

**Variación del perfil polifenólico de  
diatomeas *Phaeodactylum tricornutum*  
cultivadas en agua de mar enriquecida en  
cobre (II)**

Aroa López  
Departamento de Química

# VARIACIÓN DEL PERFIL POLIFENÓLICO DE DIATOMEAS *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADAS EN AGUA DE MAR ENRIQUECIDA EN COBRE (II)

Aroa López, Milagros Rico, Aridane González,  
Magdalena Santana, Melchor González y Norma Pérez.

Departamento de Química, Universidad de Las Palmas de Gran  
Canaria, Campus de Tafira, 35017 Las Palmas de Gran Canaria,  
Canary Islands, Spain.

e-mail: [aroa2412@gmail.com](mailto:aroa2412@gmail.com)



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

# TABLA DE CONTENIDOS

- Introducción
- Técnicas
  - Cultivo
  - SPE- HPLC
  - DPPH
- Resultados y discusión
  - Crecimiento
  - Concentración de polifenoles
- Conclusiones

# INTRODUCCIÓN

## ***-Phaeodactylum tricornutum-***

Pertenecen a la clase diatomeas, que son algas unicelulares presentes en abundancia en el fitoplancton. Las diatomeas se caracterizan por poseer una pared celular impregnada en sílice.

*Phaeodactylum tricornutum* es la única especie que compone el género *Phaeodactylum*. Se encuentra en distintas zonas costeras alrededor del mundo, con grandes variaciones de salinidad.

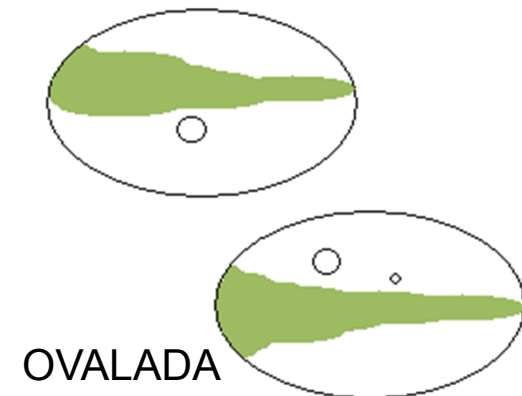
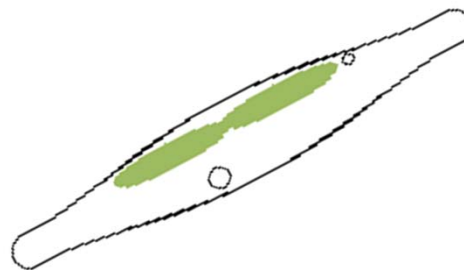
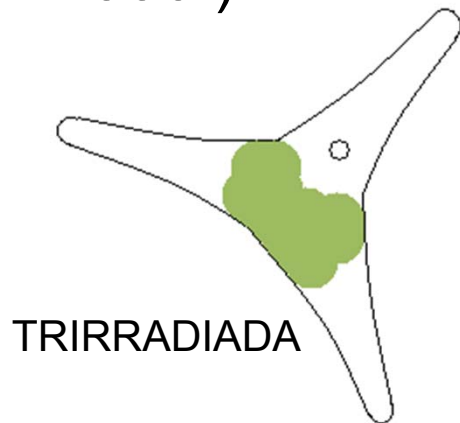
Debido a que fue de las primeras diatomeas en la que se describió la secuencia genómica completa ha sido sometida a multitud de ensayos.

# INTRODUCCIÓN

## -*Phaeodactylum tricornutum*-

*P. Tricornutum* puede existir en diferentes morfologías.

Las condiciones ambientales influyen en los cambios en la morfología y el tamaño de estas algas (Martino et al., 2007). Se pueden producir esos cambios en condiciones de altas concentraciones de cobre (Markina y Aizdaicher, 2006 ).



\* (1) De Martino et al., (2007) *Journal of Phycology*. 43:992-1009. (2) Markina et al., (2006) *Russian Journal of Plant Physiology*. 53-3: 343-347.

# INTRODUCCIÓN

## -COBRE-

El cobre es un metal que aparece en bajas concentraciones en el océano y que interviene en algunos procesos biológicos.

La contaminación por parte del hombre de tierras de cultivo y de los ecosistemas acuáticos, hace que se incremente en el medio la cantidad de este metal.

Este exceso en la concentración de cobre produce una disminución del crecimiento de microalgas, llegando a inhibirlo. (Franklin et al., 2002)

\* (1) Franklin et al. (2002) *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21/11: 2412-2422.

# INTRODUCCIÓN

## -COBRE-

Cuando los organismos se encuentran en esas condiciones de toxicidad por elevadas concentraciones de metales desarrollan mecanismos de defensa frente a esta toxicidad.

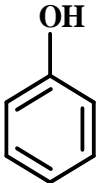
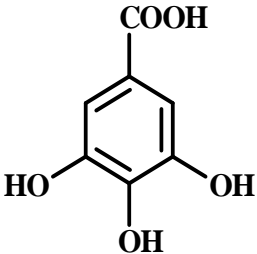
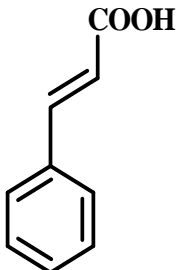
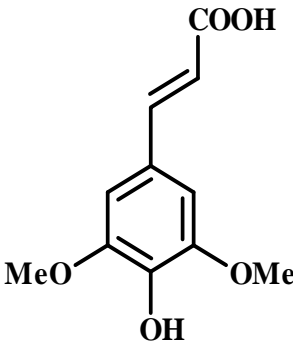
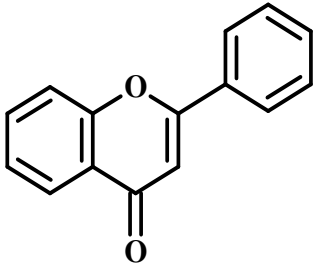
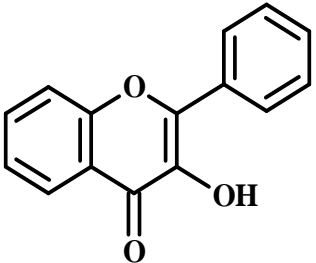
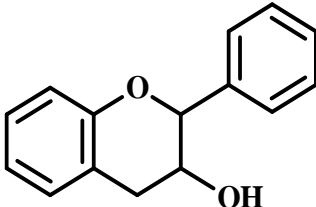
A nivel extracelular → Liberación de polifenoles (Jung et al., 2003)

A nivel de pared celular → Polifenoles asociados (Kovacik et al., 2008; Jung et al., 2003).

