 16 permitió determinar la naturaleza del tipo de esqueleto molecular. Las señales ubicadas a campo alto (0 ppm a 41 ppm), corresponden a desplazamientos químicos generados por cadenas alifáticas cíclicas de carácter esteroideal, las cuales se pueden asociar mediante comparación bibliográfica a glicósidos triterpénicos, esteroidales y glicoalcaloides. Partiendo desde este punto de vista, las señales ubicadas entre 45,77 ppm y 76,68 ppm corresponden a los desplazamientos químicos, δ_{C} , generados por los carbonos del resto glicosídico y a los unidos a heteroátomos, en un posible esqueleto esteroideal de la aglicona. Cabe destacar que la señal generada en 47,65 ppm corresponde al δ_{C} del solvente, en este caso del metanol (Silverstein, *et al*, 2005), y que el número de señales generadas por los átomos de carbono fue de 47, lo cual concuerda con el número de señales generadas por estructuras grandes como lo son esta clase de compuestos de tipo saponina (Cortés, 2017).

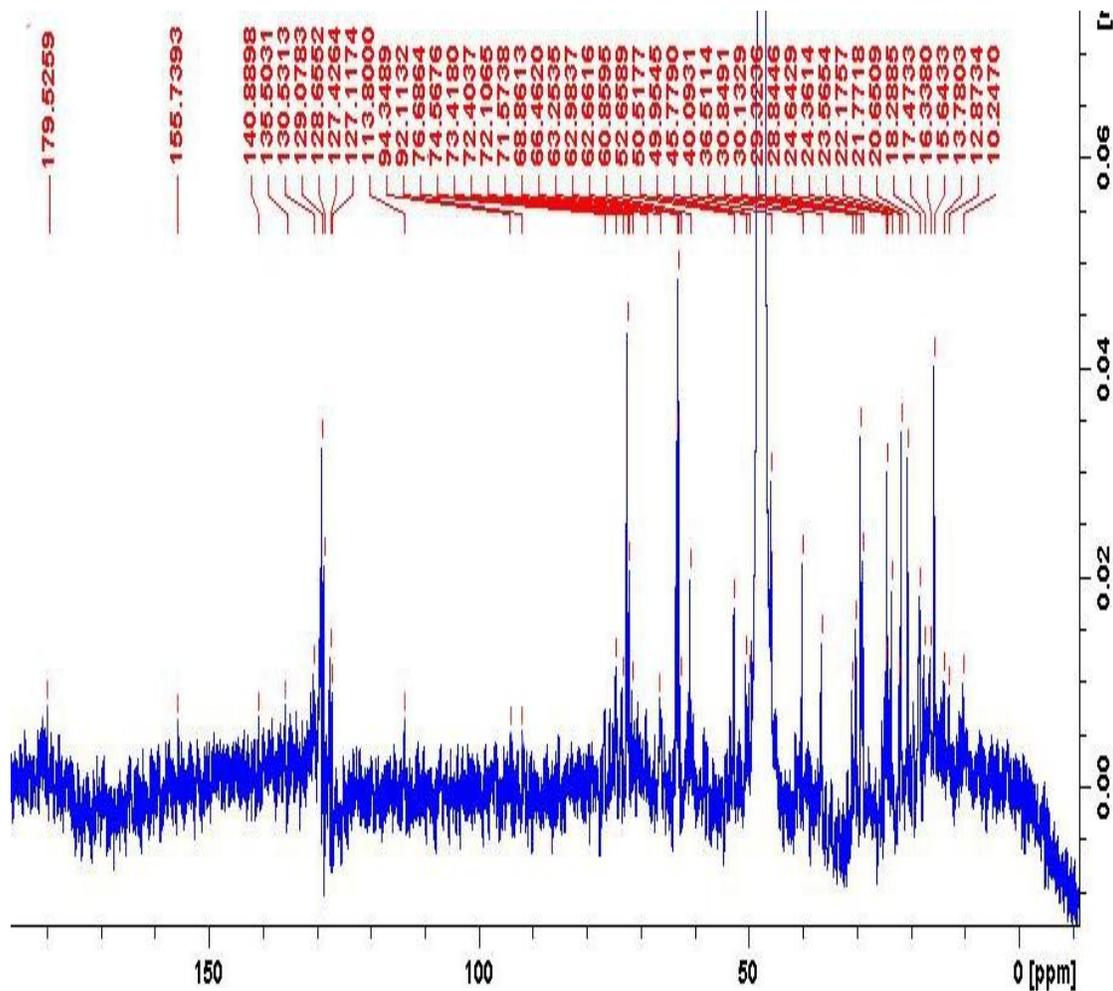


Figura 16. Espectro RMN de ^{13}C (150 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1.

Al comparar el espectro RMN de ^{13}C (150 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1 con el espectro RMN de ^{13}C (100 MHz; MeOD) del ligularósido B (figura 17), la similitud de los desplazamientos químicos coincide, permitiendo inferir que al menos un componente de la mezcla se trata de una estructura de tipo saponina con resto sacárido, la cual se considera está en mayor proporción. Una zona característica para este tipo de compuestos es la situada entre 90 ppm y 100 ppm, aquí se posicionan los desplazamientos químicos de carbonos anoméricos en glicósidos (Agrawal, 1992). Es por esto que las señales en 92,11 ppm y 94,35 ppm indican la presencia de al menos dos unidades sacáridas unidas a una aglicona esterooidal o triterpénica a través de un enlace glicosídicos.

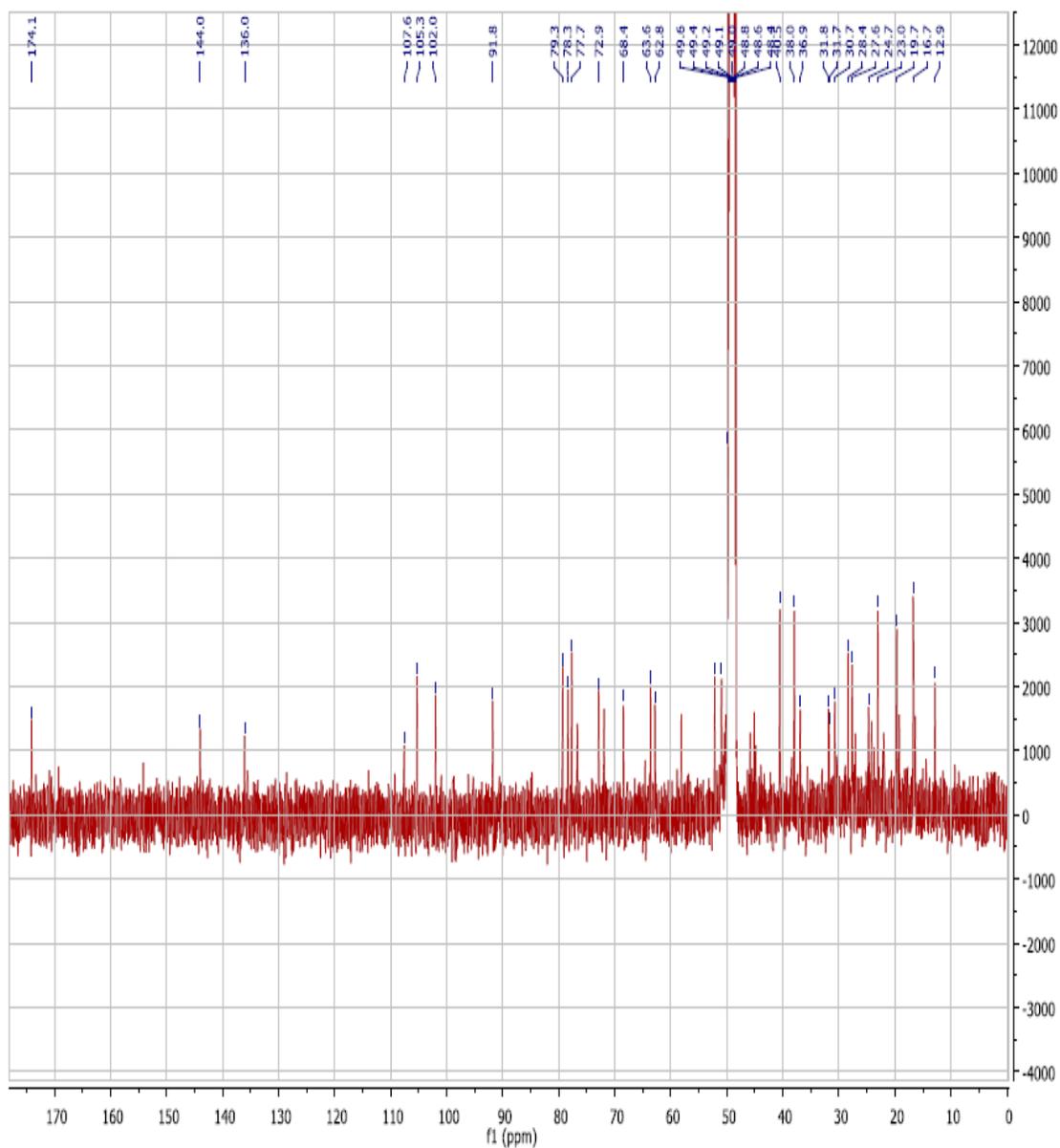


Figura 17. Espectro RMN de ^{13}C (100 MHz; MeOD) del ligularósido B (Meneses, 2015).

