

Efecto de la calidad de la luz en el crecimiento y composición bioquímica de *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae)

Seminario de Título presentado a la
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.
Para optar al título de Biología.

Camila Antonia Eriz Arancibia

Concepción, diciembre 2024.

Este Seminario de Título ha sido desarrollado en FICOLAB, Grupo de Investigación Microalgal del departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

Prof. Guía

Dra. Patricia Gómez

Prof. Co Guía

Dr. Pablo Castro

Prof. Evaluadores

Dra. Fabiola Cruces

Dr. Enrique Ostria

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han sido parte fundamental en el desarrollo de esta tesis.

En primer lugar, agradezco profundamente a mi directora de tesis, Dra. Patricia Gómez, por su constante apoyo, orientación y valiosos consejos a lo largo de todo el proceso. Su conocimiento y dedicación han sido fundamentales para la realización de este proyecto.

También extiendo mi agradecimiento al profesor co-guía de tesis, Dr. Pablo Castro, por su continuo respaldo, su valiosa orientación técnica y su contribución esencial en cada fase del proyecto, así como por los buenos momentos de alegría y el apoyo constante que compartimos durante este proceso.

También agradezco a los miembros del grupo de investigación Microalgal, Ficolab, por su colaboración y por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo mis experimentos. De igual manera, agradezco a cada uno de los integrantes del laboratorio por su ayuda y apoyo durante la realización de las investigaciones.

Mi gratitud también va dirigida a mis compañeros de investigación: Edwards Araya, Diego Ramírez y Constanza Aguayo, por su amistad, apoyo y las valiosas discusiones científicas que enriquecieron este trabajo.

Agradezco al proyecto FONDEF ID-22110127 por su apoyo financiero, el cual permitió la ejecución de este proyecto de investigación.

Por último, quiero agradecer a mi familia y amigos por su constante aliento, paciencia y amor incondicional, que me brindaron la fuerza necesaria para perseverar en los momentos más desafiantes.

Gracias a todos por su colaboración y apoyo.

INDICE

AGRADECIMIENTO	3
INDICE	4
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN	9
<i>Potencial biotecnológico en las microalgas para la producción de compuestos de interés industrial y alimenticio.</i>	9
<i>Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados y los carotenoides en la nutrición humana y animal.</i>	9
<i>¿Cómo afecta la calidad de luz al crecimiento de las microalgas?</i>	11
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	12
<i>¿Cómo afecta la calidad de luz a la acumulación de fucoxantina y EPA en la diatomea P. tricornutum?</i>	13
HIPÓTESIS:	14
Objetivo general:.....	14
Objetivos específico:.....	14
METODOLOGÍA.....	15
1.- Material biológico:.....	15
2.- Condiciones de cultivo experimental:	15
3.- Monitoreo de los parámetros del crecimiento y fisiológicos:	16
4.- Análisis bioquímicos:	17
5.-Análisis estadísticos:	19
RESULTADOS.....	21
<i>Evaluación del crecimiento y parámetros fotobiológicos de la cepa, en distintas irradiancias</i>	21
<i>Escalamiento del cultivo en volumen de 1L, con irradiancia electa en etapa anterior bajo distintas calidades de luz</i>	22
<i>Análisis fotobiológicos</i>	24
<i>Análisis bioquímicos</i>	27
DISCUSIÓN	34
<i>Efecto de la Calidad de la Luz en crecimiento y desempeño fotosintético de Phaeodactylum tricornutum</i>	34
<i>Efecto de la Calidad de la Luz en los Parámetros Bioquímicos de Phaeodactylum tricornutum</i>	36
CONCLUSIONES.....	39

CITAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXO	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curvas de crecimiento de cepa CCM-UdeC264, a diferentes irradiancias en la calidad de luz blanca, azul y roja.....	21
Figura 2: rendimiento cuántico óptico (F_v/F_m) de crecimiento de cepa CCM-UdeC 264 expuesta a tratamientos con diferentes irradiancias (50, 75, 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a distintas calidades luz (blanca, azul y roja).....	22
Figura 3: Curvas de crecimiento de la cepa CCM-UdeC264, bajo todas las calidades de luz: blanca, azul, roja y mixta (azul: roja), con una irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$	22
Figura 4: Rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) de las diferentes calidades de luz a una irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en función al tiempo.....	24
Figura 5: Enfriamiento no fotoquímico máximo (NPQ_{max}) de las diferentes calidades de luz a una irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en función al tiempo.	25
Figura 6: Velocidad máxima de transporte de electrones ($ETR_{\text{máximo}}$). de las diferentes calidades de luz a una irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en función al tiempo.....	26
Figura 7: Contenido de fenoles totales en la cepa CCM-UdeC 264 cultivada bajo diferentes calidades de luz, con irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$	27
Figura 8: Contenido de carbohidratos totales en la cepa CCM-UdeC 264, bajo diferentes calidades de luz con irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$	28
Figura 9: Contenidos de proteínas totales de <i>P. tricornutum</i> , bajo diferentes calidades de luz a una irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$	29
Figura 10: Contenido de a) Clorofila (a) b) clorofila (c1+c2) c) carotenoides totales y d) fucoxantina en la biomasa seca total de la cepa CCM-UdeC 264 bajo diferentes calidades de luz, con irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$	30
Figura 11: Contenido de lípidos totales de <i>P. tricornutum</i> , bajo diferentes calidades de luz bajo una irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$	31
Figura 12: Contenido del ácido eicosapentaenoico, en la biomasa seca de cepa CCM-UdeC 264, bajo diferentes calidades de luz bajo una irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$	33

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Parámetros de crecimiento de cepa CCM-UdeC 264 expuesta a tratamientos con diferentes irradiancias a distintas calidades luz (blanca, azul y roja)</i>	21
Tabla 2: <i>Tabla comparativa de parámetros de crecimientos de los cultivos de un litro en las diferentes calidades de luz, con irradiancia de $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$</i>	23
Tabla 3: <i>Análisis de ácidos grasos presentes en la biomasa de la cepa cultivada en distintas calidades de luz.</i>	32

RESUMEN

El uso de diodos emisores de luz (LED) en la biotecnología de cultivos de microalgas permite generar diversas calidades de luz para estudiar su impacto en el desarrollo de las microalgas. A diferencia de la luz natural, la luz artificial posibilita un control preciso tanto de la longitud de onda como de la irradiancia, facilitando una aclimatación óptima a la calidad espectral durante el cultivo, esto promueve una mayor productividad y optimiza la composición de la biomasa. Las distintas longitudes de onda e irradiancias influyen en la producción de pigmentos fotosintéticos, así como en la asignación de carbono y el proceso fotosintético general. La diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, una microalga de gran potencial biotecnológico destaca por su rápido crecimiento y elevada producción de compuestos valiosos, como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el carotenoide fucoxantina, ambos con importantes propiedades farmacológicas y nutraceuticas.

El objetivo de este estudio fue investigar cómo la calidad de la luz afecta el crecimiento y la composición bioquímica, en particular la acumulación de EPA y del carotenoide fucoxantina, en una cepa chilena de *Phaeodactylum tricornutum*. Para ello, en una primera etapa, se evaluó el crecimiento de la cepa en diferentes calidades de luz (blanca, roja y azul) a diferentes irradiancias (50, 75, 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$), para determinar la irradiancia óptima y luego escalar su cultivo a volúmenes de un litro. Se utilizaron lámparas LEDs para proporcionar luz blanca (λ_{max} : 435 nm), luz azul (λ_{max} : 452 nm), luz roja (λ_{max} : 658 nm) y una combinación 50:50 de luz azul y roja. Los resultados mostraron que el mejor tratamiento para optimizar simultáneamente el crecimiento y la composición bioquímica de la cepa fue la mezcla combinada de luz azul y roja. Los resultados de esta investigación demuestran que la calidad de la luz es un factor importante a considerar en la optimización de las condiciones de cultivo de esta diatomea, a escala comercial.

Palabras claves: *Phaeodactylum tricornutum*, calidad de luz, lámparas LEDs, EPA, fucoxantina

INTRODUCCIÓN

Potencial biotecnológico en las microalgas para la producción de compuestos de interés industrial y alimenticio.

Con el paso del tiempo el interés y aplicaciones científicas en las microalgas ha evolucionado significativamente, revelando un vasto potencial biotecnológico en diversas áreas (Camacho & Flórez 2020) e incorporando aportes en desafíos globales y ambientales, ya que, en primer lugar, son una fuente de energía renovable y sostenible. Su versatilidad y alta productividad en los cultivos conllevan un bajo costo en comparación con cultivos de plantas, destacan entre sus principales ventajas (Olabi *et al.* 2023; Gómez 2007). La biomasa obtenida de ciertas microalgas es una fuente de compuestos valiosos con interés comercial e industrial (Chen *et al.* 2023), entre los que se incluyen proteínas, lípidos, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), antioxidantes, carotenoides, esteroides, terpenoides, pigmentos, carbohidratos, entre otros (Olabi *et al.* 2023; Capek *et al.* 2023; Chen *et al.* 2023).

Actualmente, existen numerosos estudios sobre metabolitos extraídos de la biomasa producida por cultivos microalgales, con aplicaciones que van desde biofertilizantes hasta producción de biocombustibles, pasando por alimentación humana y animal, o para la elaboración de productos con uso en medicina, farmacia y/o cosmética (Gómez 2007; Brennan & Owende 2010; Hernández & Labbé 2014).

El consumo de algas marinas, tanto macroalgas como microalgas, por parte de los seres humanos se remonta a miles de años, desde comunidades indígenas (Levasseur & PerreVictor 2020) hasta diferentes culturas a nivel mundial, destacando China, Japón y Corea (Olabi *et al.*, 2023). Hoy en día el consumo de microalgas se encuentra limitado, debido al estricto control que debe abordar en términos de la seguridad alimentaria, factores comerciales, demandas del mercado y requisitos específicos de preparaciones (Brennan & Owende 2010; Mendoza *et al.* 2011). Además, deben estar catalogadas en la Administración de alimento y medicamento (FDA) como un alimento GRAS (*Generally Recognized As Safe*), lo que garantiza su consumo seguro (Olabi *et al.* 2023). Algunas de las microalgas certificadas para el consumo humano incluyen a *Arthrospira*, *Chlorella* y *Dunaliella salina*, las cuales se consideran seguras y valiosas para la dieta humana (Levasseur & Perrévictor 2020).

El interés en la alimentación y salud a base de microalgas no solo se limita a la industria humana, sino también como un valor agregado en la alimentación de varios animales. En la acuicultura, las microalgas son una fuente primaria de alimentación (Brennan & Owende 2010; Harun *et al.* 2010; Mendoza *et al.* 2011). Los géneros más comunes utilizados para la alimentación animal incluyen a *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* y *Thalassiosira*, las cuales son consumidas principalmente en estado vivo. Un estudio de Spolaore, *et al.*, 2006 determinó que el 30% de la producción mundial de las microalgas está destinada al consumo animal y que el 50% de la producción de la especie de *Arthrospira* tiene el mismo fin (Camacho & Flórez 2020; Hernández & Labbé 2014).

Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados y los carotenoides en la nutrición humana y animal.

Tanto los ácidos grasos como los carotenoides han demostrado ser componentes esenciales en la nutrición humana y animal, desempeñando roles cruciales en la salud y bienestar. No sólo mejoran la calidad de vida, sino que son clave en la prevención de diversas enfermedades crónicas (Brenes-Soto 2014). En el contexto de buscar una bioeconomía circular, donde se emplea materia prima y recursos biológicamente renovables y/o bioprocesos con el fin de obtener productos económicamente viables (Butler *et al.*, 2020), las

microalgas se presentan como candidatas prometedoras para ser utilizadas bajo este enfoque (Olabi *et al.*, 2023).

Entre los metabolitos de almacenamiento energético de alto valor se encuentran los carbohidratos y los lípidos (Caballero *et al.* 2016). Los lípidos incluyen a los triacilglicéridos (TAGs), fosfolípidos, esteroides y oxilipinas, desempeñando funciones cruciales en la fisiología celular, como el almacenamiento de energía, la estructura de la membrana celular y respuestas a estímulos ambientales. La biosíntesis de los ácidos grasos, los cuales son los bloques de construcción de los lípidos, es un proceso complejo que involucran la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA, la elongación de cadenas de ácidos grasos, y la desaturación para formar ácidos grasos insaturados (García *et al.* 2021). Entre los ácidos grasos poliinsaturados del grupo omega 3 (ω -3) que contiene dos o más doble enlaces en su cadena de carbono, destacan el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) por su papel como sustancias bioactivas y nutrientes esenciales, que deben ser consumidos en la dieta de los animales ya que no son sintetizados endógenamente (Celi *et al.* 2022).

Estos ácidos grasos son cruciales para el mantenimiento y buen funcionamiento del sistema cardiovascular, se destacan por su naturaleza esencial en el desarrollo del sistema nervioso y en las mejoras de las capacidades visuales (Levasseur & Perrévictor 2020). También se ha demostrado que favorecen el desarrollo cerebral, y contribuyen a la prevención de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias, como la diabetes, la artritis y la obesidad. Además, juegan un papel en la función antienviejecimiento y en tratamientos de trastornos psiquiátricos (Castellanos *et al.* 2015; Hamed 2016; Kim *et al.* 2012; García *et al.* 2021). Hoy en día, la fuente tradicional de producción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) proviene del aceite de pescado, y es preocupante la sobreexplotación de las pesqueras y la contaminación asociada su producción (Moon *et al.* 2019). En este contexto, se han considerado algunas microalgas como una fuente prometedora de los ácidos grasos EPA y DHA, entre las que destacan *Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana*, respectivamente (Mulders *et al.* 2012; Chen *et al.* 2023; Katiyar & Arora 2020).

Los cloroplastos de las microalgas albergan metabolitos de gran valor, como los pigmentos fotosintéticos, los que se pueden clasificar en tres grupos principales: clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas, son responsables de las diferentes tonalidades características de cada especie (Lavasasseur 2020).

Los carotenoides son pigmentos terpenoides conocidos por su capacidad antioxidante. Los carotenoides desempeñan un papel crucial en la fotoprotección celular, especialmente en situaciones en las que las fluctuaciones en la intensidad de la luz podrían provocar la absorción de energía en exceso, superando la capacidad fotosintética de las células. Esta condición puede causar fotoinhibición, un proceso en el que el exceso de energía lumínica causa la oxidación de pigmentos, lípidos y proteínas, dañando el aparato fotosintético (Jallet *et al.* 2016).

Al ser consumidos en la dieta, los carotenoides tienen efectos beneficiosos en la prevención de diversas enfermedades como el cáncer, trastornos oculares y vasculares. También son precursores vitamínicos, activadores inmunológicos y agentes antiinflamatorios (Hamed 2016). En la actualidad, la producción a escala industrial de carotenoides a partir de fuentes naturales se realiza a partir de algunas microalgas y ha permitido, por ejemplo, la comercialización de β -caroteno de *Dunaliella salina* (Brennan & Owende 2010; Mendoza *et al.* 2011) y la astaxantina de *Haematococcus pluvialis* (Butler *et al.* 2020).

Otro carotenoide de interés comercial es la fucoxantina, responsable de la coloración marrón en las algas pardas y diatomeas. Este pigmento secundario es abundante en estos organismos, debido a que actúa como pigmento captador de luz junto a la clorofila a y c,

conformando el complejo fucoxantina-proteína clorofila c (FCP), y es considerado como un compuesto de alto valor comercial (Pereira *et al.* 2021). En la actualidad la fucoxantina se extrae principalmente de macroalgas, aunque algunas microalgas han demostrado tener un alto contenido de este pigmento, como las diatomeas marinas *Phaeodactylum tricornutum*, *Odontella aurita* y *Cyclotella cryptica* (Wang *et al.* 2018; Meléndez *et al.* 2004). La fucoxantina ha demostrado tener actividades antiobesidad, antidiabéticas, antiinflamatorias, anticancerígenas y hepatoprotectoras, así como efectos protectores cardiovasculares y cerebrovasculares, lo que ha generado un gran interés en su producción sustentable (Woo *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2015).

¿Cómo afecta la calidad de luz al crecimiento de las microalgas?

La radiación solar está comprendida dentro de la radiación electromagnética, la cual se caracteriza por diferentes longitudes de onda y se manifiesta en forma de energía. Según los criterios de la Comisión Internationale de l'Eclairage (CIE) la radiación se divide en radiación infrarroja o roja lejana (>700 nm), radiación visible o radiación fotosintética activa (PAR, por sus siglas en inglés) que abarca de 400 nm a 700 nm, y radiación ultravioleta, que cubre de 280 nm a 400 nm (Taiz & Zeiger 2003). Sólo la radiación visible del espectro, o PAR, es fotosintéticamente activa en plantas y algas, ya que impulsa el proceso de la fotosíntesis, un proceso cuántico impulsado por el flujo de fotones fotosintéticos (la cantidad de fotones en el rango PAR, que incide sobre una superficie en una unidad de tiempo) (Mahari *et al.* 2024).