A nivel intracelular → Inhibición de radicales libres y quelación de metales (Quideau et al., 2011).

\*\* (1) Jung et al (2003) *Plant and Soil* 252:301-312. (2) Kovacik and Klejdus (2008) *Plant Cell Rep.*, 27, 605–615. (3) Quideau et al. (2011) *Angewandte Chemie*. 50/3: 586-621.

# INTRODUCCIÓN -POLIFENOLES-

POLIFENOLES SIMPLES		FENILPROPANOIDES	
FENOL	ÁCIDO GÁLICO	ÁCIDO CINAMICO	ÁCIDO SINAPICO
			
FLAVONOIDES			
FLAVONAS	FLAVONOLES	FLAVANOLES	
			



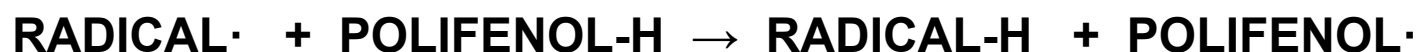
# INTRODUCCIÓN

## -POLIFENOLES-

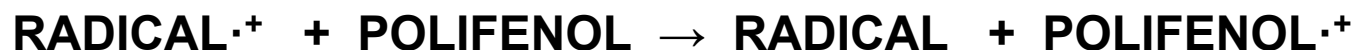
Los organismos producen estos compuestos en respuesta a los distintos tipos de estrés que sufren. La principal característica de estos compuestos es su capacidad antioxidante.\*

- INHIBEN RADICALES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO).\*

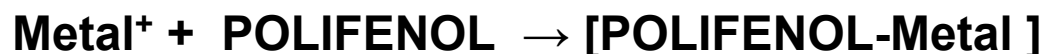
Transferencia de hidrogeno:



Transferencia de electrones:



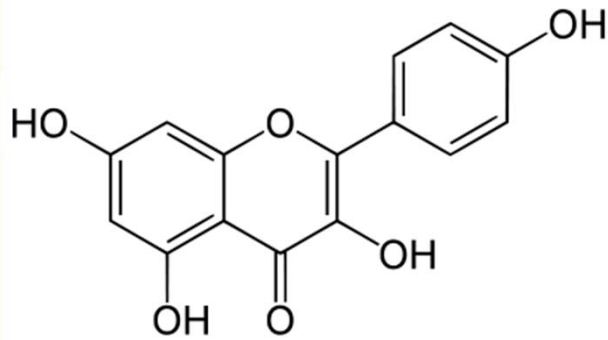
- AGENTES QUELANTES DE IONES DE METALES PESADOS.\*\*



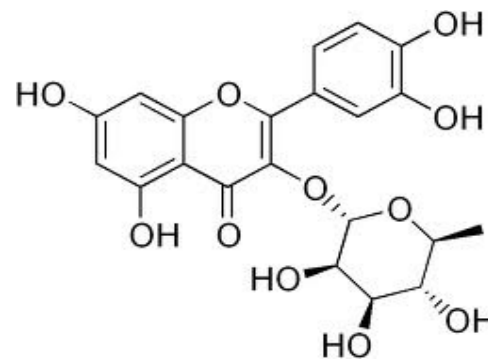
\*(1)Rivero et al.(2001) Plant Science 160: 315-321.(2) Treutter D (2006) *Environmental Chemistry Letters*.4/3:147-157

\*\*\*(1) Bentes et al. (2011) *Molecules*. 16/2:1749-1760.. (2) Neudörffer et al. (2006) *J. Agric. Food Chem*. 54:1898-1905