La zona entre 140,89 ppm y 113,80 ppm brinda mucha información con respecto a los desplazamientos. Aquí, se producen los desplazamientos químicos que pueden ser asociados al δ_{C} generado por carbonos aromáticos de anillos bencénicos y a posibles insaturaciones en la aglicona (Fu *et al*, 2009; Sidana *et al*, 2011). Además, el δ_{C} generado por el grupo $-\text{CN}$ oscila entre 118 ppm y 124 ppm, lo que da lugar a la posible

existencia de glicósidos cianogénicos dentro de la mezcla de metabolitos por la cual está compuesta la muestra. El desplazamiento químico δ_C en 155,73 ppm es característico para carbonos unidos a grupos -OH en fenoles y el δ_C correspondiente a 179,52 ppm se asocia al generado por el carbono del grupo carbonilo en amidas (Silverstein *et al*, 2005).

Análisis del espectro IR de la fracción 1.3.3.1

El IR fue útil para confirmar la presencia de grupos funcionales, lo cual permitió la inclusión de grupos de metabolitos específicos dentro de los posibles componentes de la mezcla.

El espectro IR de la fracción 1.3.3.1 (figura 18), mostró una banda de absorción entre 3469 cm^{-1} y 3238 cm^{-1} , dicha señal se debe al estiramiento del enlace O-H proveniente de alcoholes y de posibles restos de H_2O . La formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares genera el ancho de la banda que se observa en la zona antes mencionada, lo cual no permite que se puedan observar claramente otras señales. Sin embargo, a pesar de estar solapadas, se pueden observar 5 bandas de absorción las cuales se asocian las vibraciones de la tensión del enlace N-H en aminas y amidas (Silverstein *et al*, 2005).

También se puede observar una absorción débil a 2237 cm^{-1} , la cual corresponde al estiramiento del triple enlace del grupo $\text{C}\equiv\text{N}$, el cual puede asociarse a la presencia de glicósidos cianogénicos dentro de la mezcla. La absorción observada como una banda débil a 1845 cm^{-1} corresponde al sobretono del estiramiento del enlace C-H en aromáticos, lo cual concuerda con la intensa banda de absorción a 1633 cm^{-1} , que se asocia a la tensión del doble enlace $\text{C}=\text{C}$ en anillos aromáticos. Es importante resaltar que la banda de absorción generado por el estiramiento del enlace $\text{C}=\text{O}$ del grupo carbonilo en amidas también se observa en esta zona (1530 cm^{-1} a 1650 cm^{-1}), por lo cual se puede deducir que este tipo de señal puede estar solapada (Silverstein *et al*, 2005).

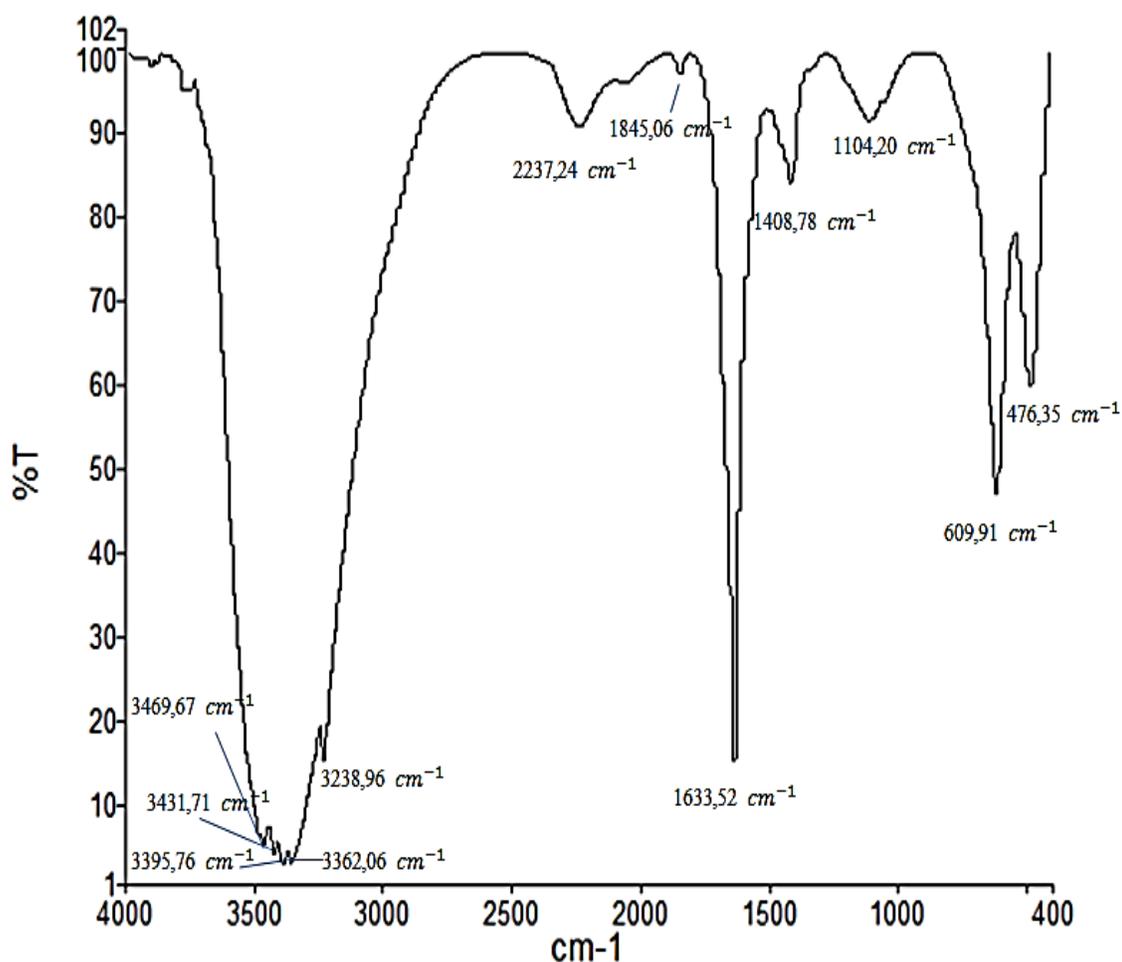


Figura 18. Espectro IR (KBr) de la fracción 1.3.3.1.

La banda observada a 1408 cm^{-1} con intensidad moderada corresponde a la absorción generada por la flexión del enlace O-H en alcoholes o también puede corresponder al estiramiento del enlace C-N en amidas. Por otro lado, la banda de absorción moderadamente débil a 1104 cm^{-1} puede asociarse al estiramiento de los enlaces C-O en alcoholes o C-N en aminas alifáticas (Silverstein *et al*, 2005).

Por último, se observan en $607,9\text{ cm}^{-1}$ y $476,4\text{ cm}^{-1}$ bandas asociadas a la vibración del enlace de flexión C-H fuera del plano en alquenos. Aunque también puede atribuirse a la banda de absorción generada por la flexión de enlace fuera del plano del anillo aromático en bencenos sustituidos (Silverstein *et al*, 2005).