Las microalgas son organismos fotosintéticos que requieren de luz, dióxido de carbono y nutrientes para su crecimiento celular (Sirisuk *et al.* 2018). Estos organismos utilizan la energía lumínica capturando fotones de la luz y fijando carbono inorgánico en forma de carbono orgánico, produciendo oxígeno y energía química a través de estructuras especializadas, denominados fotosistemas, son la unidad estructural y funcional responsables de la absorción de luz, así como de la transferencia de energía y electrones, realizando una serie de reacciones redox convirtiendo la energía lumínica en química a través de los dos tipos de fotosistemas: PSI (P700) y PSII (P680). Esta reacción dependiente de la luz ocurre en la membrana tilacoidal del cloroplasto. El ATP y el poder reductor (NADPH), resultantes de la cadena transportadora de electrones en esta fase luminosa son metabolizados en el ciclo de Calvin-Benson mediante la enzima Rubisco, cuyo producto final es la glucosa y otros azúcares (Celi *et al.* 2022). Esta fase, independiente de la luz, tiene lugar en el estroma del cloroplasto y se denomina fase oscura (Wang *et al.* 2023).

Los fotosistemas constan de dos componentes claves: el complejo antena y el centro de reacción. El complejo antena agrupa pigmentos fotosintéticos como clorofilas y carotenoides, que capturan la luz y canalizan la energía hacia el centro de reacción. En este último, una clorofila diana, que es un tipo de clorofila (a), interactúa con aceptores y dadores de electrones para convertir la energía lumínica en energía química, un paso crucial que inicia la cadena de transporte de electrones en la fotosíntesis (Taiz *et al.* 2015). Los pigmentos fotosintéticos, incluidos clorofilas y carotenoides, absorben luz en rangos específicos del espectro de radiación fotosintética activa (PAR), optimizando así la captura de energía para la fotosíntesis. La clorofila tiene picos de absorción en el azul (~430 nm) y el rojo (~660 nm). Esta energía se puede disipar como calor y ser transferida a otras moléculas, o desencadenar reacciones fotoquímicas a través de la molécula de clorofila a (Buchanan *et al.* 2015).

Los carotenoides, por otro lado, están generalmente asociados con las proteínas en las antenas y los centros de reacción, absorben en el rango de 400 a 500 nm y actúan como pigmentos accesorios, transfiriendo la energía capturada a la clorofila, ampliando la capacidad de absorción del espectro lumínico y contribuyendo a la fotosíntesis. Además, estos pigmentos desempeñan en el aparato fotosintético una función fotoprotectora,

protegiendo a los fotosistemas contra daños fotooxidativos causados por el exceso de luz (Schulze *et al.* 2014; McGee *et al.* 2019; Sirisuk *et al.* 2018).

Diferentes longitudes de onda no sólo inducen variaciones en la producción de pigmentos fotosintéticos, como los carotenoides y las clorofilas, sino que también influyen significativamente en la asignación de carbono hacia diversas rutas metabólicas dentro de la célula; estas variaciones permiten optimizar tanto la acumulación de biomasa como la síntesis de compuestos bioactivos, incluidos los ácidos grasos poliinsaturados. Por ejemplo se ha demostrado que la luz azul y roja son particularmente efectivas en estos procesos. Además, las microalgas, al enfrentarse a cambios en la calidad de la luz, suelen activar procesos de fotoaclimatación que implican modificaciones estructurales en el cloroplasto y ajustes en la composición de pigmentos, permitiendo una captura más eficiente de energía lumínica bajo diferentes condiciones ambientales (Jungandreas *et al.* 2014; McGee *et al.* 2014). Estos efectos están mediados, al menos en parte, por fotorreceptores, los cuales desempeñan un rol crucial en la regulación metabólica (fotomorfogénesis), ya que estos no sólo modulan la actividad enzimática, sino que también influyen en el control transcripcional de genes clave relacionados con la asimilación de nitrógeno y carbono; esto facilita la redistribución del carbono entre lípidos, carbohidratos y proteínas dependiendo del espectro lumínico al que se exponen las células (Dong *et al.* 2022). Aunque el análisis específico de fotorreceptores no formó parte de esta investigación, este aspecto podría ser una extensión relevante para futuros estudios que busquen complementar el entendimiento del impacto de la calidad de la luz sobre la fotosíntesis, especialmente en especies de alto interés comercial.

El uso de la iluminación artificial permite superar muchos de los inconvenientes de la luz natural, proporcionando una irradiancia óptima independiente de la hora del día y estación. Los cultivos exteriores a gran escala son difíciles de controlar debido a la fluctuación de factores como la temperatura, las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono, que varían con la luz solar. En contraste, los cultivos interiores con iluminación artificial permiten un control preciso de las condiciones, lo que puede mejorar la calidad y productividad en comparación con la iluminación natural al aire libre (Mahari *et al.* 2024; McGee *et al.* 2019). Los LEDs tienen una larga vida útil en comparación con otras fuentes de luz, lo que los hace más eficientes y económicos; además, pueden emitir en un rango específico de longitudes de onda, como la azul y roja, lo que los hace más versátiles para las aplicaciones que requieran de una iluminación controlada (Sirisuk *et al.* 2018).

Phaeodactylum tricornutum

Las diatomeas son una clase de microalgas que representan una de las poblaciones más abundantes entre las microalgas en el océano; entre ellas, la diatomea penada *Phaeodactylum tricornutum* se distingue por la capacidad de adoptar diferentes morfotipos: fusiforme, trirradiado y ovalado (Vartanian 2009; Lewin *et al.* 1958; Borowitzka y Volcani 1978 citado de Haro *et al.* 2017). Este pleomorfismo ha sido ampliamente estudiado, sugiriendo que es una de las razones que evidencia la adaptabilidad que posee esta diatomea en ambientes fluctuantes (Butler *et al.* 2020). A diferencia de otras diatomeas, que generalmente tienen frústulo rígido compuesto principalmente de sílice, el frústulo de *P. tricornutum* es predominantemente orgánico más que silicificado (Le Costaouëc *et al.* 2017; Haro *et al.* 2017). Se distribuye en ambientes costeros incluyendo estuarios y charcos rocosos, donde las condiciones pueden ser inestables (Zhao 2014; Haro *et al.* 2017).

Phaeodactylum tricornutum ha sido objeto de un extenso estudio y su genoma ha sido secuenciado completamente (Bitaubé 2008; Zhao 2014; Celi *et al.* 2022), lo que ha permitido descubrir su potencial en diversas aplicaciones (Celi *et al.* 2022; Olabi *et al.* 2023; Qiao *et al.* 2016; Butler *et al.* 2020). Esta diatomea es particularmente interesante para los

investigadores e industrialmente relevante, debido a que muestra una alta tasa crecimiento en condiciones óptimas y capacidad de producir compuestos comercialmente valiosos, siendo apta para cultivos a gran escala. En sistemas de cultivos masivos al aire libre ha demostrado ser una candidata prometedora ya que es capaz de resistir condiciones de pH alto y baja irradiancia, presenta una amplia aclimatación a distintos medios de cultivo, lo cual la convierte en una especie particularmente adecuada para su uso en biotecnología (Bitaubé 2008; Butler *et al.* 2020). Uno de los principales intereses biotecnológicos de *P. tricornutum* es su capacidad para producir compuestos de alto valor, como la producción de fucoxantina y, además, se ha investigado ampliamente como una fuente potencial de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente la producción de EPA (Haro *et al.* 2017)

¿Cómo afecta la calidad de luz a la acumulación de fucoxantina y EPA en la diatomea *P. tricornutum*?

La calidad de la luz se define como la composición espectral de la radiación lumínica, es decir, la distribución de las diferentes longitudes de onda presentes en la radiación fotosintéticamente activa. En el contexto biológico, ésta determina cómo los organismos perciben y responden a la luz, afectando procesos como la fotosíntesis, fotomorfogénesis y adaptación metabólica (Crepy 2011; Gonzalías & Lasso 2015).

La calidad de la luz juega un papel crucial en la acumulación de compuestos como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y la fucoxantina en cultivos de microalgas. Los LED, al ofrecer un espectro de luz ajustable, permiten una optimización precisa de las condiciones lumínicas para maximizar la biosíntesis de estos metabolitos. En comparación con la luz natural, los LEDs permiten proporcionar longitudes de onda específicas que pueden estimular la producción de metabolitos específicos y minimizar el calor residual ofreciendo una ventaja considerable para los cultivos controlados, donde las condiciones de crecimiento pueden ser ajustadas con precisión para favorecer la acumulación de estos compuestos valiosos (Mahari *et al.* 2024), tal como ha sido demostrado en *P. tricornutum* (Duarte *et al.* 2021).

La fucoxantina es un carotenoide clave en las diatomeas que juega un papel crucial en la recolección de luz para la fotosíntesis. Este pigmento absorbe luz en un rango de longitud de onda de 450-540nm, predominantemente en la región azul (Sirisuk *et al.* 2018 Wan *et al.* 2013; Parkes *et al.* 2021). Estudios previos han demostrado que la exposición a luz azul puede incrementar significativamente la producción de fucoxantina en diatomeas como *P. tricornutum*, lo que convierte a esta longitud de onda en una herramienta valiosa para optimizar la producción de este pigmento de alto valor en aplicaciones industriales (Wang *et al.* 2018; Parkes *et al.* 2021).

El crecimiento, contenido de lípidos y la composición de ácidos grasos de *P. tricornutum* están influenciados por diversos factores de cultivo, como la temperatura y los nutrientes (Gao *et al.* 2017; Schellenberger *et al.* 2013; Duarte *et al.* 2021), y también la luz, fuente principal de energía para la fotosíntesis (Jungandreas *et al.* 2014; Maltsev *et al.* 2021; Dong *et al.* 2023). Los ácidos grasos omega 3, incluido el EPA, forman parte principalmente de los lípidos polares como los fosfolípidos, constituyentes principales de las membranas celulares, por lo que su acumulación se ve incrementada en condiciones favorables para el crecimiento (Haro *et al.* 2017). En relación al efecto de la calidad de luz en la acumulación de EPA en *P. tricornutum*, se ha observado que particularmente la luz roja ha mostrado ser más efectiva para incrementar el contenido de EPA en las células, en comparación a tratamientos con luz azul y blanca (Duarte *et al.* 2021; Dong *et al.* 2023). Este efecto puede deberse a su influencia en los mecanismos metabólicos que favorecen la biosíntesis de ácidos grasos en *P. tricornutum* (Sirisuk *et al.* 2018), lo cual aún no está totalmente dilucidado.

Aunque la literatura científica ha avanzado considerablemente en el estudio sobre el impacto de la calidad de la luz en la composición bioquímica de microalgas, la influencia específica

de la luz en la acumulación del carotenoide fucoxantina y en la producción del ácido eicosapentaenoico (EPA) en *P. tricornutum*, aún sigue siendo un área de investigación activa. La literatura existente sugiere que la luz azul es crucial para la síntesis de fucoxantina en diferentes especies de microalgas, debido a su absorción efectiva en ese rango del espectro electromagnético (Wang *et al.* 2018; McGee *et al.* 2019; Dong *et al.* 2023). Por otro lado, la luz roja parece ser eficiente para incrementar la acumulación de EPA al estimular la biosíntesis de ácidos grasos en esta microalga (Sirisuk *et al.* 2018). Sin embargo, la respuesta precisa entre estas diferentes longitudes de onda y su efecto sobre la producción de estos metabolitos aún requiere más investigación para determinar las condiciones óptimas de iluminación y maximizar tanto la fucoxantina como el EPA en esta microalga.

Considerando los antecedentes expuestos, en esta investigación se plantean las siguientes hipótesis y objetivos.

Hipótesis:

1.- La mezcla de la calidad de luz roja y azul favorece el crecimiento en la diatomea *P. tricornutum*.

2.- La luz azul favorece la acumulación del carotenoide fucoxantina y la luz roja la acumulación del ácido eicosapentaenoico (EPA) en la biomasa de *P. tricornutum*.

Objetivo general:

Estudiar el efecto de la calidad de la luz en el crecimiento, desempeño fotosintético y composición bioquímica de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*

Objetivos específicos:

- o Evaluar el efecto de la calidad de la luz (azul, roja y blanca) en el crecimiento y desempeño fotosintético de *P. tricornutum*.
- o Determinar si la calidad de la luz (azul, roja y blanca) afecta la acumulación del carotenoide fucoxantina y del ácido graso eicosapentaenoico (EPA) en la biomasa de *P. tricornutum*.

METODOLOGÍA

Material biológico

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó una cepa de *Phaeodactylum tricornutum*, aislada desde Isla San Pedro, Chiloé, Región de Los Lagos, Chile (43°21'10"S 73°44'01"O), la cual se encuentra depositada en la Colección de Cultivo de Microalgas de la Universidad de Concepción, con el código de CCM-UdeC 264.

La cepa es mantenida en medio Walne 3X (Walne, 1970), a una irradiancia continua de 60 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 16:8 (L:O) y a una temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$.

Condiciones de cultivo experimental

1.- Primera etapa: Elección irradiancia óptima en las calidades de luz blanca, azul y roja.

En la primera etapa de este proyecto, se cultivó la cepa de *P. tricornutum* (CCM-UdeC 264) en medio Walne 3X, con un fotoperiodo de 16:8 (L:O) y a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Se iniciaron los cultivos con una densidad celular inicial de 200.000 células ml^{-1} , en un volumen de 250 ml, con aireación filtrada (0.22 μm) constante por 11 días.

Para determinar el rango máximo de irradiancia que tolera el alga sin comprometer su rendimiento fotosintético se realizaron curvas rápidas de luz utilizando un fluorímetro de pulso de amplitud modulada (JUNIOR-PAM) controlado por el software WinControl v3.25 (Walz GmbH, Germany). Este equipo emite pulsos de luz actínica de color azul. Se recolectaron alícuotas de 5 mL de cultivo y se acondicionaron en completa oscuridad durante 15 minutos antes de realizar las mediciones. En el fluorímetro JUNIOR-PAM, se empleó la configuración de curvas rápida de luz, ajustando tanto la intensidad como la duración del pulso de saturación. Las curvas de luz se realizaron con incrementos graduales de irradiancia, alcanzando un máximo de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

De los ensayos anteriores se decidió trabajar en el rango de 50 a 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los cultivos fueron expuestos a diferentes calidades de luz, con la ayuda de un espectrorradiómetro se midieron las longitudes de onda emitidas por las tres lámparas LEDs: como control tenemos la luz blanca (λ_{max} : 435nm) y como objetivo de estudio utilizamos luz azul (λ_{max} : 452nm) y luz roja (λ_{max} : 658nm).

Para cada tratamiento de calidad de luz se evaluaron diferentes densidades de flujo fotónico, medidas con un cuantómetro plano: (1) 50, (2) 75, (3) 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, con el propósito de escoger una irradiancia óptima para los cultivos, sobre el crecimiento y la actividad fotosintética de la microalga, tal como se describe en el punto 3.

2.- Segunda etapa: Cultivo en volumen de 1L con irradiancia electa, bajo las diferentes calidades de luz

En esta segunda etapa, se establecieron los cultivos bajo diferentes calidades de luz: blanca, azul y roja, con la irradiancia optima establecida en la primera etapa en función de la eficiencia fotosintética y los atributos de crecimiento: tasa de crecimiento y densidad celular máxima.

Se establecieron réplicas para los cultivos experimentales de esta segunda etapa, los cuales fueron iniciados con una densidad celular de 500.000 células ml^{-1} , en un volumen de un litro, con aireación filtrada (0.22 μm) por 12 días, a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y con fotoperiodo de 16:8 (L:O).

Adicionalmente con el objetivo de estudiar el efecto que tendría la mezcla de estas calidades de luz (azul y roja) sobre la acumulación simultánea del carotenoide fucoxantina y EPA, se estudió la mezcla de la calidad de luz roja y azul, en la proporción de 50:50.

3.- Monitoreo de los parámetros del crecimiento y fisiológicos:

Para la medición del crecimiento del cultivo y los parámetros fisiológicos se realizó:

- a) *Conteo celular*: se realizó en cámara Neubauer con un microscopio óptico, cada 48 o 74 horas. Los resultados fueron expresados como densidad celular por volumen de cultivo (células/ml).