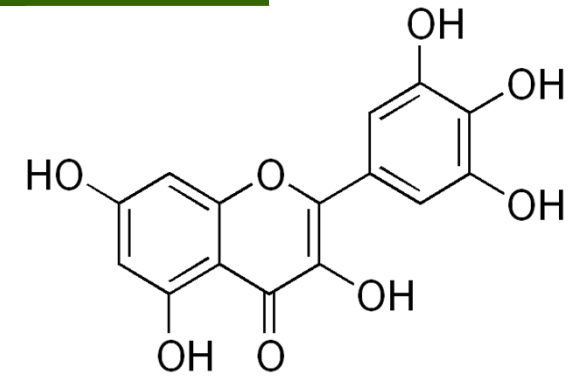
# INTRODUCCIÓN -POLIFENOLES-



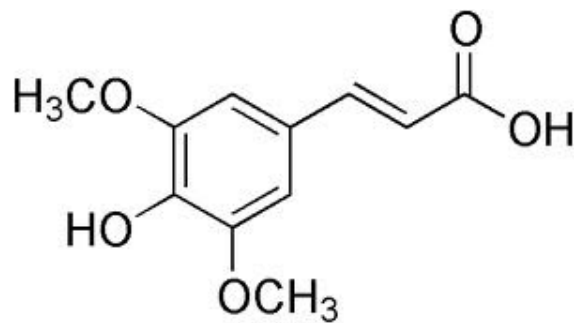
Kaempferol



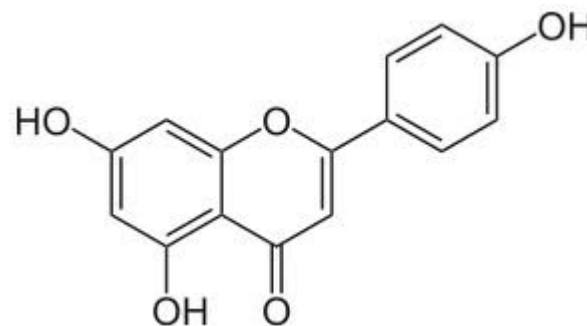
Quercitrina



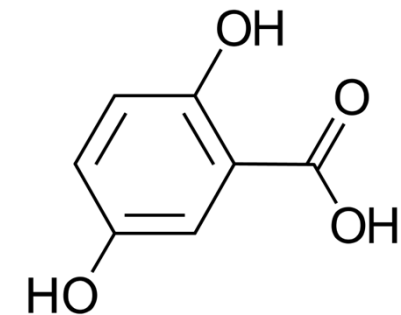
Miricetina



Acido Sinápico



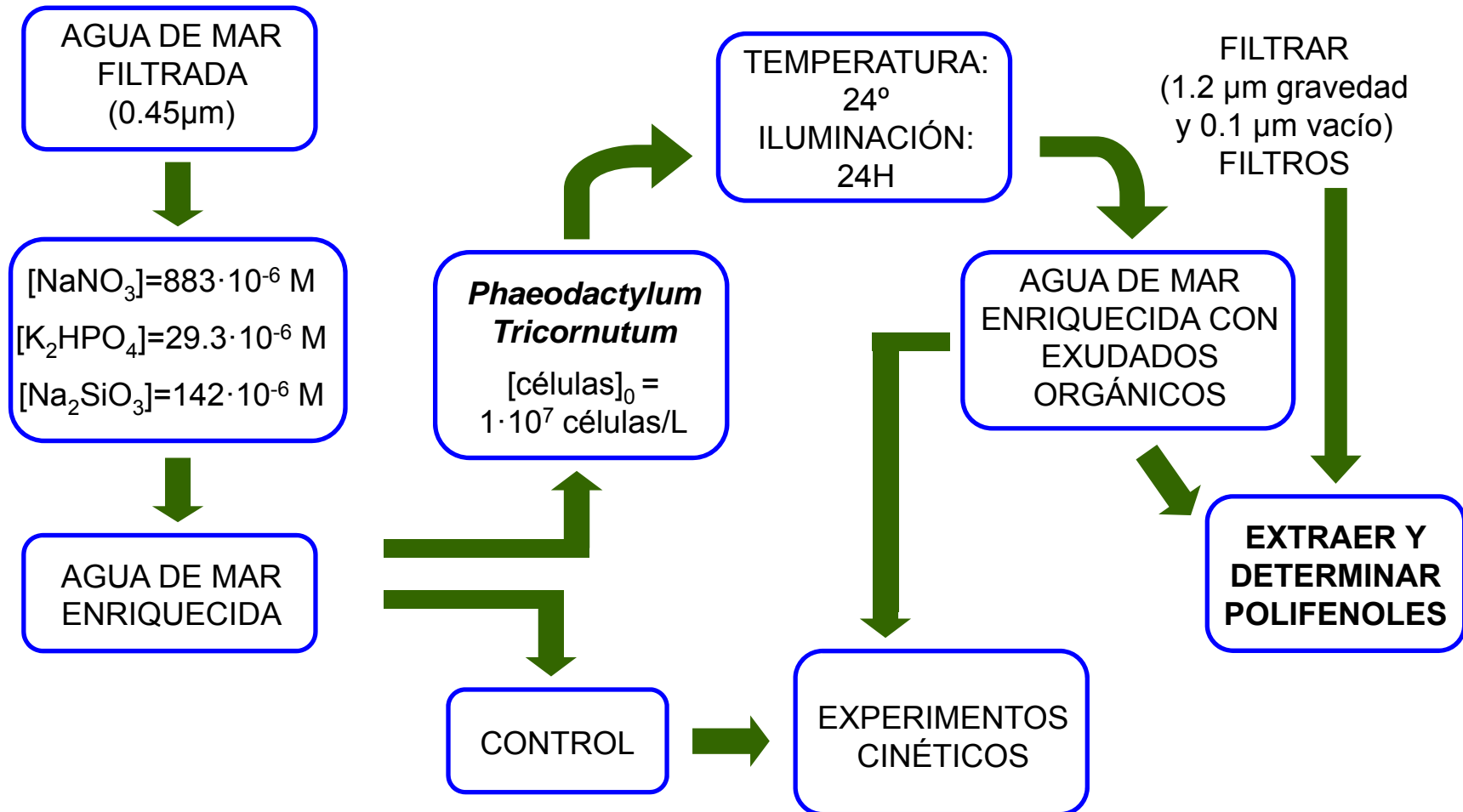
Apigenina



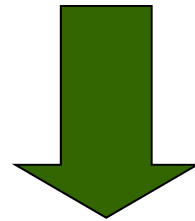
Ácido Gentísico

# MÉTODOS

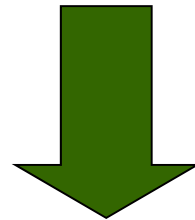
## -CULTIVO: CONDICIONES Y PROCESO-



**EXTRACCIÓN**



**PRECONCENTRACIÓN**



**ANÁLISIS**

## EXTRACCIÓN



## EXTRACCIÓN

Filtros



25 mL metanol + agitación



Centrifugar y recoger el sobrenadante



Residuo seco

## PRECONCENTRACIÓN



## PRECONCENTRACIÓN

Preparamos la muestra (0.1g/5mL HCl)



Columna SPE Cromabond Easy



Eluciones sucesivas 2mL (2%NaOH)