Análisis RMN de ^1H de la fracción 1.3.2.1

El espectro RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.2.1 (figura 19) es muy semejante al de la fracción 1.3.3.1, esto se puede observar en la figura 20, en donde se comparan dichos espectros. La semejanza en estos espectros sugiere la existencia de estructuras similares, es decir de estructuras de tipo triterpénicas o esteroidal unidas a restos glicosídicos. De forma general y como se mencionó anteriormente, el espectro RMN de ^1H se puede dividir en tres zonas: y una zona alifática (A), ubicada entre 0 ppm y 2,5 ppm la cual es generada por los δ_{H} de los protones del esqueleto triterpénico o esteroidal, una zona glicosídica (B), ubicada entre 3,0 ppm y 4,0 ppm generada por los δ_{H} de los protones del resto sacárido y una zona aromática ubicada entre 6,5 ppm y 8,0 ppm (C), que viene dada por los δ_{H} de protones aromáticos.

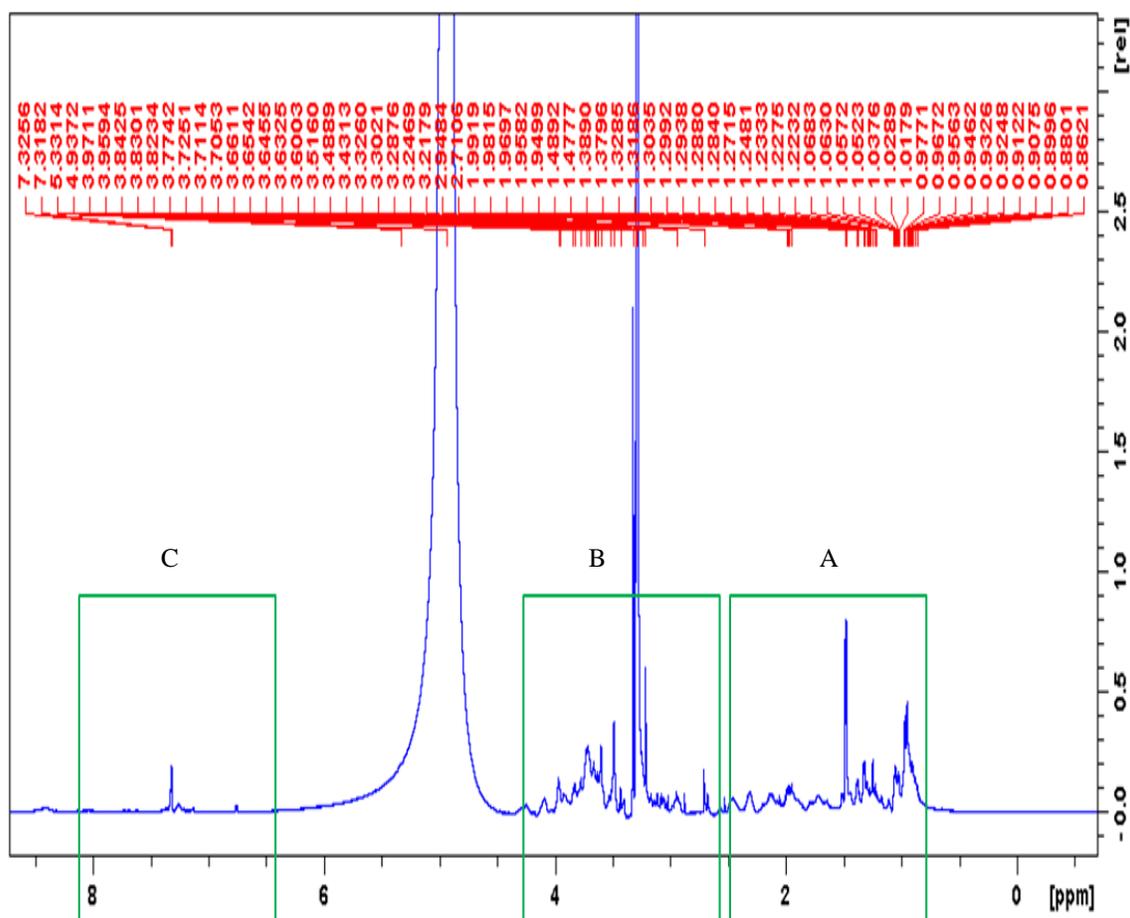


Figura 19. Espectro RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.2.1.

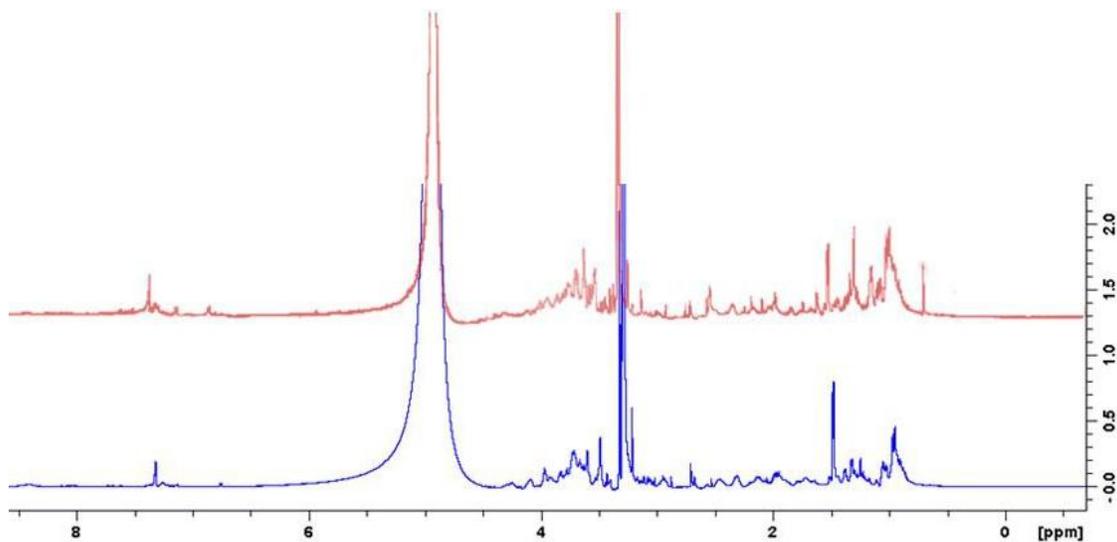


Figura 20. Comparación de los espectros de RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de las fracciones 1.3.3.1 (-) y 1.3.2.1 (-).

Al ampliar el espectro RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.2.1 entre 5,2 ppm y 6,0 ppm (figura 21) se puede observar una menor cantidad de señales y con menos intensidad que las del espectro RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.3.1.

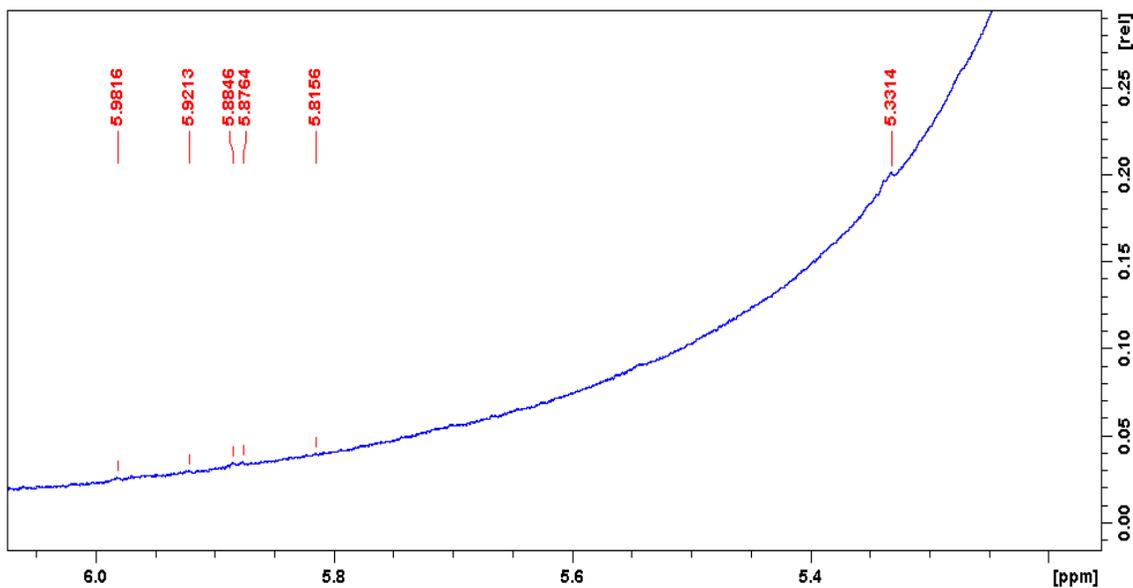


Figura 21. Ampliación del espectro RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.2.1 entre 5,2 ppm y 6,0 ppm, obtenida mediante el uso del programa TOPSPIN versión 4.0.8 descargado del servidor Bruker.