Con los datos obtenidos se construyen las curvas de crecimiento, determinando la tasa máxima de crecimiento, K_{max} (divisiones día⁻¹) durante la fase logarítmica de acuerdo a Guillard, 1973, expresando el resultado como divisiones por día:

$$K = (3.322/t_2 - t_1) \times (\text{Log } N_2/N_1)$$

Donde N_2/N_1 corresponden al número de células por ml en los días

$t_2 - t_1$ respectivamente. Además, de la curva de crecimiento se estimó la densidad celular máxima de cada cultivo tratado, incluido los cultivos controles.

- b) *Peso seco*: En el último día de cada cultivo, se secaron filtros de nitrocelulosa (de poro 0,45 μm) por 24 horas en una estufa a 80°C. Posteriormente, se enfriaron los filtros en un desecador, se pesaron y luego se filtró a través de ellos una alícuota de 10 ml de cultivo lavando con 10 ml de formiato de amonio 0.5 M. Luego, los filtros con la biomasa retenida se secaron nuevamente a 80°C por 48 horas, para luego enfriarlos y pesarlos. Los valores obtenidos del peso de los filtros con biomasa se restaron con los valores obtenidos del filtro limpio, el valor obtenido se dividió por el volumen filtrado, correspondiendo este al peso seco de la biomasa algal por volumen de cultivo (mg/ml).
- c) *Fluorescencia in vivo de la clorofila a*: La medida de fotosíntesis *in vivo* basado en la determinación de la fluorescencia de la clorofila a asociada al fotosistema II (P680) fue cuantificada utilizando un fluorímetro de pulso de amplitud modulada (JUNIOR PAM) controlado por el software WinControl v3.25 (Walz GmbH, Germany). En cada tratamiento se recolectaron muestras de los cultivos cada 48 o 74 horas, 10ml de cada replica, depositándolos en cámaras de incubación para realizar curvas de luz rápida (RLC). Las muestras se mantuvieron en oscuridad por 15 min para determinar la fluorescencia basal (F_0), posterior a esto se aplicaron pulsos de saturación, determinando la fluorescencia máxima (F_m). Con los datos obtenidos se calculó el rendimiento cuántico máximo de PSII (F_v/F_m) de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m, \text{ siendo } \rightarrow F_v = F_m - F_0$$

En donde, F_0 es la fluorescencia basal con ambiente oscuro durante 15 min y F_m es la fluorescencia máxima después de una luz de saturación $>4000 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Luz actínica azul).

- d) *Rendimiento no fotoquímico*: Este parámetro se calculó utilizando los valores de fluorescencia obtenidos por el procedimiento RLC de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$$

Donde F_m es la fluorescencia máxima después de la aplicación del pulso de luz de saturación tras la incubación de 15 min en oscuridad y F_m' después de la aplicación del pulso de luz de saturación posterior 20 s de incubación en cada tratamiento evaluado. Los valores (ETR_{max} y NPQ_{max}) fueron obtenidos usando el modelo matemático tangencial propuesto por Eilers & Peeters 1988).

- e) *Tasa de transporte de electrones*: se utilizó como un estimador de la capacidad fotosintética o producción del cultivo (Kromkamp *et al.*, 2008; Figueroa *et al.*, 2013). Se calculó mediante la siguiente ecuación, expresada por unidad de área:

$$ETR = \Delta F/F'_m \times E \times A \times F_{II} \quad (\mu mol \text{ electrones } m^{-2} s^{-1})$$

Donde $\Delta F/F'_m$ es el rendimiento cuántico efectivo. E es la irradiancia incidente PAR y F_{II} es la fracción de clorofila relacionada con el PSII, siendo 0.8 para algas pardas (Figueroa *et al.* 2003). A corresponde a la absorptancia de los tratamientos evaluados calculada como se describe según lo indicado por Castro-Varela *et al.* (2021).

4.- Análisis bioquímicos:

El último día del periodo experimental (día 12), las células fueron cosechadas por centrifugación a 4.500 rpm por 6min a 4°C. Posteriormente la biomasa fue liofilizada por 48 hrs y almacenada a -20°C, hasta sus análisis:

- a) *Humedad*: En sobres de papel aluminio de 4x5cm se pesaron 30 mg de biomasa seca, se secaron en la estufa a 80°C por 3 días. Posteriormente, se enfriaron los sobres en un desecador y se pesaron para estimar la humedad de la biomasa seca.
- b) *Extracción y cuantificación de lípidos totales*: para la determinación del contenido de lípidos totales se tomaron entre 80 - 90 mg de biomasa, los cuales se extrajeron con solventes orgánicos de acuerdo con la metodología descrita por Bligh & Dyer, 1959. La biomasa se extrajo en viales de plásticos adecuados para el homogeneizador FastPrep, agregando 1 mL de metanol y dos esferas de homogeneización. Fueron aplicados 8 ciclos de 4,0 m/s, 20 seg/ciclo. El lisado se transfirió a un tubo de vidrio al cual se agregó 1,5 ml de cloroformo y 0,8 ml de agua destilada. Los tubos se homogenizaron en vortex por 30 seg, se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron a 4°C por 24 h. Posterior a esto, se centrifugaron a 3.200 rpm durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante y transfiriéndolo a un tubo limpio. Luego, se adiciono al sobrenadante 1,5 ml de cloroformo y 1,6 ml de agua destilada (agitando hasta obtener una solución homogénea y densa), la solución se centrifugo a 3.200 rpm durante 10 min, retirando y eliminando la fase superior acuosa. La fase clorofórmica se traspasó a tubos de vidrio limpios para finalmente, agregar 500 μ l de acetona para eliminar las trazas del agua. Las muestras se dejaron evaporar en estufa a 38°C por 3 días. Las muestras secas de lípidos se resuspendieron en 1 mL de cloroformo:metanol 1:2. El contenido de lípidos totales de las biomazas se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Marsh y Weinstein (1966), en las muestras de lípidos resuspendidas y analizadas en submuestras de 50 μ l, por triplicado, para cada tubo. Luego, se agregó 2 ml de H₂SO₄ concentrado a cada tubo (incluyendo un tubo sin lípidos que se usa de blanco). Los tubos se taparon con papel aluminio para posteriormente incubarlos en estufa a 200°C durante 15 minutos y luego enfriarlos a -20°C durante 5 minutos. Posteriormente se añadió 8 ml de agua destilada a cada tubo, homogenizando y nuevamente enfriarlos a -20°C. Por

último, se procedió a leer las absorbancias de cada muestra en un espectrofotómetro a 375 nm extrapolando los valores en una curva de calibración preparada con el triglicérido tripalmitina como, estándar.

- c) *Análisis de ácido grasos*: Se realizó por cromatografía de gases. Se tomaron alícuotas de 700 µl de la muestra de lípidos totales obtenida en b) los cuales se evaporaron con N₂(g). Los lípidos fueron derivatizados por adición de 1,3 ml de trifluoruro de boro (BF₃) al 14% en metanol incrementando la volatilidad de la muestra. Luego, el tubo que contenía la mezcla anterior se llevó a un baño de agua de 90°C por 2.5 min, posteriormente se agregó 2 ml de hexano y 1 ml de agua, agitando en vortex durante 1 min, se centrifugó por 10 min a 3200 rpm para obtener 2 fases, una fase apolar donde se disolvieron los ácidos grasos y otra fase polar, concentrado con compuestos no lipídicos. La fase apolar se extrajo y traspasó a un nuevo vial, donde se evaporó con nitrógeno gas. La muestra seca se resuspendió con 100 µl de hexano y se inyectó una alícuota de 2 µl en una columna SPB-PUFA del cromatógrafo de gas Clarus 600 PerkinElmer con detector FID (Detector de ionización de llama). Luego de este procedimiento, se obtuvo un cromatograma, donde se realizó una identificación de ácidos grasos mediante la comparación de sus tiempos de retención con respecto a estándares (Sigma Aldrich) y su cuantificación relativa se llevó a cabo mediante la integración de las áreas bajo los peaks, siendo esos valores expresados como porcentaje del respectivo ácido graso con respecto a los ácidos grasos totales detectados. Los ácidos grasos tridecanoico y nonadecanoico se adicionaron a cada muestra como estándares internos para la cuantificación absoluta de cada ácido graso en la biomasa de *P. tricornutum* (expresado en mg de cada ácido graso por g de biomasa seca).
- d) *Extracción de clorofila y carotenoides totales*: Se extrajeron mediante homogenizador automático (FastPrep), a partir de 30 mg biomasa seca, con 1 ml de acetona al 90%, de acuerdo con el protocolo descrito por Strickland & Parsons, 1972. La homogeneización se realizó en dos ciclos a 4,0 m/s durante 20 segundos, posteriormente se aplicó una centrifugación a 8.000 rpm durante 5 minutos. Este procedimiento se repitió hasta que el solvente no tuviera color. Se obtuvo un sobrenadante de las muestras, las que se traspasaron y aforaron con acetona 90% en matraces aforados de 5 o 10 ml. Los carotenoides y clorofilas totales se cuantificaron mediante espectrofotometría, de acuerdo con las expresiones matemáticas propuestas por Wegmann & Metzner. 1971, generando una lectura en diversas longitudes de onda (750; 663; 644; 630; 480; 453 y 445nm), que permitieron cuantificar las distintas clorofilas, carotenoides totales y fucoxantina.
- e) *Determinación de fenoles totales*: se extrajo 30 mg de biomasa seca con 1 ml de metanol al 80% v/v, mediante un homogenizador automático (FastPrep) con una esfera de cerámica, de acuerdo a la adaptación del método descrito por Waterhouse, A.L., 2002. La homogeneización se realizó en un total de ocho ciclos a 4.0 m/s durante 20 segundos. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se separó por triplicado en tubos de vidrios, con un volumen de 25 µl. A cada tubo se le añadió 1,8 ml de agua destilada y 125 µl de reactivo Folin-Ciocalteu, con una incubación de las muestras por 3 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadió 375 µl de Na₂CO₃ 20% y 225 µl de agua destilada a cada tubo, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se realizaron lecturas de la absorbancia de la

solución, en un espectrofotómetro a una longitud de 760 nm, calculando las concentraciones de fenoles totales en función de una curva de calibración preparada con ácido gálico como estándar.

f) *Determinación de carbohidratos totales:* Para la determinación de carbohidratos totales, se preparó el reactivo Antrona-H₂SO₄: a partir de 0,200 g de Antrona en 100 ml de H₂SO₄ al 96%. Se utilizó 30 mg de biomasa microalgal seca, se homogenizó con 1 ml de agua destilada y una esfera de cerámica en homogeneizador mecánico FastPrep-24, realizando 8 ciclos a 4,0 m/s durante 20 segundos. Luego se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 10.000 rpm, los sobrenadantes obtenidos se transfirieron a nuevos tubos eppendorf. De este sobrenadante se realizó una dilución 1:100. Posteriormente, las disoluciones se repartieron por triplicado con un volumen de 250 µl, agregando 500 µl del reactivo antrona-H₂SO₄, agitando los tubos en vortex y dejando enfriar a temperatura ambiente, finalmente se incubaron en placa calefactora a 100°C y se dejó enfriar los tubos a temperatura ambiente, para posteriormente realizar la lectura espectrofotométrica con absorbancias a 625 nm. El cálculo de la concentración de carbohidratos totales fue en función a la ecuación de la recta en la curva de calibración, preparada con glucosa como estándar.

g) *Determinación de proteínas:* Según el método descrito por Lowry (1951), primero se requirió de la preparación de los siguientes reactivos para la extracción de proteínas totales:

- Solución A: Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1M
- Solución B1: CuSO₄ x 5H₂O al 0,5%
- Solución B2: Tartrato de Sodio y Potasio al 1%
- Solución C: 49 ml de solución A + 1 ml de solución B1 + 1 ml de solución B2
- Solución D: Reactivo de Folin Ciocalteau 50% v/v en agua destilada.

Para el análisis, se utilizó 30 mg de biomasa seca los cuales se hidrolizaron con 5 ml de NaOH 0,1 M, aplicando una agitación en vortex por 30 segundos. Luego, los tubos se incubaron a 100°C en placa calefactora por 1 hora, con un tubo de muestra control (NaOH). Posterior a enfriar los tubos, se agitaron en vortex y se recolectó una alícuota de 1 ml de muestra en tubos Eppendorf, los cuales fueron centrifugados a 7.000 rpm durante 15 minutos. Se recolectaron los sobrenadantes resultantes, depositándolos en tubos nuevos. Los sobrenadantes se repartieron por triplicado en un volumen de 25 µl, a tubos de vidrio. Se añadió un volumen de 975 µl de NaOH 0,1 M y 1 ml de "solución C", agitando en vortex e incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se les agregó 100 µl de "solución D", agitando en vortex y dejando incubar en oscuridad por 30 minutos. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancias en espectrofotómetro a 750 nm. Se calcularon las concentraciones de proteínas totales de acuerdo con la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración construida previamente a partir de seroalbúmina de bovino (BSA) como estándar.

5.- Análisis estadísticos:

El efecto de la calidad de la luz sobre el crecimiento, y composición bioquímica de *P. tricornutum* fue evaluado mediante ANOVA de una vía. Para los parámetros fotosintéticos se aplicó un ANOVA de dos vías ya que se evaluó también la interacción de la calidad de luz con el día en que se realizó la medición. En este último caso los factores considerados fueron tiempo (con 6 niveles) y calidad de luz (con 4 niveles).

La significancia estadística de las diferencias se determinó mediante el test *a posteriori* de Tukey, todos los datos fueron analizados para la normalidad y homogeneidad de varianza, verificándolo con el test de supuesto de normalidad de datos (Shapiro-Wilk) requerido para la aplicación de la metodología descrita. Se considero un valor de $p \leq 0,005$ para establecer la significancia estadística de las diferencias (Sokal & Rohlf, 1995). Los análisis fueron realizados usando softwares Sigma Plot version 14.5 y SPSS versión 21 (IBM, USA.)

RESULTADOS

Evaluación del crecimiento y parámetros fotobiológicos de la cepa, en distintas calidades de luz y distintas irradiancias

En la Figura 1 se observan las curvas de crecimiento de cada tratamiento de calidad de luz (blanca, azul y roja) a distintas irradiancias, donde la fase estacionaria fue alcanzada al día 11 de los cultivos, la fase exponencial de los cultivos se observó entre los días 2 y 4. En esta primera etapa, se determinó la irradiancia óptima que promovió el crecimiento del cultivo bajo las tres calidades de luz. La luz blanca se utilizó como control.

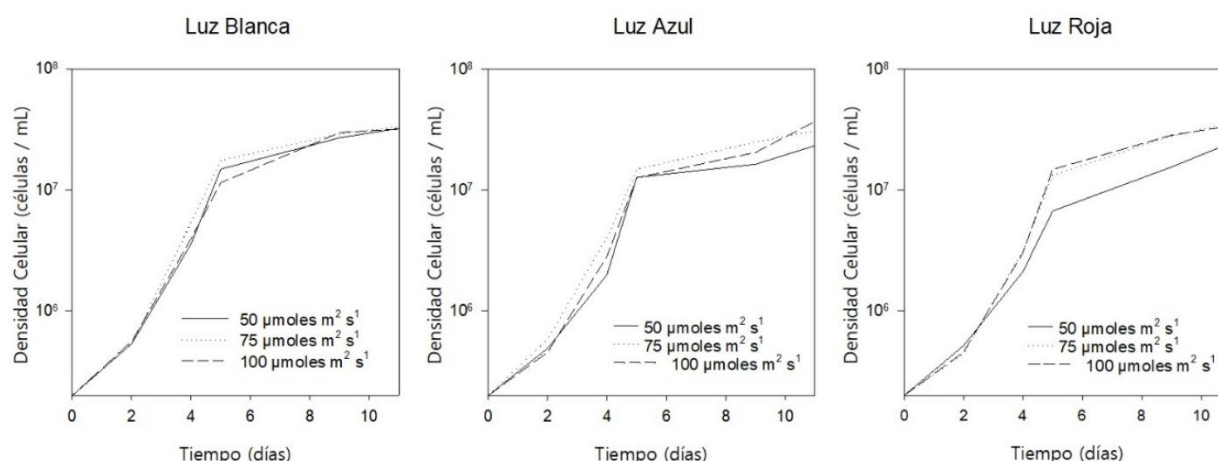


Figura 1: Curvas de crecimiento de cepa CCM-UdeC 264, a diferentes irradiancias en la calidad de luz blanca, azul y roja

Al finalizar los 11 días de cultivo se determinó la biomasa producida por volumen de cultivo en cada condición experimental, tal como se muestra en la tabla 1.