Concentrar hasta 0.5 mL



## PRECONCENTRACIÓN

2.5L Agua de mar con exudados



3 Columnas SPE Cromabond Easy

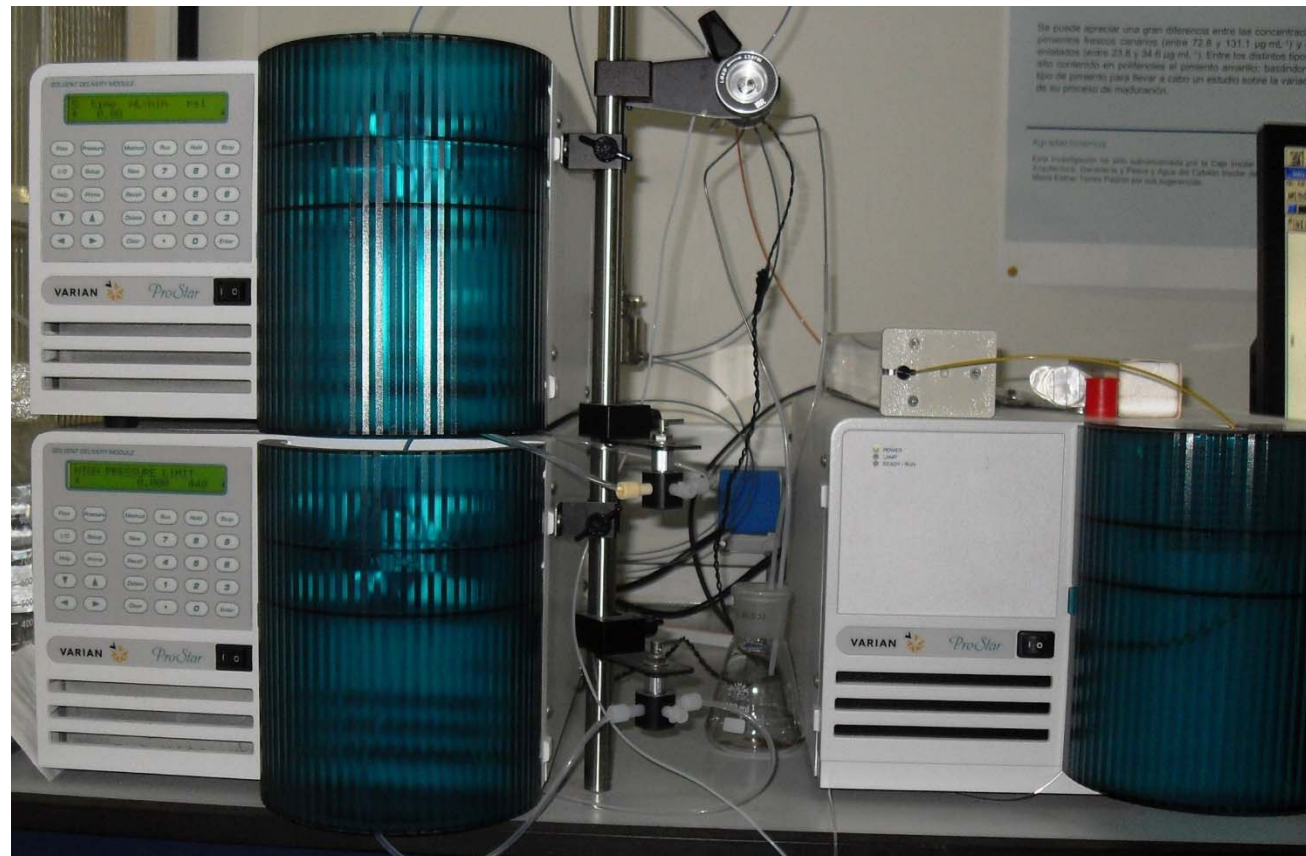


Eluciones en metanol



Concentrar hasta 0.5 mL

## ANÁLISIS



## ANÁLISIS

60 $\mu$ L MUESTRA



COLUMNA HPLC C18



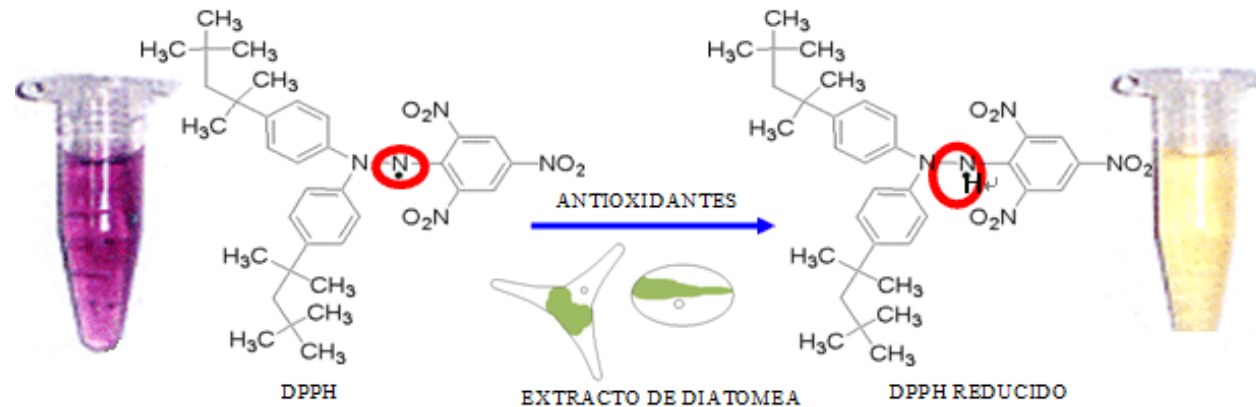
ISOCRÁTICO: MeOH / H<sub>2</sub>O (1% Ac. Fórmico)



DETECTOR UV – DIODO DE ARRAY

# MÉTODOS -DPPH-

Capacidad del antioxidante para neutralizar el radical DPPH.



1 mL de la disolución de DPPH 0.1 mM + 0.2 mL del extracto de alga.