Como se explicó anteriormente, estas señales se asocian a los protones anoméricos de los residuos sacáridos y debido al grado de intensidad, algunas señales pueden estar solapadas por los δ_H de los protones del agua.

Análisis del espectro IR de la fracción 1.3.2.1

El espectro IR de la fracción 1.3.2.1 (figura 22) y el espectro IR de la muestra 1.3.3.1 son muy similares (figura 23) y, al igual que en el caso anterior, fue útil para determinar la presencia de grupos funcionales en los componentes de la mezcla.

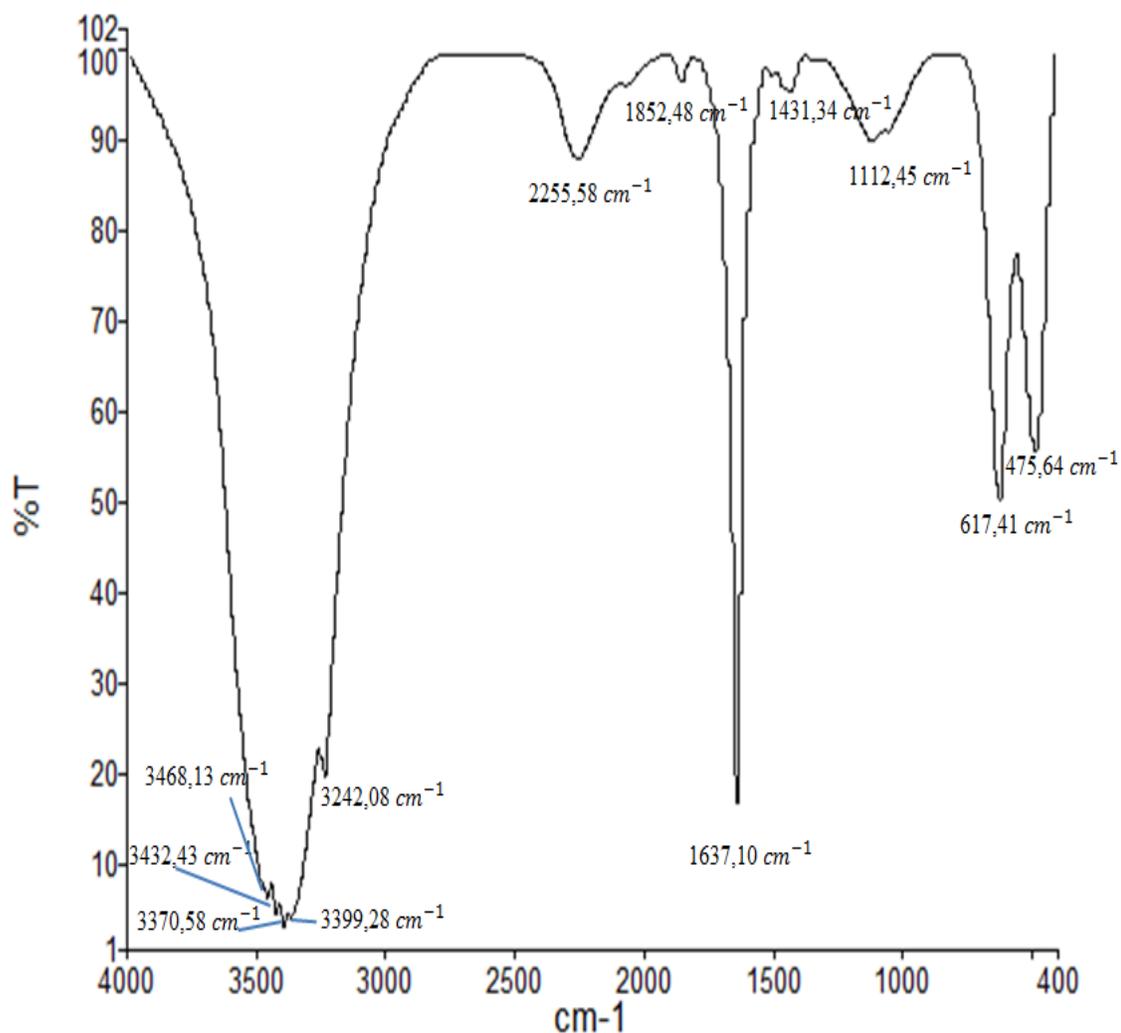


Figura 22. Espectro IR (KBr) de la fracción 1.3.2.1.

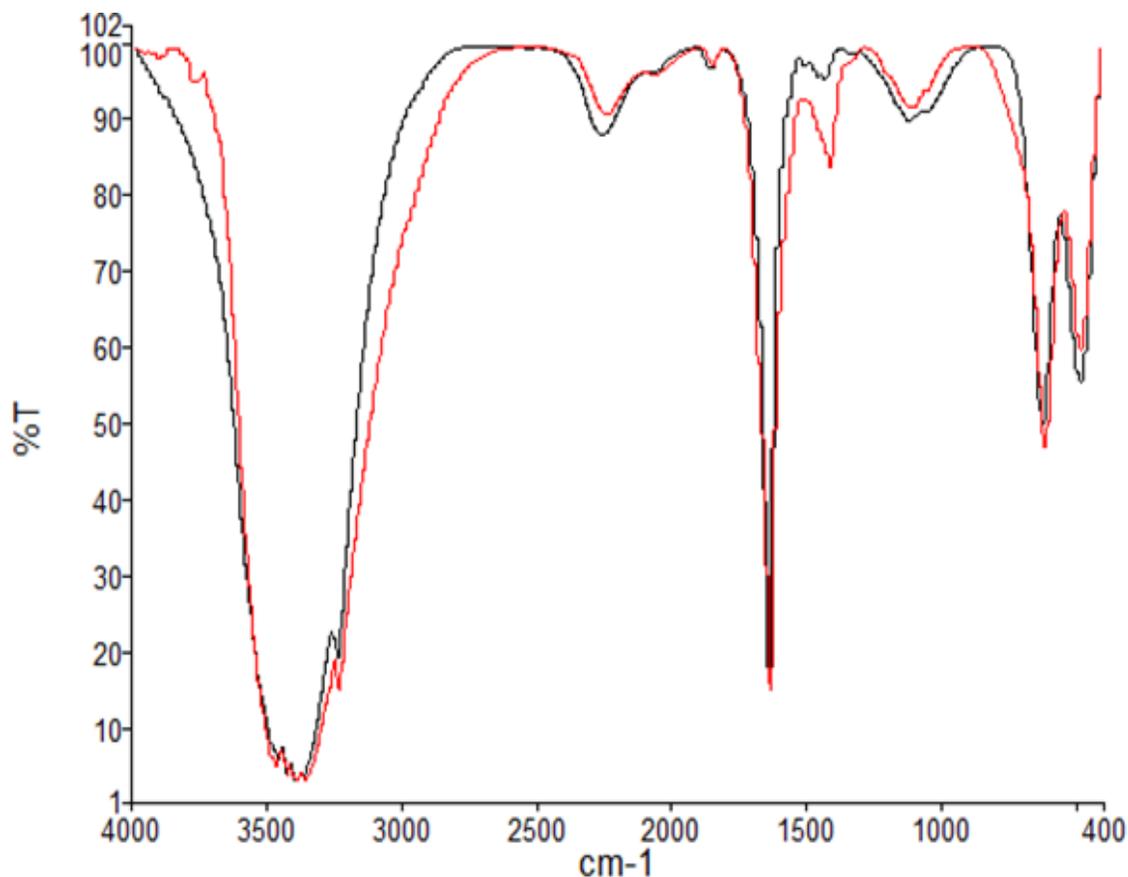


Figura 23. Comparación de los espectros IR (KBr) de las fracciones 1.3.3.1 (-) y 1.3.2.1 (-).

Las bandas de absorción entre 3468 cm^{-1} y 3242 cm^{-1} se deben al estiramiento de enlaces O-H proveniente de alcoholes y de posibles restos de H_2O , al igual que también a las vibraciones de la tensión de enlaces N-H en aminas y amidas. Las bandas de absorción débiles en $2255,58\text{ cm}^{-1}$ y $1852,48\text{ cm}^{-1}$ corresponden al estiramiento del triple enlace del grupo $\text{C}\equiv\text{N}$ y al sobretono del estiramiento del enlace C-H en aromáticos, respectivamente (Silverstein *et al.*, 2005).