En la Tabla 1 se resumen los parámetros de crecimiento de estos experimentos.

Tabla 1: Parámetros de crecimiento de cepa CCM-UdeC 264 expuesta a tratamientos con diferentes irradiancias (50, 75, 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a distintas calidades luz (blanca, azul y roja) (sin réplicas).

Irradiancia	Densidad celular máxima (cel/ml)	Tasa de crecimiento Kmax (div/día)	Peso seco (mg/ml)
Luz Blanca			
50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	32.300.000	0,91	0,72
75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	33.500.000	1,11	0,66
100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	31.800.000	0,94	0,75
Luz Azul			
50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	23.200.000	0,67	0,48
75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	30.700.000	0,93	0,72
100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	36.800.000	0,88	0,75
Luz Roja			
50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	24.500.000	0,68	0,38
75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	36.000.000	0,93	0,63
100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	33.800.000	0,91	0,68

En la figura 2 se muestran los valores del parámetro fotobiológico F_v/F_m , medidos durante estos experimentos.

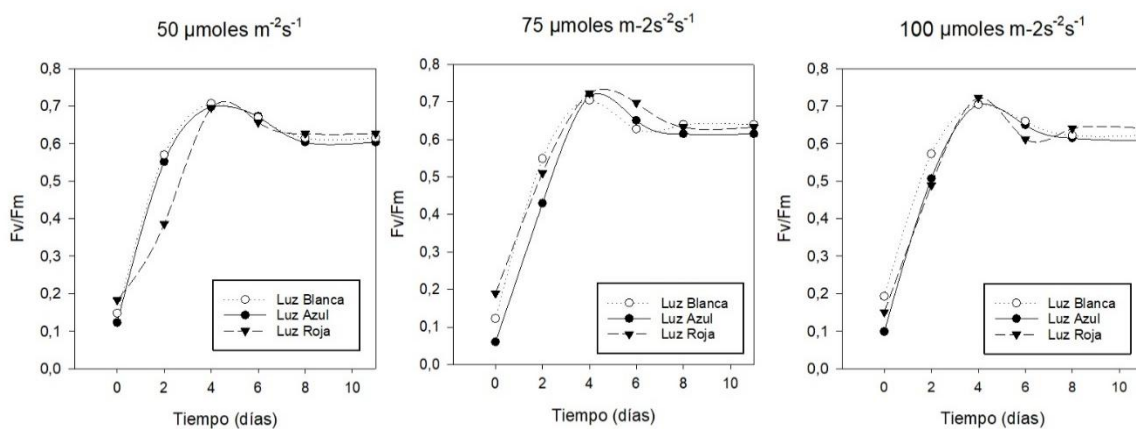


Figura 2: Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) de la cepa CCM-UdeC 264 expuesta a tratamientos con diferentes irradiancias ($50, 75, 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a distintas calidades luz (blanca, azul y roja).

El indicador del rendimiento fotosintético presento resultados que muestran a la cepa en un principio con valores de F_v/F_m menores a 0,2; sin embargo, a partir del día 7, este parámetro alcanzo valores de 0,6 evidenciando que los cultivos no se encontraban estresados y probablemente se habían aclimatado al respectivo tratamiento de luz evaluado.

Escalamiento del cultivo en volumen de 1L, con la irradiancia seleccionada, en distintas calidades de luz.

En esta segunda etapa, se cultivó la cepa *P. tricornutum* CCM-UdeC 264 en condiciones de diferentes calidades de luz, con la irradiancia seleccionada de 100 . En esta etapa se incorporó un nuevo tratamiento que incluyó una mezcla 1:1 de luz roja y azul.

Se obtuvieron curvas de crecimiento, en donde se observa que la fase exponencial se encuentra entre los días 2 y 5, alcanzando la fase estacionaria en el día 12.

Curvas de crecimiento cepa CCM-UdeC 264: Tratamiento de calidades de luz

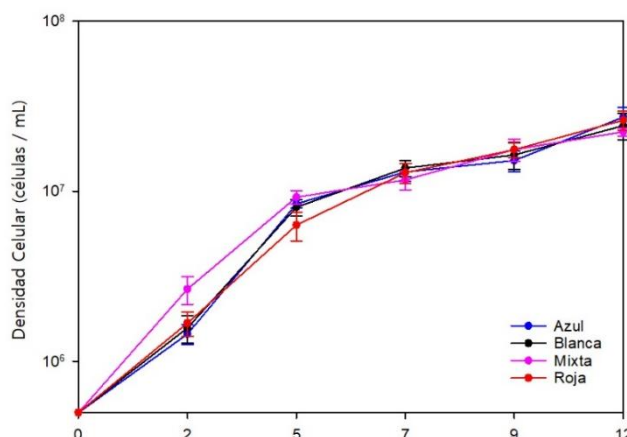


FIGURA3: Curvas de crecimiento de la cepa CCM-UdeC 264, bajo todas las calidades de luz: blanca, azul, roja y mixta (azul: roja), con una irradiancia de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

No se observaron diferencias notorias en la forma de las curvas de crecimiento en los distintos tratamientos (Figura 3). En la Tabla 2 se muestran los parámetros de crecimiento de estos cultivos. Los parámetros densidad celular máxima y peso seco no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, mientras que la tasa de crecimiento fue significativamente mayor en los tratamientos de luz roja y mixta (Tabla 2).

Tabla 2: Tabla comparativa de parámetros de crecimientos de los cultivos de un litro en las diferentes calidades de luz estudiadas en la cepa CCM-UdeC 264. Los valores son expresados en promedios \pm desviaciones estándar por tratamiento. Diferentes letras como superíndices representan diferencias significativas ($P < 0,05$) según los resultados del ANOVA y la prueba de Tukey.

Calidad de luz	Densidad celular máxima $\times 10^7$ (cel/ml)	Tasa de crecimiento Kmax (div/día)	Peso Seco (mg/ml)
Luz Blanca	$2,2 \pm 0,1^a$	$0,81 \pm 0,08^a$	$0,57 \pm 0,04^a$
Luz Azul	$2,7 \pm 0,3^a$	$0,85 \pm 0,06^a$	$0,58 \pm 0,04^a$
Luz Roja	$2,6 \pm 0,3^a$	$0,64 \pm 0,09^b$	$0,51 \pm 0,08^a$
Luz Mixta	$2,2 \pm 0,1^a$	$0,60 \pm 0,10^b$	$0,46 \pm 0,09^a$

Análisis fotobiológicos:

A continuación, se muestran los parámetros fotobiológicos evaluados en esta investigación:

a) Rendimiento cuántico óptimo:

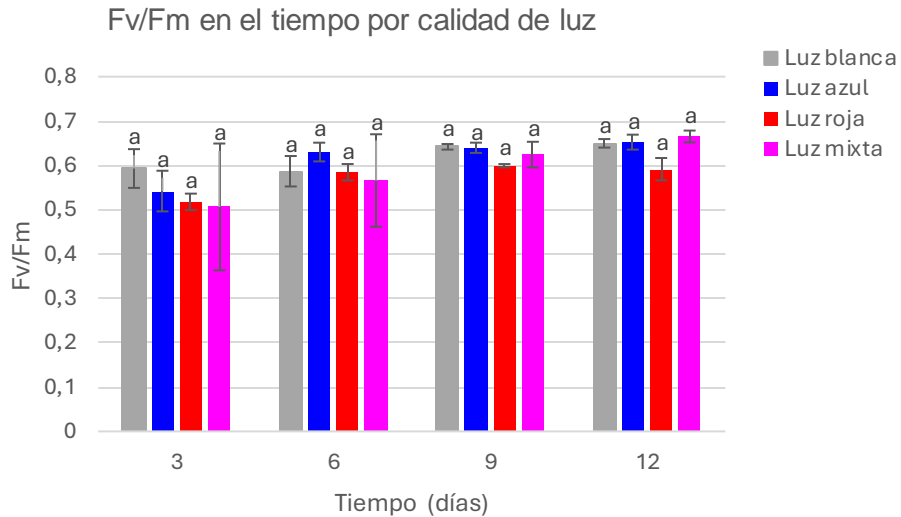


FIGURA4: Rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) de las diferentes calidades de luz a una irradiancia de $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en función al tiempo. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0,05$) según los resultados del análisis no paramétrico Kruskal Wallis. Las barras de error representan la desviación estándar.

La variable F_v/F_m , indicador del rendimiento fotosintético, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre distintas calidades de luz ni entre distintos tiempos de cultivo (Fig. 4)

b) Rendimiento no fotoquímico:

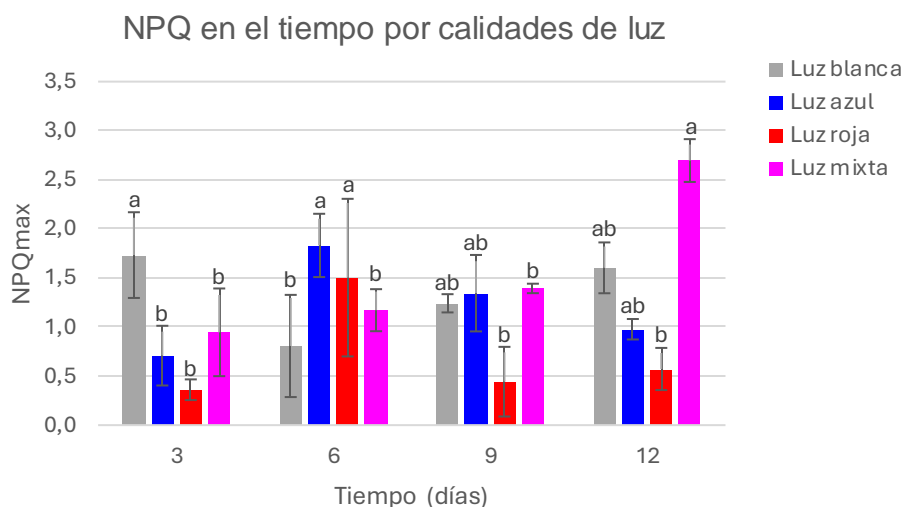


FIGURA 5: Enfriamiento no fotoquímico máximo (NPQmax) de las diferentes calidades de luz a una irradiancia de $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en función al tiempo. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0,05$) según los resultados del ANOVA de dos vías y la prueba de Tukey. Las barras de error representan la desviación estándar.

La figura 5 muestra la variable NPQ, un indicador de la activación de los sistemas de fotoprotección (NPQ). Se evaluó la interacción de cada calidad de luz con respecto a los días experimentales, esta variable mostró una alta variabilidad entre las calidades de luz en función al tiempo. Respecto al control (luz blanca), la luz mixta mostró una tendencia al aumento desde el día 3 hasta el día 12, observándose un incremento en la actividad de los sistemas de fotoprotección; sin embargo, sólo se observaron diferencias significativas para este tratamiento con respecto a la luz roja, el día 12 de cultivo (Figura 5).

a) Tasa de transporte de electrones absoluta:

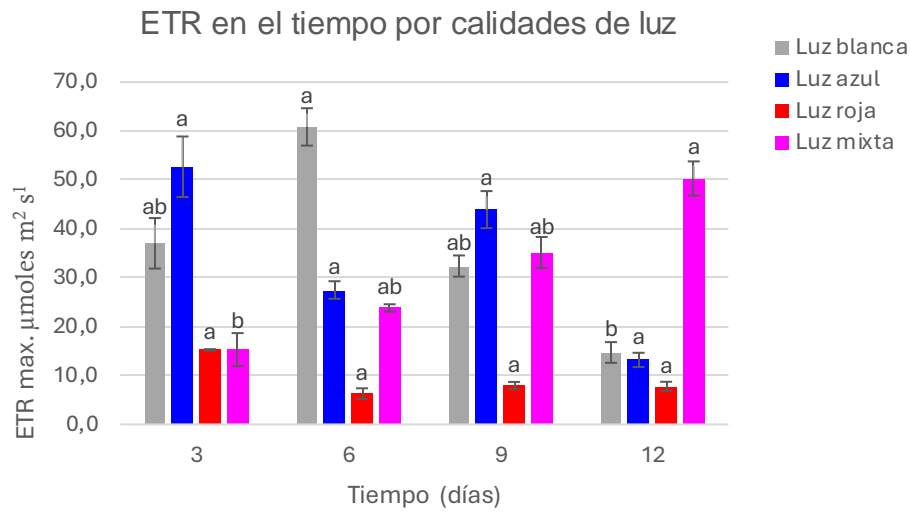


FIGURA 6: Velocidad máxima de transporte de electrones ($ETR_{\text{máximo}}$) de las diferentes calidades de luz a una irradiancia de $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en función al tiempo. Diferentes letras representan diferencias significativas ($P < 0,05$) según los resultados del ANOVA de dos vías y la prueba de Tukey. Las barras de error representan el error estándar.

Respecto a la velocidad máxima de transporte de electrones en el fotosistema II (ETR_{max}) los valores más bajos para este parámetro se obtuvieron en la calidad de luz roja, sin diferencias significativas en los distintos tiempos de cultivo. Por otro lado, los cultivos en luz mixta fueron los únicos que mostraron una tendencia al aumento a medida que pasaban los días de cultivo. Considerando que el ETR es un indicador de producción fotosintética, el tratamiento con luz mixta alcanza altos índices de rendimiento ($50,29 \pm 3,50 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Figura 6).

Análisis bioquímicos:

Al cumplir el día 12 de cultivo, se realizó la cosecha de los cultivos para proceder a conocer la concentración de biomoléculas en la biomasa de cada tratamiento.

a) Fenoles totales:

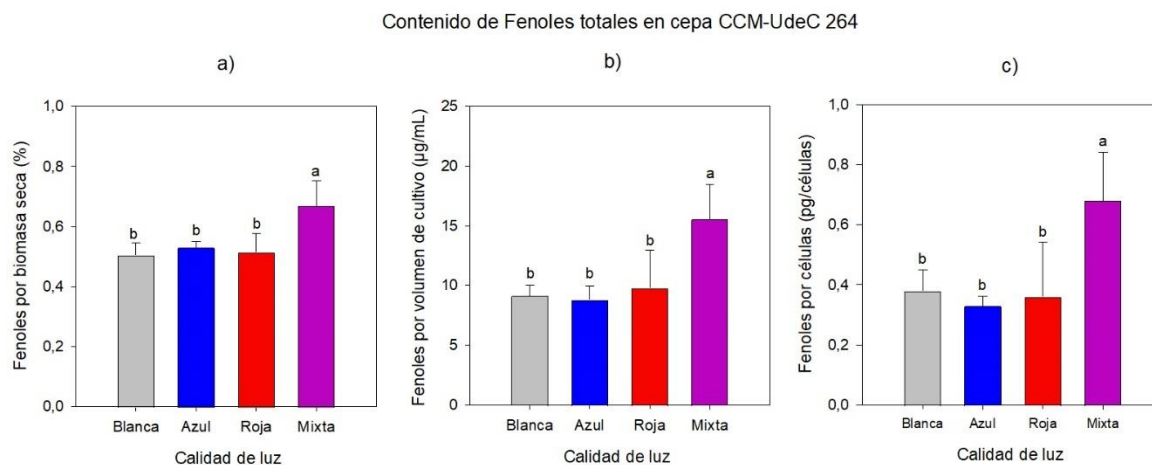


FIGURA 7: Contenido de fenoles totales en la cepa CCM-UdeC 264 cultivada bajo diferentes calidades de luz, con irradiancia de $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Expresado como a) Contenido de fenoles extraídos de biomasa seca (%). b) Fenoles por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). c) Fenoles por célula (pg cel^{-1}). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

En la figura 7 se puede observar el contenido de fenoles totales expresado por biomasa seca, por volumen de cultivo y por célula. La calidad de luz mixta mostró la mayor acumulación de fenoles en las tres expresiones ($0,69\% \pm 0,04$; $15,59 \mu\text{g ml}^{-1} \pm 2,59$ y $0,70 \text{pg cel}^{-1} \pm 0,14$) en comparación con las otras calidades de luz: blanca, azul y roja, las cuales no muestran diferencias significativas entre ellas para el contenido fenólico al finalizar el cultivo.