Se calcula el porcentaje de inhibición.

$$(1 - \text{Abs}_{\text{ext}} / \text{Abs}_{\text{DPPH}}) \times 100$$

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## -CRECIMIENTO-

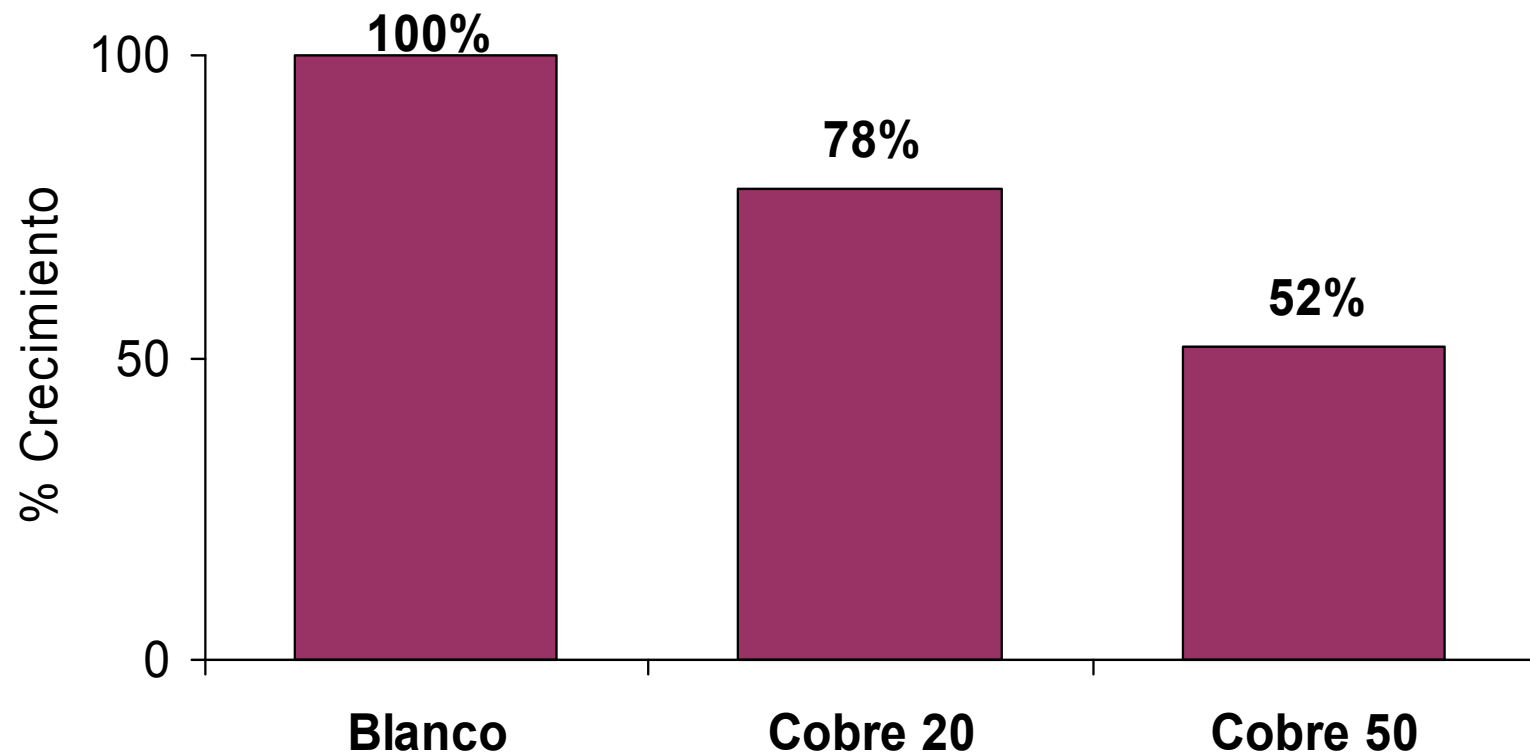
La densidad inicial de *P. Tricornutum*  $1 \cdot 10^4$  células·mL<sup>-1</sup>

Existe una relación entre [Cu] y el descenso en el número de células. El parámetro de inhibición del crecimiento en biomasa, EC50, se alcanza a una concentración de 35ug/mL (Moreno-Garrido et al., 2000)

3 Cultivos {  
-0 ug / L Cobre (Blanco)  
-20 ug / L Cobre  
-50 ug / L Cobre

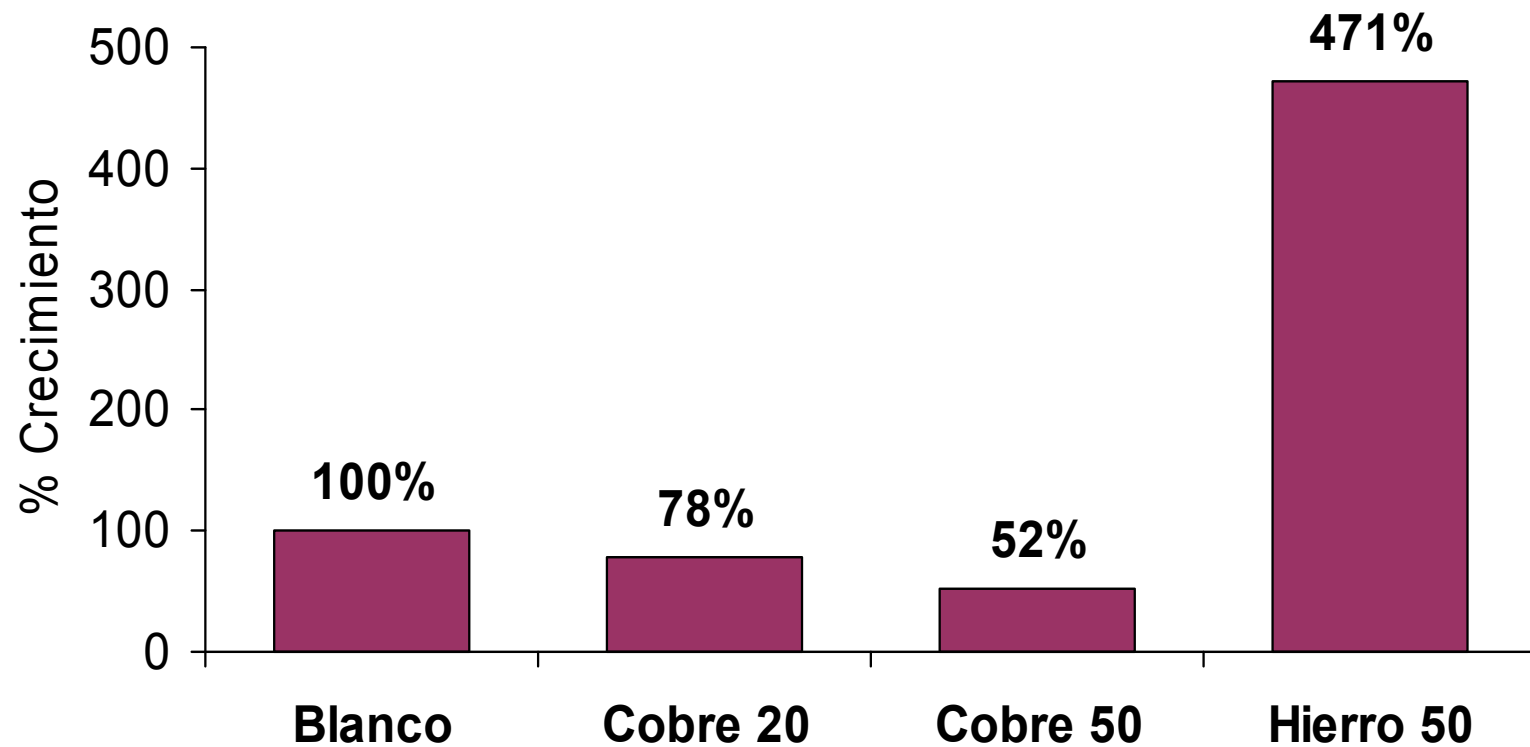
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## -CRECIMIENTO-