A $1637,10\text{ cm}^{-1}$ se observa una banda de absorbancia con gran intensidad la cual se asocia a la tensión del doble enlace C=C en anillos aromáticos y se estima que puede estar solapando el pico de absorción generado por el estiramiento del enlace C=O del grupo carbonilo en amidas. La señal en $1431,34\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la absorción

generada por la flexión del enlace O-H en alcoholes o también puede corresponder al estiramiento del enlace C-N en amidas y la banda de absorción a $1112,45\text{ cm}^{-1}$ puede asociarse al estiramiento de los enlaces C-O en alcoholes o C-N en aminas alifáticas (Silverstein *et al.*, 2005).

Por último, las bandas de absorción a frecuencias en $617,41\text{ cm}^{-1}$ y $475,64\text{ cm}^{-1}$ están asociadas a la vibración del enlace de flexión C-H fuera del plano en alquenos y a la flexión de enlace fuera del plano del anillo aromático en bencenos sustituidos (Silverstein *et al.*, 2005).

Análisis RMN de ^{13}C de la fracción 1.3.2.1

El espectro RMN de ^{13}C (150 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.2.1 (figura 24) mantiene similitud con el de la fracción 1.3.3.1. En ambos espectros se observan los δ_{C} generados tanto por el resto sacárido, así como por los carbonos alifáticos cíclicos de carácter esteroideal (0 ppm a 75 ppm), al igual que los δ_{C} asociados a los carbonos anoméricos, que en el caso de la fracción 1.3.2.1, son considerados desplazamientos químicos de carbonos anoméricos las señales en 89,20 ppm, 94,29 ppm, 96,35 ppm y 105,97 ppm. Cabe destacar que la señal generada en 47 ppm corresponde al δ_{C} del solvente, en este caso del metanol (Silverstein *et al.*, 2005), y que el número de señales generadas por los átomos de carbono fue de 64, una cantidad mayor que en la fracción 1.3.3.1, lo cual implica la presencia de más de un tipo de estructura en la mezcla.

De igual forma para esta fracción, la cantidad de señales que aparecen en zona asociada a los δ_{C} generados por los carbonos en grupos cianos, aromáticos e insaturaciones (113 ppm, a 130 ppm) es mayor que la observada en el espectro RMN de ^{13}C de la fracción 1.3.3.1, esto implica la posible existencia de heterociclos, así como de insaturaciones cercanas a heteroátomos. Además, a campo bajo se pueden observar dos señales, una a 157,40 ppm asociado al δ_{C} generado por carbonos aromáticos unidos al grupo -OH en fenoles y otra en 168,82 ppm, la cual se asocia al desplazamiento químico δ_{C} generado por el carbono del grupo carbonilo de amidas.

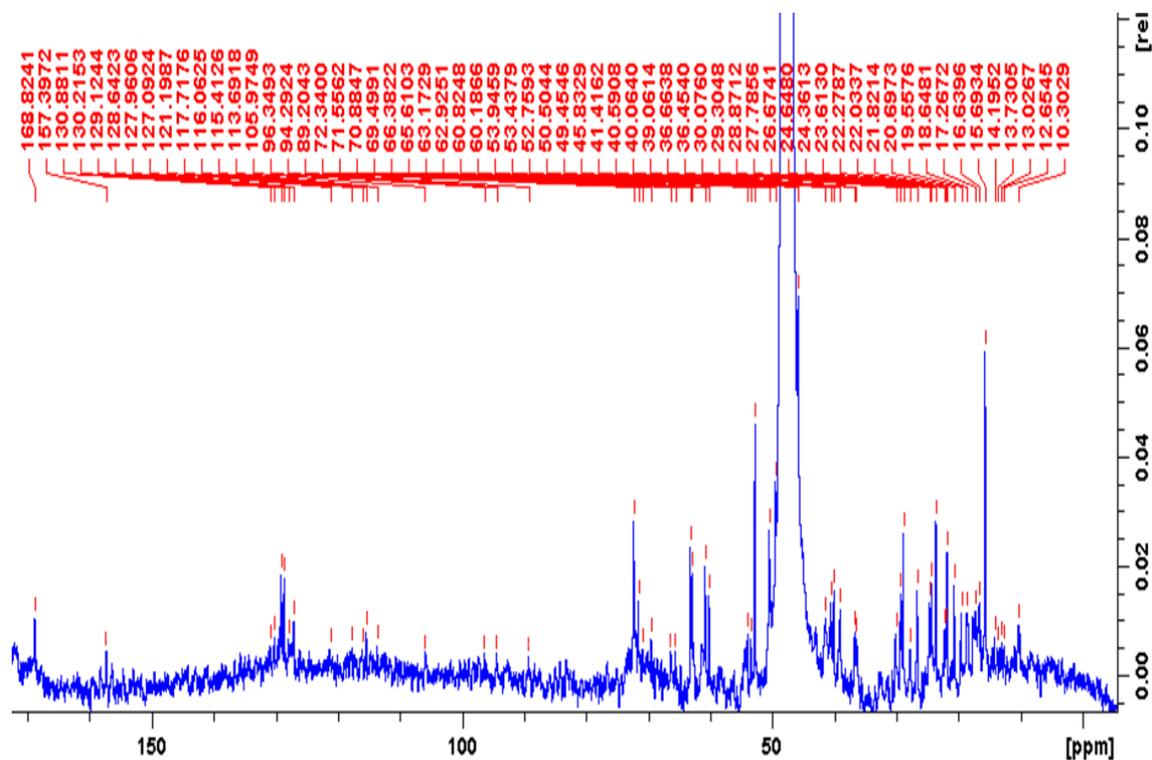


Figura 24. Espectro RMN de ^{13}C (150 MHz; MeOD) de la fracción 1.3.2.1.

Es importante resaltar que la comparación de los análisis espectroscópicos de IR (KBr), RMN de ^{13}C (150 MHz; MeOD) y RMN de ^1H (600 MHz; MeOD) de las fracciones 1.3.3.1 y 1.3.2.1 permitieron observar que ambas poseen características similares y el estudio de dichos espectros hizo posible deducir que las dos fracciones están compuestas por una mezcla que se constituye principalmente por estructuras con esqueletos triterpénicos o esteroidales de tipo saponina unidas a restos sacáridos. Esto puede deducirse esencialmente por la presencia de señales características de protones y carbonos anoméricos observadas en los espectros de RMN de ^{13}C y ^1H al igual que gracias a la comparación bibliográfica con espectros RMN de estructuras glicosídicas como el ligularósido B reportado por Meneses (2015).

Por otro lado, la existencia del grupo CN infiere la posible existencia de glicósidos cianogénicos, una hipótesis aceptable ya que por lo general este tipo de compuesto es de baja masa molecular. Además, es posible que existan otros componentes en la mezcla, el cual se estima que se trata de compuestos con al menos un grupo amida en su estructura

y un anillo aromático, ya que anteriormente en extractos en acetato de etilo de la diatomea *P. tricornutum* se aisló una especie de glicinamida con propiedades aleloquímicas, reportada por Wang *et al.*, (2016) y mostrada en figura 25.

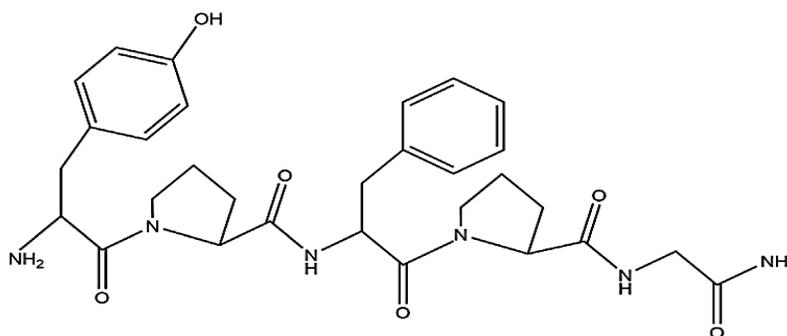


Figura 25. Estructura molecular de la TYR-PRO-PHE-PRO-GLY-NH₂ aislada a partir del extracto en acetato de etilo de la diatomea *P. tricornutum* reportado por Wang *et al.*, 2016.