b) *Carbohidratos totales:*

La figura 8 muestra el contenido de carbohidratos presentes en los cultivos

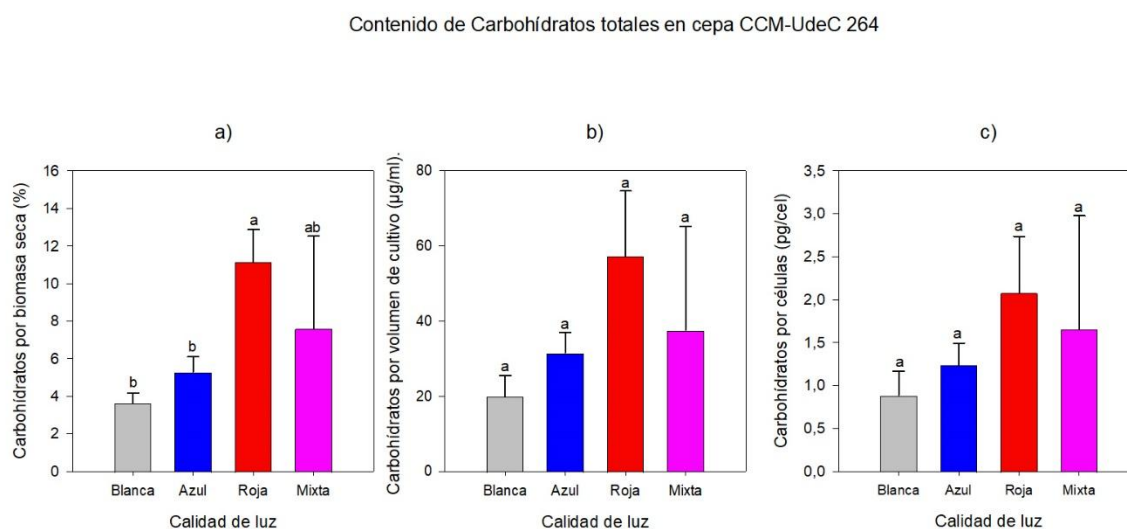


FIGURA8: *Contenido de carbohidratos totales en la cepa CCM-UdeC 264, bajo diferentes calidades de luz con irradiancia de $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$. a) Contenido de carbohidratos extraídos de biomasa seca (%). b) Carbohidratos por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). c) Carbohidratos por célula (pg cel^{-1}). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) según los resultados del ANOVA. Las barras de error representan la desviación estándar.*

En la figura 8 se puede observar que el contenido de carbohidratos totales por volumen de cultivo y por célula no cambió bajo las diferentes calidades de luz. Por otro lado, expresados por biomasa seca, se observó una mayor acumulación de carbohidratos totales cuando la cepa estuvo expuesta a la calidad de luz roja, ya sea monocromática ($10,98 \pm 1,87 \%$), o en mezcla con luz azul ($8,32 \pm 4,20\%$), con respecto a la luz blanca y azul ($3,68 \pm 0,51\%$ y $5,04 \pm 1,06\%$, respectivamente)

c) *Proteínas totales:*

En la figura 9 se observa de manera gráfica el contenido de proteínas totales presentes en los cultivos en las diferentes calidades de luz

Contenido de Proteínas totales en cepa CCM-UdeC 264

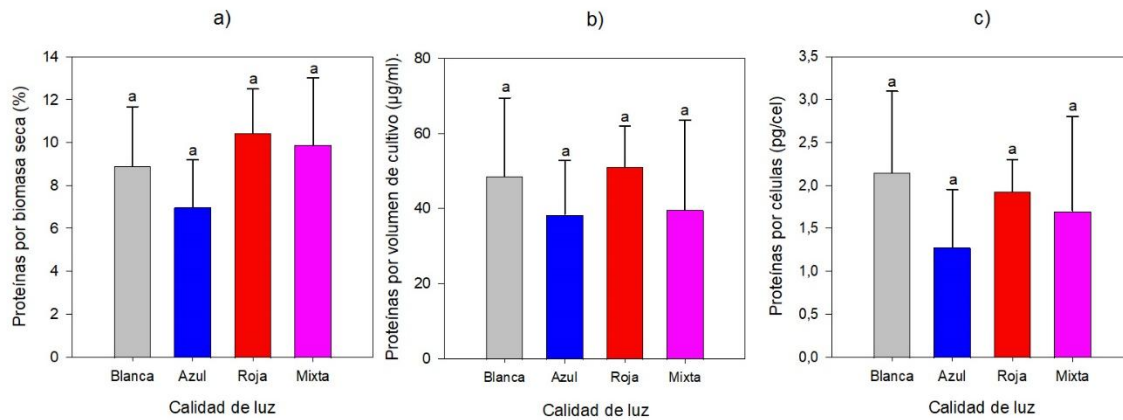


FIGURA9: *Contenidos de proteínas totales de P. tricornutum, bajo diferentes calidades de luz a una irradiancia de 100 µmoles m⁻²s⁻¹. Expresado como a) Contenido de Proteínas por biomasa seca (%). b) Proteínas por volumen de cultivo (µg ml⁻¹). c) Proteínas por célula (pg cel⁻¹). La misma letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas (p ≥ 0,05). Los datos representan el promedio ± desviación estándar en cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar.*

El contenido de proteínas de la biomasa de la cepa cultivada en los distintos tratamientos de luz no vario significativamente, en ninguna de las tres formas de expresión, tal como muestra la Figura 9.

d) *Contenido de clorofilas y carotenoides:*

La figura 10 muestra el contenido de clorofila a, clorofila c (c₁+c₂), carotenoides totales y fucoxantina en los diferentes tratamientos.

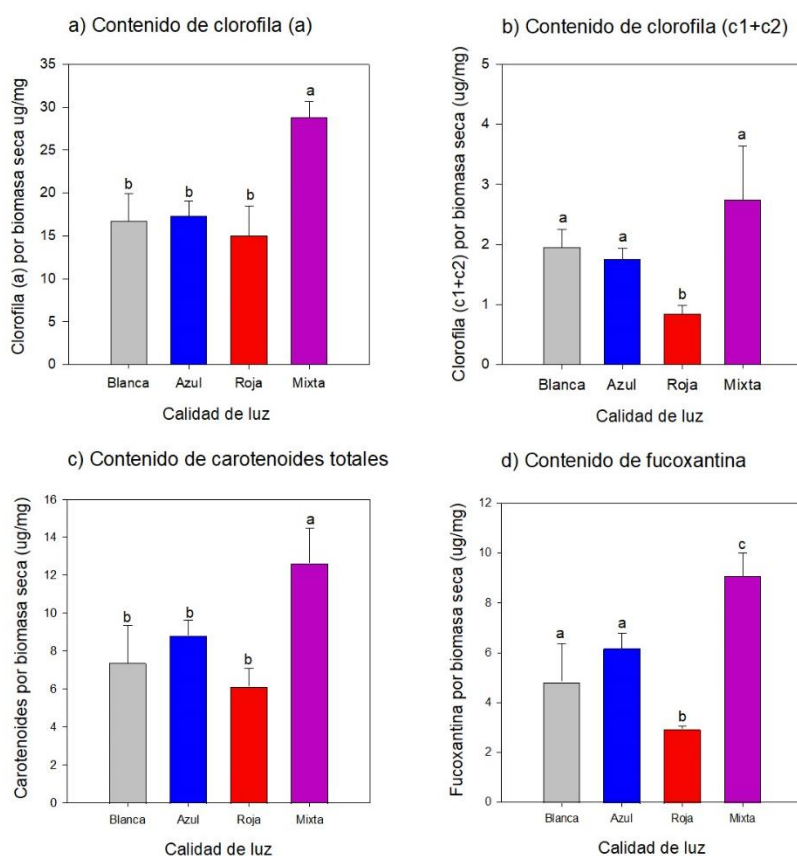


FIGURA 10: *Contenido de a) Clorofila (a) b) clorofila (c₁+c₂) c) carotenoides totales y d) fucoxantina en la biomasa seca total de la cepa CCM-UdeC 264 bajo diferentes calidades de luz, con irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Las barras de error representan la desviación estándar.*

La clorofila a y carotenoides totales no tuvieron diferencias significativas en luz blanca, azul y roja, mientras que en luz mixta en estos parámetros aumentaron significativamente (Fig. 10.a y c). Respecto a las clorofilas c₁+c₂ no tuvo diferencias en las luces blanca, azul y mixta, mientras que bajo la luz roja disminuyó significativamente el contenido (Fig.10. b). En el contenido de la fucoxantina, la luz blanca y azul no se observan diferencias significativas, mientras que la luz roja disminuyó significativamente en comparación con las otras tres calidades de luz, destacando la luz mixta nuevamente un aumento significativo (Fig.10.c).

e) *Contenido de lípidos totales:*

La figura 11 muestra el contenido de lípidos totales de la cepa en los distintos tratamientos de luz, expresados por biomasa seca, por volumen de cultivo y por célula.

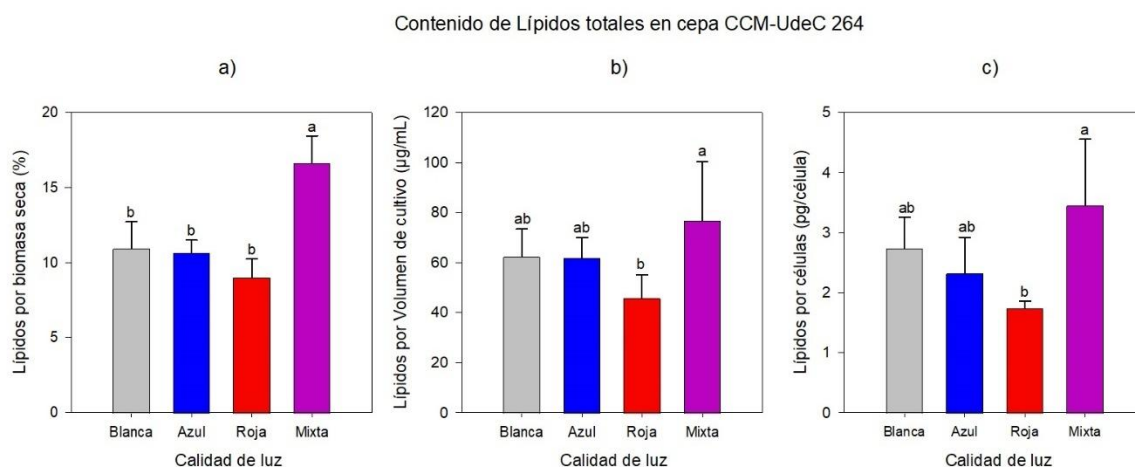


Figura 11: *Contenido de lípidos totales de *P. tricornutum*, bajo diferentes calidades de luz bajo una irradiancia de $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Expresado como a) Contenido de lípidos totales por biomasa seca (%). b) Lípidos totales por volumen de cultivo ($\mu\text{g ml}^{-1}$). c) Lípidos totales por célula (pg cel^{-1}). Superíndices con igual letra demuestran Diferentes letras indican que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Las barras de error representan la desviación estándar.*

Al expresar los valores como lípidos por biomasa seca, la luz mixta incrementó el contenido de lípidos de la cepa, siendo este incremento estadísticamente significativo. Por otro lado, los análisis expresados en lípidos totales por volumen de cultivo y por célula mostraron que la calidad de luz roja induce una disminución de la acumulación de lípidos totales en la cepa en comparación con la calidad de luz mixta. Y paralelamente podemos observar que no existen diferencias significativas entre las calidades de luz blanca ($62,50 \pm 11,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $2,75 \pm 0,51 \text{pg cel}^{-1}$) y la luz azul ($62,00 \pm 8,04 \mu\text{g ml}^{-1}$ y $2,33 \pm 0,59 \text{pg cel}^{-1}$) al comparar con calidad de luz roja (Fig. 11)

f) Perfil de ácidos grasos

La tabla 3 muestra el contenido y perfil de ácidos grasos de la cepa con los diferentes tratamientos experimentales

Tabla 3: Análisis de ácidos grasos presentes en la biomasa de la cepa CCM-UdeC 264 cultivada en distintas calidades de luz. Los valores son expresados como promedio \pm desviación estándar. Para cada tratamiento realizado se obtuvieron valores expresados como mg/g por biomasa seca y % de cada ácido graso con respecto a los ácidos grasos totales. Letras distintas en los superíndices indican diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

Ácido graso		Luz Blanca		Luz Azul		Luz Roja		Luz Mixta	
		(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)	(mg/g)	(%)
Saturados									
C12:0	Láurico	0,33 \pm 0,11 ^b	1,23 \pm 0,16 ^a	0,29 \pm 0,06 ^b	0,93 \pm 0,21 ^a	0,28 \pm 0,11 ^b	1,01 \pm 0,43 ^a	0,64 \pm 0,16 ^a	1,45 \pm 0,11 ^a
C14:0	Mirístico	2,28 \pm 0,50 ^b	7,56 \pm 0,10 ^{ab}	2,46 \pm 0,05 ^b	8,01 \pm 0,19 ^{ab}	2,12 \pm \pm 0,32 ^b	7,41 \pm 0,40 ^b	3,85 \pm 0,36 ^a	8,13 \pm 0,20 ^a
C15:0	Pentadecanoico	0,11 \pm 0,01 ^{ab}	0,30 \pm 0,00 ^a	0,09 \pm 0,01 ^{ab}	0,30 \pm 0,01 ^a	0,07 \pm 0,01 ^a	0,26 \pm 0,01 ^b	0,14 \pm 0,01 ^b	0,29 \pm 0,02 ^a
C16:0	Palmitico	4,58 \pm 1,13 ^a	15,07 \pm 0,44 ^a	5,09 \pm 0,09 ^a	16,80 \pm 0,21 ^a	4,67 \pm 1,19 ^a	16,20 \pm 2,28 ^a	6,86 \pm 0,70 ^a	14,56 \pm 0,33 ^a
C18:0	Esteárico	0,06 \pm 0,01 ^{ab}	0,19 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,01 ^{ab}	0,20 \pm 0,02 ^a	0,05 \pm 0,01 ^b	0,18 \pm 0,02 ^a	0,08 \pm 0,00 ^a	0,16 \pm 0,02 ^a
Total Saturados		7,35 \pm 1,74 ^{ab}	24,35 \pm 0,32 ^a	7,99 \pm 0,16 ^a	26,24 \pm 0,26 ^a	7,20 \pm 1,46 ^a	25,05 \pm 2,27 ^a	11,57 \pm 1,27 ^b	24,58 \pm 0,34 ^a
Monoinsaturados									
C16:1	Palmitoleico	10,32 \pm 2,77 ^b	34,28 \pm 0,98 ^b	10,20 \pm \pm 0,22 ^b	33,46 \pm 0,33 ^b	11,58 \pm 1,70 ^{ab}	40,44 \pm 1,62 ^a	15,70 \pm 1,73 ^a	33,83 \pm 0,90 ^b
C18:1n9c	Oleico	0,22 \pm 0,06 ^a	0,73 \pm 0,05 ^a	0,30 \pm 0,01 ^a	1,02 \pm 0,06 ^a	0,38 \pm 0,20 ^a	1,28 \pm 0,52 ^a	0,46 \pm 0,10 ^a	1,01 \pm 0,04 ^a
Total Monoinsaturados		10,54 \pm 2,83 ^{ab}	35,02 \pm 0,99 ^b	10,50 \pm 0,22 ^{ab}	34,48 \pm 0,30 ^b	11,95 \pm 1,90 ^{bc}	41,72 \pm 2,12 ^a	16,16 \pm 1,83 ^c	34,84 \pm 0,87 ^b
Polisaturados									
C18:2n6c	Linoleico	0,98 \pm 0,16 ^b	3,30 \pm 0,26 ^a	1,18 \pm 0,02 ^b	3,81 \pm 0,03 ^b	0,69 \pm 0,15 ^c	2,39 \pm 0,28 ^c	1,57 \pm 0,13 ^a	3,38 \pm 0,17 ^{ab}
C18:3n6	gama-linolénico	0,07 \pm 0,03 ^a	0,23 \pm 0,04 ^a	0,09 \pm 0,00 ^a	0,31 \pm 0,02 ^a	0,10 \pm 0,03 ^a	0,34 \pm 0,08 ^a	0,13 \pm 0,03 ^a	0,30 \pm 0,03 ^a
C18:3n3	alfa-linolénico	0,33 \pm 0,03 ^b	1,14 \pm 0,28 ^a	0,36 \pm 0,00 ^b	1,14 \pm 0,05 ^a	0,18 \pm 0,04 ^c	0,64 \pm 0,18 ^b	0,60 \pm 0,07 ^a	1,16 \pm 0,06 ^a
C20:3n6	cis-8,11,14-Eicosatrienoico	0,03 \pm 0,00 ^a	0,06 \pm 0,3 ^a	0,02 \pm 0,00 ^a	0,06 \pm 0,02 ^a	0,02 \pm 0,01 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a	0,02 \pm 0,00 ^a	0,05 \pm 0,01 ^a
C20:4n6	Araquidónico	0,34 \pm 0,09 ^{ab}	1,10 \pm 0,06 ^{ab}	0,43 \pm 0,02 ^a	1,59 \pm 0,39 ^a	0,23 \pm 0,09 ^b	0,79 \pm 0,23 ^b	0,49 \pm 0,03 ^a	1,13 \pm 0,18 ^{ab}
C20:5n3	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico	10,47 \pm 1,97 ^b	34,31 \pm 0,67 ^a	10,12 \pm 0,52 ^b	32,00 \pm 0,17 ^{ab}	8,07 \pm 0,53 ^b	28,56 \pm 4,50 ^b	16,38 \pm 1,12 ^a	34,05 \pm 0,61 ^{ab}
C22:6n3	cis-4,7,10,13,16,16-Docosahexaenoico	0,15 \pm 0,02 ^b	0,50 \pm 0,06 ^a	0,13 \pm 0,02 ^b	0,36 \pm 0,03 ^a	0,13 \pm 0,01 ^b	0,45 \pm 0,04 ^a	0,26 \pm 0,05 ^a	0,52 \pm 0,11 ^a
Total Poliinsaturados		12,36 \pm 2,29 ^b	40,64 \pm 1,11 ^{ab}	12,32 \pm 0,57 ^b	39,28 \pm 0,40 ^{ab}	9,41 \pm 0,37 ^b	33,23 \pm 4,17 ^a	19,45 \pm 1,27 ^a	40,58 \pm 0,59 ^b

En cuanto al contenido de ácidos grasos saturados totales, se observó que la luz mixta presento un mayor contenido en términos de mg/g de biomasa, en cambio en el contenido expresado como porcentaje dentro del perfil de ácidos grasos no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos. Para los ácidos grasos monoinsaturados expresado en mg/g, el cultivo bajo la calidad de luz mixta mostró un contenido superior en comparación con la luz blanca y azul; sin embargo, el contenido de ácidos grasos monoinsaturados, expresado en porcentaje, presenta un mayor contenido bajo luz roja. En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados totales, la luz mixta presentó un contenido significativamente mayor, al expresarlo como mg/g, respecto a las demás calidades de luz. En el contenido expresado en porcentaje, la luz mixta presenta valores mayores en su contenido de poliinsaturados totales, solo en comparación con la luz roja (Tabla 3).

La figura 12 resume el efecto de la calidad de luz en el contenido y proporción de EPA en la cepa estudiada:

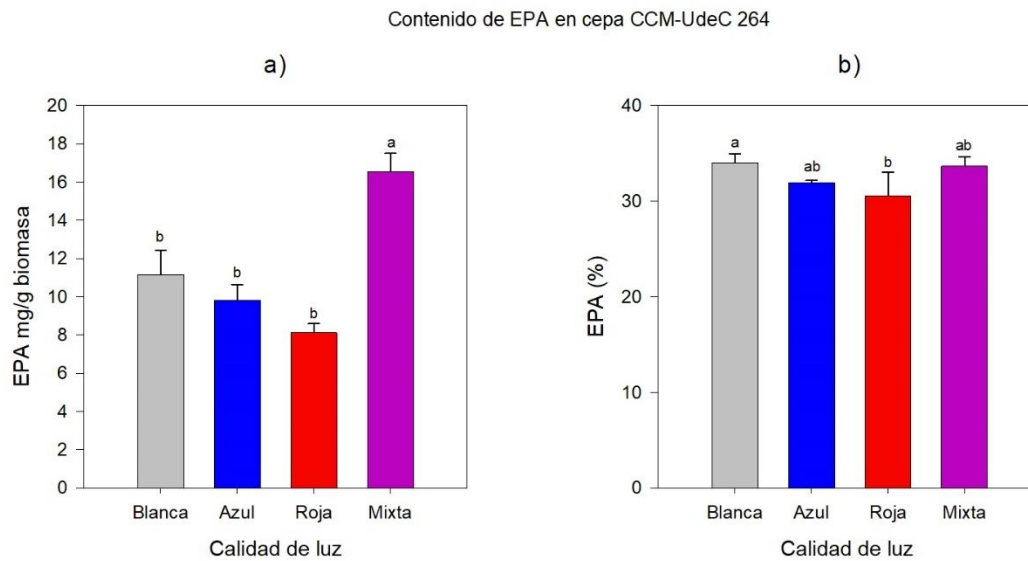


FIGURA 12: Contenido del ácido eicosapentaenoico, en la biomasa seca de cepa CCM-UdeC 264, bajo diferentes calidades de luz bajo una irradiancia de $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Expresado como a) Contenido de EPA por biomasa seca (mg/g). b) Porcentaje de EPA respecto a los ácidos grasos totales (perfil). Superíndices con igual letra demuestra que no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

El contenido de EPA expresado en mg/g de la biomasa seca muestra valores significativamente mayores ($p < 0,001$) en la calidad de luz mixta ($16,38 \pm 1,12$ mg/g), en comparación con la luz blanca, azul y roja ($10,47 \pm 1,97$; $10,12 \pm 0,52$; $8,07 \pm 0,53$). Respecto al porcentaje de EPA dentro del total del perfil de ácidos grasos podemos observar diferencias significativas sólo al comparar la calidad de luz blanca ($32,31 \pm 0,67$) con la calidad de luz roja ($28,56 \pm 4,50$), bajo la calidad de luz roja el contenido de EPA disminuyó levemente en comparación con la luz blanca.

DISCUSIÓN

Efecto de la Calidad de la Luz en crecimiento y desempeño fotosintético de Phaeodactylum tricornutum

El suministro de energía lumínica es un parámetro clave para el éxito de cultivos de microalgas, este tiene una influencia importante en el crecimiento y la composición bioquímica del organismo (Cella *et al.* 2023). La composición de pigmentos de las microalgas varía de acuerdo al grupo taxonómico al cual pertenecen, e incluyen clorofilas y pigmentos accesorios como carotenoides y pigmentos ficobilínicos (Carvalho *et al.*, 2011; Sirisuk *et al.*, 2018). Cada pigmento absorbe una longitud de onda determinada de la radiación fotosintética activa (PAR), permitiendo captar la energía necesaria para llevar a cabo la fotosíntesis (Schulze *et al.*, 2014; McGee *et al.* 2014; Sirisuk *et al.* 2018). Los análisis de varios estudios de microalgas coinciden en que los espectros de iluminación óptimos, para mejorar el rendimiento de biomasa y composición química de las microalgas, son específicos de cada especie debido a sus diferentes composiciones de pigmentos (Maltsev *et al.* 2021; Dong *et al.* 2022).

El uso de la iluminación natural en cultivos al exterior a gran escala no tiene un control constante debido a fluctuaciones naturales (Maltsev *et al.* 2021). En sistemas de cultivos cerrados, como los fotobiorreactores, se aplica iluminación artificial como el uso de diodos emisores de luz (LEDs) que permiten ajustar las condiciones de iluminación (Mahari *et al.* 2023; Maltsev *et al.* 2021), permitiendo la fotoestimulación de la biosíntesis de productos específicos de interés comercial (Wang *et al.* 2018).

La primera etapa de este estudio consistió en determinar la densidad de flujo fotónico óptima para el crecimiento de *P. tricornutum*, aportada por distintas calidades de luz. A partir de las curvas de luz obtenidas en esta etapa (Fig. 2) se observó que, una irradiancia de 100 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ previene la fotoinhibición de los fotosistemas. Coincidente con lo anterior, Cella y colaboradores (2023), en cultivos de laboratorio evidenciaron la fotoprotección PAR de *P. tricornutum*, utilizaron como irradiancia no saturante un rango de 100 - 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Se ha demostrado que *P. tricornutum* se adapta diversas dosis de energía lumínica e irradiancias, permitiendo que esta microalga logre un equilibrio entre la absorción de luz y la disipación de energía, protegiendo así de posibles fotodaños (Cella *et al.* 2023; Mahari *et al.* 2024).

El nuevo desafío en los cultivos fotoautótrofos es conocer el suministro adecuado de luz que demanda el cultivo, para evitar fenómenos como: fotolimitación y fotoinhibición (Cella *et al.* 2023; Broddrick *et al.* 2019). La regulación de esta vía biosintética está influenciada por la radiación fotosintéticamente activa (PAR), lo que hace que los organismos fotosintéticos alteren su contenido de pigmentos fotosintéticos como las clorofilas y carotenoides, ya que responden a los cambios en la intensidad de la luz y las dosis de energía luminosa (Falciatore *et al.* 2020; Cella *et al.* 2023). La diatomea *Phaeodactylum tricornutum* principalmente contiene clorofila (a) y clorofila (c), las cuales absorben dentro de un rango de longitud de onda de la luz roja y azul (Sirisuk, *et al.*, 2018; Mulders *et al.*, 2013). Dentro de los pigmentos carotenoides en *P. tricornutum*, destaca la fucoxantina como pigmento principal (Kosakowska *et al.*, 2004) la cual absorbe dentro de las longitudes de onda azules (Schulze *et al.* 2014; Hoek *et al.*, 1995 citado de Sirisuk *et al.* 2018).

Una manera de medir como el fotosistema II está utilizando la luz para la producción de energía química, es mediante la fluorescencia de la clorofila (a). La molécula de clorofila en el cloroplasto captura fotones de luz y al ser excitada, esta energía generada puede tener tres destinos como: emplearse en procesos fotoquímicos (transporte de electrones), perderse/disiparse como calor (disipación térmica) o ser remitida como fluorescencia que puede ser cuantificada bajo el rendimiento cuántico óptico (eficiencia fotosintética). Estos tres procesos están interconectados, de modo que una alteración en uno de ellos afecta a los

otros dos parámetros. Así la fluorescencia de la clorofila (a) se convierte en un indicador directo del funcionamiento del proceso fotoquímico en el fotosistema II (Buchanan *et al.* 2015).

El indicador fotobiológico Fv/Fm que mide la eficiencia fotoquímica máxima de los centros de reacción asociados al fotosistema II es un carácter que refleja la eficiencia de este fotosistema en los procesos dependiente de la luz (Bojko *et al.* 2013). Los factores en el ambiente como la temperatura, irradiancia y patrones endógenos como la composición genética, el estado fisiológico, etc. pueden afectar esta eficiencia fotoquímica (Cosgrove & Borowitzka, 2011). En esta investigación, el factor abiótico que se estudió sobre el rendimiento cuántico óptico fue la calidad de la luz, y se determinó que no influyó negativamente sobre la actividad fotosintética de *P. tricornutum*, la microalga en estudio se mostró saludable, sin signos de estrés, independiente de la calidad de luz (Fig. 4). Por lo tanto, podemos determinar que la cepa se encuentra en un estado fisiológico saludable, ya que sus valores de rendimiento cuántico óptico estuvieron entre 0,5 y 0,7. De este modo, *P. tricornutum* pueden aprovechar los fotones azules y rojos, si son entregados como luz monocromática, si son entregados en mezcla y, también si son entregados como componentes de la luz blanca, tal como se demostró en este estudio (Fig.3), sin manifestar estrés fisiológico en los valores del rendimiento fotosintético (Fv/Fm) obtenidos (Fig. 4). Coincidente con lo anterior, Jungandreas y colaboradores (2014); MacGee y colaboradores (2020) reportan valores dentro del mismo rango bajo diferentes condiciones de luz en *P. tricornutum*.

En relación con los parámetros de crecimiento observados (Tabla 2), se detectó que la tasa de crecimiento fue menor al emplear luz monocromática roja y la combinación de luz azul y roja. Esto podría estar asociado con la eficiencia del aparato fotosintético bajo estas condiciones lumínicas. La luz roja, aunque fotosintéticamente activa, puede no ser utilizada con máxima eficiencia por *P. tricornutum*, lo que ralentiza el crecimiento.

Si bien no se observó un estrés inicial en los cultivos expuestos a luz roja, las células aprovechan la energía de los fotones para activar su maquinaria fotosintética. Estudios previos, como el de Sirisuk y colaboradores (2018), sugieren que la calidad de la luz tiene un efecto predominante en la fase exponencial del crecimiento. Se encontró que las células expuestas a luz roja crecieron más rápidamente durante las primeras 48 horas en comparación con las expuestas a luz azul. Sin embargo, las densidades celulares finales fueron similares debido a factores como la limitación de nutrientes en la fase estacionaria (Sirisuk *et al.* 2018) o las diferencias en la energía contenida en los fotones de cada longitud de onda. La luz roja, al tener una longitud de onda mayor, genera fotones con menor energía en comparación con la luz azul. Esta diferencia energética implica que, cuando la clorofila absorbe fotones de luz roja, la transferencia de energía hacia otras moléculas debe ocurrir rápidamente para evitar pérdidas por emisión de calor o fluorescencia (Taiz *et al.* 2015).

En cuanto al rendimiento no fotoquímico (NPQ), este parece depender principalmente de la calidad de luz y no de la irradiancia (Jungandreas *et al.* 2014). En el presente estudio, no se observó una tendencia clara de variación entre los tratamientos, aunque se observó que la combinación de la calidad de luz azul y roja tiende a incrementar la capacidad no fotoquímica a lo largo del tiempo, reduciendo el daño lumínico, sugiriendo un posible mecanismo de protección anti-estrés. Estudios previos en *P. tricornutum* han demostrado que las condiciones de luz que inducen altos NPQ tienden a favorecer la acumulación de compuestos fotoprotectores como carotenoides y polifenoles (Rico *et al.* 2024; Nymark *et al.* 2009; Valle *et al.* 2014). A pesar de que no fue detectado claramente, en esta investigación es posible ver una correlación entre el incremento del NPQ y el aumento de los carotenoides (Fig. 5, Fig. 10 C y D), los cuales son conocidos por su capacidad de disipar el calor mediante el ciclo de las xantofilas (Demming-Adams & Adams 2002). Estos carotenoides no solo juegan un papel en la disipación de exceso de energía lumínica para evitar el daño fotoquímico, sino que también

son productos finales valiosos en términos metabólicos (Kuczynska *et al.* 2015; Meléndez *et al.* 2004)

Este proceso, que ocurre cuando la energía de la luz se absorbe más allá de la capacidad fotosintética de la célula, implica la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales hidroxilos (OH), aniones superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el oxígeno singlete (O) (Chokshi *et al.* 2017). Para prevenir la fotoinhibición, las células de diatomeas han desarrollado una variedad de herramientas de defensa, como el ciclo de diadinoxantina asociado con la desoxidación de diadinoxantina y la epoxidación de diatoxantina, el cual es implicado directamente con la disipación de energía a través de la acción del enfriamiento no fotoquímico (NPQ) (Celi *et al.* 2022). Y, por otro lado, otra molécula antioxidante que destaca son los polifenoles (Sansone & Brunet, 2019; Leopoldini *et al.* 2011), como los compuestos fenólicos presentes en microalgas, que se asocian con sus propiedades antioxidantes, desempeñando un papel importante en el crecimiento, la reproducción y la protección contra diversas condiciones de estrés. En general, los fenoles pueden acumularse en respuesta al estrés oxidativo (Cichoński & Chrzanowski 2022). Lo que podría justificar el aumento del contenido total de fenoles bajo la mezcla de calidad de luz roja y azul (Fig. 7).

La tasa de transporte de electrones (ETRmax) se observa fluctuante durante el experimento dificultando una interpretación clara de este parámetro (Fig. 6). Sólo la luz mixta mostró una tendencia al aumento a medida que incrementaban los días de cultivo, sugiriendo una alta actividad electroquímica, asociado a la cadena de transporte de electrones en el fotosistema II en esta condición (Fig. 6) Estudios como los de Wang *et al.* (2018) y Duarte *et al.* (2021) sugieren que condiciones óptimas de luz se encuentran especialmente en aquellas que incluyen longitudes de onda azul y roja, ya que favorecen la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados, al optimizar la eficiencia fotosintética y el flujo de electrones hacia la síntesis de lípidos.

Efecto de la Calidad de la Luz en los Parámetros Bioquímicos de Phaeodactylum tricornutum

El contenido total de clorofilas y carotenoides, incluido el pigmento clave fucoxantina, fue significativamente mayor bajo luz mixta en comparación con tratamientos de luz monocromática (Fig. 10). La fucoxantina, es un carotenoide importante en las diatomeas y algas pardas; en diatomeas representa más de una décima parte de la producción total de carotenoides en la naturaleza (Peng *et al.* 2011; Kuczynska *et al.* 2015). No solo actúa como un pigmento captador de luz, ha sido reportada como un compuesto con propiedades antioxidantes y potencial nutracéutico, que se incrementa bajo la luz azul (McGee *et al.*, 2019). Además, juega un papel central en la protección frente al estrés lumínico mediante su participación en el ciclo de las xantofilas y la disipación no fotoquímica para evitar la fotooxidación (Lavaud *et al.* 2003; Wang *et al.* 2018). En las diatomeas, encontramos principalmente dos tipos de clorofilas: clorofila (a) y clorofila (c). En donde la Chl (a) juega un papel central en la conversión de energía química, mientras que la Chl (c) facilita la fotosíntesis como pigmento accesorio. Las formas comunes para esta última clorofila en diatomeas se presentan como Chl (c1) y Chl (c2) distinguiéndose por su estructura (Kim *et al.* 2014) y su espectro de absorción, en donde muestra una fuerte absorción en luz azul y débil absorción en luz roja (Kuczynska *et al.* 2015). Además la fucoxantina se une principalmente al complejo proteico fucoxantina-clorofila (FCP), funcionando como un complejo recolector asociado a los PS I y II (Wang *et al.* 2018; Parkes *et al.* 2021).

La luz azul controla aspectos clave de la fisiología de las diatomeas, como el crecimiento, la productividad de biomasa y el perfil de pigmentos. En ambientes marinos, la luz azul es una de las longitudes de onda más abundantes, especialmente en comunidades bentónicas (Parkes *et al.* 2021). Las diatomeas, como *P. tricornutum*, han desarrollado mecanismos para

aprovechar la luz azul, utilizando fotorreceptores específicos como los aureocromos. Estos fotorreceptores son fundamentales para la adaptación y supervivencia de las diatomeas bajo luz azul, lo que podría explicar el aumento de la acumulación fucoxantina en presencia de esta longitud de onda (McGee *et al.* 2019), y justificando con estos antecedentes la disminución significativa de fucoxantina y clorofila (c) bajo la calidad de luz roja (Fig. 10. d).

En particular, el contenido de carotenoides, fucoxantina, lípidos y EPA fue significativamente mayor bajo la calidad de luz mixta. Mezclar luz roja y azul en el cultivo de *P. tricornutum*, resulta beneficioso para la acumulación de metabolitos de alto valor, debido a la forma en que estas longitudes de onda influyen en la fotosíntesis. La luz roja y azul son absorbidas eficientemente por la clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, optimizando la captura de fotones y la conversión de luz en energía química (Dong *et al.* 2023). Esta combinación de las calidades de luz incrementa la síntesis de la mayoría de los metabolitos de alto valor, debido a la manera en que estas longitudes de onda afectan la fotosíntesis. Se ha demostrado que la mezcla de estas calidades de luz permite una captura de fotones más eficiente y una estimulación óptima del crecimiento y la producción de metabolitos (Sirisuk *et al.* 2018), facilitando una mejor producción de compuestos valiosos, mejorando la viabilidad de los cultivos con fines comerciales.

Los valores obtenidos en este estudio para carotenoides totales, fucoxantina, lípidos totales y EPA son consistentes con los rangos previamente reportados para *P. tricornutum*. Estudios como el de Parkes y colaboradores (2021) sustenta a esta especie, como adecuada para la coproducción de EPA y fucoxantina bajo condiciones lumínicas óptimas. Los rendimientos de fucoxantina en *P. tricornutum*, van de 5,5 a 15,3 mg g⁻¹ (Wu *et al.* 2016; Kim *et al.* 2012). Además, la luz azul ha mostrado incrementar el contenido de fucoxantina en otras diatomeas, como *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira weissflogi* y *Stauroneis sp.* (Wang *et al.* 2018; Parkes *et al.* 2021).

En este experimento, bajo iluminación azul, se obtuvo un contenido de fucoxantina de 6,0 mg/g en la biomasa seca de *P. tricornutum* (Fig. 10), un valor que se encuentra dentro del rango reportado por Parkes y colaboradores (2021). Sin embargo el uso de luz mixta incrementó la acumulación de este pigmento, obteniendo un total de 8,7 mg g⁻¹ (Fig. 10). Además, Parkes y colaboradores (2021) señala una variabilidad amplia en los contenidos de fucoxantina en esta diatomea, lo que sugiere que la variación natural entre cepas o condiciones de cultivo puede ser significativa.

En este estudio, la acumulación de lípidos totales y el contenido de EPA en *P. tricornutum*, fue mayor en luz mixta, con un contenido significativamente mayor en comparación con las luces monocromáticas las cuales no presentan diferencias significativas entre ellas (fig.11 y fig. 12). *Phaeodactylum tricornutum* se ha convertido en una de las microalgas más populares en la investigación sobre la producción de lípidos en algas, como fuente potencial de biocombustibles y ácidos grasos valiosos (Gao *et al.* 2017; Duarte *et al.* 2021; Dong *et al.* 2023). La revisión de la literatura reporta una amplia diversidad de resultados respecto al impacto que la calidad de la luz tiene sobre la composición bioquímica de la diatomea en estudio, lo que podría deberse a diferencias en las condiciones experimentales, las cepas empleadas y las metodologías utilizadas en los análisis.

Sirisuk y colaboradores (2018), estudiaron cultivos de microalgas bajo diferentes proporciones de longitudes de onda azul y roja, Adicionalmente indujeron estrés bajo luz verde, para una acumulación de lípidos. Se observó que *P. tricornutum* produjo un mayor contenido de lípidos, cultivada bajo una mayor proporción de luz azul, por lo que es posible que exista una correlación entre la longitud de onda azul y la síntesis de lípidos en esta diatomea. Ruyters (1984) informó que la luz azul estaba involucrada en la activación de

enzimas, la regulación de la transcripción de genes y la derivación de energía en microalgas (Sirisuk *et al.* 2018). Duarte y colaboradores igualmente mostraron alta acumulación de ácidos grasos y triacilglicéridos (TAG) bajo luz azul, este comportamiento ya fue reportado en la diatomea *Skeletonema marinoi* (Chandrasekaran *et al.*, 2014), señalando una posible estrategia de almacenamiento de energía y carbono atribuido al papel de prevención de daños fotooxidativos (Solovchenko 2012). Sin embargo, Sharma y colaboradores (2022) analizaron el contenido lipídico bajo tratamientos de luz roja y variación de cambio de luz, reportando un aumento en la relación C/N, lípidos y carbohidratos en el cultivo de *P. tricornutum* aclimatado a la calidad de luz roja (Sharma *et al.* 2022).

Otros estudios también documentaron en las diatomeas *P. tricornutum* y *Odontella aurita*, aumentos en los ácidos grasos poliinsaturados como el EPA en condiciones repletas de nutrientes y, por otro lado, disminuciones dramáticas bajo el agotamiento de nutrientes (Tonon *et al.* 2002; Gong *et al.* 2013, como se citó en Parkes *et al.*, 2021).

A pesar de la alta variabilidad en los resultados, los datos generados en este estudio muestran coherencia con lo reportado en estudios previos. El contenido de lípidos totales en la biomasa de *P. tricornutum* es un atributo altamente dependiente de las condiciones ambientales, como la disponibilidad de nitrógeno (Cui *et al.* 2021) y la concentración de CO₂ (Song *et al.* 2014). En este contexto, se ha documentado que los cultivos expuestos a altas concentraciones de CO₂ presentan un contenido lipídico en el rango de 10 – 15 %, mientras que en condiciones de limitación de nitrógeno se han reportado valores que varían entre 15- 42 %. En el presente estudio, los cultivos evaluados mostraron un contenido de lípidos que oscila entre 9 – 10%, alcanzando un valor máximo de 16%, bajo la luz mixta (Fig. 11).

Con respecto al ácido eicosapentaenoico (EPA), en el presente estudio se obtuvo un valor máximo de 1,6 % de EPA por biomasa seca (16 mg/g, Fig. 12) en luz mixta. Sirisuk y colaboradores (2018) ha reportado un contenido de EPA del 1%, en cultivos de *P. tricornutum*, donde aplicó un sistema de dos fases de iluminación, aplicando LEDs azul y roja en proporción 1:1, luego bajo la calidad de luz verde para mejorar la biomasa celular y la producción de lípidos respectivamente. Estudios previos han reportado en cultivos de *P. tricornutum* un contenido de EPA cercano al 30% del total de ácido grasos, en cultivos establecidos con y sin suplementación de silicato de sodio (Cui *et al.* 2021); en nuestro estudio la cepa acumuló valores de máximos cercanos al 35% con un efecto positivo de la luz azul aportada en forma monocromática o en mezcla (luz blanca o mixta) (Fig. 12).

Adicionalmente *Phaeodactylum tricornutum* en condiciones normales de cultivo contiene alrededor del 18% de lípidos, 26% de carbohidratos y 36% de proteínas (Zhang *et al.* 2018). La acumulación de estos metabolitos puede ser influenciado por diversos factores ambientales, entre los cuales la calidad de luz se destaca como un elemento crítico en la regulación de rutas metabólicas específicas, favoreciendo su acumulación de manera diferencial (Dong *et al.* 2022). En el presente estudio, el % de carbohidratos en la biomasa de *P. tricornutum*, presenta una mayor acumulación bajo la luz roja y la mezcla de la calidad de azul y roja (1:1) (Fig. 8). Por otro lado, el contenido de proteínas no evidencio diferencias significativas entre los tratamientos de calidad de luz evaluados (Fig. 9). Las cantidades relativas de carbono almacenado que se acumulan en lípidos y carbohidratos pueden modificarse alterando la condición fisiológica de la célula como resultado de la ruptura de algunas vías biosintéticas y la activación de otras nuevas, lo que implica un aumento de la producción de lípidos o carbohidratos (Celi *et al.* 2022).

CONCLUSIONES

- El parámetro F_v/F_m se mantuvo en un valor estable (0,5 a 0,7) en todos los tratamientos, evidenciando que la calidad de la luz aplicada en este experimento, en general, no afectó significativamente el rendimiento fotosintético de los cultivos, ni sus parámetros de crecimiento.
- La luz mixta azul: roja (1:1) induce la activación de los sistemas de fotoprotección en *P. tricornutum*, mostrando un incremento progresivo del NPQ con el tiempo. Similar comportamiento se observa en el gradiente de protones a la forma de ETR_{max} , lo puede sugerir su orientación a los mecanismos de disipación energética (fucoxantina) y para la producción de otros metabolitos (EPA).
- La luz monocromática azul o roja no fueron eficientes en estimular la acumulación de EPA en *P. tricornutum*. La mezcla de ambas luces en proporción 1:1 tiene mayor eficiencia que todas las calidades de luz estudiadas.
- La luz monocromática azul si fue eficiente en estimular la fucoxantina en comparación a la luz roja. La mezcla de ambas luces tiene mayor eficiencia que todas las calidades de luz estudiadas.
- La luz mixta roja: azul (1:1) no incrementó significativamente el crecimiento ni el contenido de proteínas en la biomasa de *P. tricornutum* al compararla con la luz blanca o las luces monocromáticas (azul o roja).
- La luz mixta roja: azul (1:1) a una densidad de flujo fotónico de $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fue más eficiente que la luz blanca o las luces monocromáticas (azul o roja) en incrementar el contenido de fucoxantina y EPA, así como el contenido de fenoles totales, clorofila a, carotenoides totales y contenido de lípidos en la biomasa de la cepa de *P. tricornutum* estudiada.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., & Malcata, F. X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1275–1288. DOI: 10.1007/s00253-010-3047-8
- Celi, C., Fino, D., & Savorani, F. (2022). *Phaeodactylum tricornutum* as a source of value-added products: A review on recent developments in cultivation and extraction technologies. *Bioresource Technology Reports*, 19, 101122. DOI: 10.1016/j.biteb.2022.101122
- Cella, H., Nader, C., Bastolla, C. L. V., & others. (2023). PAR regulation of photoprotection in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): Roles of doses and irradiances. *Journal of Applied Phycology*, 35 (4), 2177–2191. DOI: 10.1007/s10811-023-03042-8
- Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A. *et al.* (2017). Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. DOI:10.1186/s13068-017-0747-7
- Cichoński, J., & Chrzanowski, G. (2022). Microalgae as a Source of Valuable Phenolic Compounds and Carotenoids. *Molecules*, 27(24), 8852. DOI: 10.3390/molecules27248852
- Cui, Y., Thomas-Hall, S.R., Chua, E.T. and Schenk, P.M. (2021), Development of High-Level Omega-3 Eicosapentaenoic Acid (EPA) Production from *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Phycol.*, 57: 258-268.
- Caballero, M. A., Jallet, D., Shi, L., Rithner, C., Zhang, Y., & Peers, G. (2016). Quantification of chrysolaminarin from the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal research*, 20, 180-188.
- Crepy, María Andrea. (2011). *Beneficio mutuo entre plantas emparentadas*. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4872_Crepy
- Capek, L., Uhlířiková I., Košťálová, Z., Hindáková, A., Capek, P., (2023). Structural properties of the extracellular biopolymer (β -D-xylo- α -D-mannan) produced by the green microalga *Gloeocystis vesiculosa* Nägeli. *Carbohydrate Research*. Volume 525, 108766. ISSN 0008-6215, DOI: 10.1016/j.carres.2023.108766.
- Castellanos T, Lyssia, & Rodriguez D, Mauricio. (2015). The effect of omega 3 in human health and considerations to its intake. *Revista chilena de nutrición*, 42(1), 90-95. DOI: 10.4067/S0717-75182015000100012
- Camacho, Paloma & Flórez-Castillo, J.M. (2020). Microalgas y sus aplicaciones biotecnológicas. DOI: 10.13140/RG.2.2.15543.14247.
- Cosgrove J, Borowitzka MA (2011) Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In: Suggett DJ, Prásil OJ, Borowitzka MA (eds) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications*. Springer, Dordrecht, pp 1–17
- Chen, W., Li, T., Du, S., Chen, H., Wang., Q., (2023). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Journal Article. Bioing. Biotecnología., Sec. Biotecnología Industrial. Volumen 11. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1146881

- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R., Janssen, M., (2013). Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost, *Algal Research*, Volume 2, Issue 4, Pages 333-340, ISSN 2211-9264, DOI: 10.1016/j.algal.2013.09.004.
- Barro, F. De La Haba, P., Maldonado, J.M., Fontes, A., (1989). Effect of Light Quality on Growth, Contents of Carbohydrates, Protein and Pigments, and Nitrate Reductase Activity in Soybean Plants, *Journal of Plant Physiology*, Volume 134, Issue 5, Pages 586-591, ISSN 0176-1617, DOI: 10.1016/S0176-1617(89)80152-X.
- Bitaubé Pérez, E., Caro Pina, I., Pérez Rodríguez, L., (2008). Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 40, Issue 3, Pages 520-525, ISSN 1369-703X, DOI: 10.1016/j.bej.2008.02.007.
- Brennan, L., Owende. P., (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577. Volume 14, Issue 2, ISSN 1364-0321, DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.009.
- Brenes-Soto, A., (2014). Los carotenoides dietéticos en el organismo animal. *Revision de Literatura*. Centro de Investigación en Nutrición Animal y Escuela de Zootecnia, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 8(1):21-29 ISSN: 2215-3527
- Butler, T., Vijay, R., Vaidyanathan, S., (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: A Diatom Cell Factory. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.12.023.
- Brodrick, J.T., Du, N., Smith, S.R., Tsuji, Y., Jallet, D., Ware, M.A., Peers, G., Matsuda, Y., Dupont, C.L., Mitchell, B.G., Palsson, B.O. and Allen, A.E. (2019), Cross-compartment metabolic coupling enables flexible photoprotective mechanisms in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytol*, 222: 1364-1379.
- Buchanan, B., Gruisse, W., (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*.
- Dong, M., Zhang, Y., Yu, Q., Liu, Q., Zhou, X., (2023) Regulation of light quality on lipid production, biodiesel quality, and nutritional quality of *Phaeodactylum tricornutum*. *Aquacult Int* 31, 1231–1251.
- Demmig-Adams, B., & Adams III, W. W. (2002). Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, 298(5601), 2149-2153.
- Duarte, B., Feijão, E., Goessling, J. W., Caçador, I., & Matos, A. R. (2021). Pigment and Fatty Acid Production under Different Light Qualities in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Sciences*, 11(6), 2550.
- Falciatore, A.; Jaubert, M.; Bouly, J.-P.; Bailleul, B.; Mock, T. (2020). Diatom Molecular Research Comes of Age: Model Species for Studying Phytoplankton Biology and Diversity. *Plant Cell*, 32, 547–572.
- García, T., Castillo, T., Martínez, A., Galindo, E., (2021). *Phaeodactylum tricornutum*, una fuente potencial de ácido eicosapentaenoico. Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México.
- Gómez L. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química* 19(2): 3-20. vol. XIX, núm. 2, pp. 3-20. Universidad de Oriente Santiago de Cuba, Cuba. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543707001>

Gonzalías, Y. R., & Lasso, E. R. (2016). Desarrollo de un sistema de iluminación artificial LED para cultivos en interiores-Vertical Farming (VF). *Informador técnico*, 80(2), 111-120.

Gong Y, Guo X, Wan X, Liang Z, Jiang M. (2013). Triacylglycerol accumulation and change in fatty acid content of four marine oleaginous microalgae under nutrient limitation and at different culture ages. *J Basic Microbiol*.

Gao, B., Chen, A., Zhang, W. *et al.* (2017). Co-production of lipids, eicosapentaenoic acid, fucoxanthin, and chrysolaminarin by *Phaeodactylum tricornutum* cultured in a flat-plate photobioreactor under varying nitrogen conditions. *J. Ocean Univ. China* **16**, 916–924.

Habibi, R., and Sibi, G., (2019) Light Emitting Diode (LED) Illumination for Enhanced Growth and Cellular Composition in Three Microalgae. *Adv Microb Res* 3: 007. DOI:10.24966/AMR-694X/100007

Haro, P., Sáez, K., & Gómez, P. I. (2017). Physiological plasticity of a Chilean strain of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: the effect of culture conditions on the quantity and quality of lipid production. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2771-2782.

Hamed, 2016. The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. *Food Sci. Food Saf.*, 150 (6), pp. 1104-1123.

Harun, R., Singh, M., Forde, G., Danquah, M., (2012). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable. Energy Reviews*, Volume 14, Issue 3, Pages 1037-1047, ISSN 1364-0321, DOI: 10.1016/j.rser.2009.11.004.

Hernández-Pérez, Alexis, & Labbé, José I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.

Heydarizadeh P, Veidl B, Huang B, Lukomska E, Wielgosz-Collin G, Couzinet-Mossion A, Bougaran G, Marchand J and Schoefs B (2019) Carbon Orientation in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*: The Effects of Carbon Limitation and Photon Flux Density. *Front. Plant Sci.* 10:471.

Jungandreas A, Schellenberger Costa B, Jakob T, von Bergen M, Baumann S, et al. (2014) The Acclimation of *Phaeodactylum tricornutum* to Blue and Red Light Does Not Influence the Photosynthetic Light Reaction but Strongly Disturbs the Carbon Allocation Pattern. *PLOS ONE* 9(8): e99727.

Jallet, D., Caballero, M. A., Gallina, A. A., Youngblood, M., & Peers, G. (2016). Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal Research*, 18, 51-60.

Katiyar, R., Arora, A., (2020). Health promoting functional lipids from microalgae pool. *Review, Algal Research*, Volume 46, 101800, ISSN 2211-9264, DOI.org/10.1016/j.algal.2020.101800.

Kim, S.M., Jung, Y.J., Kwon, O. *et al.* (2012) Una fuente comercial potencial de fucoxantina extraída de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl Biochem Biotechnol* 166, 1843–1855.

König,S., Eisenhut, M.,Bräutigam, A., Kurz, S., Weber, A., Büchel, C. (2017) The Influence of a Cryptochrome on the Gene Expression Profile in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* under Blue Light and in Darkness, *Plant and Cell Physiology*, Volume 58, Issue 11, Pages 1914–1923.

Kuczynska, Paulina, Malgorzata Jemiola-Rzeminska, and Kazimierz Strzalka. (2015). "Photosynthetic Pigments in Diatoms" *Marine Drugs* 13, no. 9: 5847-5881.

Kosakowska, A., Lewandowska, J., Stoń, J. *et al.* Qualitative and quantitative composition of pigments in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) stressed by iron. *Biometals* 17, 45–52 (2004). DOI: 10.1023/A:1024452802005

Leopoldini, M., N. Russo., M. Toscano. (2011). The Molecular Basis of Working Mechanism of Natural Polyphenolic Antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2): 288-306.

Liang, Y., Beardall, J., Heraud, P. (2006), Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae), *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 82, Issue 3,ISSN 1011-1344.

Lavaud, J., Bernard, B., (2003). Enrichment of the Light-Harvesting Complex in Diadinoxanthin and Implications for the Nonphotochemical Fluorescence Quenching in Diatoms. *Biochemistry*. American Chemical Society. SN- 0006-2960

Lavaud, J., & Kroth, P. G. (2006). In diatoms, the transtilacoid proton gradient regulates the non-photochemical photoprotective fluorescence that is quenched beyond its control in the xanthophyll cycle. *Fisiología vegetal y celular*, 47(7), 1010–1016. DOI: 10.1093/pcp/pcj058

Lee SH, HJ Kang, H-J Lee, M-H Kang & YK Park. (2010). Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. *Nutrition* 26: 175-183.

Ledesma Verdejo, T., (2000). Reactivos de alto valor agregado en cultivos alternativos de la microalga *Phaeodactylum tricornutum* Bohlín (Bacillariophyceae, Bacillariophyta). Universidad Autónoma de Baja California Sur. Area Interdisciplinaria e Ciencias del Mar. Departamento de Biología Marina. Tesis título Biólogo Marino. La Paz, baja California Sur, Mexico.

Levasseur, W., PerréVictor Pozzobon, P., (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. LGPM, CentraleSupélec, Université Paris-Saclay, Centre Européen de Biotechnologie et de Bioéconomie (CEBB), SFR Condorcet FR CNRS 3417, 3 rue des Rouges Terres 51110 Pomacle, France. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107545

Li, X., Manuel, J., Slavens, S. *et al.* (2021). Interactive effects of light quality and culturing temperature on algal cell size, biomass doubling time, protein content, and carbohydrate content. *Appl Microbiol Biotechnol* 105, 587–597.

Le Costaouëc, T., Unamunzaga, C., Mantecon, L., Helbert, W., (2017). New structural insights into the cell-wall polysaccharide of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Algal Research*, Volume 26, Pages 172-179, ISSN 2211-9264,

Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology*, 10(10), 1060. DOI:10.3390/biology10101060

Mayordomo, T., Vijay, R., Vaidyanathan, S., (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: A Diatom Cell Factory. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.12.023

- McClure, D., Luiz, A., Gerber, B., Barton, G., Kavanagh, J., (2018). An investigation into the effect of culture conditions on fucoxanthin production using the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. Elsevier, Algal 29, 41-48.
- McGee, D., Archer, L., Fleming, G.T.A. *et al.* (2020). Influence of spectral intensity and quality of LED lighting on photoacclimation, carbon allocation and high-value pigments in microalgae. *Photosynth Res* **143**, 67–80.
- Moon, M., Park, W. K., Suh, W. I., Chang, Y. K., & Lee, B. (2019). Biological carbon recovery from sugar refinery washing water into microalgal DHA: medium optimization and stress induction. *Scientific Reports*, 9(1), 19959
- Meléndez-Martínez, Antonio J., Vicario, Isabel M., & Francisco J., Heredia. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 149-155. ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200003&lng=es&tlng=es.
- Mendoza H, A de la Jara & E Portillo. (2011). Planta piloto de cultivo de microalgas: Desarrollo potencial de nuevas actividades económicas asociadas a la biotecnología en Canarias, 60 pp. Instituto Tecnológico de Canarias, Santa Cruz de Tenerife.
- Mulders, K., Lamers, P., Martens, D., Wijffels, R., (2014). Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *J. Phycol.*, 50: 229-242.
- Nymark M, Valle KC, Brembu T, Hancke K, Winge P, et al. (2009) An Integrated Analysis of Molecular Acclimation to High Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLOS ONE* 4(11): e7743.
- Olabi, A., Shehata, N., Taha Sayed, E., Rodriguez, C., Chinyere R., Russell, C., Ali M., (2023). Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy, *Science of The Total Environment*, Volume 854, 158689, ISSN 0048-9697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158689.
- Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH. Fucoxantina, un carotenoide marino presente en algas pardas y diatomeas: metabolismo y bioactividades relevantes para la salud humana. *Mar Drogas*. 2011; 9:1806–28.
- Pérez, B., Pina, C., Rodríguez, P., 2008. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. Volumen 40, 3 (520-525). ISSN 1369-703X. doi.org/10.1016/j.bej.2008.02.007.
- Pereira, H., Sá, M., Maia, I., Rodrigues, A., Teles, I., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. (2021). Fucoxanthin production from *Tisochrysis lutea* and *Phaeodactylum tricornutum* at industrial scale. *Algal Research*, 56, 102322.
- Qiao, H., Cong, C., Sun, C., Li, B., Wang, J., Zhang, L. (2016). Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. *Aquaculture*, Volume 452, Pages 311-317, ISSN 0044-8486,
- Remmers IM, Martens DE, Wijffels RH, Lamers PP (2017) Dynamics of triacylglycerol and EPA production in *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen starvation at different light intensities. *PLOS ONE* 12(4): e0175630.
- Rico, M., Santiago-Díaz, P., Rivero, A. *et al.* (2024) Caracterización de polifenoles y carbohidratos exudados por *Phaeodactylum tricornutum* diatom cultivados bajo estrés de Cu. *Sci Rep* **14**, 9367.

- Rico Milagros , López Aroa , Santana-Casiano J., Magdalena , González Aridane G. , González-Dávila Melchor , (2013), Variability of the phenolic profile in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* growing under copper and iron stress, *Limnology and Oceanography*, 58.
- Santana-Casiano, J. M., González, A. G., López, A., Martel, A. (2014) Characterization of phenolic exudates from *Phaeodactylum tricornutum* and their effects on the chemistry of Fe(II)–Fe(III), *Marine Chemistry*, Volume 158, Pages 10-16, ISSN 0304-4203.
- Sansone, C & C. Brunet. (2019). Promises and Challenges of Microalgal Antioxidant Production. *Antioxidants*, 8(7): 1-9.
- Sanhueza, J., Durán, S., Torres, J., (2015). Los ácidos grasos dietarios y su relación con la salud. Laboratorio de Lípidos y Antioxidantes, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile. Carrera de Nutrición y Dietética, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad San Sebastián. Universidad Autónoma de Chile, Chile.32(3):1362-1375 ISSN 0212-1611.
- Severes, A. Hegde, S. D'Souza, L Hegde, L., (2017). Use of light emitting diodes (LEDs) for enhanced lipid production in micro-algae based biofuels. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 170,
- Song, M., Pei, H., Hu, W., Han, F., Ji, Y., Ma, G., Han. L., (2014). Growth and lipid accumulation properties of microalgal *Phaeodactylum tricornutum* under different gas liquid ratios. *Bioresource Technology*, Volume 165, Pages 31-37, ISSN 0960-8524.
- Solovchenko, A. E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59, 167-176.
- Schellenberger Costa, B., Jungandreas, A., Jakob, T., Weisheit, W., Mittag, M., Wilhelm, C. (2013) La luz azul es esencial para la aclimatación a la luz y la fotoprotección en la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, *Journal of Experimental Botany*, Volumen 64, Número 2, páginas 483-493,
- Sirisuk, P., Ra, C, Jeong, G., Kim, S., (2018), Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. *Bioresource Bechnology*, Volume 253, Pages 175-181, ISSN 0960-8524,
- Sharma, N., Fleurent, G., Awwad, F., Cheng, M., Meddeb-Mouelhi, F., Budge, S. M., Germain, H., & Desgagné-Penix, I. (2020). Red Light Variation an Effective Alternative to Regulate Biomass and Lipid Profiles in *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied Sciences*, 10(7), 2531.
- Sharma N, Simon DP, Diaz-Garza AM, Fantino E, Messaabi A, Meddeb-Mouelhi F, Germain H and Desgagné-Penix I (2021) Diatoms Biotechnology: Various Industrial Applications for a Greener Tomorrow. *Front. Mar. Sci.* 8:636613.
- Schulze, P. Barreira, L. Pereira, H., Perales, J., Varela, J., (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology* 422 - 430, IS - 8. Elsevier. SN - 0167-7799
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (Nº. Ed. 6). Sinauer Associates Incorporated
- Tonon T, Harvey D, Larson TR, Graham IA., (2002) Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry*; 61(1): 15-24. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00201-7

Truong, T.Q., Park, Y.J., Koo, S.Y. (2023). Interdependence of fucoxanthin biosynthesis and fucoxanthin-chlorophyll *a/c* binding proteins in *Phaeodactylum tricornutum* under different light intensities. *J Appl Phycol* **35**, 25–42

Vartanian, M., Desclés, J., Quinet, M., Douady, S. and Lopez, P.J. (2009), Plasticity and robustness of pattern formation in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *New Phytologist*, 182: 429-442.

Valle KC, Nymark M, Aamot I, Hancke K, Winge P, et al. (2014) System Responses to Equal Doses of Photosynthetically Usable Radiation of Blue, Green, and Red Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLOS ONE* 9(12): e114211.

Wang, S., Verma, S.K., Hakeem Said, I. *et al.* (2018). Changes in the fucoxanthin production and protein profiles in *Cylindrotheca closterium* in response to blue light-emitting diode light. *Microb Cell Fact* 17, 110 <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0957-0>

Wang, W. J., Wang, G. C., Zhang, M., & Tseng, C. K. (2005). *Journal of Integrative Plant Biology*, 47, 1009–1015.

Wang, W., Wang, G. C., Zhang, M., & Tseng, C. K. (2005). Isolation of fucoxanthin from the rhizoid of *Laminaria japonica* Aresch. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(8), 1009-1015.

Woo M.-N., Jeon S.-M., Kim H.-J., Lee M.-K., Shin S.-K., Shin Y. C., Park Y.-B., and Choi M.-S., (2010). Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice, *Chemico-Biological Interactions*. 186, no. 3, 316–322, DOI: 10.1016/j.cbi.2010.05.006, 2-s2.0-77954385541.

Wu H, Li T, Wang G, Dai S, He H, Xiang W. (2016). A comparative analysis of fatty acid composition and fucoxanthin content in six *Phaeodactylum tricornutum* strains from different origins. *J. Ocean. Limnol.*; **34**: 391-398.

Mahari, W., Wan R., Waiho, K., Wong, Y., Foo, S., Kamaruzzan, A., Derek, S., Ma, L., Chang, J., Dong, C., Chisti, Y., Lam., S., (2024). Light-emitting diodes (LEDs) for culturing microalgae and cyanobacteria. *Chemical Engineering Journal*, Volume 485, 149619, ISSN 1385-8947.

Zhao, P., Gu, W., Wu, S. (2014). Silicon enhances the growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin under green light and low temperature. *Sci Rep* **4**, 3958. DOI: 10.1038/srep03958

Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., Kong, R., Han, C., Liu, Z., (2015). Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient. DOI: 10.1155/2015/723515

Zhang, W., Wang, F., Gao, B., Huang, L., & Zhang, C. (2018). An integrated biorefinery process: Stepwise extraction of fucoxanthin, eicosapentaenoic acid and chrysolaminarin from the same *Phaeodactylum tricornutum* biomass. *Algal research*, 32, 193-200.

Zhang, H., Yin, W., Ma, D. et al. (2021). Phytohormone supplementation significantly increases fatty acid content of *Phaeodactylum tricornutum* in two-phase culture. *J Appl Phycol* **33**, 13–23.

Zhong, Y., Jin, P. & Cheng, J.J. A (2018). comprehensive comparable study of the physiological properties of four microalgal species under different light wavelength conditions. *Planta* **248**, 489–498

ANEXO

Figura complementaria 1.

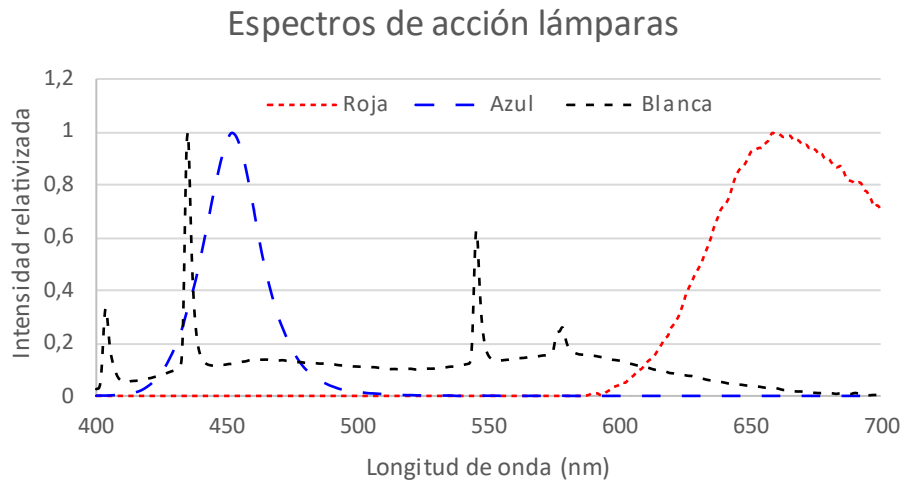


Fig. Complementaria 1: Espectros acción de cada LEDs.