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## -CRECIMIENTO-



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## -CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES-

	BLANCO	[Cu] 20 $\mu\text{g L}^{-1}$	[Cu] 50 $\mu\text{g L}^{-1}$	[Fe] 50 $\mu\text{g L}^{-1}$
Gentísico*	21.3 $\pm$ 0.7	27 $\pm$ 1	42 $\pm$ 2	11.5 $\pm$ 0.8
Miricetina*	17.9 $\pm$ 0.2	38 $\pm$ 3	43 $\pm$ 2	66 $\pm$ 3
Sinápico*	72 $\pm$ 1.1	71.7 $\pm$ 3.1	136.9 $\pm$ 10.7	60 $\pm$ 4
Quercitrina*	74.7 $\pm$ 1.2	81.7 $\pm$ 1.4	148.8 $\pm$ 3.7	70 $\pm$ 2
Kaempferol*	61.6 $\pm$ 2.5	75.5 $\pm$ 2.44	121.6 $\pm$ 1.5	64 $\pm$ 2
Apigenina*	63.0 $\pm$ 0.8	77.9 $\pm$ 1.8	128.8 $\pm$ 1.9	61 $\pm$ 2

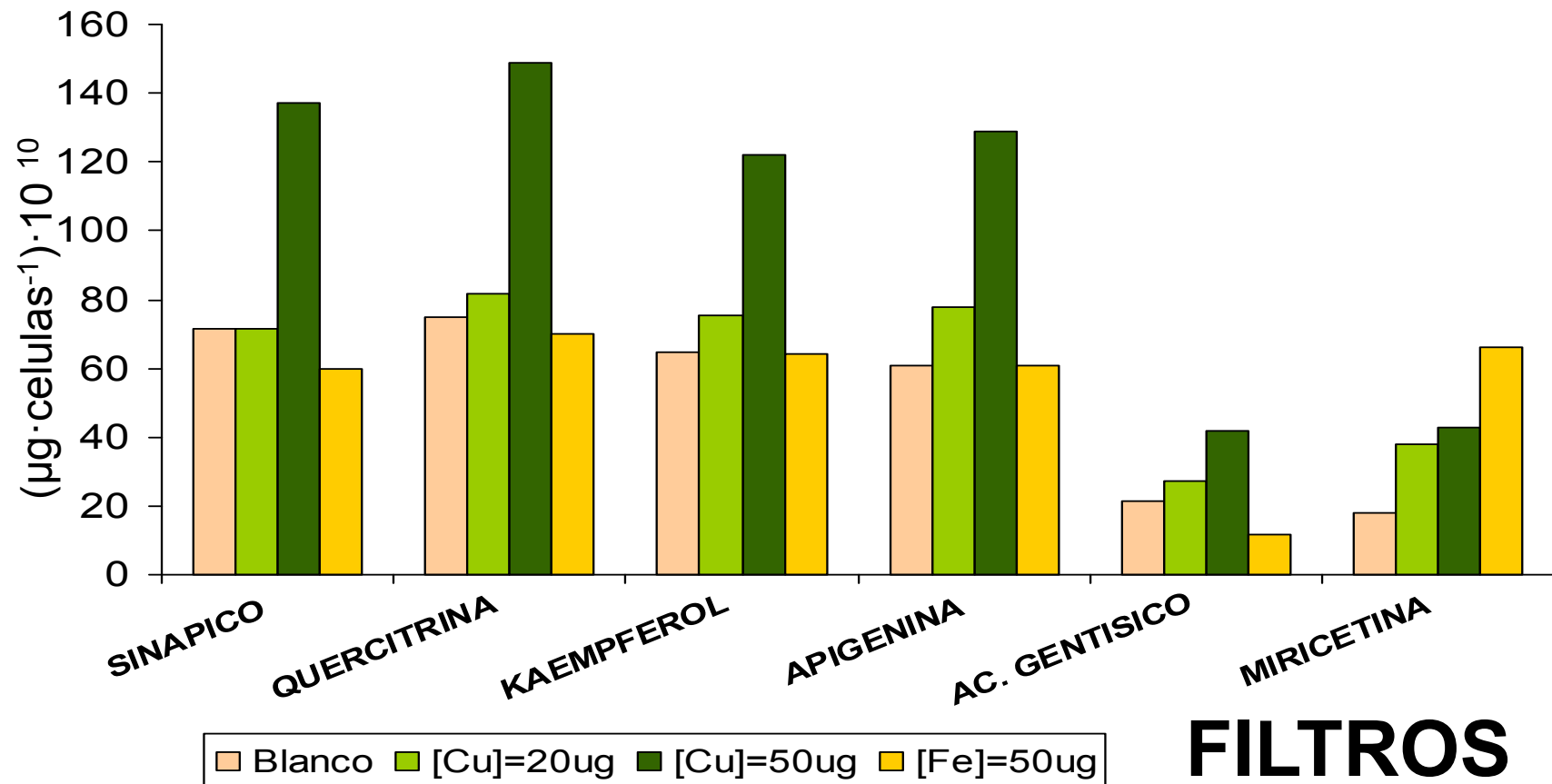
\* ( $\mu\text{g}\cdot\text{celulas}^{-1}$ ) $\cdot 10^{10}$