CONCLUSIONES

La cantidad de biomasa obtenida en los cultivos de *P. tricornutum* irradiados a 2755 lux es mayor que los irradiados a 3862,5 lux, tanto en la fase exponencial como en la estacionaria.

El extracto etanólico obtenido a partir del cultivo de la diatomea *P. tricornutum* irradiado a 2755 lux y cosechado en fase estacionaria presenta actividad antibacteriana sobre las especies *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*.

El extracto crudo MeOH/HCl (1:1) proveniente del cultivo de *P. tricornutum* irradiado a 2755 lux y cosechado en fase estacionaria, al igual que sus fracciones, no ejercieron actividad frente a las cepas bacterianas: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio alginolyticus* y *Staphylococcus aureus*.

El análisis de los espectros IR, RMN de ^{13}C y de ^1H sugiere que las fracciones 1.3.3.1 y 1.3.2.1 son similares estructuralmente y están constituidas por una mezcla de compuestos con esqueletos triterpénicos o esteroidales unidos a restos sacáridos tipo saponina, además de estructuras con características similares a la TYR-PRO-PHE-PRO-GLY-NH₂.

BIBLIOGRAFÍA

- Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, J.; Torres, E. y Herrero, C. 1995. *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. Universidad de la Coruña. España. Págs. 9-81.
- Abouzeid, S.; Fawzy, N.; Darweesh, N. y Orihara, Y. 2008. Steroidal glycoalkaloids from the berries of *Solanum distichum*. *Nat. Prod. Res.*, 22(2): 147-153.
- Ahumada, A.; Ortega, A.; Chito, D. y Benítez, R. 2016. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, 45(3): 438-469.
- Agrawal, K. 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochem.*, 31(10): 3307-3330.
- Agrawal, K. 1996. A systematic NMR approach for the determination of the molecular structure of steroidal. Págs. 299-315. En: Waller, G.R., Yamasaki, K. (eds) *Saponins Used in Food and Agriculture. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 405. Springer, Boston, MA. Springer, Boston, MA.
- Albuquerque, R.; Lima, R. y Fernandes, R. 2013. Phenotyping of vibrios isolated from marine shrimp hemolymph. *Cienc. Mar.*, 39(3): 317-321.
- Argüello, B. 2014. Identificación molecular de comunidades bacterianas Gram negativas en agua de un sistema de pre-criadero de *Lipenaeus vannamei*. Tesis de Grado. Facultad de Ingeniería Marítima. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.
- Arredondo, B. y Voltolina, D. 2007. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. CIBNOR. Pág. 22.
- Bauer, A.; Kirby, A.; Sherris, J. y Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45(4): 493-496.
- Bhakuni, D. y Rawat, D. 2005. *Bioactive marine natural products*. Anamaya Publishers, New Delhi, India.
- Bitaubé, E.; Caro, I. y Pérez, L. 2008. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricorutum* in intensive culture photobioreactor. *Biochem. Eng. J.*, 40(3): 520-525.
- Blandon, A. 2015. Estudio fitoquímico das folhas de *Solanum stipulaceum* Roem. & Schult. e composição atividade biológica e efeito da radiação gama nos óleos essenciais obtidos a partir das suas flores e folhas. Tesis de Maestría. Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidad Federal de Minas Gerais. Brazil.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.; Munro, M. G.; Northcote, P. T. y Prinsep, M. R. 2007. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 24: 81-86.

Bohlin, K. 1897. Zur morphologie und biologie einzelliger algen. *Öfvers. Vetensk-Akad. Förh., Stockh* 54: 507-29
Borbor, M. 2006. Caracterización de comunidades bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (DGGE). Tesis de Grado. Facultad de Ciencias del Mar. Escuela de Biología Marina. Universidad Estatal de Santa Elena. Ecuador.

Bridoux, M. e Ingalls, A. 2010. Structural identification of long-chain polyamines associated with diatom biosilica in a Southern Ocean sediment core. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 74(14): 4044–4057.

Burgess, J.; Jordan E.; Bregu, M.; Mearns-Spragg, A. y Boyd, K. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J. Biotechnol.*, 70(3): 27-32.

Cha, K.H.; Koo S.Y. y Lee A.D. 2008. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.*, 56(22): 10521-10526.

Chidambara, M.K.N.; Vanitha, A.; Rajesha, M.; Swamy, M.; Sowmya, P.R.; Ravishankar, G.A. 2005. *In vivo* antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* – a green microalgae. *Life Sci.*, 76(12): 1381-1390.

Colin, M.; Heredia, A.; Dos Santos, C.; Figuera, E.; Salome F.; Basiuk, V.; Rodríguez, A. y Vrieling, E. 2013. Sílice de las algas diatomeas (Clase *Bacillariophyceae*) como material complejo y su importancia nanotecnológica. *Granja*, 17(1): 5-15.

Cortés, M. 2017. Síntesis de nuevos alcaloides esteroidales y de β -aminoalcoholes con potencial actividad biológica. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.

D'Ippolito, G.; Tucci, S.; Cutignano, A.; Romano, G.; Cimino, G.; Miralto, A. y Fontana, A. 2004. The role of complex lipids in the synthesis of bioactive aldehydes of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1686(1-2): 100-107.
De Martino, A.; Meichenin, A.; Shi, J.; Pan, K. H. y Bowler, C. 2007. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (*Bacillariophyceae*) accessions. *J. Phycol.*, 43: 992–1009.

Desbois, A.; Mearns-Spragg, A. y Smith, V. 2009. A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricorutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant (MRSA). *Mar. Biotechnol.*, 11: 45–52.

Díaz, L. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas

como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET*, 1(2): 32-55.

Dunstan, A.; Volkman, J.; Barrett, S.; Leroi, J.; Jeffrey, S. 1994. Phym chemistry. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (*Bacillariophyceae*). *Phytochemistry*, 35: 155-161.

Fischer, H.; Robl, I.; Sumper, M. y Kröger, N. 1999. Targeting and covalent modification of cell wall and membrane proteins heterologously expressed in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (*Bacillariophyceae*). *J. Phycol.*, 35: 113–20.

Fu, P.; Zhao, C. C.; Tang, J.; Shen, Y.H.; Xu, X.K. y Zhang, W.D. 2009. New flavonoid glycosides and cyanogenic glycosides from *Dracocephalum peregrinum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 57(2): 207-210.

Geider, R.; Osborne, A. y Raven, J. 1985. Light dependence of growth and photosynthesis in *Phaeodactylum tricorutum* (*Bacillariophyceae*). *J. Phycol.*, 21: 609-619.

Ghisalberti, E. 2006. Steroidal glycoalkaloids: Isolation, structure, analysis and biosynthesis. *Nat. Prod. Commun.*, 1(10): 859-884.

Gómez, B.; Thompson, F.; Thompson, C.; Garcia, A.; Roque, A. y Swings, J. 2004. *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54: 261-265.

Gómez Luna, L. 1997. Cultivo y aplicación de las microalgas *dunaliella* salina y *Chlorellavulgaris* en Cuba. Tesis doctoral. Universidade da Coruña, Facultade de Ciencias, Departamento de Biología Celular y Molecular. España.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Págs. 26-60. En: Smith, W.L. and Chanley, M.H. (eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.

Guzman, S.; Gato, A. y Calleja, J. 2001. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytother. Res.*, 15(3): 224-230.

Guzman, S.; Gato, A.; Lamela, M.; Freire, M. y Calleja, M. 2003. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytother. Res.*, 17(6): 665-671.

Hassan, S.T.S. 2020. Brassicasterol with dual-infective properties against HSV-1 and *Mycobacterium tuberculosis*, and cardiovascular protective effect: Nonclinical *in vitro* and *in silico* assessments. *Biomedicine*, 8(132): 1-12.

- Herrera, C.; Canales, F. y Martínez, E. 2014. Elaboración de probiótico a base de suero de leche de vaca para combatir infecciones de *Vibrio* sp. en camarones *Litopenaeus vannamei*, de forma experimental. *Revista Científica de la UNAM-León*, 5(2): 52-59.
- Hildebrand, M.; Dahlin, K. y Volcani, B. E. 1998. Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: sequences, expression analysis and identification of homologs in other diatoms. *Mol. Gen. Genet.*, 260(5): 480–86.
- Ingalls, A.; Whitehead, K. y Bridoux, M. 2010. Tinted windows: The presence of the UV absorbing compounds called mycosporine-like amino acids embedded in the frustules of marine diatoms. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, 74: 104-115.
- Jaspars, M. y Houssen, W. 2006. Isolation of marine natural products. In: *Natural Products Isolation*. Sarker, S.; Latif, Z. y Gray, A. (eds). Segunda edición. Editorial Humana Press Inc. New Jersey. Págs. 353-390.
- Jiang, H. y Gao, K. 2004. Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *J. Phicol.*, 40(4): 651-654.
- Kim, S.; Jung, Y.; Kwon, O.; Cha, K.; Um, B.; Chung, D. y Pan, C. 2012. A potencial commercial source of fucoxanthin extracted from the microalgae *Phaeodactylum tricorutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 166(7): 1846-1855.
- Koller, M.; Salerno, A.; Tuffner P.; Koinigg, M.; Böchzelt, H.; Schober, S.; Pieber, S.; Schnitzer, H.; Mittelbach, M. y Braunegg, G. 2012. Characteristics and potential of microalgal cultivation strategies: a review. *J. Clean. Prod.*, 37: 377-388.
- Kräbs, G. y Büchel, C. 2011. Temperature and salinity tolerances of geographically separated *Phaeodactylum tricorutum* Böhlin strains: maximum quantum yield of primary photochemistry, pigmentation, proline content and growth. *Bot. Mar.*, 54(3): 231-241.
- Kröger, N.; Deutzmann, R.; Sumper, M. 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, 286(5442): 1129–1132.
- Kröger, N.; Deutzman, R.; Bergsdorf, C. y Sumper, M. 2000. Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proce. Nat. Aca. Sci.*, 97(26): 14133-14138.
- Lenis, L.; Benítez, R.; Peña, E. y Chito, D. 2007. Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. *Sci. Tech.*, 8(33): 97-102.
- Lewin, J. C. 1958. The taxonomic position of *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Gen.*

Microbiol., 18(2): 427-432.

Leyva, D. 2013. Evaluación del contenido de fenoles, lípidos y ensayos de evaluación de la actividad antioxidante de la microalga *Phaeodactylum tricorutum* mantenida a distintas condiciones de cultivo. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México.

Liang, Y.; Sun, M.; Tian, C.; Cao, C. y Li, Z. 2014. Effects of salinity stress on the growth and chlorophyll fluorescence of *Phaeodactylum tricorutum* and *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae). *Bot. Mari.*, 57(6): 469-476.

Lincoln, R.; Strupinski, K. y Walker, J. 1990. Biologically active compounds from diatoms. *Diatom Res.*, 5(2): 337-349.

Lio, G.; Leño, E.; Peñaranda, M.; Villa, A.; Sombito, C. y Guanzon, N. 2005. Antiluminous *Vibrio* factors associated with the “green water” grow-out culture of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 250:1-7.

Lioudmila, A.; Zaslavskaja, J.; Casey, P.G.; Kroth, A.R. y Grossman, K. E. Apt. 2000. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* (bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *J. Phycol.*, 36(2): 379–386.

López, M.; Chomina, B.; Haros, M.; Barraza, R. y Valdez, E. 2013. Determinación de la carga de bacterias en zona de efluente camaronícola. *Biotecnia*, 15(1): 33-38.

López-Muñoz, I.; Abalde, J. y Herrero, C. 1992. Crecimiento y contenido en pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas con diferentes temperaturas e intensidades de luz. *Biología*, 30: 59-65.

Maeda, M.; Nogami, K.; Kanematsu, M. y Hirayama, k. 1997. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiology*, 358: 285-290.

Marques, A.; Thanh, T.; Sorgeloos, P. y Bossier, P. 2006. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquaculture*, 258(1-4): 116-126.

Meneses, C. 2015. Saponinas y flavonoides de *Passiflora ligularis* y evaluación de su actividad antiinflamatoria. Tesis de Maestría. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Colombia. Colombia.

Menezes, M. 2011. *Solanum campaniforme*: constituintes químicos, estudo de fragmentação e desreplição por espectrometria de massas com ionização por electrospray (IES-EM/EM). Tesis doctoral. Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Centro de Ciencias, Universidade Federal do Ceará. Brazil.

- Mimouni, V.; Ulmann, L.; Pasquet, V.; Mathieu, M.; Picot, L.; Bougaran, G.; Cadoret, J.P.; Morant-Manceau, A. y Schoefs, B. 2012. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 13(15): 2733-2750.
- Mioso, R.; Toledo Marante, F.; Bravo, I. y Bessonart, M. 2014. Química de productos naturales aplicada a la acuicultura: una revisión interdisciplinar. *Quim. Nova*, 37(3): 513-520.
- Molina, C. y Sánchez, M. 2017. Inhibitory effect of benthic diatom species on three aquaculture pathogenic *Vibrios*. *Algal Res.*, 27: 131-139.
- Molina, C.; Sánchez, M. y Lizárraga-Partida, M. 2013. Inhibition of pathogenic *Vibrio* by the microalgae *Isochrysis galbana*. *J. Appl Phycol.*, 26(6): 2347-2355.
- Montes, O. 2014. Efecto de la intensidad de la luz y de la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior, Programa de Posgrado en Ciencias. México.
- Oraday, M. 1998. Componentes químicos de algas del estado Tamaulipas y su aplicación en la farmacología. Tesis de grado. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Pacini, F. 1854. Osservazioni microscopiche e deduzione patologiche sul colera asiatico. *Gazette Medicale de Italiana Toscano Firenze*, 6: 405-412.
- Patra, J. K.; Patra, A. P.; Mahapatra, N. K.; Thatoi, H. N.; Das, S.; Sahu, R. K. y Swain, G. C. 2009. Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from Chilika Lake, Orissa, India. *Malays. J. Microbiol.*, 5(2): 128-131.
- Pisal, D.S. y Lele, S.S. 2005. Carotenoid production from microalgae, *Dunaliella salina*. *Indian J. Biotechnol.*, 4: 476-483.
- Priyadarshani, I y Rath, B. 2002. Commercial and industrial applications of micro algae: a review. *J. Algal Biomass Util.*, 3(4): 89-100.
- Ramírez, A.; Cerdán, L.; Robles, A.; Acién, F.; Gonzalez, P. y Molina, E. 2007, Lipid extraction from the microalgae *Phaeodactylum tricorutum*. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 109(2): 120-126.
- Ramírez-Mérida, L.; Ragagnin de Menezes, C.; Queiroz-Zepka, L. y Jacob-Lopes, E. 2015. Microalgas: potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados. *CeN.*, 37: 07-17.

- Raposo M, Rui, M. y Alcina, M. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci.*, 93(15): 479-486.
- Raven, J.A. y Geider, R.J. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol.*, 110(4): 441-461.
- Reis, A.; Gouveia, L.; Veloso, V.; Fernandes, H.; Empis, J. y Novias, J. 1996. Eicosapentaenoic acid-rich biomass production by the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* in a continuous-flow reactor. *Bioresour. Technol.*, 55: 83-88.
- Réveillon, D.; Séchet, V.; Hess, P. y Amzil, Z. 2016. Production of BMAA and DAB by diatoms (*Phaeodactylum tricorutum*, *Chaetoceros* sp., and *Thalassiosira pseudonana*) and bacteria isolated from a diatom culture. *Harmful Algae*. 58: 45-50.
- Rodríguez, I. y Guil, J. 2008. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chem.*, 180(3): 1023-1026.
- Rodríguez, J. 2003. Productos naturales de origen marino, una perspectiva en la búsqueda de nuevos fármacos. *An. R. Soc. Esp. Quím.*, 2: 5-13.
- Roulard, R.; Fontaine, J.X.; Jamali, A.; Cailleu, D.; Tavernier, R.; Guillot, X.; Rhazhi, L.; Petit, E.; Molinie, R. y Mesnard, F. 2017. Use of qNMR for speciation of flax seeds (*Linum usitatissimum*) and quantification of cyanogenic glycosides. *Anal. Bioanal. Chem.*, 409(30): 7011-7026.
- Round, F. E.; Crawford, R. M. y Mann, D. G. 1990. *The diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ruivo, M.; Amorim, A. y Cartaxana, P. 2011. Effects of growth phase and irradiance on phytoplankton pigment ratios: implications for chemotaxonomy in coastal waters. *J. Plankton Res.*, 33(7): 1012-1022.
- Salvesen, I.; Reitan, K.; Skjermo, J. y Oie, G. 2000. Microbial environments in marine larviculture: impacts of algal growth rates on the bacterial load in six microalgae. *Aquac. Int.*, 8: 275-287.
- Santafé, G.; Guzmán, M. y Torres, O. 2014. Triterpenos holostánicos con actividad antifúngica obtenidos del pepino de mar *Holothuria floridana*, recolectado en la bahía de Cispatá, Córdoba-Colombia. *Inf. Tecnol.*, 25(2): 87-92.
- Sapriel, G.; Quinet, M.; Heijde, M.; Jourden, L.; Tanty, V.; Luo, G.; Le Crom, S. y Lopez, P. 2009. Genome-Wide transcriptome analyses of silicon metabolism in *Phaeodactylum tricorutum* reveal the multilevel regulation of silicic acid transporters. *PLoS ONE*, 4(10): 1-14.

- Scholz B. y Liebezeit G. 2006. Chemical screening for bioactive substances in culture media of microalgae and cyanobacteria from marine and brackish water habitats: first results. *Pharm. Biol.*, 44(7): 544–549.
- Shaw B.; Andersen R. y Harrison P. 1995. Feeding deterrence properties of apo-fucoxanthinoids from marine diatoms. I. Chemical structures of apo-fucoxanthinoids produced by *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar. Biol.*, 124: 467-472.
- Sidana, J.; Singh, S.; Arora, S.; Foley, W. y Singh, I. 2011. Terpenoidal constituents of *Eucalyptus loxophleba* ssp. *lissophloia*. *Pharm. Biol.*, 50(7): 823-827.
- Silverstein, R.; Webster, F. y Kiemle, D. 2005. *Spectrometric identification of organic compounds*. Editorial John Wiley & Sons Inc, New York. Págs. 7(2): 72-227.
- Sotomayor, M. y Balcázar, J. 2003. Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *Rev. AquaTIC*, 19: 9-15.
- Sukenik, B.; Mortain-Bertrand, A. y Falkowski, P.G. 1990. Adaptation of the photosynthetic apparatus to irradiance in *dunaliella tertiolecta*: A kinetic study. *Plant Physiol.*, 92(4): 891-898.
- Sumper M.; Brunner E. y Lehnmann G. 2005. Biomineralization in diatoms: characterization of novel polyamines associated with silica. *FEBS Lett.*, 579(17): 3765-3769.
- Sumper, M. y Kröger N. 2004. Silica formation in diatoms: The function of long chain polyamines and silaffins. *J. Mat. Chem.*, 14: 2059-2065.
- Sumper, M. y Brunner, E. 2006. Learning from diatoms: Nature's tools for the production of nanostructured silica. *Adv. Funct. Mater.*, 16: 17-26.
- Sumper, M. y Lehmann, G. 2006. Silica pattern formation in diatoms: species specific polyamine biosynthesis. *ChemBioChem.*, 7(9): 1419-1427.
- Tendencia, E. y De la Peña, M. 2003. Investigation of some components of the greenwater system which makes it effective in the initial control of luminous bacteria. *Aquaculture*, 218: 115-119.
- Terekhovaa, V.; Aizdaicherd, L.; Buzolevac, D. y Somovc, G. 2009. Influence of Extrametabolites of marine microalgae on the reproduction of the *Bacterium Listeria monocytogene*. *Russ. J. Mar. Biol.*, 35(4): 355-358.
- Valencia, E.; Mac Donald, D.; Cuyos, M. y Dueñas, R. 2005. Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Agaricus bisporus*. *Biotempo*, 5: 31-36.

Villamil, L.; Figueras, M y Novoa, B. 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, 219(1-4): 43-56.

Villar, R.; Laguna, M.; Calleja, J. y Cadavid, J. 1992. Effects of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* extracts on the central nervous system. *Planta Med.*, 58(5): 405-409.

Viteri, E. 2016. Caracterización microbiológica de bacterias marinas recuperadas en sistemas de producción comercial de postlarva (*Litopenaeus vannamei*), Mar Bravo-Santa Elena. Tesis de grado. Universidad Estatal Península de Santa Elena, Facultad de Ciencias del Mar, Departamento de Biología Marina. Ecuador.

Wang, R.; Wang, J.; Xue, Q.; Tan, L.; Cai, J. y Wang, H. 2016. Preliminary analysis of allelochemicals produced by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Chemosphere*, 165: 298-303.

HOJAS DE METADATOS
Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

| | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Título | EVIDENCIA ESPECTROSCÓPICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS DE NATURALEZA SAPONÍNICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MICROALGA <i>Phaeodactylum tricornutum</i> |
| Subtítulo | |

Autor(es)

| Apellidos y Nombres | Código CVLAC / e-mail | |
|--------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| QUINTERO CATALÁN ANDY ALEXANDER | CVLAC | 23.433.913 (cedula) |
| | e-mail | ANDY.QUINTERO22@GMAIL.COM |
| | e-mail | |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |
| | CVLAC | |
| | e-mail | |
| | e-mail | |

Palabras o frases claves:

| |
|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i>, microalga, saponina, condiciones de cultivo. |
| |

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

| Área | Sub área |
|-----------------|----------------------------|
| CIENCIAS | QUÍMICA |
| | PRODUCTOS NATURALES |
| | |
| | |
| | |

Resumen (abstract):

La diatomea *Phaeodactylum tricornutum* fue cultivada axénicamente y de forma unialgal en medio f/2 Guillard, exponiéndola a 2755 y 3862,5 lux. Las fases exponencial y estacionaria se alcanzaron a los 8 y 17 días respectivamente, obteniéndose 4 extractos etanólicos de los cuales sólo el irradiado a 2755 lux y cosechado en fase estacionaria presentó actividad antibacteriana frente a *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. El residuo orgánico proveniente de este último cultivo, se maceró en una mezcla MeOH/HCl (1:1) obteniéndose un nuevo extracto, del cual mediante biparticiones y cromatografías de columna se pudieron obtener diferentes fracciones a las cuales se les evaluó su actividad antibacteriana frente a varias cepas y se les realizaron análisis espectroscópicos de RMN e IR, lo que permitió identificar la presencia de una familia de compuestos dentro de las subfracciones 1.3.3.1 y 1.3.2.1. En ambas, el estudio de los análisis espectroscópicos establece la presencia de estructuras con esqueletos triterpénicos o esteroidales unidas a restos sacáridos de tipo saponina, y también a estructuras de tipo aminoácido como la TYR-PRO-PHE-PRO-GLY-NH₂.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

| Apellidos y Nombres | ROL / Código CVLAC / e-mail | |
|--------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WILLIAN HENRÍQUEZ | ROL | C <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 8.249.952 |
| | e-mail | whenriquez66@gmail.com |
| | e-mail | |
| HELLEN BRUZUAL | ROL | C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 18581108 |
| | e-mail | tuamorhelena@gmail.com |
| | e-mail | |
| YVANOVIS DASILVA | ROL | C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> |
| | CVLAC | 12.660.605 |
| | e-mail | yvanovisdasilva@gmail.com |
| | e-mail | |

Fecha de discusión y aprobación:

| Año | Mes | Día |
|------|-----|-----|
| 2023 | 02 | 02 |

Lenguaje: SPA _____

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

| Nombre de archivo | Tipo MIME |
|-------------------------------|-------------------------|
| Tesis-AndyQuintero.doc | Application/word |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado(a) en Química

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado(a)

Área de Estudio: Química

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

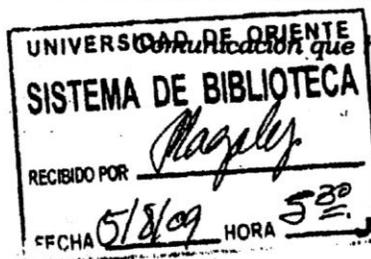
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNPELO
Secretario

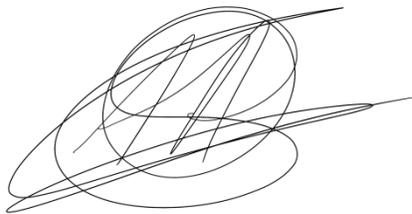


C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

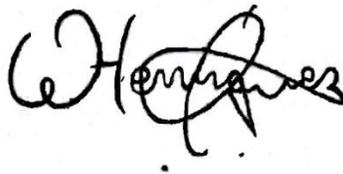
JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



**ANDY QUINTERO
AUTOR**



**PROF: WILLIAN HENRÍQUEZ
ASESOR**