**FILTROS**



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## -CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES-



**FILTROS**

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## -CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES-

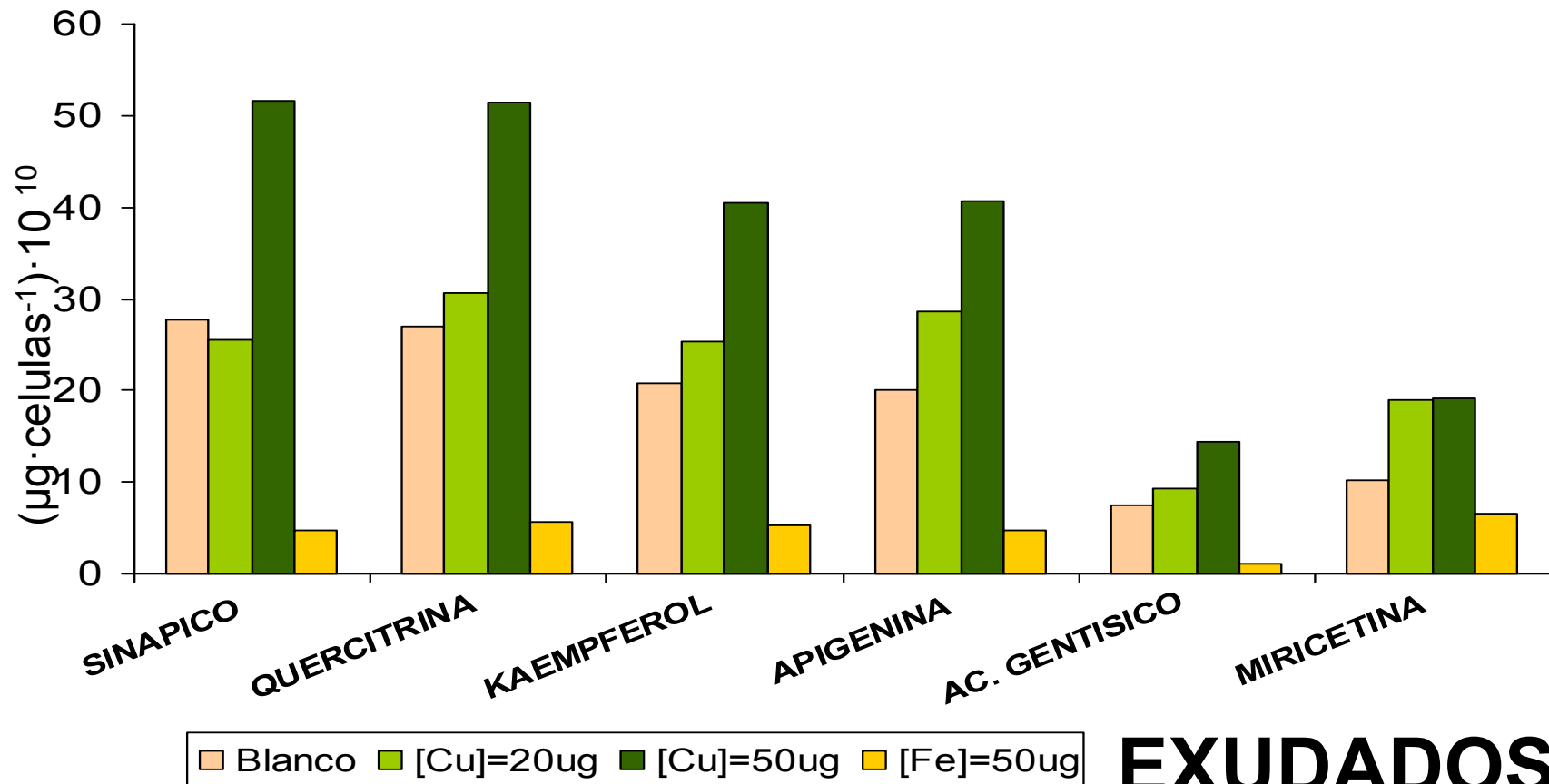
	BLANCO	[Cu] 20 µg L <sup>-1</sup>	[Cu] 50 µg L <sup>-1</sup>	[Fe] 50 µg L <sup>-1</sup>
Gentísico*	7.4 ± 0.1	9.38 ± 0.71	14.4 ± 1	1.04 ± 0.03
Miricetina*	10.3 ± 0.3	18.9 ± 0.81	19.1 ± 0.59	6.6 ± 0.7
Sinápico*	27.8 ± 0.8	25,5 ± 0.81	51.7 ± 1.3	4.81 ± 0.07
Quercitrina*	27 ± 1.8	30.6 ± 0.9	51.5 ± 2.2	5.7 ± 0.3
Kaempferol*	20.7 ± 0.3	25.4 ± 0.75	40.5 ± 2.46	5.3 ± 0.2
Apigenina*	19.8 ± 1.7	28.7 ± 0.7	40.6 ± 2.6	4.7 ± 0.08

\* (µg·celulas<sup>-1</sup>)·10<sup>10</sup>

## EXUDADOS

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## -CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES-



**EXUDADOS**

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## -CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES-

ÁCIDO GÁLICO	ÁCIDO PROTOCATEICO
CATEQUINA	ÁCIDO VANILLICO
EPICATEQUINA	ÁCIDO SIRÍNGICO
ÁCIDO CLOROGENICO	ÁCIDO GENTÍSICO
ÁCIDO CAFEICO	ÁCIDO <i>p</i> -COUMÁRICO
ÁCIDO FERÚLICO	RUTINA
MIRICETINA	QUERCETINA

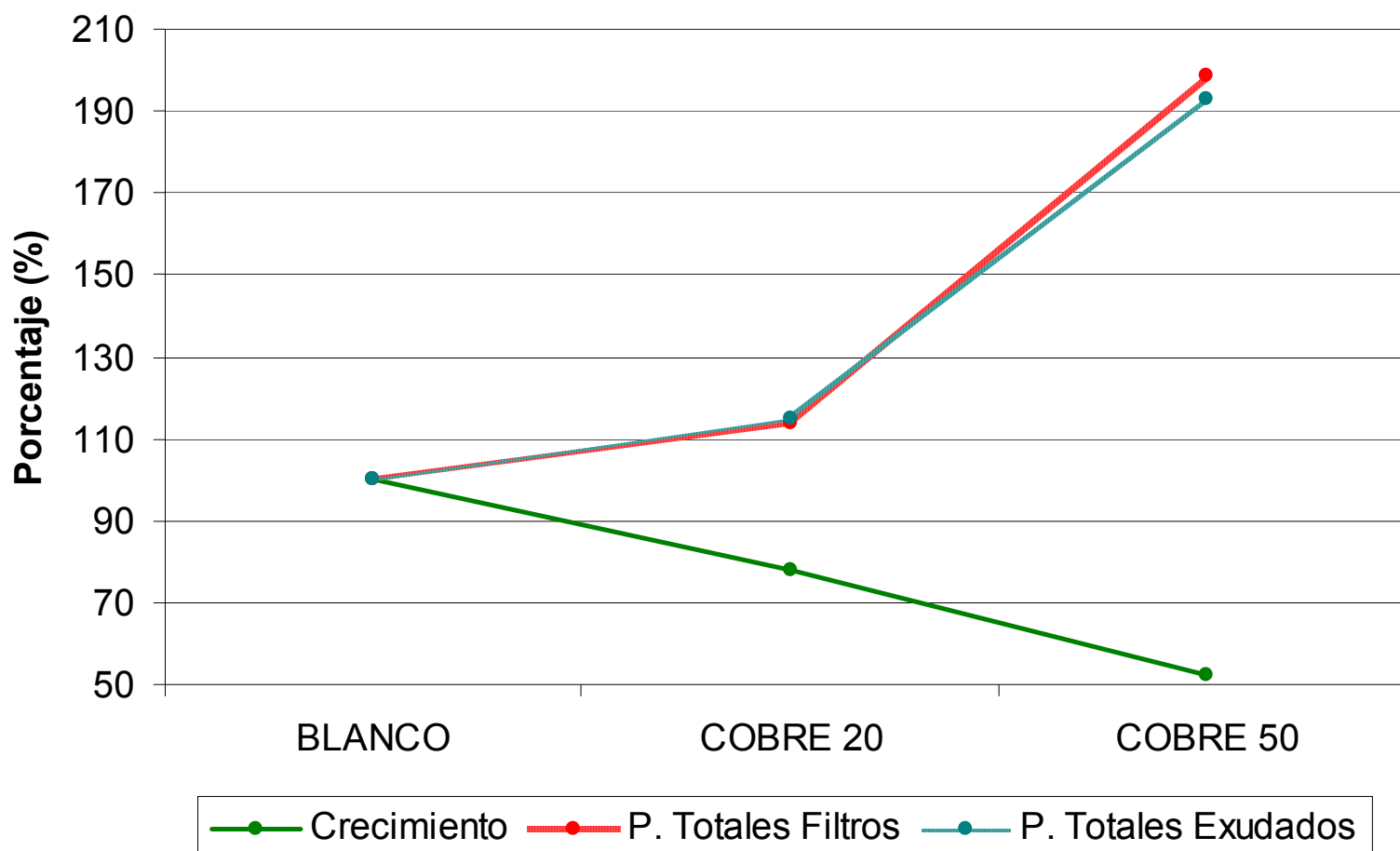
BLANCO: 484,2; COBRE (20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 581,3; COBRE (50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) =1049,4\*

\*  $\mu\text{g}$  POLIFENOLES TOTALES  $\cdot\text{celulas}^{-1}\cdot 10^{10}$

\*\* López et al. (2011) Food Chemistry 125:1104-1111.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## -CRECIMIENTO vs RECUPERACIONES-



## CONCLUSIONES

### SPE-HPLC

- RÁPIDO
- SENSIBLE
- PRECISO

La presencia de cobre es tóxica para la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* porque su crecimiento se ve inhibido a partir de ciertas concentraciones del ion cobre (II).

Destacar de los polifenoles su espectacular incremento a niveles tóxicos de cobre. Esto hace suponer que son generados para proteger al organismo a nivel intracelular y extracelular.

## CONCLUSIONES

CULTIVOS UNICELULARES	PRODUCTOS ALIMENTICIOS
<i>P. tricornutum</i> 132 ug g <sup>-1</sup> (616,2 ug g <sup>-1</sup> si tenemos en cuenta todos los polifenoles)	Wakame 1.01ug g <sup>-1</sup> ( <i>Undaria pinnatifida</i> )
<i>Spongiochloris spongiosa</i> 5.1 µg g <sup>-1</sup>	Nori 1.9 ug g <sup>-1</sup> ( <i>Porphyra tenera</i> )
Cyanobacteria <i>Anabaena doliolum</i> 3.6 µg g <sup>-1</sup>	

Debido a los múltiples beneficios de los polifenoles; entre los que destacan la prevención de enfermedades degenerativas como alzheimer, cáncer, enfermedades cardiovasculares, entre otras, sería interesante tener en cuenta a la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* para su uso en la industria alimentaria o farmacéutica como un suplemento farmacéutico.

# VARIACIÓN DEL PERFIL POLIFENÓLICO DE DIATOMEAS *Phaeodactylum tricornutum* CULTIVADAS EN AGUA DE MAR ENRIQUECIDA EN COBRE (II)

Aroa López, Milagros Rico, Aridane González,  
Magdalena Santana, Melchor González y Norma Pérez.

Departamento de Química, Universidad de Las Palmas de Gran  
Canaria, Campus de Tafira, 35017 Las Palmas de Gran Canaria,  
Canary Islands, Spain.

e-mail: [aroa2412@gmail.com](mailto:aroa2412@gmail.com)



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

## MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN