



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**POTENCIAL DE CEPAS DE MICROALGAS AISLADAS DE LA COSTA DE YUCATÁN
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL**

Tesis que presenta

ALAN RODRIGO LÓPEZ ROSALES

**En opción al título de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE**

Mérida, Yucatán, febrero del 2017

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el proyecto CB-2011/166371: "Diversidad Molecular de Microorganismos en Sedimentos y Aguas de la Costa Yucateca con Capacidad para la Producción de Bioenergía" bajo la dirección de la Dra. Ruby Alejandra Valdez Ojeda. Así como sus conocimientos y su dedicación a este trabajo de tesis de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante el Fondo Institucional Ciencia Aplicada por el proyecto No. 253986: Apoyos complementarios para la adquisición de equipo científico 2015.

Al Dr. Luis Felipe Barahona por toda su sabiduría y enseñanza, así como también todo el tiempo dedicado a los análisis de los datos de esta tesis.

A la Dra. M. Concepción Lora Vilchis por su apoyo en la revisión de esta tesis, así como también de sus consejos.

A la Biol. Katia Isabel Ancona, por todos sus conocimientos compartidos en Ficología.

A los técnicos Q.I. Tanit Toledano y M. en C. Jorge Domínguez, por todo su apoyo y ayuda en cualquier circunstancia, dentro y fuera del laboratorio.

Al CONACyT por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto a través de la beca No.522627.

A mis compañeros de generación, y del laboratorio Carlos, Ricardo, Harbey, Rayo, Alexis y Itza.

A mis padres por brindarme todas las herramientas y el apoyo durante todos estos años, por soportar la distancia y comprender mis actividades académicas en el centro de investigación.

Gracias

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 1	
ANTECEDENTES	2
1.1. Microalgas	2
1.1.1. Estructura de las microalgas.....	3
1.1.2. Clasificación	6
1.1.3. Organización celular en las microalgas.....	8
1.1.4. Nutrientes en las microalgas.....	8
1.2. Limitación de nutrientes en las microalgas	10
1.2.1. Nitrógeno en los cultivos microalgales.....	11
1.3. Potencial de las microalgas marinas.....	12
1.3.1. Diferentes aplicaciones de las microalgas marinas.....	12
1.4. Determinación del contenido lipídico en las microalgas	15
1.5. Lípidos en microalgas.....	16
1.6. Metabolismo y síntesis de lípidos	17
1.7. Estrategias para la modificación lipídica	20
1.8. Biodiesel a partir de microalgas.....	21
1.8.1. Procesos de obtención de biodiesel	22
1.9. Búsqueda de nuevas cepas con potencial para producir TAG	24
OBJETIVOS.....	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
CAPITULO 2	

METODOLOGÍA	28
2.1. Estrategia experimental	28
2.2. Metodología experimental.....	29
2.3. Obtención de material biológico.....	30
2.4. Métodos de aislamiento	31
2.4.1. por micropipeteo.....	31
2.4.2. Estriado en medio sólido	31
2.5. Adaptación al medio de cultivo	31
2.6. Escalamiento del cultivo microalgal	31
2.7. Purificación y tratamiento.....	32
2.7.1. Lavados con agua de mar estéril.....	32
2.7.2. Dilución seriada	32
2.7.3. Tratamiento con antibióticos	32
2.7.4. Método de choque ácido	32
2.8. Determinación de la curva de crecimiento	33
2.9. Producción de biomasa	33
2.10. Recuperación y secado de la biomasa.....	34
2.11. Extracción de lípidos totales.....	34
2.12. Cromatografía en capa fina	34
2.13. Cromatografía de columna.....	35
2.14. Transesterificación	35
2.15. Análisis del perfil lipídico	35
2.15.1. Análisis por cromatografía de gases-masas.....	35
2.15.2. Análisis por espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier.....	36
CAPITULO 3	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37

3.1. Obtención de cepas de microalgas	37
3.2. Acondicionamiento al medio de cultivo	37
3.3. Acondicionamiento de crecimiento microalgal	39
3.4. Purificación y tratamiento.....	41
3.4.1. Antibióticos	41
3.4.2. Dilución seriada	43
3.4.3. Método con choque ácido.....	44
3.5. Determinación de la curva de crecimiento	44
3.5.1. Densidad y tamaño celular	45
3.6. Producción recuperación y secado de la biomasa de las tres cepas	46
3.7. Extracción de lípidos totales	47
3.7.1. Cromatografía de capa fina del extracto lipídico total.....	48
3.8. Separación por cromatografía en columna de los extractos crudos	49
3.9. Transesterificación de los TAG	50
3.10. Análisis del perfil lipídico	51
3.10.1. Análisis por cromatografía de gases-masas de los grupos de fracciones de las tres cepas bajo estudio.....	51
3.11.1.1 . Hidrocarburos	54
3.11.1.2. FAME	55
3.11.1.3. Ácidos orgánicos	56
3.11.1.5. Terpenos	57
3.11.1.6. Esteroles	58
3.11.1.7. Aminas	58
3.11.2. Análisis por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier	59
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	64

ANEXO 1 Formulación medios utilizados	73
ANEXO 2 Resultados de cromatografía de gases-masas (cromatogramas).....	75
ANEXO 3 Resultados de cromatografía de gases-masas (basa de datos).....	79
ANEXO 4 Absorciones IR mezcla de estándares de fosfolípidos	98

Listado de Tablas

Tabla 1.1. Clasificación de las microalgas y cianobacterias [6].	7
Tabla 1.2. Niveles de producción de aceite a partir de especies oleaginosas [34].	14
Tabla 1.3. Acumulación lipídica en diferentes especies de microalgas [35].	15
Tabla 1.4. Composición de ácidos grasos de algunas microalgas y cianobacterias (porcentaje de ácidos grasos totales).	19
Tabla 1.5. Comparación de propiedades de biodiesel microalgal, diesel y estándar ASTM para biodiesel [22].	22
Tabla 2.1. Coordenadas de los puntos de muestreo.	30
Tabla 2.2. Condiciones en los sistemas de fotobiorreactores [14, 24].	33
Tabla 2.3. Relación de la dimensión estimada de las columnas cromatográficas para separar distintos pesos de muestra.	35
Tabla 3.1. Efecto a la variación del pH en la densidad celular en las cepas P1, P2 y P3.	40
Tabla 3.2. Efecto del tamaño de inóculo en la densidad celular en las cepas P1, P2 y P3.	40
Tabla 3.3. Defecto de la variación en la concentración de nutrientes del medio Guillard f/2 en densidad celular de las cepas P1, P2 y P3.	41
Tabla 3.4. Grupos obtenidos de la separación por cromatografía en columna del extracto lipídico de las cepas bajo estudio.	49
Tabla 3.5. Compuestos identificados por cromatografía de gases-masas en las cepas P1, P2 y P3 (Anexo 2).	52
Tabla A.1.1. Constitución de medio BG-11 salino modificado [14, 24].	73
Tabla A.1.2. Constitución medio Guillard f/2 modificado [14, 24].	73
Tabla A.3.1. Compuestos identificados en el Grupo 1, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.	79
Tabla A.3.2. Compuestos identificados en el Grupo 2, de los extractos de las cepas P1 y P2.	84
Tabla A.3.3. Compuestos identificados en el Grupo 2, del extracto de la cepa P3.	87
Tabla A.3.4. Compuestos identificados en el Grupo 3, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.	91
Tabla A.3.5. Compuestos identificados en el Grupo 4, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.	93

Tabla A.3.6. Compuestos identificados en el Grupo 5, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.	97
Tabla A.4.1. Espectro de absorción IR mezcla estándares de fosfolípidos [99].....	98

Listado de Figuras

Figura 1.1. Fotomicrografía en microscopía electrónica de barrido de dos especies de microalgas. a) <i>Coelastrum pulcherum</i> (Chlorophyta); y b) <i>Achnanthes exigua</i> (Bacillariophyta) [7].....	2
Figura 1.2. Características estructurales de una célula de cianobacteria. (C) gránulos de cianoficina (gránulo estructurado); (Car) carboxisoma (cuerpo poliédrico); (D) fibrillas de ADN; (G) aerotopos (vesículas de gas); (P) plasmalema; (PB) granulos de cuerpo polifosfato; (PG) gránulos de poliglucano; (PY) ficobilisomas; (R) ribosomas; (S) vaina; (W) pared celular [8, 9].....	5
Figura 1.3. Orgánulos presentes en una célula eucariota microalgal (<i>Chlamydomonas</i>). (C) cloroplasto; (CV) vacuola contráctil; (ER) retículo endoplasmático; (F) flagelos; (G) aparato de Golgi; (M) mitocondria; (N) núcleo; (P) pirenoide; (S) almidón; (V) Vacuola; (W) pared celular [8, 9].	6
Figura 1.4. La producción de energía por la conversión de biomasa de microalgas usando procesos de combustión directa, bioquímicos, termoquímicos y químicos [32].	14
Figura 1.5. Visión general simplificada de los metabolitos y las vías de representación en la biosíntesis de lípidos de microalgas que se muestran en negro y enzimas que se muestran en rojo [38].	18
Figura 1.6. Reacción de transesterificación [58].	23
Figura 2.1. Estrategia experimental llevada a cabo en las tres cepas bajo estudio.	28
Figura 2.2. Desarrollo experimental llevado a cabo en las tres cepas bajo estudio.	29
Figura 2.3. Ubicación de los puntos de muestreo.	30
Figura 2.4. Fotobiorreactor con humidificador de aire.	33
Figura 3.1. Acondicionamiento al medio de cultivo sintético (Cepa P1, P2 y P3), ocho días posterior a su inóculo. a) BG11 salino (SIGMA C3061); y b) Guillard f/2 (SIGMA G9903).....	38
Figura 3.2. Acondicionamiento al medio de cultivo cepa P1, P2 y P3, veintinueve días posterior a su inóculo.	38
Figura 3.3. Variaciones de pH en medio de cultivo Guillard f/2. a) Cultivo inicial; y b) veintinueve días posterior a su inóculo.....	39

Figura 3.4. Variaciones en el tamaño de inóculo. Cepas P1, P2 y P3; veintiún días posterior a su inóculo.	40
Figura 3.5. Adición del doble de nutrientes en medio de cultivo Guillard f/2. a) Cultivo quince días posterior a su inóculo; y b) veintiún días posterior a su inóculo.	41
Figura 3.6. Aplicación de 200 y 400µL de Amikacina. a) Primer día de la aplicación y b) ocho días después de la aplicación.	42
Figura 3.7. Purificación de las cepas por (a) dilución seriada 1:10, 1:100, 1:100 y	43
Figura 3.8. Cultivo obtenido posterior al choque ácido: a) sembrado cultivos P1, P2 y P3 en medio solido; b) cultivos observado bajo microscopio.	44
Figura 3.9. Curva de crecimiento de las cepas P1(■), P2(●) y P3(▲).	45
Figura 3.10. Producción de biomasa seca de las cepas P1, P2 y P3 (g·L ⁻¹).	47
Figura 3.11. Lípidos totales obtenidos de las cepas P1, P2 y P3, en función al número de extracción: Ext. 1; Ext. 2 y Ext. 3, hacen referencia al número de extracciones.	48
Figura 3.12. Cromatografía en capa fina de los extractos lipídicos de las cepas P1 (a), P2 (b) y P3 (c) (S: aceite; E1, E2 y E3: número de extracción); cuadro línea roja discontinua: compuestos no polares; cuadro línea roja continua: TAG; y cuadro línea azul discontinua: compuestos polares [67].	49
Figura 3.13. Cromatografía en capa fina de los triacilglicéridos obtenidos de la cromatografía en columna de las cepas P1(a), P2(b) y P3(c) y el producto de la transesterificación (S1: aceite comestible [71]; E1 y E2: extracto lipídico (triacilglicéridos) por duplicado; S2: biodiesel [71]; T1 y T2 Transesterificado por duplicado).	51
Figura 3.14. Espectro de trasmisión FTIR cepa P1 (línea negra), P2 (línea roja) y P3 (línea azul); Grupo 6.	60
Figura A.2.1. Cromatograma cepa P1.	75
Figura A.2.2. Cromatograma cepa P2.	76
Figura A.2.3. Cromatograma cepa P3.	77
Figura A.2.4. Cromatograma grupo 2 cepa P3.	78
Figura A.3.1. Compuestos identificados en el Grupo 1, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.	83

Figura A.3.2. Compuestos identificados en el Grupo 2, de los extractos de las cepas P1 y P2.	86
Figura A.3.3. Compuestos identificados en el Grupo 3, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.	93
Figura A.3.4. Compuestos identificados en el Grupo 4, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.	96
Figura A.4.1. Fosfolípidos identificados en la lecitina de soya [98].	99

RESUMEN

Numerosas cepas de microalgas marinas son capaces de sintetizar más del 50% de su peso en lípidos (la mayoría triacilglicéridos, TAG) los cuales son empleados para convertirlos mediante transesterificación, en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Sin embargo, los rendimientos varían entre las especies, por lo que la búsqueda de nuevas cepas de microalgas continúa vigente. El presente trabajo se enfoca en la evaluación del potencial para la producción de biodiesel, de tres cepas de microalgas marinas (P1, P2 y P3) colectadas en ambientes marinos de Yucatán. En este sentido, se adaptaron al medio de cultivo Guillard f/2, se aislaron y purificaron por medios químicos. Posteriormente, se determinó la producción promedio de biomasa en peso seco de las cepas P1, P2 y P3 las cuales fueron de 0.82 ± 0.03 , 0.58 ± 0.01 y 0.56 ± 0.02 g·L⁻¹, respectivamente al final de quince días de cultivo. Se obtuvo una producción lipídica de 230.93 ± 36 , 163.52 ± 21 y 128.27 ± 16 mg·L⁻¹, respectivamente. El perfil lipídico está compuesto por ácidos grasos saturados en minoría (C14:0, C16:0 y C18:0), y en mayoría son monoinsaturados (C18:2 *cis*- Δ^9) y poliinsaturados (C18:2 *cis*, *cis*- Δ^9). Los perfiles lipídicos de las cepas P1 y P3 resultaron adecuados para la producción de biodiesel. Además de los FAME identificados, se detectó la presencia de fosfolípidos e hidrocarburos en los perfiles de las tres cepas, los cuales pueden ser empleados para la producción de otros biocombustibles. Este trabajo aporta información de cepas de microalgas marinas productoras de TAG y ofrecen una alternativa interesante como fuente de lípidos para la producción de biodiesel, así como también la obtención de compuestos bioactivos como subproducto. Sin embargo, son necesarios más estudios como: efecto de limitación de nutrientes, estrés lumínico y salino, para optimizar la productividad lipídica. Así como también la identificación genética y morfotaxonomía de las cepas aisladas.

ABSTRACT

Many strains of marine microalgae are able to synthesize more than 50% of their weight in lipids (most triacylglycerides, TAG) which are used to convert them by transesterification into methyl esters of fatty acids (FAME). However, yields vary among species, so the search for new microalgae strains continues. The present work focuses on the evaluation of the potential for biodiesel production of three strains of marine microalgae (P1, P2 and P3) collected in marine environments of Yucatan. In this sense, they are adapted to the Guillard f / 2 culture medium, isolated and purified by chemical means. Subsequently, the average biomass production in dry weight of strains P1, P2 and P3 were determined, which were 0.82 ± 0.03 , 0.58 ± 0.01 and 0.56 ± 0.02 g·L⁻¹, respectively at the end of fifteen days of cultivation. A lipid production of 230.93 ± 36 , 163.52 ± 21 and 128.27 ± 16 mg·L⁻¹, respectively, was obtained. The lipid profile is composed of the saturated fatty acids in minority (C18: 2 *cis*, *cis*- Δ^9) and polyunsaturated fatty acids (C14: 0, C16: 0 and C18: 0). The lipid profiles of strains P1 and P3 were suitable for the production of biodiesel. In addition to those identified FAME, the presence of phospholipids and hydrocarbons were detected in the profiles of the three strains, which can be used for the production of other biofuels. This work provides the information of strains of marine microalgae producing TAG and provides an interesting alternative as a source of lipids for the production of biodiesel, as well as the production of bioactive compounds as a by-product. However, more studies are needed such as nutrient limiting effect, light and saline stress, to optimize lipid productivity. As well as the genetic and morphotaxonomic identification of isolated strains.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda mundial de energía, ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes de bioenergía. En este sentido las microalgas representan una alternativa ventajosa como fuente de materia prima en comparación con los cultivos oleaginosos terrestres, debido a que poseen una alta tasa de crecimiento, alto contenido de lípidos y captación de dióxido de carbono como fuente de carbono inorgánica. Adicionalmente la diversidad de cepas microalgales ofrece un panorama amplio de fuentes de bioenergía. La producción de biodiesel a partir de cultivos oleaginosos requiere la disponibilidad de fuentes de agua dulce ya que los cultivos de jatropha, colza o soja requieren 13,676; 14,201; y 19,924 L de agua de riego por L de biodiesel, respectivamente. El uso de microalgas (*Chlorella vulgaris*) para la producción de biodiesel puede reducir la utilización de agua a 591 ± 170 L de agua dulce por L de biodiesel y en *Nannochloropsis oculata* a 721 ± 376 L de agua de mar por L de biodiesel. Aunque los valores de consumo de agua dulce y salada son similares, la mayoría de los sistemas de producción necesitarán más energía para obtener agua dulce que agua de mar. Por ello, las microalgas marinas, se han postulado como candidatas para la producción de biomasa rica en lípidos neutros o triacilglicéridos (TAG), para la síntesis de biodiesel. Esto evitaría las polémicas relacionadas con la competencia de su cultivo con la producción de alimentos y el consumo humano. Algunos de los parámetros claves que afectan la factibilidad económica de la producción de biodiesel a partir de microalgas son: una baja producción de biomasa microalgal, la ineficiencia en los procesos de recuperación de biomasa y de extracción de lípidos; y sobre todo, una baja productividad de triacilglicéridos (TAG). Esto último debido a que la capacidad de síntesis de triacilglicéridos es dependiente de la especie de microalgas, por lo que la selección de nuevas cepas de microalgas marinas con potencial para producción de TAG es una de las vertientes más importantes. Por otra parte, el aislamiento de cepas autóctonas de microalgas es una ventaja para la producción de biomasa a gran escala, ya que las cepas aisladas cerca del área de producción se encuentran adaptadas al ambiente circundante, reduciendo también cualquier impacto ambiental por la introducción de nuevas especies en los ecosistemas. En este sentido, el presente trabajo se enfocó en la evaluación de tres cepas de microalgas marinas aisladas de la costa de Yucatán, para la producción de triacilglicéridos.

CAPITULO 1 ANTECEDENTES

1.1. Microalgas

Las microalgas son organismos pertenecientes al reino *plantae*, comprenden un grupo muy diverso de organismos fotosintéticos. Se clasifican como talofitas, es decir, plantas inferiores, por presentar una estructura simple no vascularizada con ausencia de raíz, tallo y hojas. Sus estructuras reproductivas están desprotegidas (Criptogamia), son productoras de esporas y están desprovistas de semillas y flores (Figura 1.1) [1, 2, 3]. Tienen similitudes en muchos aspectos con las plantas superiores, como por ejemplo, la composición de sus carbohidratos de reserva, proteína y pigmentos fotosintéticos [4, 5, 6]. Por otra parte, el término microalga no tiene ningún valor taxonómico, pero es muy práctico ya que incluye microorganismos algales con clorofila a, b, y c; así como las ficobilinas, carotenoides y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica [6]. Las microalgas presentan una amplia distribución geográfica, se pueden encontrar prácticamente en todas las condiciones ambientales de la Tierra, desde los suelos fértiles hasta los desiertos fríos y calientes. Sin embargo, es en los ambientes acuáticos, tanto marinos como en aguas continentales, donde estas prevalecen [4].

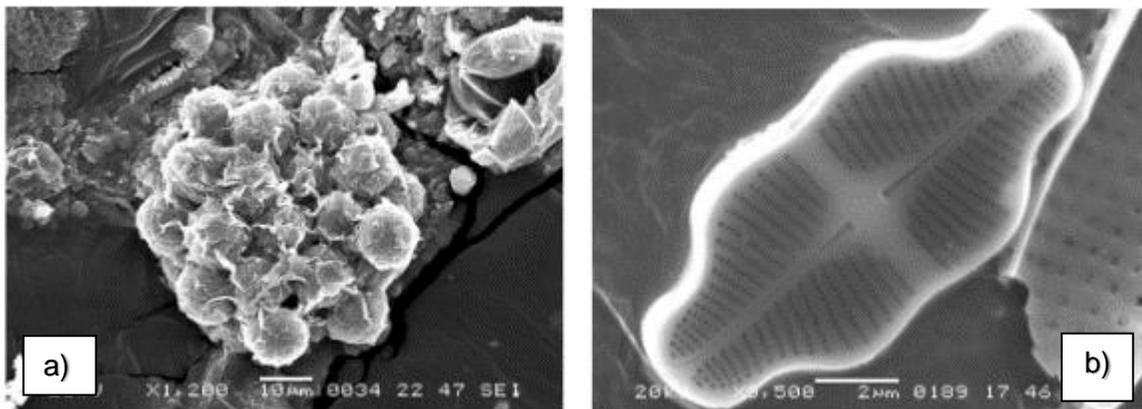


Figura 1.1. Fotomicrografía en microscopía electrónica de barrido de dos especies de microalgas. a) *Coelastrum pulcherum* (Chlorophyta); y b) *Achnanthes exigua* (Bacillariophyta) [7].

Los grupos de microalgas incluyen individuos con notables similitudes morfológicas, las cuales surgen como respuesta adaptativa y convergentes al medio físico en el que habitan: altamente heterogéneo y caracterizado por diversos gradientes de luz, temperatura y

nutrientes modificados por la turbulencia del agua, la presencia de nubes, la diferencia en gradientes térmicos, la afluencia de lluvias, entre otros factores oceanológicos o limnológicos [7].

1.1.1. Estructura de las microalgas

Hay dos tipos básicos de células algales: las más primitivas con organización procariotas y las más complejas son eucariotas. Las primeras, las cianobacterias, carecen de organelos de doble membrana como plastos, mitocondrias, núcleos, aparatos de Golgi y flagelos (Figura 1.2). Una célula eucariota (Figura 1.3) está a menudo rodeada por una pared celular, en el caso de las clorófitas está compuesta de polisacáridos parcialmente producidos y secretados por el aparato de Golgi [8, 9].

- Flagelos: Son apéndices cilíndricos móviles que se encuentran en tipos de células ampliamente divergentes a lo largo de la planta y el reino animal, que mueven la célula a través de su entorno o mueven el medio ambiente en relación con la célula. Estos pueden consistir en un axonema de nueve microtúbulos de doblete que rodean a dos microtúbulos centrales, con todos los microtúbulos encerrados en la membrana plasmática (Figura 1.3, f) [9]. La arquitectura flagelar de las algas verdes, han dado lugar a conocer que las células flageladas pueden tener organización cruzada o lateral; donde en el primer caso pueden ser DO (en dirección opuesta), CW (en sentido a las manecillas del reloj), CCW (en sentido opuesto a las manecillas del reloj) y la última corresponden a las Charophyta–algas verdes, que se relacionan filogenéticamente con las plantas superiores [6]. Los flagelos de las microalgas verdes *Chlamydomonas* se han utilizado como modelo de estructura flagelar [7]. En contraste, los flagelos de las algas pardas, son heterocontes, por tanto uno de los flagelos tienen mastigonemas.
- Pared celular: En general, las paredes de las células de las algas están formadas por dos componentes: 1) el componente fibroso que forma el esqueleto de la pared y 2) el componente amorfo, que forma una matriz dentro de la cual está incrustado el componente fibroso (Figura 1.2 y 1.3, w) [7]. El tipo más común de componente fibroso es la celulosa, un polímero de 1,4 β -D-glucosa. Sin embargo se identificado que en algunas algas verdes sifonáceas y en algunas Rhodophyta (*Porphyra*, *Rhodochorton*, *Laurencia* y *Rhodymenia*), que la celulosa es reemplazada por un manano (polímero de 1,4-D-manosa), produciendo xilanos fibrilares de diferentes

polímeros. Los componentes mucilaginosos amorfos se producen en las cantidades más grandes en Phaeophyceae y Rhodophyta, cuyos polisacáridos son comercialmente explotados (ácido algínico) [7, 9].

- Plástidos: El tipo básico de plástido en las microalgas es un cloroplasto, un plástido capaz de realizar la fotosíntesis (Figura 1.3, c). En Rhodophyta y Chlorophyta, los cloroplastos están limitados por la doble membrana de la envoltura del cloroplasto. En las otras algas eucariotas, la envoltura del cloroplasto está rodeada por una de las dos membranas del cloroplasto retículo endoplasmático (cloroplasto R.E.), que tiene ribosomas unidos a la cara externa de la membrana adyacente al citoplasma [9]. El cloroplasto R.E. es el remanente de la membrana de vacuola de alimento y/o la membrana plasmática implicada en la endosimbiosis original que lleva a los tipos de estructura de cloroplasto en algas eucariotas. (A) Un tilacoide por banda, sin retículo endoplásmico de cloroplasto (Rhodophyta). (B) Dos tilacoide por banda, dos membranas de cloroplasto R.E. (Cryptophyta). (C) Tres tilacoides por banda, una membrana de cloroplasto R.E. (Dinophyta, Euglenophyta). (D) Tres tilacoides por banda, dos membranas de cloroplasto R.E. (Prymnesiophyta y Heterokontophyta). (E) De dos a seis tilacoide por banda, no hay cloroplasto R.E. (Chlorophyta) [5, 6].
- Mitocondria y peroxisomas: Hay dos tipos de mitocondrias en las células de algas. Mitocondrias con crestas laminares (aparecen en las algas rojas, algas verdes, euglenoides y Criptophyta); mitocondria con crestas tubulares (Heterokontophyta y Haptophyta) (Figura 1.3, m) [8].
- Vacuolas contráctiles: La capacidad de las células microalgales para ajustarse a los cambios en la salinidad del medio es un aspecto importante de la fisiología de éstas. En las células con paredes, esta osmorregulación se realiza con la ayuda de la presión de turgencia, mientras que en células que carecen de pared no se realiza la regulación de los solutos presentes en las células mediante vacuolas contráctiles. En este último caso, las células aumentan la concentración interna de moléculas osmóticamente activas cuando la concentración de solutos disueltos aumenta en el medio externo [7]. Como es sabido, la concentración interna de tales moléculas disminuye cuando la concentración de sales disueltas en el medio externo disminuye (Figura 1.3, v). La vacuola contráctil repite rítmicamente este procedimiento. Si hay dos vacuolas contráctiles, generalmente se llenan y vacían

alternativamente. Las vacuolas contráctiles ocurren más frecuentemente en el agua dulce que las algas marinas, un fenómeno que da credibilidad a la teoría de que las vacuolas contráctiles mantienen un balance hídrico en las células. Las células de microalgas en agua dulce tienen una mayor concentración de sustancias disueltas en su protoplasma que en el medio circundante, de modo que hay un aumento neto de agua en las células [5, 6].

- **Núcleo:** El núcleo que contiene el material genético de la célula, está rodeado por una doble membrana con poros en el mismo. Los contenidos del núcleo son un nucléolo, cromosomas (Figura 1.3, n) [5, 6, 8, 9].

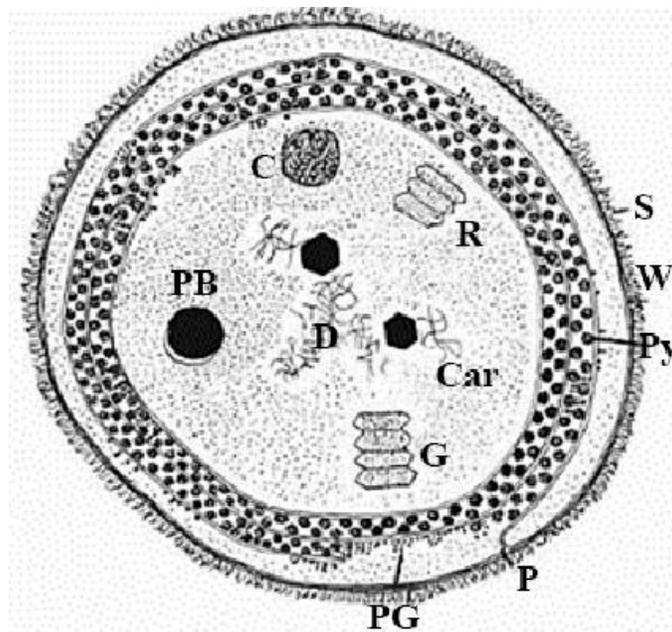


Figura 1.2. Características estructurales de una célula de cianobacteria. (C) gránulos de cianoficina (gránulo estructurado); (Car) carboxisoma (cuerpo poliédrico); (D) fibrillas de ADN; (G) aerotopos (vesículas de gas); (P) plasmalema; (PB) granulos de cuerpo polifosfato; (PG) gránulos de poliglucano; (PY) ficobilisomas; (R) ribosomas; (S) vaina; (W) pared celular [8, 9].

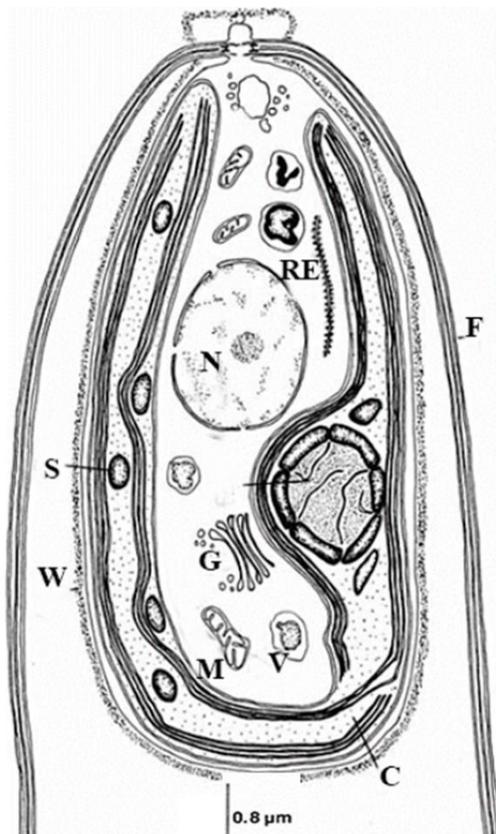


Figura 1.3. Orgánulos presentes en una célula eucariota microalgal (*Chlamydomonas*).

(C) cloroplasto; (CV) vacuola contráctil; (ER) retículo endoplasmático; (F) flagelos; (G) aparato de Golgi; (M) mitocondria; (N) núcleo; (P) pirenoide; (S) almidón; (V) Vacuola; (W) pared celular [8, 9].

1.1.2. Clasificación

Las cianobacterias y algas, son organismos polifileticos que han sido colocados en diferentes esquemas de clasificación (Tabla 1.1); en general a partir de los caracteres morfológicos, pigmentos, sustancias de reserva, composición de la pared celular, estructuras de reproducción, hábitat, entre otros. Por estas características se ubicaban tradicionalmente en criptogramas, talofitas o protistas [10].

Más tarde, con el uso de microscopía electrónica la ultraestructura y los diferentes marcadores moleculares se han generado nuevas propuestas de clasificación ubican a los organismos fotosintéticos en los supergrupos Excavata (euglenoideos), SAR (diatomeas, pardas), Archeoplastida (algas verdes, rojas) y también señalan que es necesario seguir

estudiando estos organismos porque aún hay muchas *taxa* que requieren ser reubicados [10].

- Procariota, representan la División Cyanophyta (Cianobacterias) y Prochlorophyta [6, 8].
- Eucariota: División Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Prymnesiophyta, Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae, Cryptophyta y Dinophyta [10].

A partir de las cianobacterias, cuyo registro fósil data del precámbrico, se conoce que estos procariontes son muy especiales, ya que producen fotosíntesis oxigenica; cuya capacidad les ha permitido acumular oxígeno en los ecosistemas y así mismo en la tierra donde se favoreció, con el tiempo, el crecimiento de organismos con metabolismo aerobio. En contraste, con las eucariontes cuyos niveles de organización son desde unicelulares no móviles, móviles, cenocíticos, filamentos, cladomas unicelulares y multicelulares [5, 10].

Tabla 1.1. Clasificación de las microalgas y cianobacterias [6].

División	Nombre común	Clorofila	Carotenoides	Sustancia de reserva	Hábitat
Chlorophyta	Algas verdes	<i>a y b</i>	β -caroteno Xantofilas	Azúcares Almidón Fructosano Aceites	A. Salada A. Dulce Terrestre
Charophyta	Algas pétreas	<i>a y b</i>	α -caroteno β -caroteno Xantofilas	Almidón	A. dulce
Euglenophyta	Euglenoides	<i>a y b</i>	β -caroteno Xantofilas	Paramilón Azúcares	A. Dulce A. Salada Terrestre
Chrysophyta	Algas amarillo-verdosas Algas pardas-doradas Diatomeas	<i>a y c</i>	β -caroteno Fucoxantina Xantofilas	Aceites	A. Dulce A. Salada Terrestre
Phaeophyta	Algas pardas-doradas	<i>a y c</i>	β -caroteno Fucoxantina Xantofilas	Manitol Aceites	A. Salada

Rhodophyta	Algas rojas	a y d (pocas veces)	Xantofilas	Almidón florideano	A. Dulce A. Salada
Pyrrrophyta	Dinoflagelados	a y c	β -caroteno Flocoxantina Dinozanotina	Almidón Glucano	A. Dulce A. Salada

A pesar de las diferencias estructurales y morfológicas entre los representantes de cada división, comparten similitudes fisiológicas con las plantas, por ejemplo: estructura celular (material celular y el tipo de actividades celulares que tienen lugar y las paredes de membrana de ambos tipos de células contienen 20 a 50% de celulosa); procesos metabólicos (diseñados para convertir la energía luminosa en energía química); reproducción (división de una sola célula o fragmentación de una colonia, asexual por la producción de esporas motiles, o sexual por la unión de gametos.), etc. [11].

1.1.3. Organización celular en las microalgas

Las microalgas tienen diferentes tipos de organización celular [6]:

- Unicelular: microalgas solitarias móviles o no móviles. En las formas móviles, tienen flagelos acronemáticos o pleuronemáticos en diferentes posiciones.
- Colonia, Son especies de microalgas que forman un agregado de células. Algunas microalgas pueden formar colonias con movilidad (ej. *Volvox*) o colonias no móviles (ej. *Gloeocystis*) en este caso, hay división de trabajo en células vegetativas y otras reproductivas.
- Cenobios: Las células no móviles pueden organizarse en cenobios con un número fijo de células (ej. *Scenedesmus*).
- Filamentosa: generalmente presentan células cilíndricas dispuestas una después de otra, pueden ser ramificadas o no ramificadas.

1.1.4. Nutrientes en las microalgas

Las células microalgales requieren elementos en proporciones relativas fijas para poder reproducirse [12]. La diversidad de especies en un ambiente acuático se encuentra determinada por la proporción que existe entre los nutrientes disponibles en el medio y los requerimientos nutricionales de cada especie. De esta forma, diferentes especies que se encuentran creciendo en una misma comunidad pueden estar limitadas por diferentes recursos [13].

Las microalgas pueden ser autótrofas (litótrofo o holofíticas) o heterótrofas (organotrófico). Las primeras, utilizan compuestos inorgánicos como fuente de carbono, pueden ser fotoautótrofas (fotolitotróficos), es decir, utilizan la luz como fuente de energía, o quimioautótrofos (quimiolitótrofos), oxidan compuestos inorgánicos para la obtención de energía. Sus principales productos de almacenamiento incluyen almidón y/o lípidos. Bajo luz y temperatura óptimas, algunas especies autótrofas de microalgas son capaces de multiplicarse rápidamente a una velocidad de $0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (peso seco) y obtener una biomasa final de $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (peso seco). Tratamientos de estrés como el déficit en nutrientes (nitrógeno y fósforo) resultan en la acumulación de lípidos, pero mientras tanto, el estrés ejercido derogan en la reducción de la tasa de crecimiento. En presencia de fuentes de carbono orgánico como la glucosa o el acetato, algunas especies de *Chlorella*, *Chlamydomonas*, etc.; se observó el aumento en las tasas de crecimiento ($24 \text{ g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (peso seco)) [8].

Las microalgas heterótrofas, utilizan compuestos orgánicos para su crecimiento, o la luz como fuente de energía (fotoheterótrofos). Este grupo de microalgas heterótrofas son fagocíticas (holozóicos), debido a que absorben los nutrimentos en vesículas para la digestión. También pueden ser osmótrofos, si absorben los nutrientes en una forma soluble a través de la membrana plasmática [8, 14]. Si las microalgas se alimentan heterotróficamente de material orgánico, se les denomina saprófitas, mientras que si viven en un hospedero, son parásitos. Por ejemplo, *Amoebophilidium protococcarum*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Heterosigma akashiwo*, etc [14, 13]. Un ejemplo de combinación de auto- y heterotrofia son las microalgas flageladas, ya que estas son caracterizadas por ser autótrofas, aunque requieren de pequeñas cantidades de compuestos orgánicos, pero no como una fuente de energía, requiriendo por igual de vitaminas para su multiplicación. Algunas microalgas sintéticas son mixotróficas (heterótrofas facultativas), son capaces de utilizar también compuestos orgánicos [13].

La composición química de las microalgas se encuentra directamente determinada por la toma de material inorgánico (cationes y aniones) del medio acuático circundante [15]. Los nutrientes inorgánicos pueden dividirse en dos grupos: macronutrientes, requeridos en grandes cantidades y micronutrientes, requeridos en concentraciones muy bajas. Los macronutrientes (incluyen compuestos con nitrógeno, fósforo, sílice y azufre) son componentes fundamentales de macromoléculas y tienen un papel clave en la estructura celular [14]. El sílice difiere de los demás macronutrientes por tener un limitado rol biológico,

su importancia es estructural y no metabólica; para las diatomeas y crisofíceas (silicoflagelados), ya que necesitan para la formación de las frústulas o su pared celular. Por su parte, los micronutrientes tienen un papel metabólico específico en la fisiología de las microalgas [16].

1.2. Limitación de nutrientes en las microalgas

El concepto de factores limitantes desarrollado por Liebig, conocido como la ley del mínimo, establece que el crecimiento es limitado por aquel nutriente cuya concentración esté cerca del mínimo requerido, sin embargo, cuando la concentración del nutriente incrementa, aumenta el crecimiento hasta que otro nutriente llega a ser limitante [13, 17]. De igual manera, al aumentar la población celular, más nutrientes limitantes llegan a ser incorporados por las células, por lo que menos de estos se encuentran disponibles para su posterior crecimiento. Por lo tanto, si no hay un reabastecimiento del nutriente, la concentración disminuye hasta que eventualmente no soporta aumentos de biomasa, porque la cantidad es muy baja [16].

Por otro lado, el modelo de Droop asume que la tasa de crecimiento microalgal es una función de las reservas intracelulares del nutriente, por lo que la abundancia de nutrientes determina la tasa de asimilación y almacenamiento intracelular [18]. De esta manera, si la reproducción es continua, la cantidad de recursos contenidos en cada organismo (tasa celular), disminuye, por tanto, la reducción de la tasa celular lleva a un decremento en la tasa de crecimiento hasta alcanzar un mínimo, y no ocurre más crecimiento por lo que se alcanza la fase estacionaria en la curva de crecimiento [19]. De esta forma, el almacenamiento intracelular de nutrientes no limitantes puede jugar un papel significativo en la regulación del crecimiento de la comunidad algal [13].

Por otra parte, la tasa a la cual los organismos consumen los nutrientes depende de la disponibilidad de éstos, así como de la habilidad de los organismos para consumirlos. Aún si un nutriente es muy abundante, existen límites en la tasa a la cual un organismo puede consumirlos, posiblemente relacionados con la presencia de un número limitado de sistemas de transporte en la membrana celular, que limita a su vez la cantidad de nutrientes disueltos que pueden ser transportados al interior de la célula por unidad de tiempo [19]. Sin embargo, varios grupos de microalgas pueden desarrollar una interesante adaptación para asegurar la disponibilidad de nutrientes mediante la asimilación excesiva de nutrientes usualmente durante periodos en que se presentan altas concentraciones [13]. Tanto la

asimilación de nutrientes como el crecimiento celular pueden variar en función de la luz, el pH y la temperatura. La asimilación de un nutriente, particularmente aquel que es abundante y limitante como el fósforo, responde al gradiente de energía libre entre el interior y el exterior de la célula. Por lo tanto, cualquier condición ambiental que limite la energía celular puede limitar la asimilación de nutrientes y como consecuencia el crecimiento celular [20].

1.2.1. Nitrógeno en los cultivos microalgales

El nitrógeno es uno de los componentes esenciales de muchas biomoléculas, como aminoácidos y nucleótidos y por lo tanto de proteínas y ácidos nucleicos [13, 17]. Un incremento en la disponibilidad de nitrógeno inorgánico generalmente deriva en un incremento en la abundancia de productores primarios. Sin embargo, altos niveles de nitrógeno inorgánico que no pueden ser asimilados por los sistemas ecológicos pueden causar efectos adversos en los organismos menos tolerantes [21].

El nitrógeno está presente en diferentes formas químicas en el agua, incluyendo nitrógeno diatómico (N_2), amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), otros óxidos de nitrógeno y nitrógeno en compuestos orgánicos. El amonio normalmente está en bajas concentraciones en aguas oxigenadas donde las bacterias lo oxidan a nitrato. En hábitats naturales, las principales fuentes de nitrógeno son nitratos y sales de amonio, pero en aguas altamente contaminadas, los compuestos orgánicos nitrogenados llegan a ser importantes y puede haber una relación entre algunos de los productos de excreción animal (amonio, urea, ácido úrico y aminoácidos) y el crecimiento de flagelados como *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, etc. [17, 22].

En medios de cultivo, el nitrógeno se suministra en forma de sales de amonio o nitratos, ya que son éstas las principales formas de nitrógeno que usan las microalgas, aunque la mayoría puede utilizar también nitritos, urea y otras formas de nitrógeno orgánico. El nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas en forma de amonio, mientras que la asimilación de nitrato requiere de la transformación de nitrato a nitrito y luego a amonio, mediante cuatro pasos de reducción que requieren energía; por lo que resulta más favorable para las algas el uso del amonio [17, 23].

De esta forma, cuando hay suficiente concentración de amonio y nitrato, la mayoría de las algas utilizan principalmente el amonio, mientras que el nitrato no es utilizado hasta que los iones de amonio han desaparecido. Esta preferencia está relacionada con el control de

asimilación de nitrato. En general, la asimilación de amonio causa la retroalimentación, inhibición y represión de las enzimas responsables para la reducción del nitrato [24].

A nivel bioquímico, la limitación de nitrógeno influye directamente en la formación de aminoácidos, lo cual a su vez limita la transcripción del ARNm y por lo tanto se inhibe parcialmente la síntesis de proteínas. Por otra parte, la eficiencia del fotosistema II (PSII) disminuye inicialmente como una consecuencia de la disipación térmica de la energía absorbida, derivando en una reducción de la tasa fotosintética, lo cual a su vez lleva a una reducción en la tasa de respiración [14].

1.3. Potencial de las microalgas marinas

El interés en el potencial biotecnológico de las microalgas surgió en Alemania, al ser consideradas como una fuente abundante de proteínas de bajo costo para la alimentación humana [25, 26]. Por ejemplo *Chlorella*, se utilizó como organismo modelo a principios del siglo XX en los laboratorios de Warburg (1883-1970) para estudiar los procesos básicos de la fotosíntesis [14]. El potencial y la producción de biomasa microalgal se convirtió en una realidad en Alemania en la década de 1940, y hacia el final de la Segunda Guerra Mundial, las microalgas se cultivaron en grandes cantidades para la producción de lípidos, como fuente de energía. Esto fue seguido por la investigación en Stanford (Estados Unidos), Tokio (Japón), Essen (Alemania), Israel, República Checa y Taiwán, para la síntesis de varios bio-productos químicos y su utilización para tratamiento de aguas residuales [26].

1.3.1. Diferentes aplicaciones de las microalgas marinas

La aplicación de las algas se diversificó a la acuicultura, el tratamiento de aguas residuales, la obtención de sustancias químicas finas, la producción farmacéutica y los procesos de bioconversión energética [26]. A partir de la crisis energética de 1973 la producción de microalgas se reconoció como una fuente bioenergética con potencial económico [27]. A este respecto, se ha demostrado que varias microalgas autótrofas pueden acumular aceites, por lo que se consideran oleaginosas. La productividad microalgal es la consecuencia de la asimilación continua de carbono y su orientación hacia la síntesis activa de ácidos grasos.

Posterior a la crisis energética, se propuso a las microalgas como organismos con potencial para la producción de combustibles renovables [28], siendo sus principales ventajas:

- Alta eficiencia en la conversión de fotones de luz (aproximadamente 3-8% contra 0.5% de las plantas terrestres, lo que representa más altos rendimientos de biomasa por hectárea), altas tasas de crecimiento (por ejemplo, 1-3 duplicaciones/día) [29].
- Mayor capacidad de secuestro de CO₂ [27].
- Son capaces de crecer en un medio líquido, con un mejor manejo, y puede utilizar la sal y aguas residuales (solución salina / agua salobre / agua de mar), con lo que se reduce el uso de agua dulce [30].
- Utilizan nitrógeno y fósforo de una variedad de fuentes de aguas residuales (por ejemplo, escorrentía agrícola, operaciones de alimentación de animales concentrados e industrial y las aguas residuales municipales), lo cual provee beneficio adicional en la biorremediación de aguas residuales [31].
- Utilizan zonas marginales no aptas para fines agrícolas (por ejemplo desiertos y tierras de costa), por lo tanto no compiten con las tierras de cultivo para la producción de alimentos [27].
- La producción no es estacional y se puede cosechar por lotes casi todo el año [29].
- Los cultivos pueden ser inducidos a producir una alta concentración de materia prima de aceite, almidón o biomasa [31].
- Los sistemas de producción de biomasa se pueden adaptar fácilmente a varios niveles operacionales industriales y tecnológicos [29].
- Puede ser cultivado sin el uso de fertilizantes y pesticidas, lo que resulta en menos residuos que puedan afectar el ambiente [27].
- La conversión de la luz en energía química puede ser responsable de una amplia gama de síntesis de combustible: protones y electrones (biohidrógeno), azúcares y almidón (para bioetanol), aceites (para biodiesel) y biomasa (para BTL y el biometanol, vía bioquímica, termoquímica, químicas y procesos de combustión directa (Figura 1.4) [29, 31].
- Producen co-productos de valor añadido o subproductos como ejemplo, proteínas, polisacáridos, pigmentos, biopolímeros y fertilizantes [31].
- La producción de aceite por área se estima entre 4.6 y 18.4 L m⁻², esto es, de 7 a 30 veces mayor que los cultivos terrestres [14].

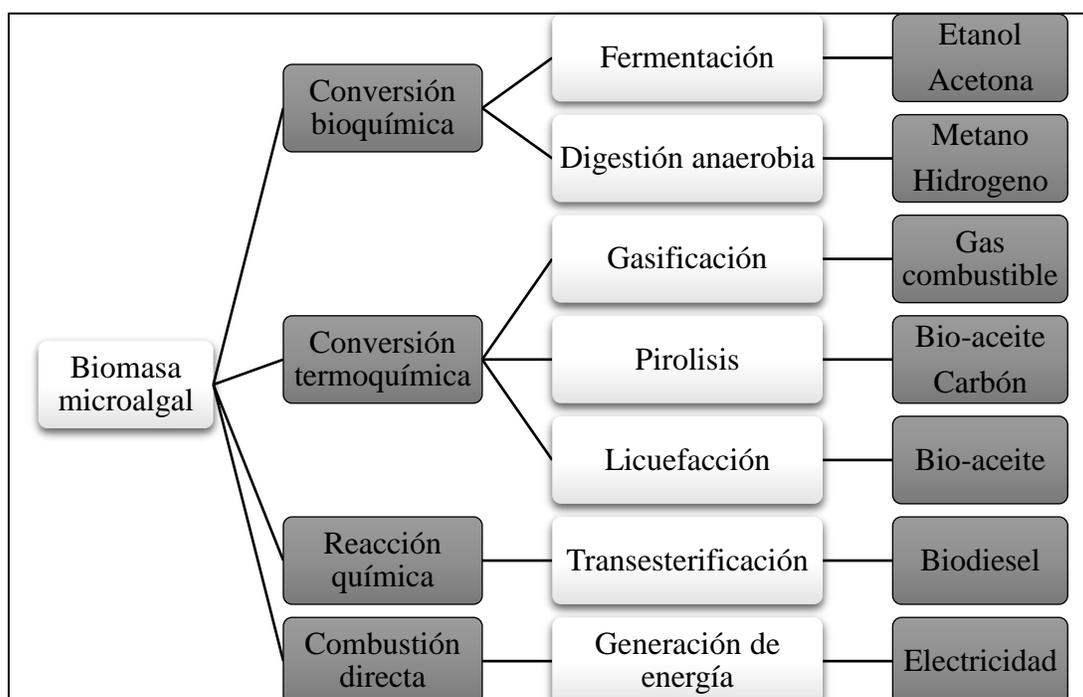


Figura 1.4. La producción de energía por la conversión de biomasa de microalgas usando procesos de combustión directa, bioquímicos, termoquímicos y químicos [32].

En una superficie de 52,000 km², se pueden obtener 95 millones de barriles de biodiesel al día, a un precio sensiblemente inferior al del petróleo actual [8]. Estudios señalan diferentes niveles de producción anual de volumen de aceite por km² [33] (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Niveles de producción de aceite a partir de especies oleaginosas [34].

Fuente de la biomasa	Contenido de aceite (%/biomasa seca)	Rendimiento de aceite (L/ha año)	Uso de tierra (m ² año/kg de biodiesel)	Productividad biodiesel (kg/ha año)
Maíz (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Cáñamo (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soya (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatrofa (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862

Girasol (<i>Helianthus annus</i> L.)	40	1,070	11	946
Castor (<i>Ricinus communis</i>)	48	1,307	9	1,156
Palma (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5,366	2	4,747
Microalgas (contenido bajo de aceite) (<i>Schizochytrium</i> sp.)	30	58,700	0.2	51,927
Microalgas (contenido medio de aceite) (<i>Nannochloropsis</i> sp.)	50	97,800	0.1	86,515
Microalgas (contenido alto de aceite) (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	70	126,900	0.1	121,104

1.4. Determinación del contenido lipídico en las microalgas

La determinación de la composición bioquímica de las microalgas resulta complicada debido a que es susceptible a modificaciones por condiciones de cultivo o estrés nutrimental. Esto último, conlleva al incremento de la fracción lipídica, y al decremento de la productividad del cultivo. El contenido de lípidos en las microalgas puede exceder el 80% del peso de la biomasa seca aunque los niveles más comunes oscilan entre 20-50% [34]. En la tabla 1.3 se enlistan varias especies de microalgas y su capacidad para la producción de lípidos. De manera general, el rendimiento de las microalgas en estanques genera 140,625 litros de aceite/ha, lo cual es superior en 10-40% al producido por aceite de palma [35].

Tabla 1.3. Acumulación lipídica en diferentes especies de microalgas [35].

Agua dulce/ marina	Microalga	Lípidos (% peso seco)
Agua dulce	<i>Chlorella emersonii</i>	63
	<i>Chlorella protothecoides</i>	11-59
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	27
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	13-23
	<i>Chlorella saccharophila</i>	18-54
	<i>Chlorella</i> sp.	19-43
	<i>Chlorella vulgaris</i>	15-58

	<i>Chorella zofingiensis</i>	51
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	35
	<i>Neochloris oleoabundans</i>	26-38
	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	31
	<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	8-12
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	10-43
	<i>Scenedesmus rubescens</i>	27-43
	<i>Scenedesmus sp.</i>	7-53
Agua Marina	<i>Chlorella minutissima</i>	57
	<i>Chlorella sp.</i>	35-52
	<i>Chlorella vulgaris</i>	57
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	24
	<i>Nannochloris sp.</i>	40
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	8-54
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	24-60
	<i>Tetraselmis suecica</i>	20-54

1.5. Lípidos en microalgas

En general, en las microalgas los principales componentes de la fracción lipídica son TAG, ácidos grasos libres, ceras, esteroides, hidrocarburos, glicolípidos, fosfolípidos y pigmentos, también se encuentran compuestos inusuales como ácidos grasos halogenados o hidroxilados, alquenonas de cadena larga y otros. Los lípidos producidos por microalgas pueden ser agrupados en dos categorías, lípidos de almacenamiento (lípidos no polares) y lípidos estructurales (lípidos polares) [35].

Dentro de los lípidos de almacenamiento se encuentran los TAG, constituidos principalmente por ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados, éstos por lo general se encuentran acumulados en cuerpos lipídicos. Estos son los lípidos que mediante una transesterificación pueden producir biodiesel [36]. Por su parte, los lípidos estructurales tienen un alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), los cuales son nutrientes esenciales para animales acuáticos y humanos. Los lípidos polares (fosfolípidos) y esteroides son importantes componentes estructurales de la membrana celular, la cual actúa como una barrera permeable selectiva para la célula [22]. Es importante mencionar que la composición en lípidos insaturados y esteroides de la membrana, es la principal determinante

de su grado de fluidez, que es indispensable mantener para todos los sistemas de transporte, estos incluyen los transportes relacionados al proceso fotosintético y respiratorio [31].

1.6. Metabolismo y síntesis de lípidos

La composición de ácidos grasos de las microalgas comúnmente incluye moléculas de 12 a 22 átomos de carbono, saturadas e insaturadas, donde la posición y el número de enlaces dobles (1 a 6) son variables, siendo por lo general en configuración *cis*. Los ácidos grasos C16:0 a C18:0 son los más comunes no obstante moléculas de cadena media (C10:0, C12:0, C14:0) o demasiado larga (mayores a 20C) predominan en algunas especies como *Coelastrum* sp., *Haematococcus pluvialis* y *Nannochloropsis oculata* (Tabla 1.4) [27]. Observándose que en las microalgas marinas prevalecen los ácidos grasos saturados y mono-insaturados; y en menor proporción los compuestos poli-insaturados (PUFA) [4, 37]. La variación en el perfil de ácidos grasos es dependiente de la especie, así como también su entorno (nutrientes, luz y temperatura) [38]. El metabolismo lipídico de las microalgas (Figura 1.5) es similar al de plantas superiores, particularmente en la biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos. Los ácidos grasos libres se sintetizan en el cloroplasto, mientras que las proteínas de membrana que tienen sus centros activos orientados hacia el citosol, son aquellas encargadas de transportar desde la hemicapa citosólica hasta la extracelular [39]. En términos generales, los productos fotosintéticos, son el sustrato del Ciclo de Calvin en el cual el CO₂ fijado es transformado en piruvato y acetil-CoA en el cloroplasto, donde las moléculas de acetil-CoA son sometidas a numerosos ciclos de adición descarboxilativa y β-reducción para la síntesis de *novo* de ácidos grasos (grupos acilo: ACIL-ACP), hasta producir moléculas de C16:0 y C18:0 saturadas [23]. Posteriormente, los ácidos grasos son secuencialmente transferidos a las posiciones 1, 2 y 3 del glicerol-3-fosfato, donde intermediarios se desvían hacia la elongación de lípidos de membrana [27].

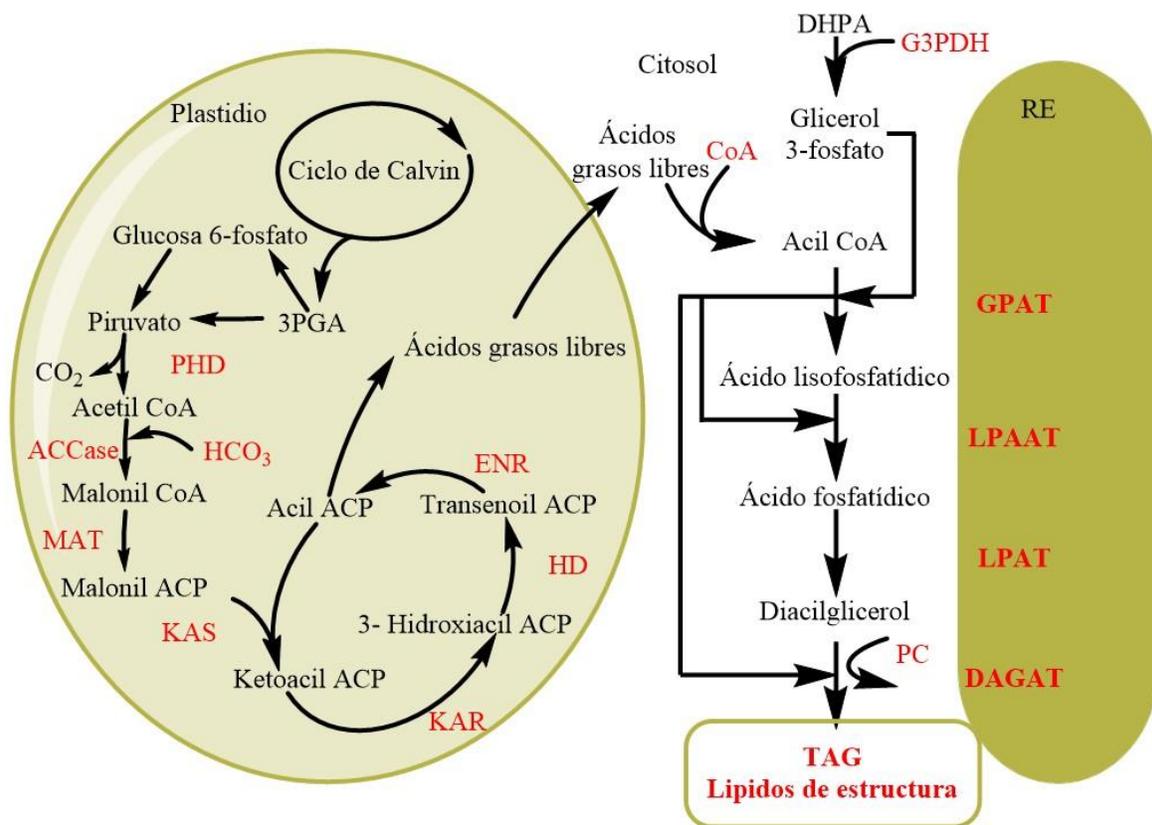


Figura 1.5. Visión general simplificada de los metabolitos y las vías de representación en la biosíntesis de lípidos de microalgas que se muestran en negro y enzimas que se muestran en rojo [38].

Tabla 1.4. Composición de ácidos grasos de algunas microalgas y cianobacterias (porcentaje de ácidos grasos totales).

Ácidos grasos	Bacillariophyta		Eustigmatophyta		Chlorophyta			Haptophyta		Cyanophyta		Cryptophyta		Dinophyta	
	<i>B.a</i>	<i>C.sp</i>	<i>N.sp</i>	<i>M.s</i>	<i>C.s</i>	<i>C.v</i>	<i>P.i</i>	<i>E.h</i>	<i>I.g</i>	<i>A.sp</i>	<i>T.e</i>	<i>H.b</i>	<i>R.I</i>	<i>G.s</i>	<i>S.sp</i>
C10:0											27-50				
C11:0											2-5				
C14:0	32.0	23.6	6.9	2.3				35.1	23.1	29-34	7.21	2	18	6.5	3.2
C15:0								2.2	1.1		1-2			0.2	0.5
C16:0	5.0	9.2	19.9	20.2	40.0	18.0	9.1	5.1	14.0		11-17	13.3	13.1	24.8	9.4
C16:1 ω 5															
C16:1 ω 7	27.0	36.5	27.4	26.9	4.0	5.0	0.7		2.0		4-7	13	5	2.6	0.7
C16:1 ω 9				3.6					1.0	36-39					
C16:2 ω 4		6.0					0.6					3	6.1		
C16:2 ω 7	2.0	0.9			11.0	12.0			1.0						
C16:3	8.0	2.6			17.0	2.1									
C18:0				0.6			2.1	1.0	1.1	1-2	2-6		2.2	1.9	0.5
C18:1 ω 7							5.9	1.0	1.0					0.3	0.3
C18:1 ω 9		3.0	1.7	4.5	5.0	9.2	9.2	14.3	13.0	1-2	3-7	2.0	10.1	11.8	1.2
C18:1 ω 13											1-4				
C18:2 ω 6			3.5	2.0	36.0	43.0	9.3	2.1	5.0	1-2			2.2	0.7	1.5
C18:3 ω 3		0.5	0.7		23.0	10.0	1.0	7.0							
C18:3 ω 6		0.9		1.0			0.6		7.0		6-19	11	16	0.3	0.2
C18:4 ω 3		0.6	4.2				1.2	8.0	10.0					0.1	5.2
C18:5 ω 4								10.0				30	23	3.7	10.6
C20:0														6.4	43.1
C20:4 ω 6		4.1					58.9								
C20:5 ω 3	26.0	8.0	34.9	37.1								11	13	14.1	1.8
C20:6 ω 3		1.0						1.0		1				24.2	18.8
C24:0								11.0	14.0					0.2	

Abreviación de especies microalgales: *B.a.*, *Biddulphia aurita* [40]; *C.sp.*, *Chaetoceros* sp. [41]; *N.sp.*, *Nannochloropsis* sp. [42]; *M.s.*, *Monodus subterraneus* [43]; *C.s.*, *Chlorella sorokiniana* [44]; *C.v.*, *Chlorella vulgaris* [45]; *P.i.*, *Parietochloris* [46]; *E.h.*, *Emiliana huxleyi* [47]; *I.g.*, *Isochrysis galbana* [48]; *A.sp.*, *Aphanocapsa* sp. [49]; *S.p.*, *Spirulina platensis* [50]; *T.e.*, *Trichodesmium erythraeum* [51]; *H.b.*, *Hemiselmis brunescens* [43]; *R.I.*, *Rhodomonas lens* [52]; *G.s.*, *Gymnodinium sanguineum*; *S.sp.*, *Scrippsiella* sp [53].

1.7. Estrategias para la modificación lipídica

La disponibilidad de nutrientes tiene un impacto significativo en el crecimiento y la proliferación de células microalgales, así como amplios efectos en la composición lipídica. De esta manera, cuando los nutrientes no son limitados, la tasa de división celular es constante y la biosíntesis activa de TAG disminuye. Esto ocurre para algunas especies de microalgas en presencia de luz y CO₂ [54].

Bajo condiciones ambientales no favorables o condiciones de estrés, algunas especies de microalgas modifican la ruta de biosíntesis de lípidos hacia la formación y acumulación de lípidos neutros (20-50 % peso constante en seco), principalmente en forma de TAG [54]. El comportamiento de las microalgas bajo limitación nutrimental es considerablemente variable y por tanto, no es posible establecer una tendencia generalizada entre las especies microalgales [55]. Sin embargo, la limitación de nitrógeno es considerada como la estrategia más eficiente para incrementar el contenido de TAG en las microalgas, en particular los conformados por ácidos grasos con un elevado grado de saturación. Respuestas similares son inducidas por la deficiencia de fósforo, azufre y silicio, siendo el efecto de este último específico para las diatomeas [56]. Las principales condiciones de estrés físico con la temperatura y la intensidad luminosa; el primero, puede modificar la composición de ácidos grasos insaturados mediante el aumento y disminución de la temperatura; la baja intensidad luminosa induce la formación de lípidos polares, mientras que la alta intensidad luminosa disminuye el contenido total de lípidos polares, con un aumento concomitante en la cantidad de lípidos de almacenamiento neutros, principalmente los TAG. Además de los factores químicos y físicos, la fase de crecimiento y/o senescencia del cultivo afecta también el contenido de TAG y la composición de ácidos grasos. El contenido de lípidos y la composición de ácidos grasos también están sujetos a variación durante el ciclo de crecimiento, usualmente con un aumento en los TAG en la fase estacionaria. Cultivos en senescencia también aumenta el contenido de lípidos de las células, con un notable aumento en los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, y una disminución de los PUFAs [34, 55]. Además de estrategias de estrés químicos y físicos que pueden cambiar el contenido de lípidos y la composición en la microalga; el método de extracción puede afectar significativamente al rendimiento lipídico. La extracción de lípidos de microalgas generalmente sigue dos pasos: disrupción celular (que depende en gran medida de la forma de la célula, tamaño y estructura de la pared) y extracción con disolvente (que depende de

la composición lipídica). El método de extracción de lípidos funciona de manera diferente dependiendo de las especies de alga [33].

1.8. Biodiesel a partir de microalgas

El uso por primera vez de aceites vegetales como combustibles, se remonta al año de 1900, siendo Rudolph Diesel, quien lo utilizara por primera vez en su motor de ignición-compresión, prediciendo de esta manera el uso futuro de los biocombustibles [55]. Durante la segunda guerra mundial, y ante la escasez de combustibles fósiles, se destacó la investigación realizada por Otto y Vivacqua en Brasil, sobre diésel de origen vegetal, pero fue hasta el año de 1970, que el biodiesel se desarrolló de forma significativa a raíz de la crisis energética y el elevado costo del petróleo [40].

Las primeras pruebas técnicas con biodiesel se llevaron a cabo en 1982 en Austria y Alemania, pero solo hasta el año de 1985 en Silberberg (Austria), se construyó la primera planta piloto productora de RME (Rapeseed Methyl Ester–metiléster o aceite de semilla de colza). Hoy en día países como Alemania, Austria, Canadá, Estados Unidos, Francia, Italia, Malasia y Suecia son pioneros en la producción, ensayo y uso de biodiesel en autos [57].

El biodiesel es un biocombustible sintético líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, nuevos o usados, mediante procesos químicos de esterificación y transesterificación, y que se aplica en la preparación de sustitutos totales o parciales del petrodiesel o gasóleo obtenido del petróleo [55]. El biodiesel químicamente se define como una mezcla de monoalquilésteres de alcohol de cadena corta, usualmente etanol o metanol, con ácidos grasos de cadena larga obtenido a partir de biomasa renovable y que es técnicamente capaz de sustituir al diésel derivado del petróleo [35].

En contraste con el petrodiesel, el biodiesel ofrece varias ventajas ya que es una fuente de energía renovable y biodegradable (Tabla 1.5) (se degrada cuatro veces más rápido que el diésel fósil) y produce menos contaminantes (CO_x , hidrocarburos aromáticos policíclicos, partículas de hollín, óxidos de azufre, nitrógeno y metales) durante su combustión a causa de su estado oxigenado, siendo por lo tanto menos nocivo. Además, posee propiedades lubricantes que reducen el desgaste del motor, es seguro para su transporte, almacenamiento y manejo debido a su baja volatilidad y elevado punto de inflamación (100-170 °C). El biodiesel puede utilizar la infraestructura actual de almacenamiento y distribución para el diésel de petróleo. Asimismo, debido a la similitud de las propiedades físicas y químicas del diésel fósil con las del biocombustible, su uso no requiere de

modificación alguna en los motores diésel convencionales, por lo que puede ser empleado en mezclas biodiesel-diesel al 2% (B2), 5% (B5) y 20% (B20) [44].

Tabla 1.5. Comparación de propiedades de biodiesel microalgal, diesel y estándar ASTM para biodiesel [22].

Propiedades	Biodiesel de aceite de microalgas	Diesel	Estándar ASTM biodiesel
Densidad (kg·L ⁻¹)	0.864	0.838	0.86-0.90
Viscosidad (mm ² s ⁻¹ , cSt a 40 °C)	5.2	1.9-4.1	3.5-5.0
Punto de inflamabilidad (°C)	115	75	Min 100
Punto de solidificación (°C)	-12	-50 a 10	-
Punto de obstrucción filtro frío (°C)	-11	-3.0	Verano máximo 0 Invierno máximo <-15
Valor ácido (mg KOH g ⁻¹)	0.374	Max 0.5	Max 0.5
Poder calorífico (MJ kg ⁻¹)	41	40.45	-
Proporción H/C	1.81	1.81	-

1.8.1. Procesos de obtención de biodiesel

Existen diversas metodologías para la síntesis de biodiesel, cuatro de ellas han sido exhaustivamente estudiadas: el uso directo de aceites o mezclas de éstos con diésel fósil, micro emulsiones, pirólisis y transesterificación. En la actualidad el diésel es producido mediante una transesterificación (Figura 1.6) [38], esta requiere tres moléculas de alcohol por cada molécula de TAG para producir una molécula de glicerol, y tres moléculas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) [37].

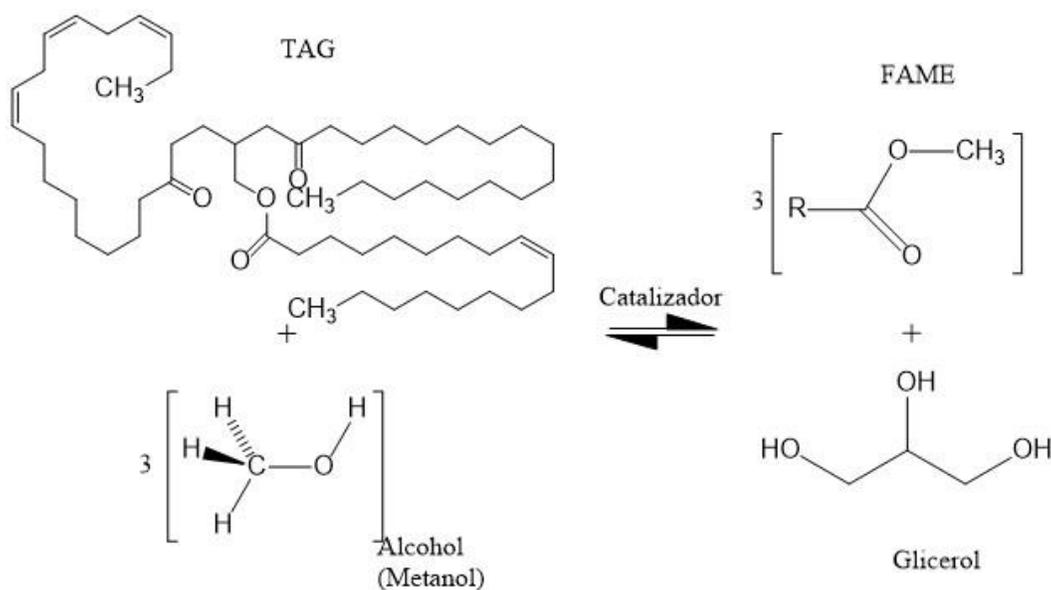


Figura 1.6. Reacción de transesterificación [58].

Los principales factores que influyen en el proceso de la transesterificación para la producción de biodiesel, son la relación molar alcohol:glúcidos, el tipo del catalizador (álcali, ácido, lipasas), la temperatura, el tiempo de reacción y el contenido de agua, así como el tipo de ácidos grasos de la materia prima [40].

La reacción de transesterificación se puede lograr mediante bases o ácidos. Se prefiere la vía catalizada por una base, aunque catalizada por ácido es una alternativa atractiva en ciertas situaciones, por ejemplo existe una menor sensibilidad a la presencia de agua o la reducción de la saponificación. Sin embargo, en general, la catálisis ácida presenta menor actividad respecto a la catálisis básica [44]. Como resultado, se requieren temperaturas más altas y tiempos de reacción más largos en estos procesos. Esto significa que la transesterificación química requiere de energía y posteriormente también requiere la separación del glicerol y del catalizador. Variantes de la reacción de transesterificación se han desarrollado para hacer frente a estos problemas, incluyendo un calentamiento rápido con la ayuda de microondas [57] o la mejora de mezcla y calentamiento mediante tratamientos ultrasónicos [59].

Mediante el uso de alcoholes supercríticos (metanol o etanol), la extracción de los aceites y la reacción de transesterificación pueden simplificarse en la conversión de un solo paso a partir de biomasa húmeda, aquí los alcoholes pueden funcionar como extractor de los lípidos y estimulador de la reacción de transesterificación [54]. Esto aplicado a microalgas

hace factible la producción de biodiesel a partir de organismos oleaginosos (microalgas) en forma de biomasa húmeda [54, 57].

1.9. Búsqueda de nuevas cepas con potencial para producir TAG

Además de los equipos necesarios para el crecimiento de microalgas, es esencial prestar mucha atención a la selección de las especies y cepas más adecuadas, sus condiciones de cultivo y los nutrientes disponibles para su crecimiento, ya que de estos dependerá la composición de los ácidos grasos que la microalga produzca. En la mayoría de los casos, la producción de cualquier compuesto dependerá de las especies y cepas, y se deberá elegir aquella(s) cuya producción y/o productividad lipídica sea alta bajo ciertas condiciones de cultivo. Para integrar una colección de microalgas en la industria de producción de biodiesel, es fundamental elegir cepas con alta tasa de crecimiento, alta productividad de biomasa y condiciones de cultivo específicas adecuadas al entorno donde se va a establecer la producción [54]. En este sentido, se han establecido diferentes criterios para la selección de nuevas cepas productoras de TAG.

- La tasa de crecimiento, que normalmente se mide por la cantidad total de biomasa acumulada por unidad de tiempo y unidad de volumen [24].
- La disponibilidad de nutrientes, en particular, de las fuentes de dióxido de carbono cuando el objetivo de secuestro de carbono también se considera pertinente [60].
- Selección del tipo de crecimiento, ya que el crecimiento heterotrófico podría proporcionar mejor productividad que otras condiciones de cultivo. Sin embargo, los cultivos heterótrofos pueden contaminarse con mucha facilidad, sobre todo en sistemas de cultivo abiertos, causando problemas en la producción a gran escala, además de que tienen baja o nula rentabilidad [24].
- Robustez y resistencia a cambios en las condiciones ambientales, tales como nutrientes, luz, temperatura y contaminación por presencia de otros microorganismos.
- La cosecha y el procesamiento [61].

JUSTIFICACIÓN

Las microalgas marinas han demostrado ser candidatas como fuente de materia prima para la producción de biodiesel. Esto es debido a que algunas especies presentan un alto contenido de ácidos grasos disponibles para su extracción. Sin embargo, estos contenidos varían de especie a especie, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas cepas con potencial para producir triacilglicéridos. En este sentido, el presente trabajo se enfoca en la evaluación de tres cepas de microalgas marinas aisladas de aguas marinas de Yucatán para la producción de triacilglicéridos.

HIPÓTESIS

Cepas de microalgas verdes marinas aisladas de aguas marinas de Yucatán pueden producir TAG con un perfil adecuado de ácidos grasos para la obtención de biodiesel.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el potencial productor de triacilglicéridos de tres cepas de microalgas marinas aisladas de aguas marinas de Yucatán.

Objetivos particulares

- Aislar y obtener cultivos unialgales de tres cepas de microalgas marinas para caracterizar su perfil lipídico
- Determinar la productividad lipídica de las tres cepas bajo estudio.
- Obtener el perfil lipídico de los ácidos grasos transesterificados de las tres cepas bajo estudio.

CAPITULO 2 METODOLOGÍA

2.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental (Figuras 2.1 y 2.2), se describe a continuación.

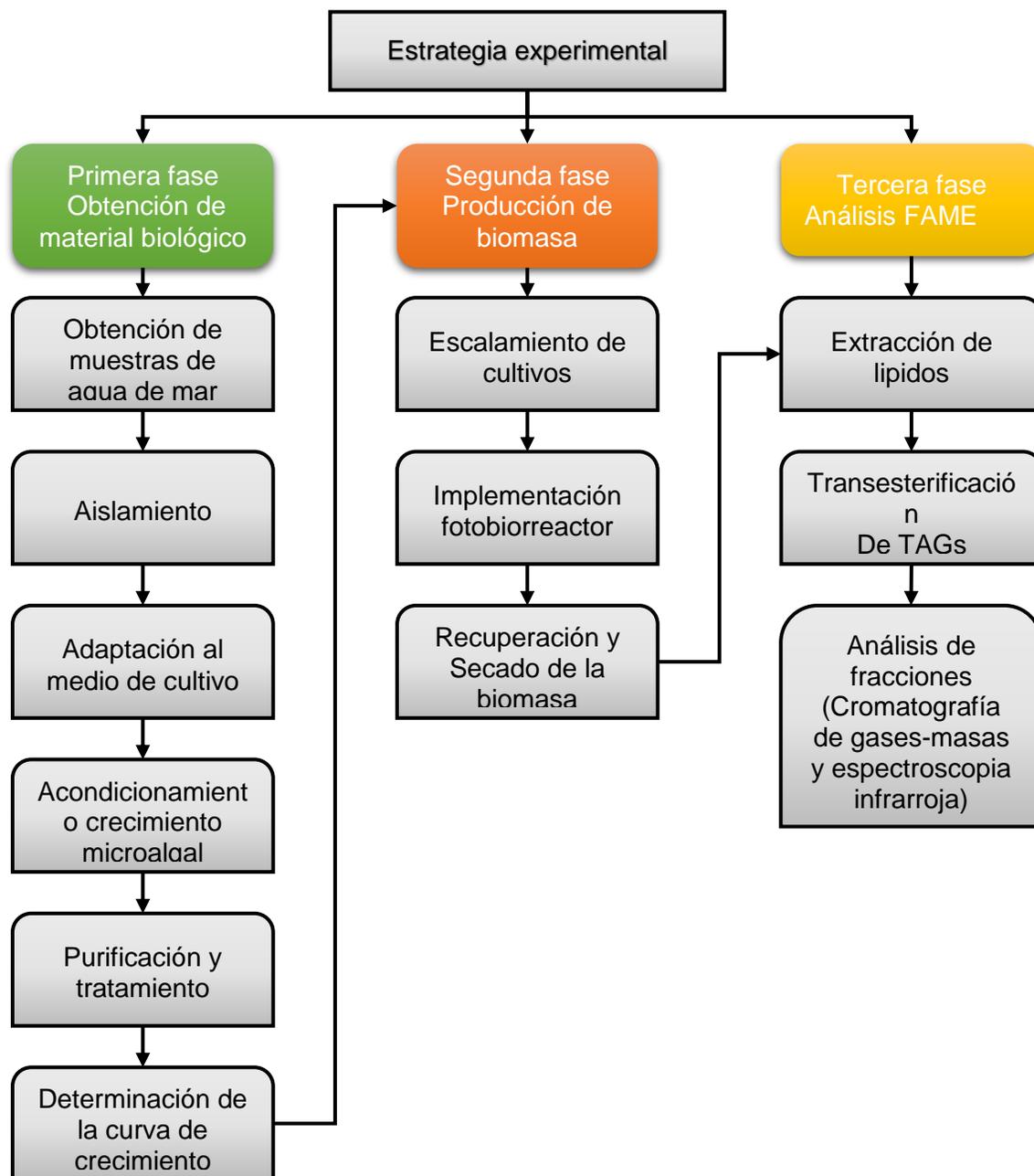


Figura 2.1. Estrategia experimental llevada a cabo en las tres cepas bajo estudio.

2.2. Metodología experimental

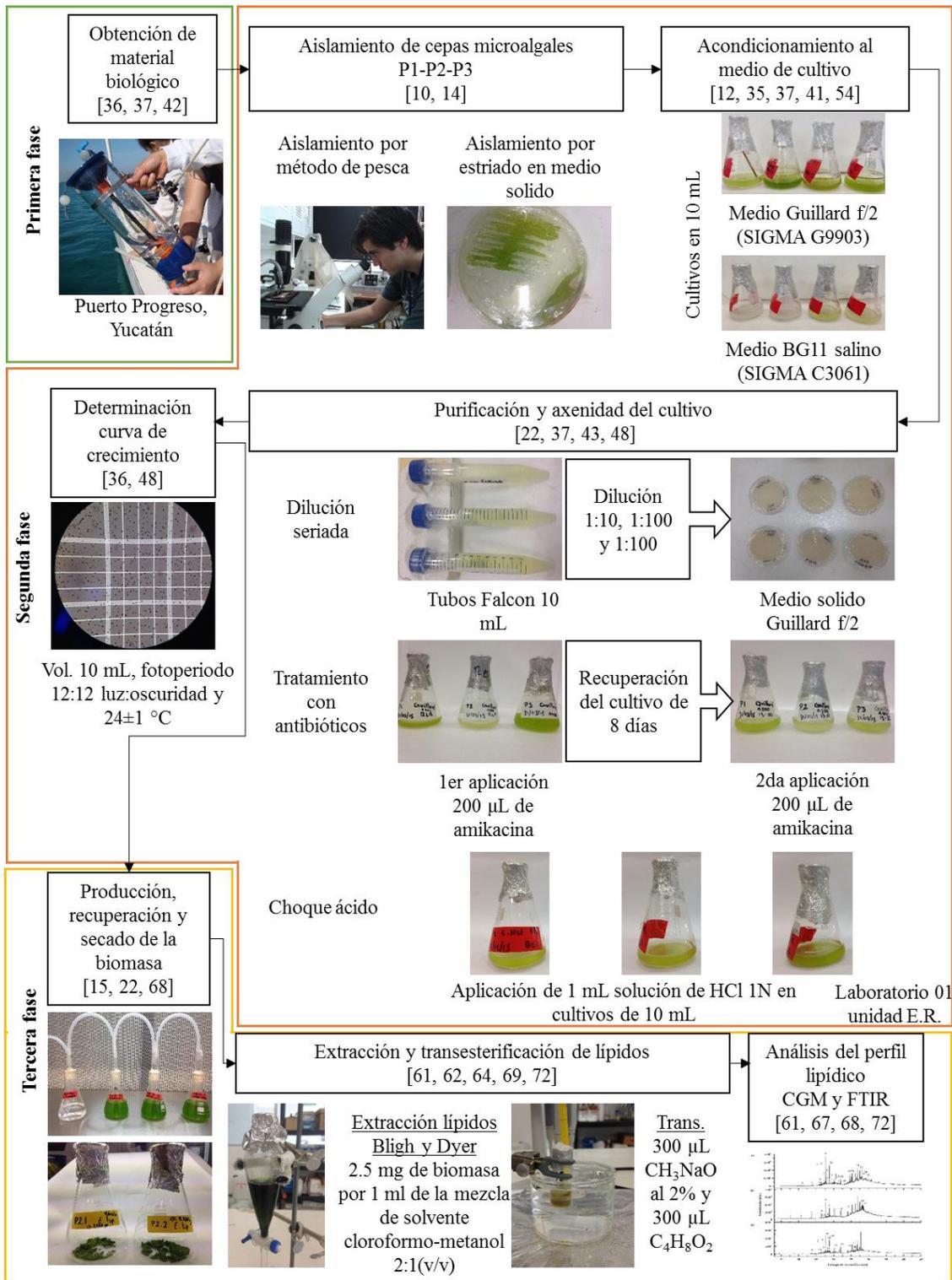


Figura 2.2. Desarrollo experimental llevado a cabo en las tres cepas bajo estudio.

2.3. Obtención de material biológico

Las cepas de microalgas marinas fueron colectadas en el Puerto de Progreso Yucatán (Figura 2.3), por el grupo de investigación de la Dra. Ruby Valdez. Se realizaron tres muestreos utilizando GPS como referencia (Garmin 72H) (Tabla 2.1). En cada punto de muestreo se midieron los parámetros físico-químicos *in situ* (Extech Stick EC500; temperatura, pH y conductividad eléctrica) [37]. Los muestreos se tomaron estratificadamente a diferentes profundidades (superficial, 0.5m y 1.0m) utilizando una botella LaMotte Van Dorn de 5L de capacidad (1120-G45, Wildco) para la toma de una mayor cantidad de organismos en la superficie por su dependencia a la luz [38], [42]. Por lo anterior el tiempo de muestreo fue de 08:00 am a 11:00 am en mayo de 2014.

Tabla 2.1. Coordenadas de los puntos de muestreo.

Sitios de muestreo			
	Sitio P1	Sitio P2	Sitio P3
Latitud (N)	21°19'01.33799"	21°17'09.38410"	21°17'09.36610"
Longitud (O)	89°40'50.05141"	89°41'50.05970"	89°41'50.07770"

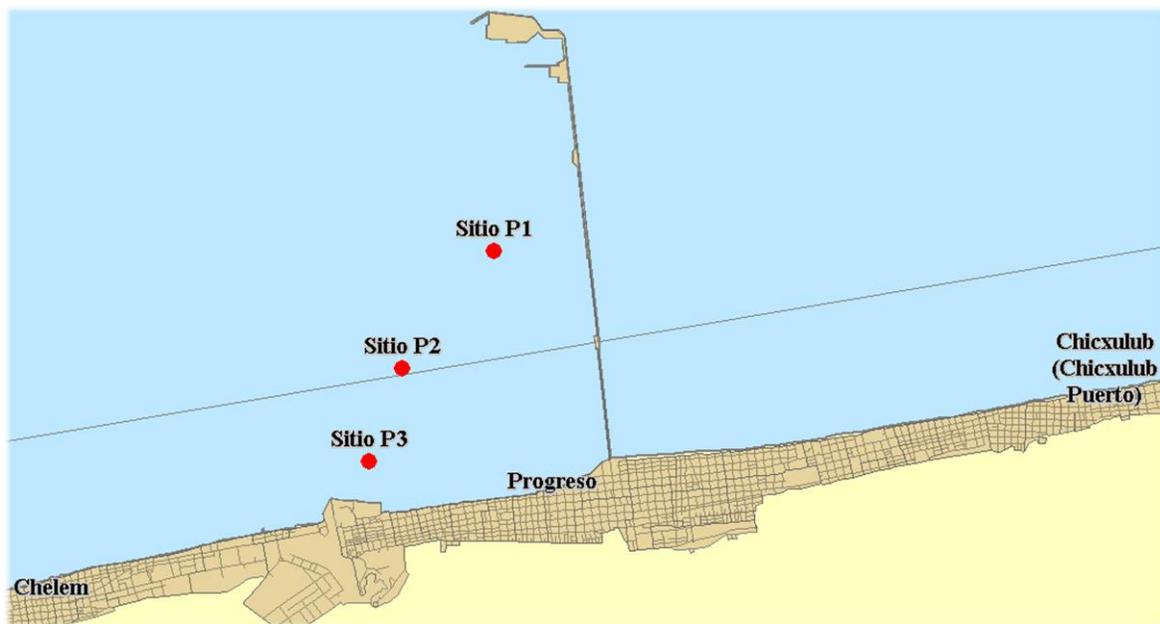


Figura 2.3. Ubicación de los puntos de muestreo.

2.4. Métodos de aislamiento por micropipeteo

Se depositó 200 µL de cultivo en un porta objetos excavado para observación en invertoscopio (ZEISS Axio Observer, 5), empleando una micropipeta Pasteur con una tetina de goma se tomaron las células más aisladas, de mayor tamaño y mejor coloración. Posteriormente, las células se trasladaron a la siguiente excavación para su aislamiento se agregó una gota de medio Guillard f/2 (Catálogo SIGMA, medio no. G9903) y BG11 salino (Catálogo SIGMA, medio no. C3061) para evitar desecación por exposición. Finalmente, se inoculó en 1 mL de medio de cultivo Guillard f/2 y BG11 salino para su crecimiento [11, 12, 37, 38].

2.4.2. Estriado en medio sólido

Esta técnica se realizó usando medio Bold Basal (BBM) sólido. Se tomó 500 µL del cultivo microalgal y se sembró por agotamiento en caja Petri en medio sólido BBM. La incubación se realizó hasta la aparición de colonias aisladas y de mayor tamaño. Éstas colonias con mayor coloración y más aisladas se inocularon en 10 mL de medio líquido [4, 14]. El medio sólido BBM se ha empleado en el aislamiento y purificación de cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Synechococcus* y *Prochlorococcus*, debido a que carece de fuente de carbono inhibiendo la proliferación bacteriana [3].

2.5. Adaptación al medio de cultivo

Las cepas fueron inoculadas en cultivos mixtos enriquecidos con medio Guillard f/2 (Catálogo SIGMA, medio no. G9903) y BG11 salino (2% NaCl) (Catalogo SIGMA, medio no. C3061) (Anexo 1). La preparación de los medios se realizó utilizando agua de mar colectada en los sitios de muestreo. El agua con valores de salinidad >30 UPS (Extech Stick EC500) se filtró (0.2 µm) y almacenó a 4°C hasta su uso [12, 22, 38, 41, 54].

2.6. Escalamiento del cultivo microalgal

Se realizó la variación en las condiciones de cultivo para observar modificaciones en el tiempo de cultivo, así como en el aumento de la densidad celular. Las variaciones en el medio de cultivo fueron: pH (6, 7 y 8), tamaño de inóculo (10, 20 y 30 %) y la concentración del medio de cultivo (2x) [15, 38].

2.7. Purificación y tratamiento

2.7.1. Lavados con agua de mar estéril

Este procedimiento se llevo a cabo eliminando el agua del medio, para lo cual se centrifugaron 35 mL de cultivo (Eppendorf®; Modelo 5804 R) a 4500 rpm/ 7 minutos/ 14 °C. Se resuspendió la pastilla en agua de mar esteril, estos lavados se realizaron tres veces, con el objetivo de eliminar la contaminación dentro del cultivo. Posteriormente se realizó el inoculo en medio de cultivo estéril [38].

2.7.2. Dilución seriada

Tomando 1 mL del cultivo microalgal se depositó en 9 mL de agua destilada. Se realizaron las diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 (v/v) y esta última se cultivó en medio Guillard f/2 sólido, para observar el crecimiento y la posible contaminación en cada cepa [38].

2.7.3. Tratamiento con antibióticos

La selección del antibiótico, se realizó posterior a la siembra de los cultivos en medio LB (Luria-Bertani) para la proliferación bacteriana [4], seguido de un antibiograma para determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas a los antibióticos. Los antibióticos utilizados fueron: cloranfenicol, amikacina y estreptomicina [38, 43].

Se realizaron precultivos de las tres cepas y se observaron al microscopio para determinar si existe carga bacteriana excesiva, posterior a lo cual se aplicó 200 µL de Amikacina y se incubaron por 2 horas a 37°C [43].

2.7.4. Método de choque ácido

Este procedimiento se llevó a cabo, en la fase exponencial de los cultivos con el propósito de descartar cualquier inhibición en el crecimiento, 20 mL de cultivo y se separaron por centrifugación (10 mL de cultivo) a 4500 rpm, 7 minutos y 10 °C (Eppendorf; Modelo 5804 R). Se realizaron tres lavados con agua destilada y 1 mL de HCl 1N. Se dispersaron por agitación durante dos minutos, para evitar cualquier daño mecánico en las células [24], tres lavados con agua destilada para eliminar cualquier remanente de ácido en el cultivo, al final del tercer lavado las pastilla fue suspendida en medio Guillard f/2. La recuperación del cultivo se realizó sometiendo los cultivos a fotoperiodo reducido (8:16 horas luz: oscuridad) y agitación manual cada veinticuatro horas, para reducir el estrés luminoso y mecánico respectivamente [38, 48].

2.8. Determinación de la curva de crecimiento

Los cultivos microalgales (10 mL), se incubaron en foto-periodo de 12:12 luz:oscuridad, temperatura 25 ± 2 °C y agitación constante 120 rpm. Cada 48 horas se tomaron 500 μ L para determinar las curvas de crecimiento. El conteo celular se realizó con un hematocitómetro Neubauer [24]. Para calcular el número de células por unidad de volumen, se dividió la cantidad de células halladas en los cuadrantes de la cámara Neubauer entre el volumen de la alícuota para el análisis:

$$\text{Densidad celular} = \frac{\text{No. de Células}}{\text{Volumen}} = \frac{\text{No. de Células}}{0.02 \mu\text{L}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{\text{mL}} = \frac{\text{No. de Células} \times 50,000}{\text{mL}}$$

2.9. Producción de biomasa

La producción de biomasa se realizó mediante la implementación de un sistema de fotobiorreactores (Figura 2.4) con un volumen de 250 mL de medio con humidificador de aire, bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 2.2.



Figura 2.4. Fotobiorreactor con humidificador de aire.

Tabla 2.2. Condiciones en los sistemas de fotobiorreactores [14, 24].

Condiciones	Valor
Temperatura	24 ± 2 °C
Flujo de la aireación	3.6 vvm
Fotoperiodo (Luz: Oscuridad)	16:8
pH	8

Luminosidad	100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$
Volumen	250 (4)

2.10. Recuperación y secado de la biomasa

La recuperación de la biomasa se realizó al inicio de la fase estacionaria y se separó por centrifugación del medio de cultivo (Centrífuga Orto Alresa Digicen 21", Centrifugación 5,057 g, 7 min y 25 °C). El precipitado se lavó con agua bidestilada estéril, para eliminar la sales y minerales del medio de cultivo. La biomasa total se sometió a congelación crítica -80°C durante 24 horas (Revco DxF -80°C) y se liofilizó (Labconco; Modelo 77530 Vacum: 0.1 bar, -53 °C, 72 horas) [62]. La producción de biomasa (mg L^{-1}) se calculó en base al peso seco total por volumen de cultivo.

2.11. Extracción de lípidos totales

La biomasa seca se sometió a extracción con solventes orgánicos por el método de Bligh y Dyer [63], partiendo de 2.5 mg de biomasa por 1 mL de la mezcla de solvente cloroformo-metanol 1:2 (v/v) de acuerdo a Wahlen *et al.* [56], Volkman *et al.* [48], Iverson *et al.* [64], Lee *et al.* [65] y Araujo *et al.* [66].

Se incubó a 40 °C, 150 rpm durante 3 horas, para la extracción total de lípidos. A continuación para separar la fase sólida y líquida, se colocó la mezcla de biomasa solvente dentro de un embudo de separación de 125 mL. Se recuperó la fase líquida y se sometió a evaporación mediante un evaporador rotatorio (IKA RV 10 AT, a 60 rpm, 40 °C y 10 °C en la columna de enfriamiento). La extracción se realizó tres veces. El extracto lipídico se disolvió con cloroformo, y se colocó en viales a peso constante. La evaporación del cloroformo se realizó dentro de una campana de extracción de humos durante 24 horas. Una vez evaporado el solvente se pesaron los viales.

2.12. Cromatografía en capa fina

Como fase estacionaria se utilizaron placas de gel de sílice (cromatofolios Merck, silicagel 60), y como fase móvil, una mezcla de hexano, acetato de etilo y ácido acético en una proporción 9:1:0.1 (v/v). El revelado de las placas se realizó empleando una solución de ácido fosfomolibdico al 10% en ácido sulfúrico. Las referencias empleadas fueron para la presencia de TAG: aceite comestible (Capullo, humedad <0.5% y acidez <0.5 °) y para los FAME: biodiesel de aceite de canola obtenido previamente en el laboratorio (composición de FAME: 16:1, 4.1 %; 18:0, 2%; 18:1, 63%; 18:2, 20%) [67].

2.13. Cromatografía de columna

Los extractos lipídicos fueron fraccionados mediante cromatografía de columna por gravedad (CC) (marca ESEVE, 2427), empleando una columna de 50 cm de longitud por 2.5 cm de diámetro y sílice gel (tamaño de partícula 0.007 μm) como fase estacionaria.

La relación del gel de sílice se tomó en base al peso del extracto (Tabla 2.3), calculando un volumen ocupado de la fase estacionaria de 18 cm^3 y 22 g de gel de sílice dentro de la columna. El disolvente o fase móvil fue el hexano; hexano-acetato de etilo 9:1, 8:2 y 7:3; y metanol. Esta selección y proporción de la fase móvil se definió en base a los resultados obtenidos por la cromatografía en capa fina [61, 68].

Tabla 2.3. Relación de la dimensión estimada de las columnas cromatográficas para separar distintos pesos de muestra.

Peso de la muestra (g)	Diámetro de la columna (cm)	Altura del adsorbente (cm)	Longitud de la columna (cm)
0.1	1-1.5	15	60
0.2	1.5-2	20	60
0.3	2.5-3	20-25	75
1	3-3.5	30	75
2-3	4-5	40-45	75

2.14. Transesterificación

La transesterificación se realizó en el extracto lipídico total y las fracciones de triacilglicéridos (TAG) recuperadas de la columna. La reacción inició adicionando 2% de metóxido de sodio al extracto lipídico en un vial de 25 mL [64] con agitación moderada a 60°C y 90 min (parrilla de agitación y calentamiento, Thermolyne SP-131325) [61], [69]. Posterior a la transesterificación de los TAG presentes en la fracciones, se eliminó el catalizador y glicerol remanente de la reacción, empleando el mismo procedimiento de CC utilizando una pipeta Pasteur con un empaquetamiento de sílica gel y una fase móvil de cloroformo [51].

2.15. Análisis del perfil lipídico

2.15.1. Análisis por cromatografía de gases-masas

Las fracciones se analizaron por cromatografía de gases-masas (GC System, Agilent Technologies 7890B, acoplado a un detector masico Agilent Technologies 5977A). Esto se

realizó empleando una columna DB5-HT (30 m x 250 μm ID x 0.25 μm de espesor de película) con las siguientes condiciones: 3 mL/min de flujo de He como gas acarreador. La temperatura del inyector y detector FID fue de 300 °C. La temperatura del horno fue escalonada: inicialmente 70 °C durante 5 min; 10 °C/min hasta 200 °C durante 5 min; y 20 °C/min hasta 290 °C. Finalmente esta temperatura se mantuvo por 22.5 min. El volumen de inyección de la muestra fue 1 μL . Se utilizó la base de datos del espectro de masas NIST05 (National Institute of Standards and Technology) para la identificación de los picos mayoritarios [61, 67] .

2.15.2. Análisis por espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier

Los fosfolípidos se identificaron por espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR, Bruker Tensor II). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: la radiación emitida por un diodo láser de luz infrarroja IR (longitud de onda de 3-8 μm), se aplicó con una resolución de 4 cm^{-1} en un intervalo de longitud de onda de 500 a 4000 cm^{-1} [70]. Un modo de reflectancia total atenuada (ATR) también fue aplicado a las muestras mediante el accesorio ATR con punta de diamante el cual funciona con fuentes de radiación de rango espectral NIR (IR rango lejano), MIR (IR rango mediano), FIR (IR rango cercano). La resolución empleada fue de 4 y 32 cm^{-1} escaneos por muestra. Posteriormente se utilizó la base de datos SDBS (Spectral Database for Organic Compounds) para la identificación de los compuestos usando el software OPUS (versión 7.5 build). Las señales detectadas se identificaron empleando la librería de estándares de referencia (SDBS) [62] y espectros FTIR reportados y relacionados con los grupos moleculares específicos.

CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de cepas de microalgas

La colecta realizada en cada uno de los puntos de muestreo registró en general porcentajes de sobresaturación de oxígeno ($8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), lo cual indica una alta actividad fotosintética en la columna de agua por los microorganismos fitoplactónicos. La colecta se realizó en días soleados, con lo cual las microalgas se ubican en la columna de agua (35 cm de profundidad) o en la superficie para la captación de fotones de luz [5].

3.2. Acondicionamiento al medio de cultivo

La aclimación de las tres cepas de microalgas, se realizó mediante su inoculación (1:10 v/v) en medios sintéticos: BG11 salino (SIGMA C3061) (Anexo 1, Tabla A.1.1) y Guillard f/2 (SIGMA G9903) (Anexo 1, Tabla A.1.2). Los resultados obtenidos indicaron que la aclimatación de las tres cepas fue mayor en medio Guillard f/2 (Figura 3.1). Esto debido a los nutrientes que posee el medio. A diferencia del medio BG11 el medio Guillard proporciona los nutrientes y vitaminas necesarias para obtener una mayor densidad celular; y la disminución del tiempo de cultivo [55]. El medio f/2 presenta una mayor concentración de nitrógeno y fosforo; siendo estos macronutrientes significantes para el crecimiento de microalgas marinas. La relación de 16N:1P es de vital importancia ya que de esta dependerá la composición química apta para la síntesis de TAG en las células microalgales, donde, se ha observado en cultivo de *Chlamydomonas salina* una relación de 12N:0.5P el aumento en la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados, siendo estos no aptos para la producción de biodiesel por su baja estabilidad oxidativa [43, 56]. También una diferencia clave entre ambos medios es el contenido de vitaminas en el medio f/2; la cianocobalamina, la tiamina y la biotina; estas son necesarias para especies de microalgas verdes en cultivos iniciales [22, 55].

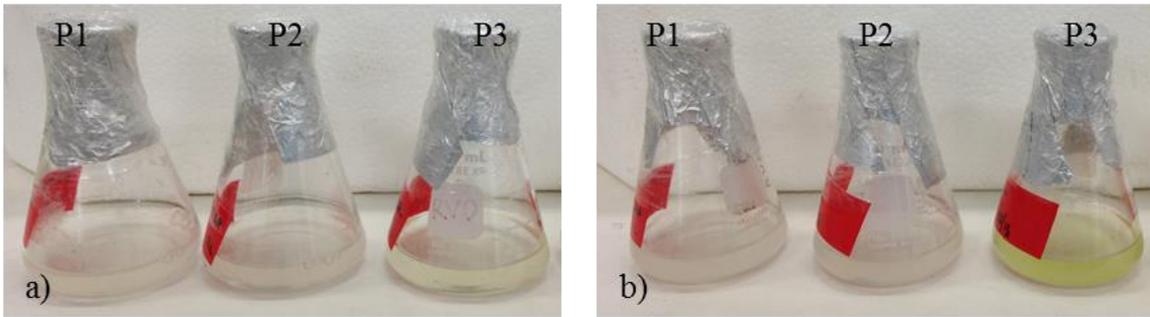


Figura 3.1. Acondicionamiento al medio de cultivo sintético (Cepa P1, P2 y P3), ocho días posterior a su inoculo. a) BG11 salino (SIGMA C3061); y b) Guillard f/2 (SIGMA G9903).

Cabe mencionar que en las tres cepas, se observaron diferencias en coloración y tiempos de crecimiento en los medios empleados, considerando que las tres cepas son especies diferentes, por ellos cada cepa puede tener una mejor adaptación al medio de cultivo, ya que el crecimiento de diferentes cepas de microalgas marinas difiere individualmente a los nutrientes presentes en el medio de cultivo, por ello los posteriores experimentos se realizaron con medio Guillard f/2 (Figura 3.2).

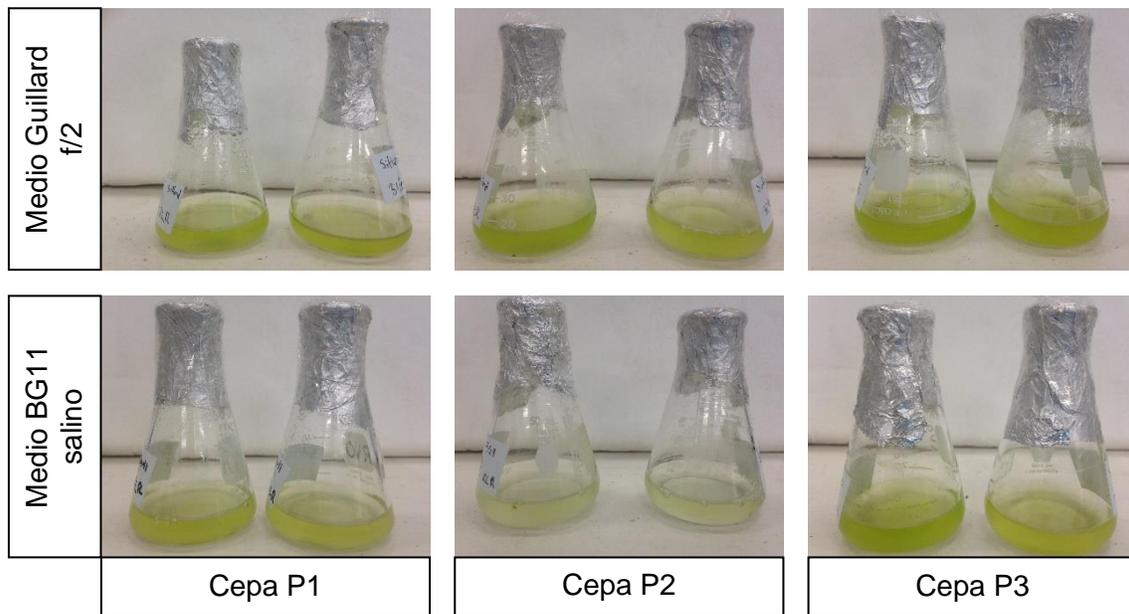


Figura 3.2. Acondicionamiento al medio de cultivo cepa P1, P2 y P3, veintiún días posterior a su inoculo.

3.3. Acondicionamiento de crecimiento microalgal

Posterior al periodo de aclimatación se realizaron variaciones al pH del medio Guillard f/2, para disminuir la contaminación bacteriana [5]. Las variaciones en el pH no fueron tan abruptas, esto con el propósito de no estresar o modificar el comportamiento de las microalgas. El pH fue de 6 y 7, estos valores ligeramente ácidos empleados, se deben a que las microalgas marinas son capaces de resistir pH desde 6 a 8.5 sin alteración en el tamaño o en su comportamiento celular [6].

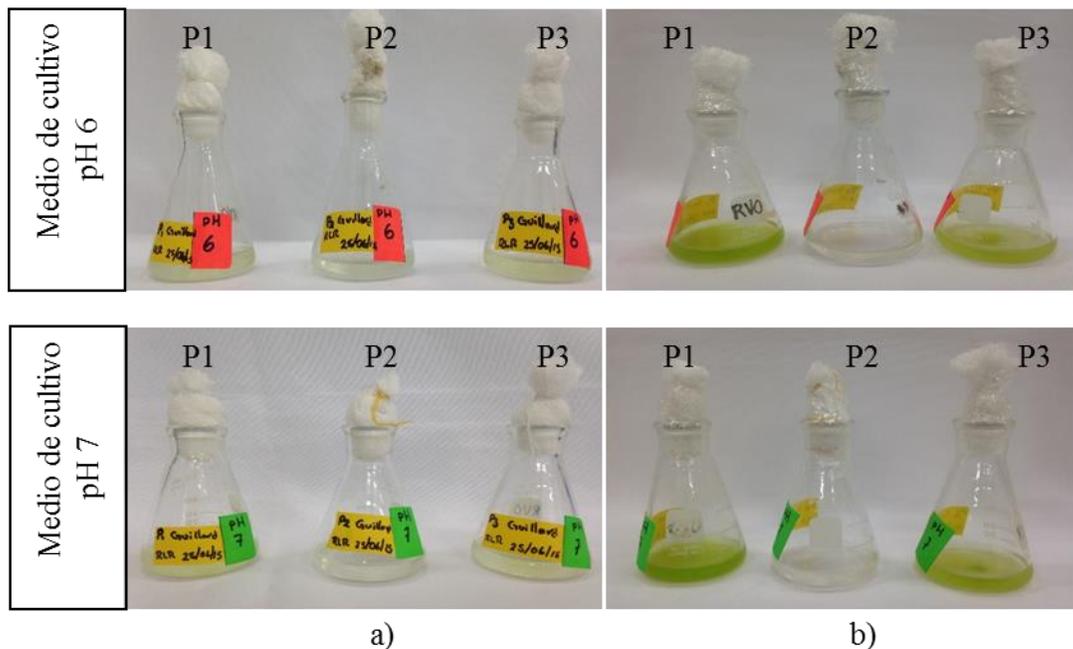


Figura 3.3. Variaciones de pH en medio de cultivo Guillard f/2. a) Cultivo inicial; y b) veintiún días posterior a su inculo.

Posterior al acondicionamiento por pH, se observaron variaciones en los cultivos. La densidad celular de la cepa P2 disminuyó significativamente (Tabla 3.1), mientras que las cepas P1 y P2 no mostraron variaciones en el crecimiento, ni en su coloración (Figura 3.3). La disminución de la carga bacteriana se observó en las tres cepas, debido a que las bacterias son sensibles a valores de pH menores a 7. Se ha identificado que en cultivos marinos las bacterias crecen en ambientes alcalinos a ~8.2 pH; y al existir una disminución en este pH la duplicación de las bacterias se ve inhibida, debido a que las bacterias deben

mantener un pH citoplásmico que sea compatible con la integridad funcional y estructural óptima de las proteínas citoplasmáticas que soportan el crecimiento [8].

Tabla 3.1. Efecto a la variación del pH en la densidad celular en las cepas P1, P2 y P3.

Nombre de la cepa	Densidad celular (células·mL ⁻¹)			
	pH 6		pH 7	
	Día 1	Día 21	Día 1	Día 21
P1	1.00x10 ⁴	1.10x10 ⁷	1.00x10 ⁴	1.56x10 ⁷
P2	1.00x10 ⁴	3.24x10 ⁴	1.00x10 ⁴	4.34x10 ⁵
P3	1.00x10 ⁴	5.40x10 ⁶	1.00x10 ⁴	6.66x10 ⁶

Se evaluaron diferentes tamaños de inóculo, para incrementar la densidad celular y disminuir el tiempo del cultivo. Los tamaños del inóculo evaluados fueron 10, 20 y 30% con respecto al volumen del medio. La mayor densidad celular, se observó en la relación del 10% (Figura 3.4). Este resultado puede ser debido a que la menor densidad celular permitió una mayor disponibilidad de nutrientes por unidad celular.

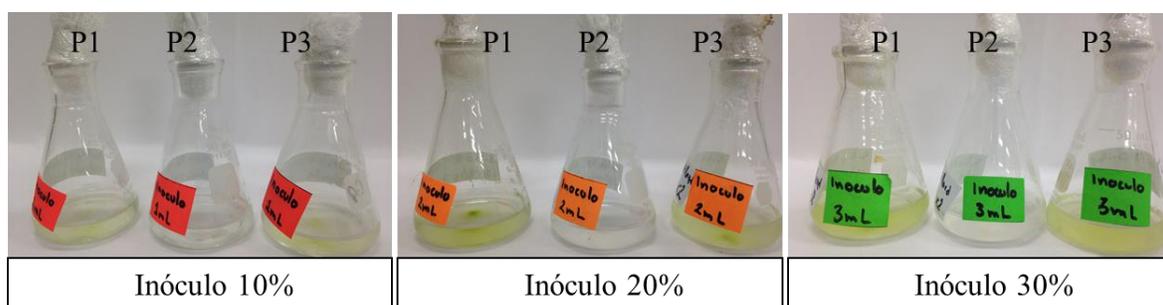


Figura 3.4. Variaciones en el tamaño de inóculo. Cepas P1, P2 y P3; veintiún días posterior a su inóculo.

Tabla 3.2. Efecto del tamaño de inóculo en la densidad celular en las cepas P1, P2 y P3.

Nombre de la cepa	Densidad celular (células mL ⁻¹)					
	Inóculo 10%		Inóculo 20%		Inóculo 30%	
	Día 1	Día 21	Día 1	Día 21	Día 1	Día 21
P1	1.00x10 ⁴	1.80x10 ⁷	1.00x10 ⁴	1.37x10 ⁷	1.00x10 ⁴	1.29x10 ⁷
P2	1.00x10 ⁴	5.67x10 ⁵	1.00x10 ⁴	4.07x10 ⁵	1.00x10 ⁴	1.80x10 ⁵
P3	1.00x10 ⁴	8.22 x10 ⁶	1.00x10 ⁴	6.56x10 ⁶	1.00x10 ⁴	6.07x10 ⁶

El doble de nutrientes del medio Guillard f/2 se empleó en el cultivo de las cepas, para evaluar incrementos en la densidad celular y disminución en el tiempo de cultivo (Figura 3.5). Este experimento, demostró ser una alternativa efectiva para la disminución del tiempo de cultivo, que además permitió un aumento considerable en la densidad celular (Tabla 3.3), esto debido a la mayor cantidad de nutrientes y vitaminas en el medio, favoreciendo así el crecimiento de las células en cultivos iniciales.

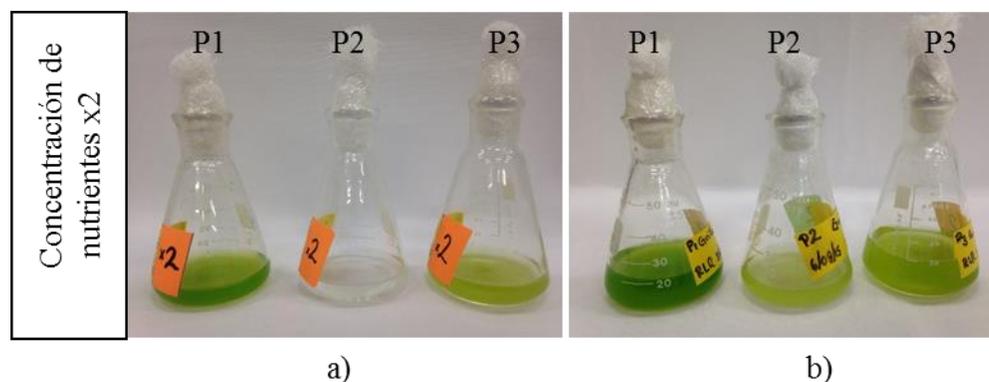


Figura 3.5. Adición del doble de nutrientes en medio de cultivo Guillard f/2. a) Cultivo quince días posterior a su inoculo; y b) veintiún días posterior a su inoculo.

Tabla 3.3. Defecto de la variación en la concentración de nutrientes del medio Guillard f/2 en densidad celular de las cepas P1, P2 y P3.

Nombre de la cepa	Densidad celular (células·mL ⁻¹)		
	Cantidad de nutrientes 2x		
	Día 1	Día 15	Día 21
P1	1.00x10 ⁴	1.87x10 ⁷	2.09x10 ⁷
P2	1.00x10 ⁴	2.89x10 ⁶	1.01x10 ⁷
P3	1.00x10 ⁴	9.97x10 ⁶	1.37x10 ⁷

3.4. Purificación y tratamiento

3.4.1. Antibióticos

El resultado del antibiograma determinó que la comunidad bacteriana presente en los cultivos de las tres cepas es sensible a la Amikacina, la actividad antimicrobiana que presenta este antibiótico es usualmente positiva frente a los bacilos gram-negativos aeróbicos, cuyo mecanismo de acción en la célula es unirse al sitio aminoacilo del ARN

ribosómico 16S dentro de la subunidad ribosomal 30S, lo que conduce a la lectura errónea del código genético y a la inhibición de la translocación (pasos iniciales requeridos para la síntesis de péptidos son continuos tales como la unión de mRNA y la asociación de la subunidad ribosomal 50S, pero el alargamiento no se produce) [38, 43].

Las condiciones de incubación, se deben a que en un ambiente mesofílico las bacterias proliferan con lo cual el antibiótico es más efectivo. Antes y después de la aplicación del antibiótico, se verificó mediante observación al microscopio la presencia bacteriana. Cabe señalar que este método se ha empleado en el laboratorio con excelentes resultados.

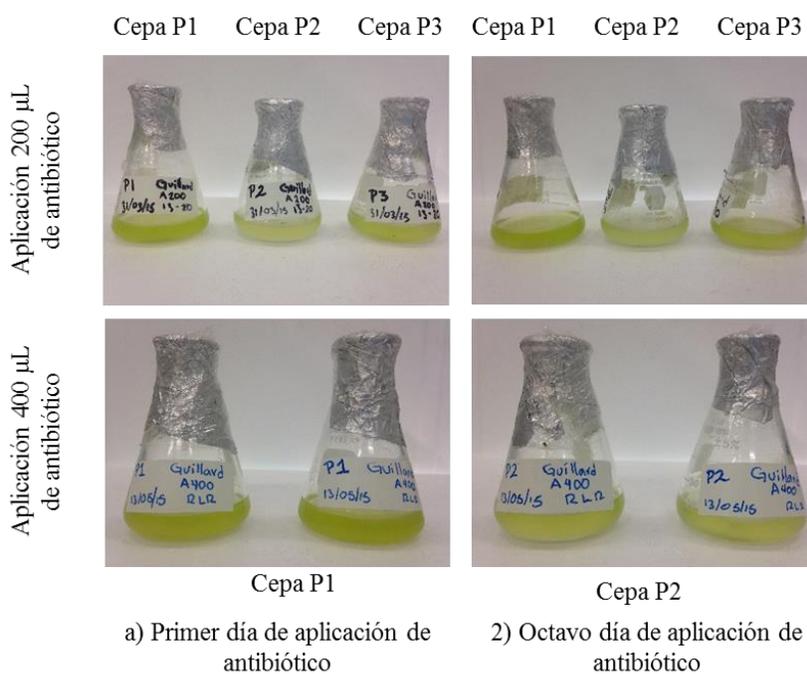


Figura 3.6. Aplicación de 200 y 400µL de Amikacina. a) Primer día de la aplicación y b) ocho días después de la aplicación.

La efectividad del método también se observó en la disminución de la turbidez del medio y la completa eliminación de la apariencia blanquecina en la parte superior de los cultivos [28]. Sin embargo se realizó una segunda aplicación de antibiótico debido a que los cultivos aún presentaban turbidez considerable. La recuperación de la densidad celular del cultivo se observó al término de ocho días. Posterior a los ocho días se realizó el mismo procedimiento de observación, aplicación de antibióticos e incubación (Figura 3.6, a).

En las cepas P1 y P2, se observó una disminución en la turbidez y un aumento en la coloración (verde brillante). La cepa P3 no resistió la segunda aplicación (Figura 3.6, b), debido probablemente a la baja densidad celular. Donde, se ha identificado en cultivos de *Nannochloropsis* sp. con una densidad celular menor ($\sim 1.33 \times 10^5$), la aplicación de estreptomycin como método de purificación provocó un efecto en la reducción en la tasa de crecimiento; y la total eliminación de las células microalgales por la inhibición del fotosistema II [43].

3.4.2. Dilución seriada

La cepa P1 y P2, mostraron disminución en la turbidez y un aumento en la coloración. A diferencia de las cepas P1 y P2, la siembra de la cepa P3, mostró contaminación bacteriana (Figura 3.7, b). Esto es coincidente con el resultado obtenido en el tratamiento anterior, en el que la carga bacteriana desplazó completamente a las microalgas. Este método ha demostrado ser efectivo si es aplicado en conjunto con la utilización de antibióticos al inicio del cultivo, así como también la separación por centrifugación, aunado al final con la siembra de estas diluciones en medio sólido para su posterior aislamiento [55].

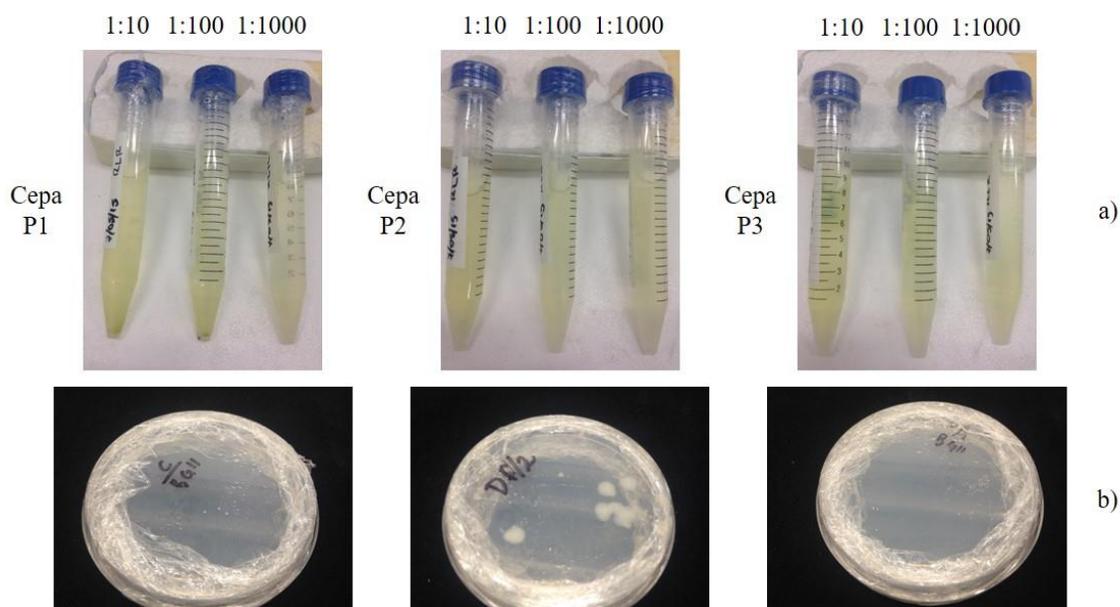


Figura 3.7. Purificación de las cepas por (a) dilución seriada 1:10, 1:100, 1:1000 y (b) siembra en caja Petri.

3.4.3. Método con choque ácido

Este procedimiento se llevó a cabo en la fase exponencial de los cultivos, esto con el propósito de descartar cualquier inhibición en el crecimiento. Posterior a 8 días de la recuperación del cultivo se observó una mejor coloración y menor turbidez en los cultivos, demostrando la efectividad de este método. La disminución de la contaminación en el cultivo, se corroboró realizando el sembrado en medio sólido y observación en microscopio óptico. Se observó la completa eliminación bacteriana (Figura 3.8, a), y la mejoría en el crecimiento en el medio sólido (Figura 3.8, b), caso contrario a las metodologías llevadas a cabo anteriormente. Destacando la resistencia de la cepa P3 en la aplicación de este método, caso contrario ocurrido en los métodos de purificación con antibióticos.

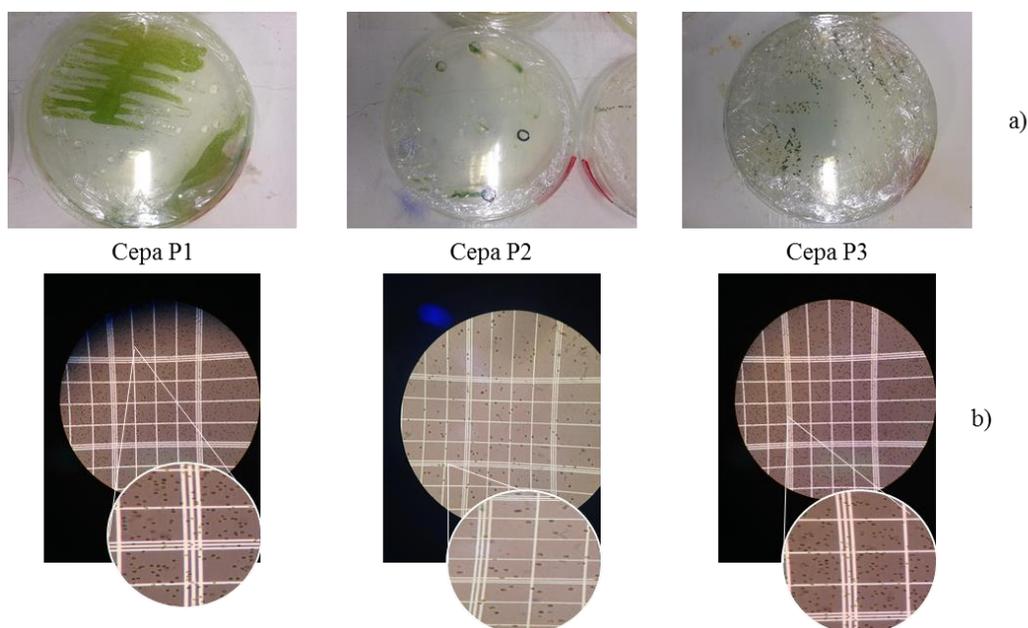


Figura 3.8. Cultivo obtenido posterior al choque ácido: a) sembrado cultivos P1, P2 y P3 en medio solido; b) cultivos observado bajo microscopio.

3.5. Determinación de la curva de crecimiento

El conteo celular, se realizó cada dos días, debido a que la división celular ocurre en periodos más largos en cepas de microalgas marinas a diferencia de las cepas de microalgas de agua dulce [68].

La curva de crecimiento de la cepa P1 (Figura 3.9), presentó una fase de latencia de cuatro días, mientras que la fase exponencial con una duración de catorce días. Al día dieciocho del cultivo, inició la fase estacionaria. La densidad celular más alta fue registrada a partir de

los veinte días. La cepa P2 (Figura 3.9), presentó una fase de latencia de seis días, mientras que la fase exponencial con una duración de catorce días. Al día veinte del cultivo, inició la fase estacionaria. La densidad celular más alta fue registrada a partir de los veintidos días. La cepa P3 (Figura 3.9), presentó una fase de latencia de seis días, mientras que la fase exponencial con una duración de doce días. Al día veinte del cultivo, inició la fase estacionaria. La densidad celular más alta fue registrada a partir del día veinte de cultivo, seguidamente se observó una disminución en la densidad celular, dando inicio a la fase de lisis celular.

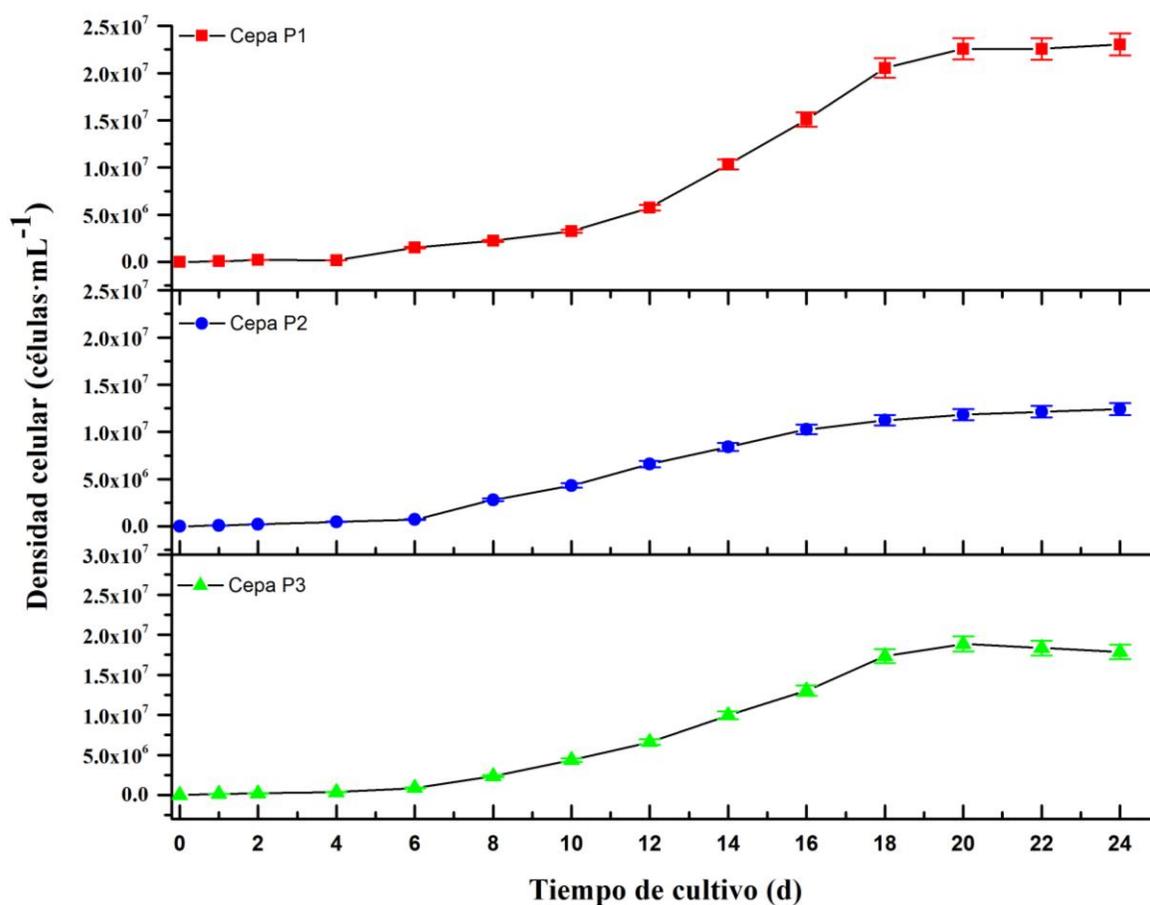


Figura 3.9. Curva de crecimiento de las cepas P1(■), P2(●) y P3(▲).

3.5.1. Densidad y tamaño celular

La cepa P1 mostró una mayor densidad celular (2.16×10^7 células·mL⁻¹), seguida de la cepa P3 (1.89×10^7 células·mL⁻¹), mientras que la cepa P2 mostró la menor densidad (1.21×10^7 células·mL⁻¹). Sin embargo la cepa P2 presentó mayor tamaño celular, en comparación con

la cepa P3. Al observarse tamaños diferentes, así como también, una densidad celular diferentes, nos indicarían que estas cepas pueden ser especies diferentes, ya que en la mayoría de los cultivos de la cepa P3 se observó la formación de cenobios; y una formación y coloración celular diferente en las tres cepas.

La determinación del tamaño celular se realizó tomando el promedio de doce mediciones de células aisladas, en la fase exponencial. En promedio el tamaño celular de las cepas P1, P2 y P3, fue 2.2 μm , 4.5 μm y 1.8 μm respectivamente.

3.6. Producción recuperación y secado de la biomasa de las tres cepas

La producción de biomasa se llevó a cabo tomando el inóculo de un cultivo escalado con anterioridad en fase exponencial. La inoculación de cada una de las cepas se realizó: (1) inoculando 1×10^4 células·mL⁻¹; y (2) 10% de inóculo, para definir el tamaño de inóculo adecuado. La recuperación de la biomasa demostró que con un inóculo de 1×10^4 células·mL⁻¹ se obtuvo 2.56×10^7 , 1.98×10^7 y 2.32×10^7 células·mL⁻¹, para las cepas P1, P2 y P3 respectivamente. Mientras que con el inóculo de 10% se obtuvo 2.66×10^7 , 2.09×10^7 y 2.40×10^7 células·mL⁻¹ respectivamente. Este procedimiento permitió la obtención de mayor densidad celular mediante el fotobiorreactor, debido a que un aumento en la concentración de células inoculadas favorece la capacidad de duplicación de microalgas en cultivos aireados con burbujeo, como ha sido reportado en cultivos de *Nannochloropsis* sp. [71].

La producción de biomasa seca de las cepas P1, P2 y P3 (Figura 3.10) fue de 0.82 ± 0.03 , 0.58 ± 0.01 y 0.56 ± 0.02 g·L⁻¹, respectivamente. No se detectaron diferencias significativas (ANOVA, $P < 0.05$, $n=3$) en la producción de biomasa obtenida de las cepas P2 y P3, caso contrario de la cepa P1, que presentó una mayor producción de biomasa. Se observó una similitud en la producción de biomasa seca en la cepa P1 con la reportada en especies marinas: en *N.salina* de 0.9 g·L⁻¹, *N. oleoabundans* 1.1 g·L⁻¹ y *D. primolecta* 0.9 g·L⁻¹. Mientras que para las cepas P2 y P3, se ha observado la producción de biomasa seca en cultivos de *S. salina* de 0.6 g·L⁻¹, *M. aeruginosa* de 0.8 g·L⁻¹ y *P. subcapitata* de 0.4 g·L⁻¹ [48, 67].

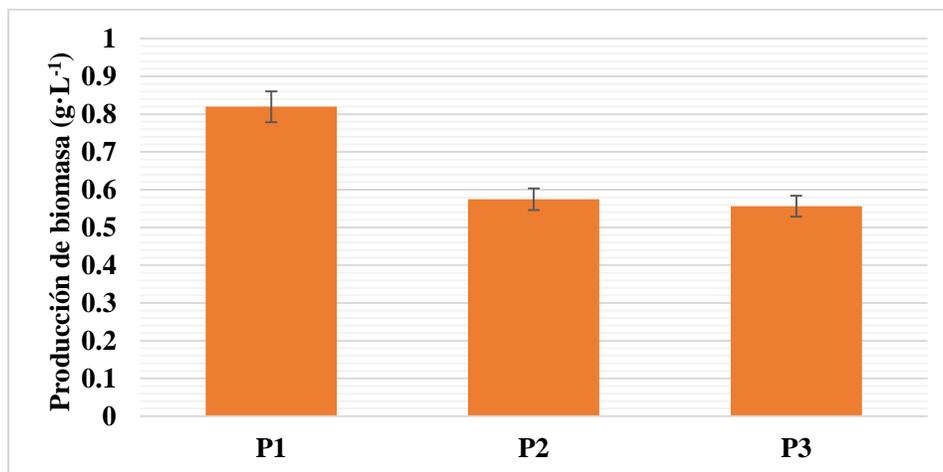


Figura 3.10. Producción de biomasa seca de las cepas P1, P2 y P3 (g·L⁻¹).

3.7. Extracción de lípidos totales

Los valores de extracción lipídica en las cepas P1, P2 y P3 se muestra en la Figura 3.11, en P2 y P3 los pesos de las extracciones dieron como se espera, la primera extracción presento mayor cantidad que las segundas, y en P1 la segunda extracción presento una mayor cantidad debido al realizar la primer extracción, se observó la formación de una película grumosa, que dificultó la recuperación de la fase móvil.

El extracto lipídico total de las tres extracciones realizadas a la biomasa seca en las cepas P1, P2 y P3, fue de 307.91 ± 36 , 218.02 ± 21 y 171.02 ± 16 mg·L⁻¹, respectivamente (Figura 3.11). Obteniendo un contenido lipídico en base a la biomasa seca para las cepas P1, P2 y P3 de 37.56, 37.91 y 30.75 %, respectivamente. Observándose similitudes en lo reportado en microalgas marinas, donde se ha identificado extracciones de lípidos que corresponden al 25 a 56 % de lípidos por peso seco [47]. Se ha reportado que la utilización de una mezcla de solvente polares y no polares permiten extraer una mayor cantidad de lípidos, y otros compuestos (por ejemplo: pigmentos, carbohidratos y biopolímeros) [72].

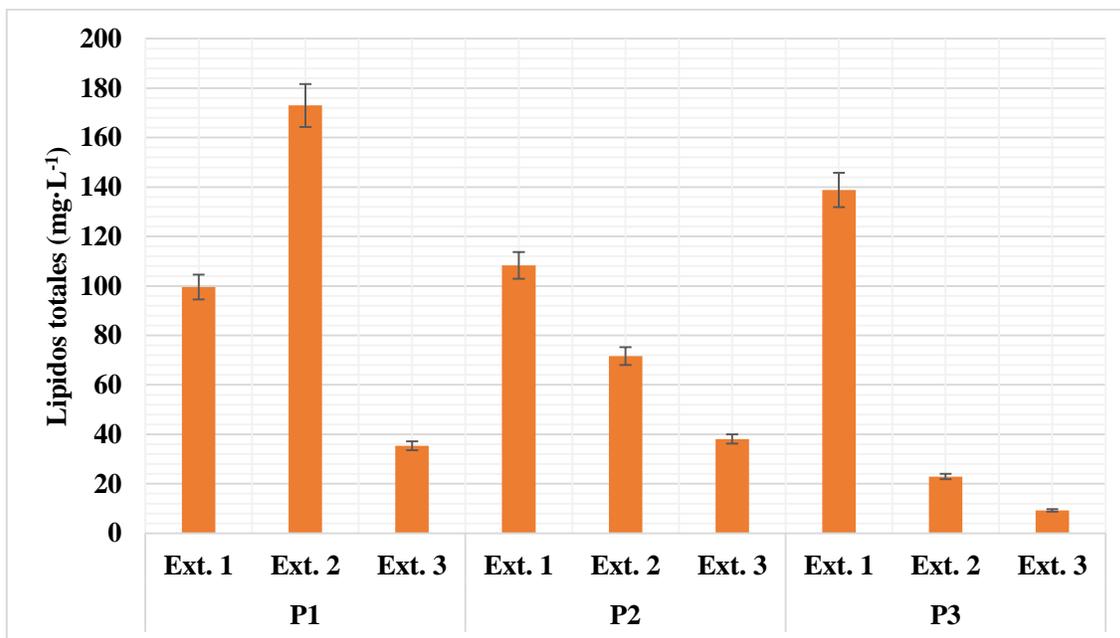


Figura 3.11. Lípidos totales obtenidos de las cepas P1, P2 y P3, en función al número de extracción: Ext. 1; Ext. 2 y Ext. 3, hacen referencia al número de extracciones.

3.7.1. Cromatografía de capa fina del extracto lipídico total

El análisis de cromatografía de capa fina del extracto lipídico total de las tres cepas permitió detectar la presencia de lípidos polares (ácidos grasos y fosfolípidos) y no polares (terpenos y TAG). Se observó una presencia mayor de TAG en la primera extracción en las tres cepas (Figura 3.12). No se observó la presencia de TAG posterior a la tercera extracción en las tres cepas. Esta separación de compuestos (polares y no polares) es consistente con lo reportado, por cromatografía en capa fina de extractos de *Nannochloropsis* sp. [67].

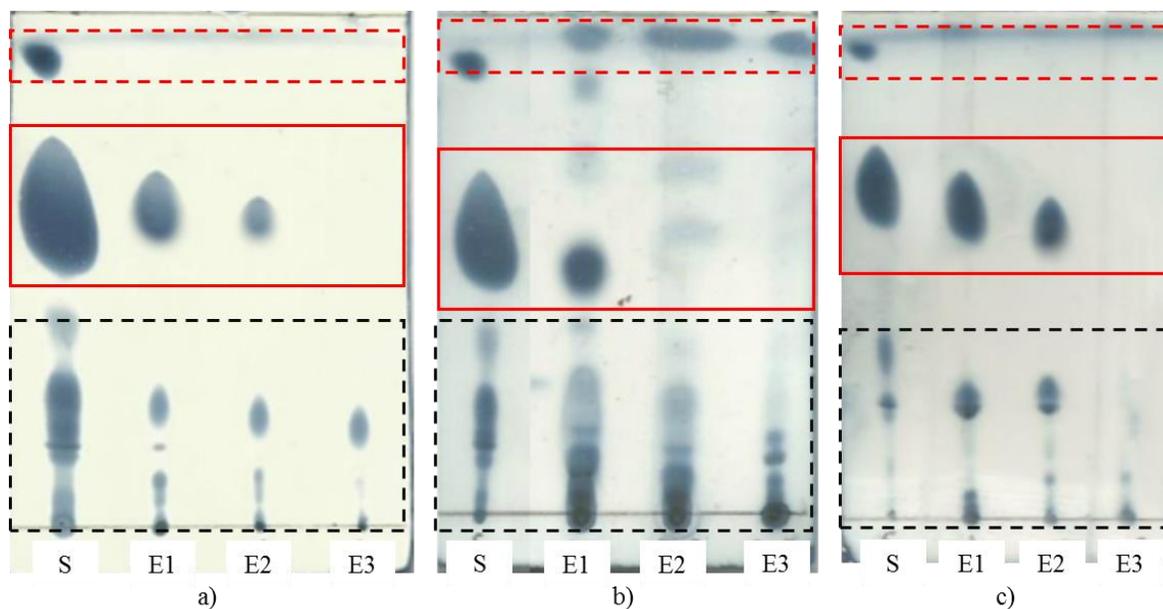


Figura 3.12. Cromatografía en capa fina de los extractos lipídicos de las cepas P1 (a), P2 (b) y P3 (c) (S: aceite; E1, E2 y E3: número de extracción); cuadro línea roja discontinua: compuestos no polares; cuadro línea roja continúa: TAG; y cuadro línea azul discontinua: compuestos polares [67].

3.8. Separación por cromatografía en columna de los extractos crudos

El fraccionado de los grupos se realizó en función a los solventes o mezclas de estos. Es por esto que se seleccionaron los solventes hexano (no polar), acetato de etilo (polar aprótico) y metanol (polar prótico). La utilización de un gradiente de polaridad de la fase móvil puede permitir una mejor separación de las fracciones [40].

Las pequeñas fracciones de eluatos se unieron en grupo en base a los resultados obtenidos del análisis por cromatografía de capa fina; y se pesaron (Tabla 3.4). La composición de cada grupo fracciones se analizó por cromatografía de capa fina.

Tabla 3.4. Grupos obtenidos de la separación por cromatografía en columna del extracto lipídico de las cepas bajo estudio.

Extracto	Fracción	Peso de la fracción (mg)
Cepa P1	1	7.3
	2	11.2
	3	10.7
	4	7.4

	5	89.5
Cepa P2	1	5.7
	2	7.5
	3	4.2
	4	11.5
	5	7
	6	34.2
Cepa P3	1	11.3
	2	4
	3	13
	4	11
	5	4.7
	6	12.2

3.9. Transesterificación de los TAG

Posterior a la separación de los extractos lipídicos, se continuó con la transesterificación de las fracciones correspondientes a los TAG. Donde, debido a los resultados negativos obtenidos en la transesterificación del extracto lipídico total, se realizaron modificaciones a las condiciones de la reacción: 1) se incrementó la concentración del metóxido de sodio (6%), debido a que altas proporciones de metanol e hidróxido de sodio, son necesarias para la conversión óptima directa de los triacilglicéridos a ésteres metílicos de ácidos grasos en microalgas verdes [35, 50, 71]; 2) La eliminación de la humedad del extracto y la separación de ácidos grasos libres de los triacilglicéridos por cromatografía de columna, con lo cual se consigue un aumento en la eficiencia de conversión de triacilglicéridos a FAME [73, 74]. En este sentido, es necesario señalar que las pequeñas modificaciones realizadas al protocolo pueden tener un gran efecto en la eficiencia de la reacción de transesterificación [71].

Las modificaciones realizadas en la reacción de transesterificación resultaron en la conversión de los triacilglicéridos en ésteres metílicos de ácidos grasos en las tres cepas (Figura 3.13).

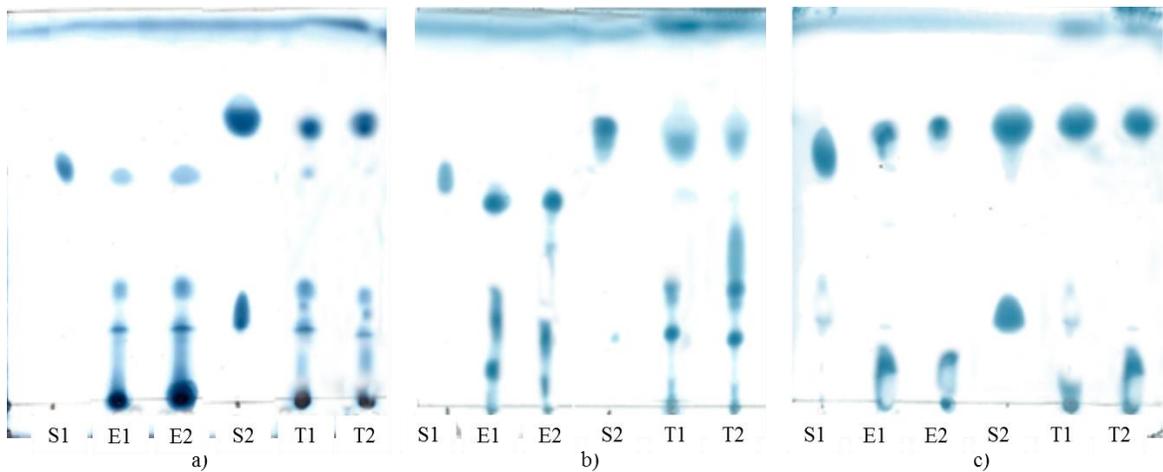


Figura 3.13. Cromatografía en capa fina de los triacilglicéridos obtenidos de la cromatografía en columna de las cepas P1(a), P2(b) y P3(c) y el producto de la transesterificación (S1: aceite comestible [71]; E1 y E2: extracto lipídico (triacilglicéridos) por duplicado; S2: biodiesel [71]; T1 y T2 Transesterificado por duplicado).

3.10. Análisis del perfil lipídico

3.10.1. Análisis por cromatografía de gases-masas de los grupos de fracciones de las tres cepas bajo estudio

Los resultados obtenidos por cromatografía de gases-masas de la cepa P1 (Anexo 2, Figura A.1), P2 (Anexo 2, Figura A.2) y P3 (Anexo 2, Figura A.3) indicaron la presencia de cinco grupos principales (Tabla 3.5): hidrocarburos, FAME, ácidos orgánicos, terpenos, esteroides y aminas.

Tabla 3.5. Compuestos identificados por cromatografía de gases-masas en las cepas P1, P2 y P3 (Anexo 2).

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1		Cepa P2		Cepa P3	
		No. De pico	% de área bajo la curva	No. De pico	% de área bajo la curva	No. De pico	% de área bajo la curva
Ciclotetradecano	C ₁₄ H ₂₈					1	14.10
Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀			2	5.64		
Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	3	4.89			3	4.35
1-Octadeceno	C ₁₈ H ₃₆					4	10.89
1-Heptadeceno	C ₁₇ H ₃₄	5	23.75				
Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	6	6.91	6	8.48	6	5.97
Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	7	4.86			7	5.72
Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀			8	4.66	8	4.36
Eicosano	C ₂₀ H ₄₂			9	7.80	9	8.78
Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄			10	7.28	10	8.31
Docosano	C ₂₂ H ₄₆					11	6.92
Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	12	3.95			12	7.76
Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄					13	4.86
Tricosano	C ₂₃ H ₄₈					14	3.47
Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂					15	3.74
Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	16	3.37				
2,2,4-Trimetil-1,3-pentanediol 1-isobutirato	C ₁₂ H ₂₄ O ₃					17	5.01
3-Hidroxi-ácido butanoico	C ₄ H ₈ O ₃	18	10.78				
2,4-Di-t-butil fenol	C ₁₄ H ₂₂ O			19	5.73		
Ácido n-Hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	20	7.98	20	3.98	20	10.22
			4.18		10.05		26.01

Éster metílico de ácido hexadecanoico	$C_{17}H_{34}O_2$	21	3.11	21	13.85	21	7.82
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	$C_{18}H_{36}O$	22	5.25 5.29				
9-acido Octadecenoico	$C_{18}H_{34}O_2$			23	8.04	23	3.97
Ácido octadecanoico	$C_{18}H_{36}O_2$			24	5.42	24	3.81
Éster metílico de ácido graso 9,12-Octadecadienoico	$C_{19}H_{34}O_2$			25	4.92	225	12.34
Éster metílico de ácido oleico	$C_{19}H_{36}O_2$			26	7.37		
2-Palmitoilglicerol	$C_{19}H_{38}O_4$	27	9.94				
Neofitadieno	$C_{20}H_{38}$			28	53.76 10.46	28	3.88 54.05 7.05
Fitol	$C_{20}H_{40}O$			29	3.02		
Bis(2-etilhexil) éster de ácido hexadecanoico	$C_{22}H_{42}O_4$	30	41.25 3.94	30	4.93		11.30
(Z)-13-Docosenamida	$C_{22}H_{43}NO$					31	61.35
Bis(2-etilhexil) ftalato	$C_{24}H_{38}O_4$					32	12.31
25-oxo-25-Norcolesterol	$C_{26}H_{42}O_2$					33	3.34
Campesterol	$C_{28}H_{48}O$			34	6.58		
Clionasterol	$C_{29}H_{50}O$			35	26.79	35	5.64 8.25

3.11.1.1 Hidrocarburos

Los hidrocarburos identificados en las tres cepas son hidrocarburos de C12 a C29, la mayoría de número par (C12, C16, C22 y C24) y saturados (alcanos), aunque también se identificaron algunos insaturados ($C_n H_{2n+2}$) [67]. Los hidrocarburos identificados en mayor porcentaje en la cepa P1 son 1-heptadeceno, heptadecano, pentadecano y octadecano (Anexo 3, Figura A.1), con 23.75, 6.91, 4.89, 4.89% total del área de los picos, respectivamente (Tabla 3.5). En el caso la cepa P2, los hidrocarburos con mayor porcentaje fueron: heptadecano, heneicosano y docosano (Anexo 3, Figura A.1), con 84.80, 7.80, 7.28% total del área de los picos, respectivamente (Tabla 3.5). En la cepa P3, los hidrocarburos en mayor porcentaje fueron: ciclotetradecano, 1-octadeceno, eiconsano y heneicosano (Anexo 3, Figura A.1), con 14.10, 10.89, 8.78 y 8.31% total del área de los picos, respectivamente (Tabla 3.5).

El contenido de hidrocarburos en microalgas generalmente es bajo (menor al 0.07% en peso seco), la mayoría alcanos de cadena lineal y alquenos [61]. En las cepas bajo estudio el porcentaje en peso seco de hidrocarburos fue de 0.055, 0.041 y 0.044 en la cepa P1, P2 y P3, respectivamente. En microalgas marinas, los hidrocarburos de número impar están constituidos en más del 60%; típicamente C15, C17 o C21, con frecuencia saturados [75]. En las tres cepas se detectó un mayor porcentaje de hidrocarburos de cadena lineal saturados. En la cepa P1 se identificó en mayor porcentaje al 1-heptadeceno ($C_{15}H_{32}$) y al heptadecano ($C_{17}H_{36}$); en la cepa P2 al heptadecano ($C_{15}H_{32}$) y al eicosano ($C_{21}H_{44}$); y en la cepa P3 al heptadecano ($C_{17}H_{36}$). Esto coincide con lo descrito por varios autores respecto al contenido de hidrocarburos en microalgas marinas verdes. De los hidrocarburos identificados, el heptadecano (C17:0), ha sido encontrado en 33 especies de microalgas verdes, 10 de ellas especies marinas, en las que el heptadecano representó más del 80% del total de hidrocarburos [75, 76].

El 1-octadeceno ($C_{18}H_{36}$) se ha identificado extractos de especies de microalgas marinas (*Spirulina* sp. y *Dunalliella salina*) en 5-10 % total del área de los picos [57]. Además se ha identificado su aplicación en la medicina regenerativa, ya que este presente cualidades anticancerígena, antioxidante y antimicrobiana [41, 45].

El 1-heptadeceno se ha reportado en especies de microalgas marinas, derivado de la descarboxilación del ácido palmítico y esteárico [71].

La presencia de los compuestos identificados, se debe probablemente a las condiciones autótrofas en las que se cultivaron las cepas. Se ha reportado en *Chlorella vulgaris* cultivada heterotróficamente en oscuridad sintetiza hidrocarburos 25:1 y 21:1; mientras que en autotrofia y luz sintetiza pequeñas cantidades de alcanos saturados (C17-C36), que representan menos del 1% de peso seco [77]. Cabe señalar que los hidrocarburos de microalgas son materia prima con potencial para el desarrollo de combustibles [75], aunque su uso aún está en desarrollo, debido a que se requieren conocimientos en los requisitos ambientales para la producción de hidrocarburos y vías fisiológicas de síntesis de hidrocarburos en las microalgas. Adicionalmente, a las necesidades para el escalamiento económicamente viable [78, 79].

3.11.1.2. FAME

Los ésteres metílicos de ácidos grasos identificados en las tres cepas, corresponden a C16 y C18. El FAME identificado en la cepa P1 fue: éster metílico de ácido n-hexadecanoico (Anexo 3, Figura A.2), con 3.11 y 5.25% total del área de los picos. En la cepa P2 en mayor porcentaje fueron: éster metílico de ácido hexadecanoico, éster metílico de ácido graso 9, 12-octadecadienoico y éster metílico de ácido oleico (Anexo 3, Figura A.2), con 13.85, 4.92 y 7.37% total del área de los picos, respectivamente. En la cepa P3, los FAME identificados fueron: éster metílico de ácido hexadecanoico y éster metílico de ácido graso 9, 12-octadecadienoico (Anexo 3, Figura A.2), con 7.82 y 12.34% total del área de los picos, respectivamente.

El éster metílico de ácido graso n-hexadecanoico (C16:0) fue identificado en mayor porcentaje en los extractos de las cepas P1 y P2. Este ácido graso saturado de cadena larga, se ha identificado, con porcentajes superiores al 15% respecto a otros ácidos grasos, en la mayoría de los extractos transesterificados de cepas de microalgas marinas y de agua dulce productoras de TAG para su conversión a biodiesel [61, 75, 76].

En la cepa P2 se identificaron ésteres metílicos de ácidos grasos saturados e insaturados (ácido hexadecanoico (C16:0) y 9, 12-octadecadienoico (C18:1 *cis*- Δ^9)), y una minoría de poliinsaturados (ácido graso 9, 12-octadecadienoico (C18:2 *cis*, *cis*- Δ^9)). Los ésteres metílicos del extracto de la cepa P1 y P2, son apropiados para la producción de biodiesel, debido a que contienen cantidades moderadas de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con 2 o más dobles enlaces (C18:2 *cis*, *cis*- Δ^9), lo cual favorece una baja volatilidad, baja estabilidad de oxidación, y tendencia a la formación de grumos. Esto se ha observado en

biodiesel derivado de semillas oleaginosas [60, 80, 81]. En el extracto de la cepa P2, se detectó 13.85 y 8.04% de FAME de ácidos grasos saturados e insaturados. En la composición de biodiesel, se prefiere una proporción relativamente baja de ácidos grasos saturados (menor al 22% en peso de FAME) e insaturados. Particularmente, el ácido octadecenoico en configuración *cis*- es ideal para el biodiesel, debido a que la mezcla de éste con ácidos grasos saturados tiende a mejorar las propiedades de flujo en frío sin perder las características de degradación oxidativa [81, 82, 83].

3.11.1.3. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos identificados en las tres cepas, corresponde a ácidos grasos libres y ácidos orgánicos insaponificables. Los ácidos orgánicos identificados en la cepa P1 fueron: 6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona, 3-hidroxi-ácido butanoico, ácido n-hexadecanoico y bis(2-etil hexil) éster de ácido hexadecanoico (Anexo 3, Figura A.3), con 5.25 y 5.29; 10.78; 7.98 y 4.18; 41.25 y 3.94% total del área de los picos, respectivamente. En la cepa P2 en mayor porcentaje fueron: ácido n-hexadecanoico, 9-ácido octadecenoico, ácido octadecanoico y bis(2-etil hexil) éster de ácido hexadecanoico (Anexo 3, Figura A.3), con 3.98 y 10.05; 8.04; 13.85; y 4.93% total del área de los picos, respectivamente. En la cepa P3, los ácidos orgánicos identificados fueron: ácido n-hexadecanoico, 9-ácido octadecenoico, ácido octadecanoico y bis(2-etil hexil) éster de ácido hexadecanoico (Anexo 3, Figura A.3), con 5.01; 10.22 y 26.01; 3.8; y 11.30, 10.95 y 16.79% total del área de los picos, respectivamente.

El bis(2-etilhexil) éster de ácido hexadecanoico (di (2-etilhexil) adipato o DEHA) identificado en mayor porcentaje en las cepas P1 y P3, es un constituyente de materiales poli-flexibles (cloruro de vinilo) o PVC y películas alimenticias (film transparente), empleado en la industria de vinilo flexible [84]. Se utiliza como disolvente y componente de lubricantes de aviación, así como en el procesamiento de nitrocelulosa y caucho sintético. Así también en butiral de polivinilo plastificado, butirato de acetato de celulosa, poliestireno y cera dammar [85]. DEHA es relativamente insoluble en agua por lo que es probable su distribución en el sedimento a través de la biota del ecosistema acuático o por los efluentes procedentes de plantas productoras de materiales plásticos [74]. Sin embargo, hasta este estudio, no ha sido reportado su identificación en la composición lipídica de microalgas verdes. La posible contaminación por el sitio de muestreo no es una posibilidad, por el constante cambio de medio de cultivo y los tratamientos de purificación a los cuales se sometieron las cepas [56].

El compuesto en mayor porcentaje en la cepa P3 fue el ácido n-hexadecanoico (ácido palmítico) con 26.01% mientras que en la cepa P1 se detectó 7.98%. En especies de microalgas marinas se han identificado ácidos grasos saturados comúnmente ácido tetradecanoico, pentadecanoico, hexadecanoico y 9-octadecanoico, siendo el ácido palmítico (hexadecanoico) el mayoritario. Además de ser constituyente del biodiesel, su uso se ha reportado como suplemento alimenticio y en aplicaciones médicas [67].

El 3-hidroxi ácido butanoico identificado en la cepa P1, es precursor en la formación de homopolímeros en cianobacterias marinas; por ejemplo el poli-(3-hidroxi butirato), derivado de la obtención de un radical hidrofílico (anfifílico) del 3-hidroxi ácido butanoico [86].

El 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (hexahidrofarnesil acetona) o HHA identificado en la cepa P1, se deriva del diterpeno fitol, compuesto secundario sintetizado por las plantas superiores por su capacidad para esterificar clorofila-a [72]. También se caracteriza por ser una fragancia natural en plantas superiores [87, 88] y como componente lipídico en microalgas verdes, tales como *Mougeotia viridis*, *Cladophora* sp. [89, 90], *Botryococcus braunii* [91] y la alga marina café *Padina pavonia* [90].

3.11.1.5. Terpenos

Los terpenos identificados en la cepa P2 fueron: neofitadieno y Fitol (Anexo 3, Figura A.4), con 53.76, 10.40 y 3.02% total del área de los picos, respectivamente.

En la cepa P3, los terpenos identificados fueron: neofitadieno y di(2-etilhexil) ftalato (Anexo 3, Figura A.4), con 3.88, 54.05 y 7.05; y 12.31% total del área de los picos, respectivamente. El neofitadieno, identificado en mayor porcentaje en la cepa P2 y P3, es un terpeno de plantas y microalgas. Su empleo se ha reportado como bactericida, antimicótico, antipirético, analgésico, antioxidante y vermifungicida [92, 93]. Entre los terpenos totales en microalgas de agua dulce y marina (*Spyrogira* sp.), el 0.629% con respecto a su peso seco es fitol, neofitadieno y fitano, entre otros [94].

El di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) identificado en la cepa P3, es un producto petroquímico utilizado como plastificante o disolvente en una variedad de productos industriales. Este compuesto es un contaminante ambiental detectado en sedimentos marinos, aunque también en microalgas marinas. El DEHP se ha identificado en extractos lipídicos de microalgas (*Tetraselmis suecica* y *Chlorella sorokiniana*), cianobacterias (*Synechocystis* sp.) y cultivos mixtos (*Streptomyces* sp. y *Chlorella sorokiniana*) [45, 56, 83]. Sin embargo,

es difícil determinar si el DEHP fue producido por estos organismos, o bien la muestra se contaminó durante el proceso de separación [56].

3.11.1.6. Esteroles

El esteroles identificado en la cepa P2 fue: el campesterol (Anexo 3, Figura A.3), con 6.58% total del área de los picos.

En la cepa P3, los esteroides identificados fueron: 25-oxo-25-norcolesterol y clionasterol (Anexo 3, Figura A.3), con 3.34; 5.64 y 8.25% total del área de los picos, respectivamente. Se ha identificado al 25-oxo-25-norcolesterol en extractos de especies de microalgas marinas (*Skeletonema costatum*) en 4.14 % total del área de los picos [46]. Así también se ha identificado en extractos de cianobacterias sometidas a procesos de biodegradación de hidrocarburos y en el control del crecimiento de especies invasivas de diatomeas [17].

El campesterol y el clionasterol identificados en las cepas P2 y P3, son derivados de la conversión de colesterol 24-metileno a fucosterol, en la síntesis de isoprenoides en microalgas verdes [77]. Se ha reportado que los esteroides de microalgas, especialmente microalgas verdes, difieren de los de las plantas superiores en que los grupos alquilo en el C24 tienen una configuración 24S, en contraste con la configuración 24R de esteroides en plantas superiores. Estos esteroides de microalgas marinas se han empleado como nutrimento para el crecimiento de organismos marinos, como juveniles y ostras [73, 77]. Por otra parte, se ha propuesto la utilización de esteroides como sustitutos en aceites comestibles [73].

En menor concentración se detectó el 2-palmitoilglicerol, reportado como sustrato de desaturasas de cloroplastos aislados de células vegetales [95].

En menor concentración se detectó el 2-palmitoilglicerol, el cual se ha reportado que su función es ser el sustrato para desaturasas de cloroplastos aislados de células vegetales [95].

3.11.1.7. Aminas

La amina identificada en el extracto de la cepa P3 fue: (Z)-13-docosenamida (Anexo 3, Figura A.3), con 61.35 % del área total de los picos. Este compuesto ha sido reportado como alelopático, en extractos lipídicos de algunas de cianobacterias (*Microcystis aeruginosa* y *Quadrigula closterioides*) [60, 96].

3.11.2. Análisis por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier

Las técnicas cromatográficas realizadas a las fracciones lipídicas indicaron que los compuestos presentes son fosfolípidos. Es por esto que el análisis de éstos se realizó mediante espectroscopía infrarroja (IR) por transformada de Fourier (FTIR) [97]. Este tipo de compuestos no son eficientemente analizados por espectrometría de gases-masas, debido a que pueden causar efecto matriz en el calibrado interno, impidiendo así su identificación.

La mayor ventaja de este método espectroscópico es el gran número de muestras que se pueden analizar y comparar con espectros o estándares, así como la detección de características específicas de los compuestos, prescindiendo así del uso de solventes para su análisis, con lo cual es de carácter no destructivo [86].

La literatura reporta que las intensidades relativas de FTIR en *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae), se correlacionan con el contenido químicamente medido de fosfolípidos celulares y estándares y/o base de datos [89].

En este sentido se analizaron las tres fracciones correspondientes a compuestos polares, con lo cual se detectaron 11 señales en el rango de 500 a 4000 cm^{-1} . Las señales fueron identificadas como grupos constituyentes de la lecitina de soya (hit de 502). La mayoría de los constituyentes de la lecitina de soya son fosfolípidos: fosfatidilcolina (19-21%), fosfatidil etanolamina (8-20%), fosfatidil inositol (20-21%) y ácido fosfatídico (5-1%) (Anexo 3, Figura A.3.1) [98]. Estos compuestos presentan señales entre 1000 y 3100 cm^{-1} ; donde, se ha identificado que los grupos fosfatos se ubican dentro del rango de las señales entre 1000 y 1300 cm^{-1} [99] (Anexo 3, Tabla A.3.1).

Los fosfolípidos fosfatilcolina, fosfatidil inositol y ácido fosfatídico ya se han identificado en las fracciones fosfolipídicas de *Nitzschia closterium* y *Chlorella vulgaris* [100]. Mientras que en *Nannochloropsis* sp., *Chlorococcum* sp. y *Spirulina* sp., se han detectado fosfatilcolina, fosfatil etanolamina y esteroides [86, 101].

La detección de los fosfolípidos identificados se debe a los espectros de transmisión obtenidos de la lectura de la transmitancia registrada (Figura 3.28).

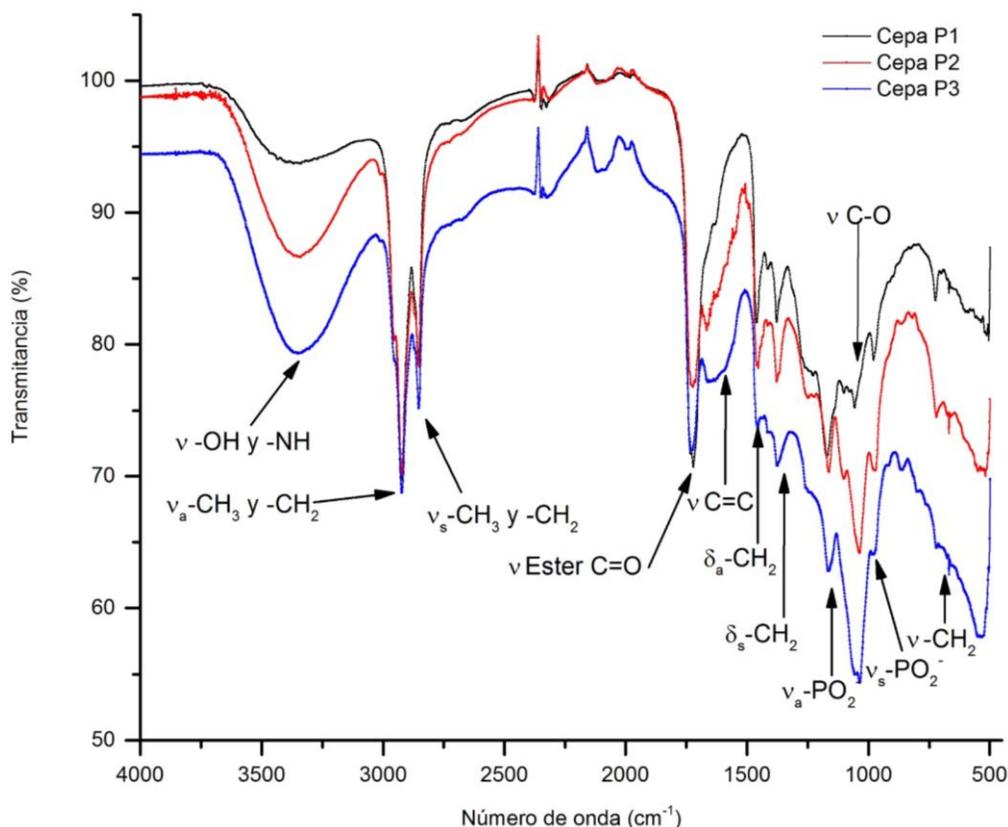


Figura 3.14. Espectro de trasmisión FTIR cepa P1 (línea negra), P2 (línea roja) y P3 (línea azul); Grupo 6.

Las primeras señales de 3370, 3340 y 3356 número de onda (cm^{-1}), respectivamente, corresponden a vibraciones de estiramiento de $-\text{OH}$ ($\nu\text{-OH}$) y $-\text{NH}$ ($\nu\text{-NH}$), es decir una amina primaria. Las segundas de 2916, 2929 y 2911 número de onda (cm^{-1}), corresponden al estiramiento asimétrico de un grupo metilo ($\nu_{\text{a}}\text{-CH}_2$) y metileno ($\nu_{\text{a}}\text{-CH}_3$). Las terceras de 2847, 2846 y 2833 número de onda (cm^{-1}) corresponden a vibraciones de estiramiento simétrico de un grupo metilo ($\nu_{\text{s}}\text{-CH}_2$) y metileno ($\nu_{\text{s}}\text{-CH}_3$). Las cuartas de 1714, 1721 y 1728 número de onda (cm^{-1}) corresponden a vibraciones del estiramiento del carbonilo ($\nu\text{-C=O}$ éster). Las señales de 1616, 1650 y 1650 número de onda (cm^{-1}) corresponden a vibraciones de estiramiento de un grupo alqueno ($\nu\text{-C=C}$).

La señal tercera y cuarta, son debidas al estiramiento de un grupo de éster de lípidos o ácidos carboxílicos e indican la presencia del glicerol unido a un ácido graso, estructura secundaria de un fosfolípido [67]. La sexta señal de 1456 número de onda (cm^{-1}), corresponde a vibraciones de tensión asimétrico de un grupo metilo ($\delta_{\text{a}}\text{-CH}_2$). La séptima

señal de 1363, 1377 y 1371 número de onda (cm^{-1}), corresponden a vibraciones de tensión simétrico de un grupo metilo ($\delta\text{s-CH}_2$).

La octava señal de 1162 número de onda (cm^{-1}), corresponden a vibraciones de estiramiento asimétrico de un grupo fosfato (va-PO_2). La novena señal de 1099, 1098 y 1999 número de onda (cm^{-1}), corresponde a vibraciones de estiramiento de un grupo carbonilo (v-C-O). La décima señal de 1026 número de onda (cm^{-1}), corresponde a vibraciones de estiramiento simétrico de un grupo fosfato (vs-PO_2). La onceava señal de 718 y 674 números de onda (cm^{-1}), corresponde a vibraciones de un grupo metilo (v-CH_2). La octava y décima señal a 1162 y 1026 cm^{-1} , son debido al grupo funcional de fosfodiéster con estiramiento simétrico (vs-PO_2) y asimétrico (va-PO_2), respectivamente. Esto debido a que el fosfodiéster presenta un enlace covalente en un grupo hidroxilo en el carbono 3' con un grupo fosfato PO_4^{3-} [85], correspondiente a la fracción fosfato ($-\text{PO}_2$ y P=O) unida a la terminal hidroxilo del glicerol.

La novena y onceava señal a 1099 y 718 cm^{-1} , son debido al estiramiento de un grupo carbonilo y un metileno, respectivamente, ambos de la fracción del grupo fosfato [98].

En resumen, los espectros FTIR detectados muestran consistentemente, las absorciones asociadas a fosfatos, lo cual es indicativo de la presencia de fosfolípidos [97]. Los grupos moleculares detectados en el grupo 6 de la cepa 1, se encuentran dentro de la región de la huella dactilar (800 a 1300 cm^{-1}) correspondiente a las absorciones de fosfolípidos [98]. Mientras que el grupo 6 de las cepas 2 y 3, muestran la ausencia de metileno, lo cual indica la presencia de fosfatidil etanolamina y fosfatidil inositol a 750 a 650 cm^{-1} .

Los espectros FTIR obtenidos son similares a los reportados para *Chlorella vulgaris* [102] *Ostreopsis ovata* y *Ostreopsis* sp. [101]. Estos resultados son comparables con los reportados en la identificación de fosfolípidos a 2960 cm^{-1} [102] en *Oocystis* sp., debido a que se detectó: estiramiento asimétrico de un grupo metilo (va-CH_2) y metileno (va-CH_3) a 2930 cm^{-1} , estiramiento de $-\text{CH}$ a 1745 cm^{-1} , estiramiento de vibraciones de estiramiento carbonilo (v-C=O éster) a 1455 cm^{-1} y estiramiento simétrico (vs -PO_2) y asimétrico (va -PO_2) en 1240 cm^{-1} de PO_2 (diester fosfato).

CONCLUSIONES

- Se aislaron con éxito de aguas marinas de Yucatán, tres cepas de microalgas: P1, P2 y P3. Posterior a la exitosa adaptación al medio sintético salino Guillard f/2, se realizaron técnicas de purificación y modificaciones (pH, tamaño de inóculo y concentración de nutrientes) al medio de cultivo. Estas modificaciones permitieron obtener mayor densidad celular (25, 70 y 31 %, respectivamente), y una mejor adaptación *in vitro*.
- La producción de biomasa y lípidos para las cepas P1, P2, P3 fueron para lípidos totales en la biomasa seca de: 37.56, 37.91 y 30.75 %, respectivamente. Y una productividad lipídica menor en las cepas P2 y P3 (21.38 y 27.25 mg·L⁻¹), mientras que la cepa P1 presentó la mayor (38.49 mg·L⁻¹·d⁻¹).
- Inicialmente la reacción de transesterificación en los extractos lipídicos totales fue inhibida. Por lo que los TAG fueron separados de los compuestos inhibitorios mediante fraccionamiento por cromatografía de columna y capa fina. Los TAG fueron exitosamente obtenidos y transesterificados por modificaciones a la reacción.
- El análisis del perfil lipídico mostró un perfil adecuado en la cepa P2 y P3 de ácidos grasos para la producción de biodiesel. En el extracto de la cepa P2, se detectaron ácidos grasos saturados (C16:0 y C18:2 *cis*, *cis*-Δ⁹), ácidos grasos monoinsaturados en mayor proporción (C18:2 *cis*-Δ⁹) y poliinsaturados en menor proporción (C18:2 *cis*, *cis*-Δ⁹). Los ésteres metílicos en los extractos de la cepa P2 y P3 poseen una composición de ácidos grasos adecuada para el biodiesel, debido a que sólo contienen porcentajes moderados de ácidos grasos poliinsaturados con 2 o más dobles enlaces, responsables de baja volatilidad y estabilidad a la oxidación, y tendencia a la formación de grumos. La particularidad de la cepa P1 siendo la única cepa en presentar la síntesis únicamente de ácidos grasos saturados (C16:0), también la cepa que presentó la mayor producción de FAME y fosfolípidos entre las tres cepas.
- La identidad de los compuestos sintetizados por las cepas, indicó que son materia prima con gran potencial para la producción de biocombustibles, aunado a sus características únicas: como el uso de agua de mar para su cultivo, utilización de especies autóctonas,

perfiles adecuados de ácidos grasos, y la posibilidad de obtención de sub-productos para la producción de energía (hidrocarburos) o lípidos bioactivos (esteroles, ésteres, fosfolípidos, entre otros).

- Para delimitar su identidad taxonomica de las cepas aisladas, se requiere la caracterización de algunos marcadores moleculares (rbcL, ITS2), así como la observación de los morfos en microscopía de barrido electrónico y electrónica de transmisión para cada uno de los taxa involucrados.

BIBLIOGRAFIA

1. Loera-Quezada M M; Olguín E J, Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades, *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal* 1, 91-116, 2010.
2. Garibay-Hernández A; Vázquez-Duhalt R; Sánchez Saavedra M; Serrano Carreón L; Martínez Jiménez A, Biodiesel a partir de microalgas, *BioTecnología* 13, 38-61, 2009.
3. Estrada C A; Noguera Y C; López J E, *Desarrollo tecnológico prototipo para la producción de biodiesel a partir de microalgas en sistemas cerrados, como biocombustible de segunda generación*, en *Eighth LACCEI Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technology*, Arequipa, 2010.
4. South G R; Whittick A en *An Introduction to Phycology*, John Wiley & Sons, 2009.
5. Hoek C; Mann D; Jahns H M en *Algae: an introduction to phycology*, Cambridge university press, 1995; 45-67.
6. Van den Hoek C; Stam W; Olsen J, The emergence of a new chlorophytan system, and Dr. Kornmann's contribution thereto, *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 42, 339-383, 1988.
7. López-Adrián S J; Barrientos-Medina R C, Diversidad y distribución del fitoplacton de agua dulce en la península de Yucatán, México, *Ibugana: Boletín del Instituto de Botánica* 13, 3-12, 2005.
8. Cid A; Herrero C; Torres E; Abalde J, Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*: effects on photosynthesis and related parameters, *Aquatic Toxicology* 31, 165-174, 1995.
9. Hennenberg K J; Fritsche U; Herrera R; Eggert A; Renato M; Hunt S; Bunnag B, Aquatic biomass: sustainable bioenergy from algae, *Issue Paper*, November 2009.
10. Adl S M; Simpson A G; Lane C E; Lukeš J; Bass D; Bowser S S; Brown M W; Burki F; Dunthorn M; Hampl V, The revised classification of eukaryotes, *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59, 429-514, 2012.
11. South G R, A checklist of marine algae of eastern Canada, second revision, *Canadian journal of botany* 62, 680-704, 1984.

12. Hecky R; Kilham P, Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment, *Limnology and Oceanography* 33, 796-822, 1988.
13. Le Rouzic B; Bertru G, Phytoplankton community growth in enrichment bioassays: Possible role of the nutrient intracellular pools, *Acta Oecologica* 18, 121-133, 1997.
14. Barsanti L; Gualtieri P en *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*, Blackwell Publishing Inc., 43, 2014.
15. Dudgeon D; Arthington A H; Gessner M O; Kawabata Z-I; Knowler D J; Lévêque C; Naiman R J; Prieur-Richard A-H; Soto D; Stiassny M L, Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges, *Biological reviews* 81, 163-182, 2006.
16. Lagus A, Role of nutrients in regulation of the phytoplankton community in the Archipelago Sea, northern Baltic Sea, *Annales Universitatis Turkuensis A II* 239 2009.
17. Wijesekara I; Pangestuti R; Kim S-K, Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae, *Carbohydrate Polymers* 84, 14-21, 2011.
18. Browne C A, Liebig and the law of the minimum, *Liebig and after Liebig. Publication* 71-82, 1942.
19. Lampert W; Sommer U en *Limnoecology: the ecology of lakes and streams*, Oxford university press, 2007.
20. Hansson L A; Brönmark C; Anders Nilsson P; Åbjörnsson K, Conflicting demands on wetland ecosystem services: nutrient retention, biodiversity or both?, *Freshwater Biology* 50, 705-714, 2005.
21. Camargo J A; Alonso Á, Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment, *Environment international* 32, 831-849, 2006.
22. Chu S, The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: part I. Methods and culture media, *The Journal of Ecology* 284-325, 1942.
23. Barajas A G; González L; Guzmán L; Kafarov A; Moreno V; Nuñez M; Plata M; Velasquez V; Barajas G, *Bioprospección de microalgas colombianas para la producción de biodiesel*. 2010: IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología

- de los Biocombustibles y Seminario Internacional de Biocombustibles y Co-Productos a Partir de Microalgas.
24. Stewart W D P en *Algal physiology and biochemistry*, Univ of California Press, 10, 1974.
 25. de la Noue J; de Pauw N, The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae, *Biotechnology advances* 6, 725-770, 1988.
 26. Dodds W K, Eutrophication and trophic state in rivers and streams, *Limnology and Oceanography* 51, 671-680, 2006.
 27. Schenk P M; Thomas-Hall S R; Stephens E; Marx U C; Mussgnug J H; Posten C; Kruse O; Hankamer B, Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production, *Bioenergy research* 1, 20-43, 2008.
 28. Campbell L; Liu H; Nolla H A; Vaultot D, Annual variability of phytoplankton and bacteria in the subtropical North Pacific Ocean at Station ALOHA during the 1991–1994 ENSO event, *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 44, 167-192, 1997.
 29. Wetzel R G; Comellas M; Chinchilla M en *Limnología*, Editorial Omega, 1981.
 30. Costa J A V; De Morais M G, The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae, *Bioresource technology* 102, 2-9, 2011.
 31. González-López C; Ación F; Fernández-Sevilla J; Molina E, Uso de microalgas como alternativa a las tecnologías disponibles de mitigación de emisiones antropogénicas de CO₂, *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal* 2, 93-106, 2011.
 32. Arredondo B; Vázquez R, Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas, *Ciencia y Desarrollo, CONACyT* 27, 99-111, 1991.
 33. Thompson G A, Lipids and membrane function in green algae, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 1302, 17-45, 1996.
 34. Solovchenko A; Khozin-Goldberg I; Cohen Z; Merzlyak M, Carotenoid-to-chlorophyll ratio as a proxy for assay of total fatty acids and arachidonic acid content in the green microalga *Parietochloris incisa*, *Journal of Applied Phycology* 21, 361-366, 2009.
 35. Faife-Pérez E; Otero-Rambla M A; Alvarez-Delgado A, Producción de biodiesel a partir de microorganismos oleaginosos. Una fuente de energía renovable (Parte II: Microalgas), *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 46, 26-35, 2012.
 36. Gouveia L; Oliveira A C, Microalgae as a raw material for biofuels production, *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 36, 269-274, 2009.

37. Moreno J R; Medina C D; Albarracín V H, Aspectos ecológicos y metodológicos del muestreo, identificación y cuantificación de cianobacterias y microalgas eucariotas, *Reduca (Biología). Serie Microbiología*. 5, 110-125, 2012.
38. Richmond A en *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, John Wiley & Sons, 2008.
39. Sharma K K; Schuhmann H; Schenk P M, High lipid induction in microalgae for biodiesel production, *Energies* 5, 1532-1553, 2012.
40. Orcutt D; Patterson G, Sterol, fatty acid and elemental composition of diatoms grown in chemically defined media, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 50, 579-583, 1975.
41. Renaud S M; Thinh L-V; Lambrinidis G; Parry D L, Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures, *Aquaculture* 211, 195-214, 2002.
42. Sukenik A, Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*, *Chemicals from microalgae* 41-56, 1999.
43. Mühling M; Fuller N J; Millard A; Somerfield P J; Marie D; Wilson W H; Scanlan D J; Post A F; Joint I; Mann N H, Genetic diversity of marine *Synechococcus* and co-occurring cyanophage communities: evidence for viral control of phytoplankton, *Environmental Microbiology* 7, 499-508, 2005.
44. Patterson G W, The distribution of sterols in algae, *Lipids* 6, 120-127, 1971.
45. Nichols B; Harris P; James A, The biosynthesis of trans- Δ 3-hexadecenoic acid by *Chlorella vulgaris*, *Biochemical and biophysical research communications* 21, 473-479, 1965.
46. Khozin-Goldberg I; Cohen Z, The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*, *Phytochemistry* 67, 696-701, 2006.
47. Volkman J; Gllan F; Johns R; Eglinton G, Sources of neutral lipids in a temperate intertidal sediment, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 1817-1828, 1981.
48. Volkman J; Jeffrey S; Nichols P; Rogers G; Garland C, Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128, 219-240, 1989.

49. Kawachi M; Atsumi M; Ikemoto H; Miyachi S, *Pinguiochrysis pyriformis* gen. et sp. nov.(Pinguiophyceae), a new picoplanktonic alga isolated from the Pacific Ocean, *Phycological research* 50, 49-56, 2002.
50. Andersen R A, Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae, *American Journal of Botany* 91, 1508-1522, 2004.
51. Kenyon C; Rippka R; Stanier R, Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae, *Archiv für Mikrobiologie* 83, 216-236, 1972.
52. Parker P L, Fatty acids in recent sediment, *Marine Science* 12, 135-142, 1967.
53. Chuecas L; Riley J, Component fatty acids of the total lipids of some marine phytoplankton, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 49, 97-116, 1969.
54. Mayo A W, Effects of temperature and pH on the kinetic growth of unialga *Chlorella vulgaris* cultures containing bacteria, *Water environment research* 64-72, 1997.
55. Ramos-Higuera E; Alcocer J; Ortega-Mayagoitia E; Camacho A, Nitrógeno: elemento limitante para el crecimiento fitoplanctónico en un lago oligotrófico tropical, *Hidrobiológica* 18, 105-113, 2008.
56. Wahlen B D; Willis R M; Seefeldt L C, Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures, *Bioresource technology* 102, 2724-2730, 2011.
57. Beach D H; Harrington G W; Holz G G, The polyunsaturated fatty acids of marine and freshwater cryptomonads, *The Journal of Protozoology* 17, 501-510, 1970.
58. Begon M; Townsend C R; Harper J L, Ecology: from individuals to ecosystems, 2006.
59. Mansour M P; Volkman J K; Holdsworth D G; Jackson A E; Blackburn S I, Very-long-chain (C 28) highly unsaturated fatty acids in marine dinoflagellates, *Phytochemistry* 50, 541-548, 1999.
60. Kalva A; Sivasankar T; Moholkar V S, Physical mechanism of ultrasound-assisted synthesis of biodiesel, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48, 534-544, 2008.
61. Demirbaş A, Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey, *Energy conversion and Management* 44, 2093-2109, 2003.
62. Pretsch E; Clerc T; Seibl J; Simon W en *Tables of spectral data for structure determination of organic compounds*, Springer Science & Business Media, 2013.

63. Bligh E G; Dyer W J, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911-917, 1959.
64. Iverson S J; Lang S L; Cooper M H, Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue, *Lipids* 36, 1283-1287, 2001.
65. Lee J-Y; Yoo C; Jun S-Y; Ahn C-Y; Oh H-M, Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresource technology* 101, S75-S77, 2010.
66. Araujo G S; Matos L J; Fernandes J O; Cartaxo S J; Goncalves L R; Fernandes F A; Farias W R, Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method, *Ultrasonics sonochemistry* 20, 95-98, 2013.
67. Yao L; Gerde J A; Lee S-L; Wang T; Harrata K A, Microalgae lipid characterization, *Journal of agricultural and food chemistry* 63, 1773-1787, 2015.
68. Poirier M-A, *Stable alkoxyated fatty acid alkyl esters from transesterification-alkoxylation of vegetable oils*. 2013, Google Patents.
69. Özmen N; Sami Çetin N; Tingaut P; Sèbe G, Transesterification reaction between acetylated wood and trialkoxysilane coupling agents, *Journal of applied polymer science* 105, 570-575, 2007.
70. Smith B C en *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*, CRC press, 2011.
71. Řezanka T; Zahradnik J; Podojil M, Hydrocarbons in green and blue-green algae, *Folia microbiologica* 27, 450-454, 1982.
72. Kang W; Ji Z; Wang J, Composition of the essential oil of *Adiantum flabellulatum*, *Chemistry of natural compounds* 45, 575-577, 2009.
73. Rzama A; Benharref A; Arreguy B; Dufourc E, Volatile compounds of green microalgae grown on reused waste water, *Phytochemistry* 38, 1375-1379, 1995.
74. Xu G; Li F; Wang Q, Occurrence and degradation characteristics of dibutyl phthalate (DBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in typical agricultural soils of China, *Science of the Total Environment* 393, 333-340, 2008.
75. Qin J, *Hydrocarbons from algae*, en *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 2010, Springer. p. 2817-2826.

76. Nevenzel J C, Occurrence, function and biosynthesis of wax esters in marine organisms, *Lipids* 5, 308-319, 1970.
77. Patterson G W; Krauss R W, Sterols of Chlorella. I. The naturally occurring sterols of *Chlorella vulgaris*, *C. ellipsoidea*, and *C. saccharophila*, *Plant and Cell Physiology* 6, 211-220, 1965.
78. Anjum N A; Pereira M E; Ahmad I; Duarte A C; Umar S; Khan N A en *Phytotechnologies: Remediation of environmental contaminants*, CRC Press, 2012.
79. Borowitzka M A; Moheimani N R en *Algae for biofuels and energy*, Springer, 2013.
80. Hawash S; Kamal N; Zaher F; Kenawi O; El Diwani G, Biodiesel fuel from Jatropha oil via non-catalytic supercritical methanol transesterification, *Fuel* 88, 579-582, 2009.
81. Vieitez I; da Silva C; Borges G R; Corazza F C; Oliveira J V; Grompone M A; Jachmanián I, Continuous production of soybean biodiesel in supercritical ethanol-water mixtures, *Energy & Fuels* 22, 2805-2809, 2008.
82. Ahmad S; Siwayanan P; Abd Murad Z; Abd Aziz H; Seng Soi H, Beyond Biodiesel, *Methyl esters as the route for the production of surfactants feedstock. International News on Fats, Oils and Related Materials* 18, 216-220, 2007.
83. Chojnacka K; Marquez-Rocha F-J, Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae, *Biotechnology* 3, 21-34, 2004.
84. Tickner J A; Schettler T; Guidotti T; McCally M; Rossi M, Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review, *American journal of industrial medicine* 39, 100-111, 2001.
85. Fromme H; Gruber L; Schlummer M; Wolz G; Böhmer S; Angerer J; Mayer R; Liebl B; Bolte G, Intake of phthalates and di (2-ethylhexyl) adipate: results of the Integrated Exposure Assessment Survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data, *Environment international* 33, 1012-1020, 2007.
86. Řezanka T; Dor I; Prell A; Dembitsky V, Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species, *Folia microbiologica* 48, 71-75, 2003.
87. Rayne S; Karacabey E; Mazza G, Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications, *Industrial crops and products* 27, 335-340, 2008.

88. Muanda N; Dicko A; Soulimani R, Chemical composition and biological activities of *Ficus capensis* leaves extracts, *Journal of Natural Products* 3, 147-160, 2010.
89. Elenkov I; Stefanov K; Dimitrova-Konaklieva S; Popov S, Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*, *Phytochemistry* 42, 39-44, 1996.
90. Kamenarska Z; Stefanov K; Dimitrova-Konaklieva S; Najdenski H; Tsvetkova I; Popov S, Chemical composition and biological activity of the brackish-water green alga *Cladophora rivularis* (L.) Hoek, *Botanica Marina* 47, 215-221, 2004.
91. Abdel-Aal E I; Haroon A M; Mofeed J, Successive solvent extraction and GC–MS analysis for the evaluation of the phytochemical constituents of the filamentous green alga *Spirogyra longata*, *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 41, 233-246, 2015.
92. Herrero M; Ibáñez E; Cifuentes A; Reglero G; Santoyo S, *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials, *Journal of Food Protection*® 69, 2471-2477, 2006.
93. Plaza M; Santoyo S; Jaime L; Reina G G-B; Herrero M; Señoráns F J; Ibáñez E, Screening for bioactive compounds from algae, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 51, 450-455, 2010.
94. Mudge S M; Bebianno M J A; East J A; Barreira L A, Sterols in the Ria Formosa Lagoon, Portugal, *Water Research* 33, 1038-1048, 1999.
95. Roughan P; Slack C, Cellular organization of glycerolipid metabolism, *Annual Review of Plant Physiology* 33, 97-132, 1982.
96. Jiang L; Luo S; Fan X; Yang Z; Guo R, Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂, *Applied energy* 88, 3336-3341, 2011.
97. Vidyadharani G; Dhandapani R, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the analysis of lipid from *Chlorella vulgaris* *Int. J. Adv. Sci. Eng. Vol 1*, 2014.
98. Nzai J; Proctor A, Soy lecithin phospholipid determination by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and the acid digest/arseno-molybdate method: a comparative study, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76, 61-66, 1999.
99. Meng X; Pan Q; Ding Y; Jiang L, Rapid determination of phospholipid content of vegetable oils by FTIR spectroscopy combined with partial least-square regression, *Food chemistry* 147, 272-278, 2014.

100. El Baky H H A; El Baz F K; El Baroty G S; Asker M M; Ibrahim E, Phospholipids of some marine macroalgae: Identification, antiviral, anticancer and antimicrobial bioactivities, *Pharma. Chem* 6, 370-382, 2014.
101. Laurens L M; Wolfrum E J, Feasibility of spectroscopic characterization of algal lipids: chemometric correlation of NIR and FTIR spectra with exogenous lipids in algal biomass, *BioEnergy Research* 4, 22-35, 2011.
102. Miglio R; Palmery S; Salvalaggio M; Carnelli L; Capuano F; Borrelli R, Microalgae triacylglycerols content by FT-IR spectroscopy, *Journal of applied phycology* 25, 1621-1631, 2013.

ANEXO 1
Formulación medios utilizados

Tabla A.1.1. Constitución de medio BG-11 salino modificado [14] [24].

Componente	Solución Stock (g. L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad utilizada	Concentración en el medio (M)
Ácido cítrico	0.6	1 mL	3.12x10 ⁻⁵
Citrato de amonio férrico	6	1 mL	3.00x10 ⁻⁵
NaNO ₃	-	1 mL	1.76x10 ⁻²
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	40	1.5 g	1.74x10 ⁻⁴
MgSO ₄ .7H ₂ O	75	1 mL	3.04x10 ⁻⁴
CaCl ₂ . 2H ₂ O	36	1 mL	2.45x10 ⁻⁴
Na ₂ CO ₃	20	1 mL	1.89x10 ⁻⁴
MgNa ₃ EDTA.H ₂ O	1	1 mL	2.79x10 ⁻⁴
Solución de metales traza	(Ver siguiente)	1 mL	-

Solución de metales traza BG-11

Componente	Solución Stock (g. L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad utilizada	Concentración en el medio (M)
H ₃ BO ₃	-	2.86 g	4.63x10 ⁻⁵
MnCl ₂ .4H ₂ O	-	1.81 g	9.15x10 ⁻⁶
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	0.22 g	7.65x10 ⁻⁷
CuSO ₄ .5H ₂ O	79	1 mL	3.16x10 ⁻⁷
NaMoO ₄ .2H ₂ O	-	0.39 g	1.61x10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	49.4	1 mL	1.70x10 ⁻⁷

Tabla A.1.2. Constitución medio Guillard f/2 modificado [14] [24].

Componente	Solución Stock (g. L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad utilizada	Concentración en el medio (M)
NaNO ₃	75	1 mL	8.82x10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5	1 mL	3.62x10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	30	1 mL	1.06 x10 ⁻⁴
Solución de metales traza	(Ver siguiente)	1 mL	-
Solución de vitaminas		0.5 mL	-

Solución de metales traza f/2

Componente	Solución Stock (g. L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad utilizada	Concentración en el medio (M)
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	3.15 g	1.17x10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	-	4.36 g	1.17x10 ⁻⁵
MnCl ₂ .4H ₂ O	180	1 mL	9.10E-07
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22	1 mL	7.65x10 ⁻⁸
CoCl ₂ .6H ₂ O	10	1 mL	4.20x10 ⁻⁸
CuSO ₄ .5H ₂ O	9.8	1 mL	3.03x10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6.3	1 mL	2.60x10 ⁻⁸

Solución de vitaminas f/2

Componente	Solución Stock (g. L ⁻¹ dH ₂ O)	Cantidad utilizada	Concentración en el medio (M)
Tiamina .HCl (Vitamina B ₁)	-	200 mg	2.96x10 ⁻⁷
Biotina (Vitamina H)	1	1 mL	2.05x10 ⁻⁹
Cianocobalamina (Vitamina B ₁₂)	1	1 mL	3.69x10 ⁻¹⁰

ANEXO 2
Resultados de cromatografía de gases-masas (cromatogramas)

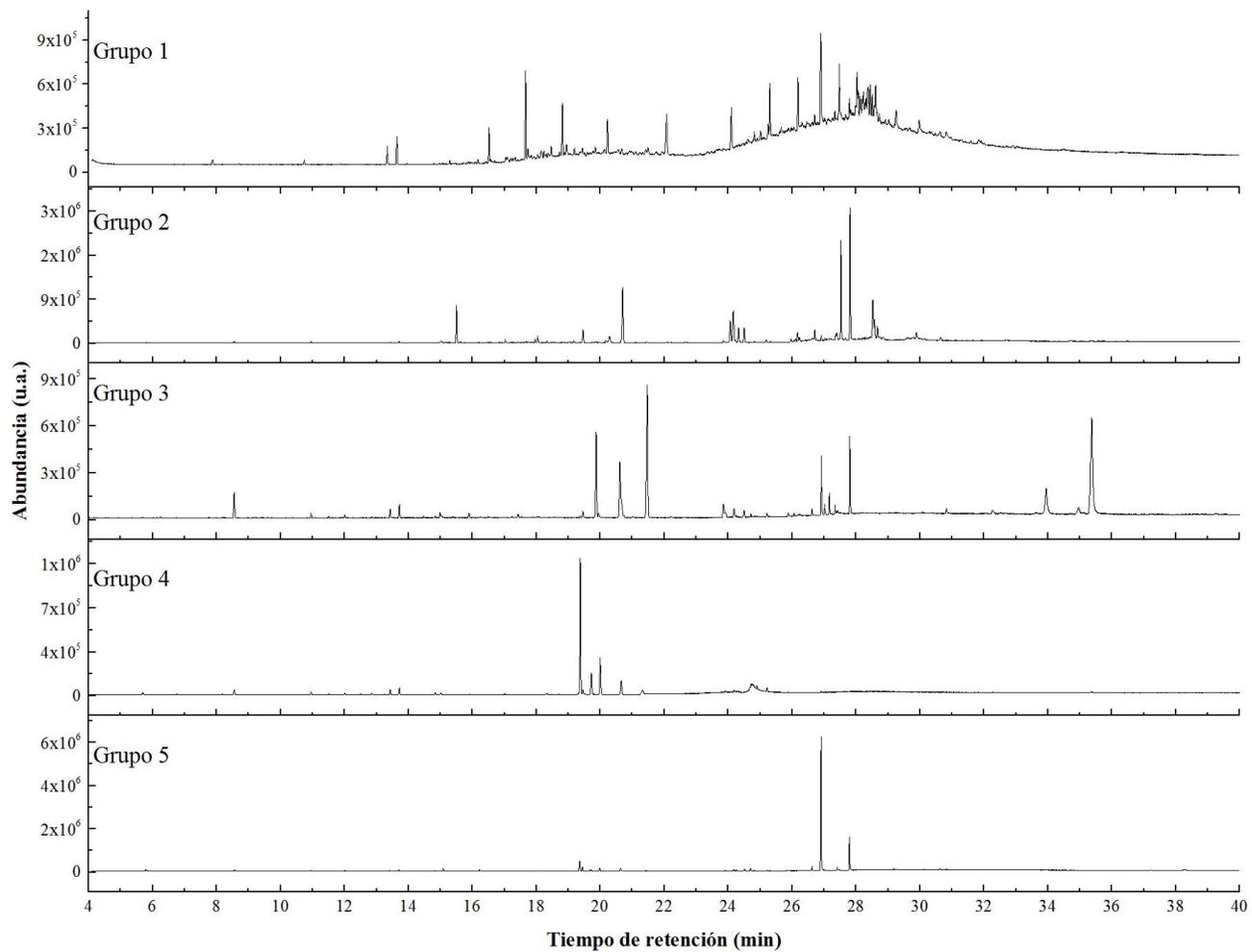


Figura A.2.1. Cromatograma cepa P1.

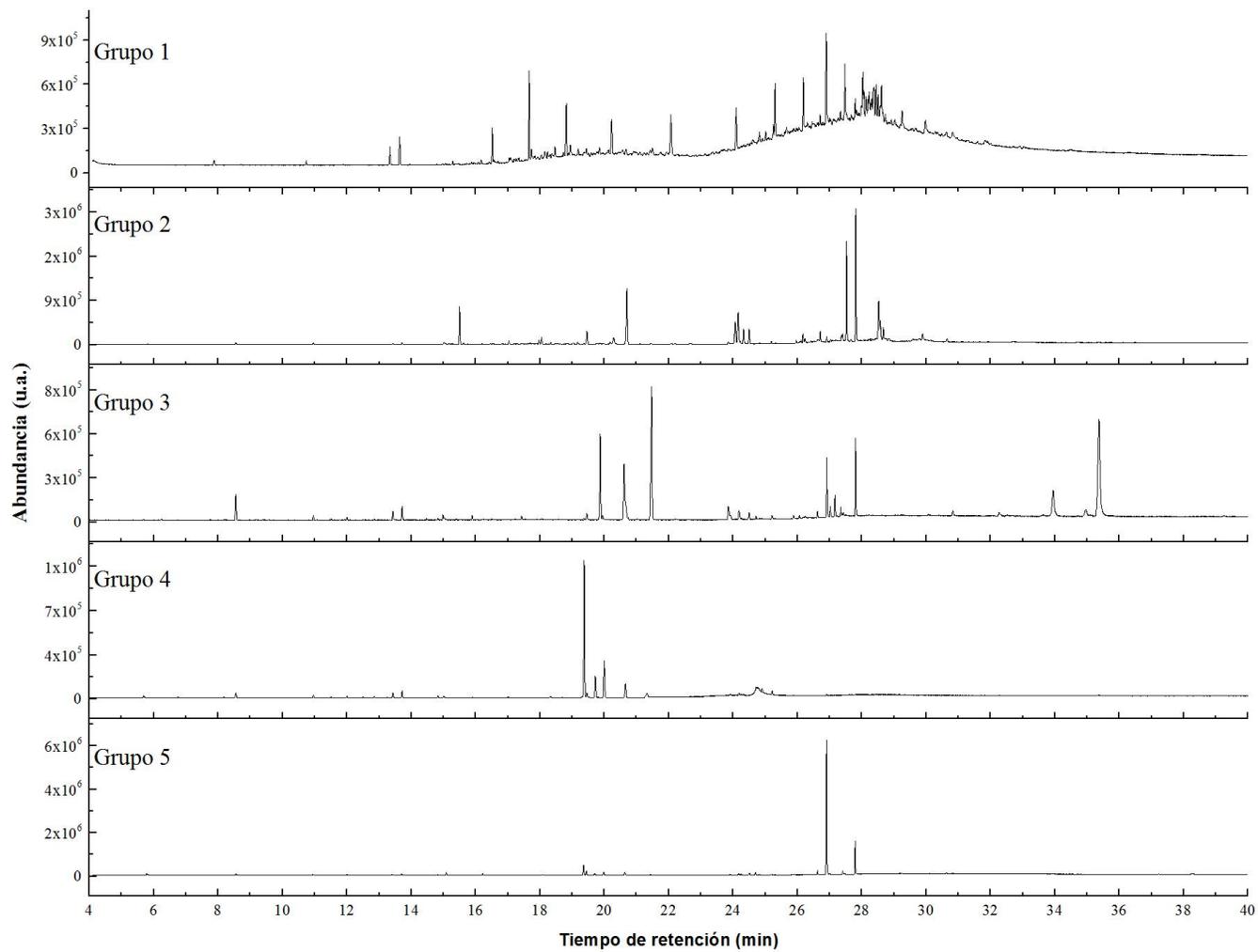


Figura A.2.2. Cromatograma cepa P2.

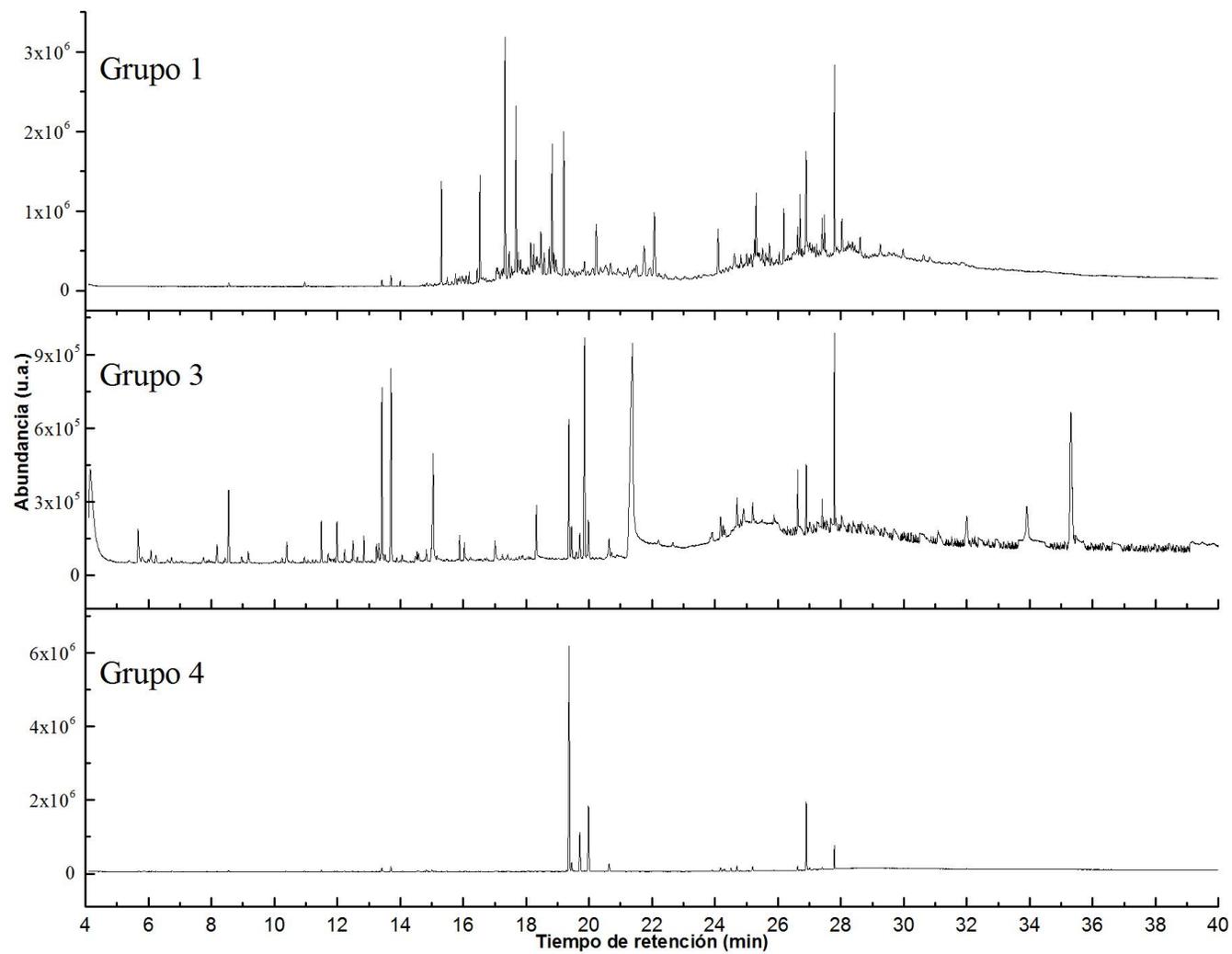


Figura A.2.3. Cromatograma cepa P3.

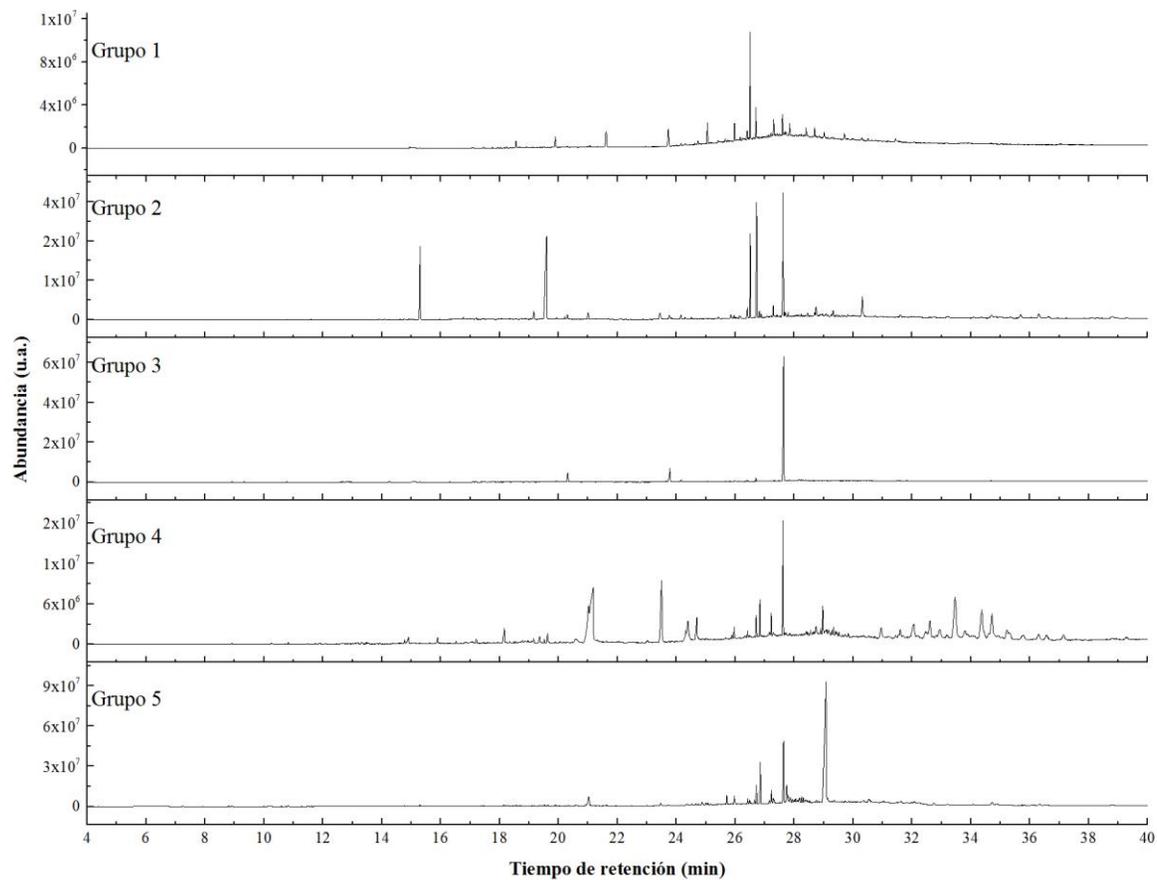


Figura A.2.4. Cromatograma grupo 2 cepa P3.

ANEXO 3
Resultados de cromatografía de gases-masas (basa de datos)

Tabla A.3.1. Compuestos identificados en el Grupo 1, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1				Cepa P2				Cepa P3			
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
Dodecano	C ₁₂ H ₂₆	1	96	10.96	0.35	2	94	10.73	0.44	-	-	-	-
1,3-Pentanediol, 2,2,4-trimetil-, 1-isobutirato	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	-	-	-	-	3	91	13.64	2.71	-	-	-	-
2,2,4-Trimetil-1,3-pentanediol 1-isobutirato	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	1	91	13.71	0.43
2-Metil dodecano	C ₁₃ H ₂₈	4	93	16.09	0.42	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Hidroxi-N'-[2-(trifluorometil)fenil]-3-piridincarboximidamida	C ₁₃ H ₁₀ F ₃ N ₃ O	-	-	-	-	-	-	-	-	18	90	25.73	0.96
Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	2	96	14.00	0.23	9	94	18.82	5.64	-	-	-	-
2,4-Di-tert-butilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	3	97	15.50	0.36
Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	3	98	15.31	4.89	-	-	-	-	2	98	15.31	4.35
1,6-Dimetil-4-isopropiltetralin	C ₁₅ H ₂₂	-	-	-	-	-	-	-	-	4	98	15.76	0.46
Cetano	C ₁₆ H ₃₄	5	98	16.44	0.93	-	-	-	-	6	98	16.44	0.53

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1				Cepa P2				Cepa P3			
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	6	98	16.53	4.47	-	-	-	-	7	97	16.53	4.07
Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	-	-	-	-	4	96	16.52	3.51	-	-	-	-
8-Heptadecano	C ₁₇ H ₃₄	7	98	17.46	2.94	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	8	99	17.68	6.91	7	99	17.67	8.48	10	99	17.68	5.97
2-Metil- Hexadecano	C ₁₇ H ₃₆	-	-	-	-	-	-	-	-	8	95	17.26	0.42
8-Heptadeceno	C ₁₇ H ₃₄	-	-	-	-	-	-	-	-	9	99	17.45	1.39
Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	12	95	18.83	4.86	13	96	28.03	2.90	12	98	18.83	5.72
1-Yodo-octadecano	C ₁₈ H ₃₇ I	24	98	28.61	2.05	-	-	-	-	-	-	-	-
Octadecametilciclononasiloano	C ₁₈ H ₅₄ O ₄ Si ₉	-	-	-	-	-	-	-	-	13	93	19.20	6.84
Pentadecil heptafluorobutanuato	C ₁₉ H ₃₁ F ₇ O ₂	11	94	18.74	1.41	-	-	-	-	-	-	-	-
9-Nonadeceno	C ₁₉ H ₃₈	18	90	25.25	0.71	-	-	-	-	-	-	-	-
Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	19	95	25.31	1.98	10	96	20.23	4.66	14	96	20.23	2.96

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1			Cepa P2			Cepa P3					
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	20	96	26.19	1.80	11	98	22.07	7.80	17	96	25.31	2.56
Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	22	93	27.48	1.87	12	97	27.48	7.28	16	98	24.10	2.56
1-Bromodocosano	C ₂₂ H ₄₅ Br	25	93	29.25	1.15	-	-	-	-	-	-	-	-
9-Heptil- heptadecano	C ₂₄ H ₅₀	17	91	23.48	0.84	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	21	98	26.89	3.95	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	13	91	20.07	0.62	-	-	-	-	15	94	22.07	4.86
Heneicosano, 11-(1-etilpropil)-	C ₂₆ H ₅₄	-	-	-	-	8	90	17.74	1.27	-	-	-	-
Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	9	91	17.82	3.37	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Heptacosanol	C ₂₇ H ₅₆ O	16	94	21.95	1.31	-	-	-	-	-	-	-	-
Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	14	91	20.48	0.43	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Metil-octacosano	C ₂₉ H ₆₀	23	91	27.87	1.47	-	-	-	-	-	-	-	-
Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	15	91	21.33	0.46	6	83	17.09	0.64	11	91	17.82	0.59

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1			Cepa P2			Cepa P3					
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
Tetratetracontano	C ₄₄ H ₉₀	10	91	18.06	0.46	5	83	17.05	0.47	5	90	16.09	0.50
Hexacloroetano	C ₂ Cl ₂	-	-	-	-	1	94	7.87	0.71	-	-	-	-

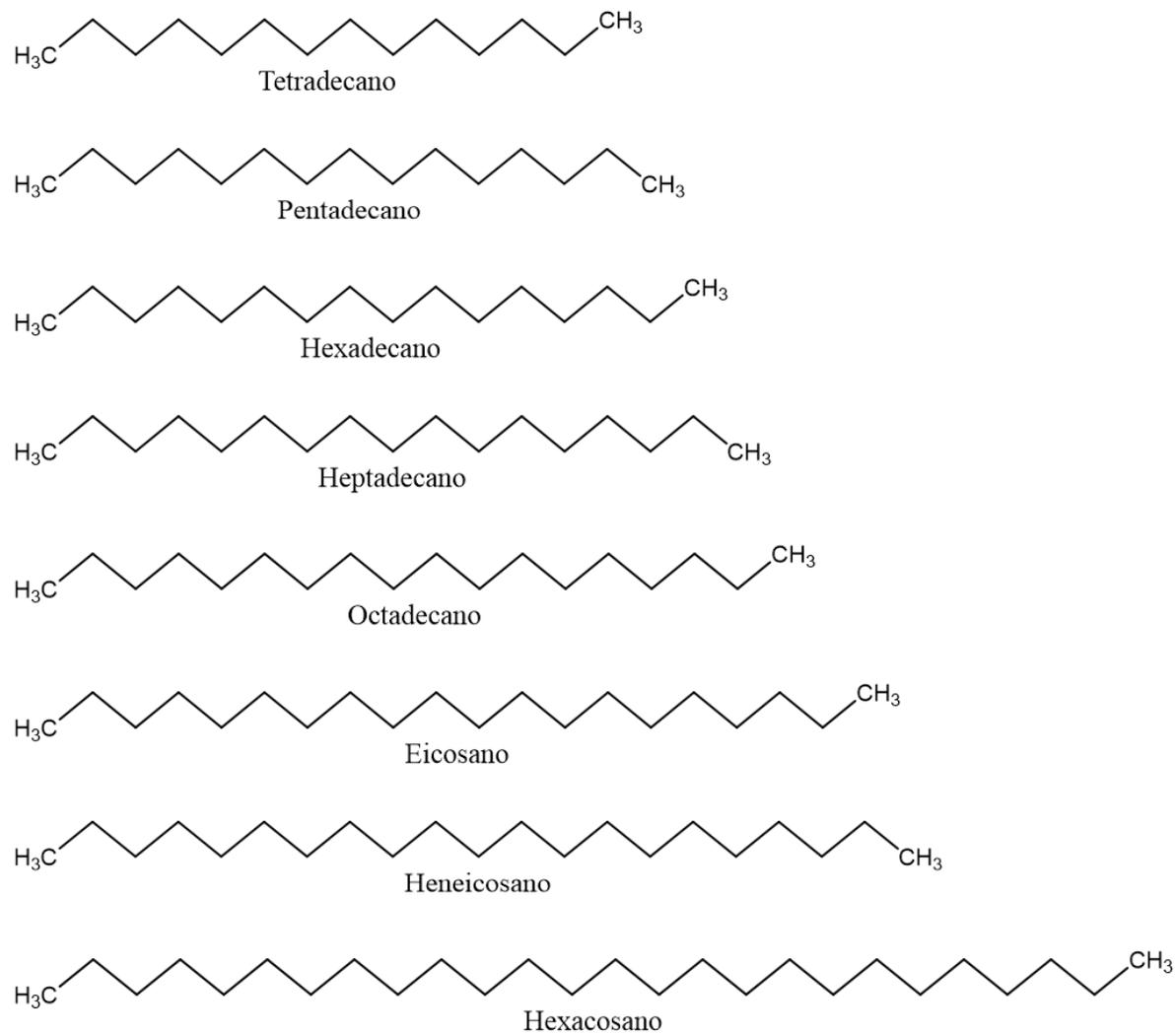


Figura A.3.1. Compuestos identificados en el Grupo 1, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.

Tabla A.3.2. Compuestos identificados en el Grupo 2, de los extractos de las cepas P1 y P2.

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1			Cepa P2				
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
(1Z)-1,4,8-Ciclododecatrieno	C ₁₂ H ₁₈	-	-	-	-	23	93	25.96	0.61
2-(1-Feniletil)fenol	C ₁₄ H ₁₄ O	-	-	-	-	16	93	18.04	1.07
2,4-Di-t-butilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	-	-	-	-	14	97	15.51	5.73
Metil tetradecanoato	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	-	-	-	-	15	96	17.97	0.56
Ácido palmiticoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	-	-	-	-	26	95	27.37	1.17
Bis(2-etilhexil) carbonato	C ₁₇ H ₃₄ O ₃	-	-	-	-	27	80	27.52	12.18
Ester metílico de ácido hexadecanoico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	27	98	20.67	3.11	18	98	20.70	13.85
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	C ₁₈ H ₃₆ O	26	97	19.45	5.25	17	97	19.46	2.64
9- acido Octadecenoico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-	-	-	-	28	92	28.53	8.04
Metil 8,11,14-heptadecatrienoato	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-	-	-	-	29	81	28.58	3.06
3- Octil- éster metílico de ácido graso oxiraneoctanoico	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	-	-	-	-	24	76	26.17	1.48
Ester metílico de ácido graso 9,12-Octadecadienoico	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	-	-	-	-	19	99	24.07	4.92

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1			Cepa P2				
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
Éster metílico de ácido oleico	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	-	-	-	-	20	99	24.16	7.37
Metil estereato	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	-	-	-	-	22	99	24.50	2.8
Fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	-	-	-	-	21	91	24.33	3.02
Bis(2-etilhexil) ester de ácido hexadecanoico	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	28	95	26.90	7.59	25	90	26.91	0.86
4-Octil-N-(4-octilfenil)anilina	C ₂₈ H ₄₃ N	-	-	-	-	30	99	30.65	0.79

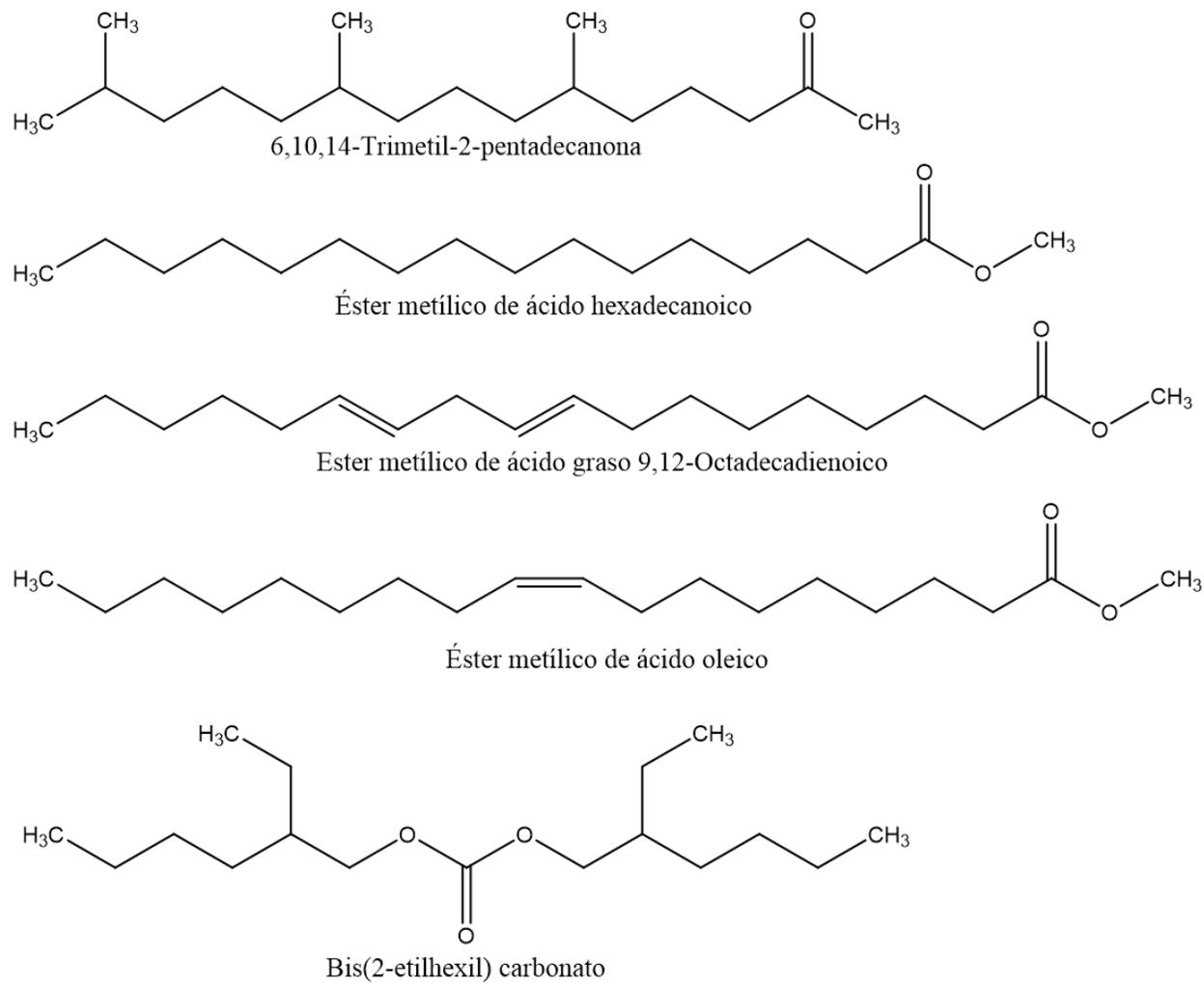


Figura A.3.2. Compuestos identificados en el Grupo 2, de los extractos de las cepas P1y P2.

Tabla A.3.3. Compuestos identificados en el Grupo 2, del extracto de la cepa P3.

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5			
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	1 2	9 8	18.5 6	2.28	-	-	-	-	-	-	-	
Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	1 4	9 8	19.8 9	4.36	-	-	-	-	-	-	-	
Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	1 7	9 8	21.6 2	8.78	-	-	-	-	-	-	-	
Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	1 6	9 9	23.7 3	8.31	-	-	-	-	-	-	-	
Docosano	C ₂₂ H ₄₆	1 9	9 7	25.0 5	6.92	-	-	-	-	-	-	-	
Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	2 0	9 6	26.7 0	7.76	-	-	-	-	-	-	-	
Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	2 1	9 6	27.3 1	3.74	-	-	-	-	-	-	-	
Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	2 2	9 7	27.8 5	3.47	-	-	-	-	-	-	-	
11-Decil-heneicosano	C ₃₁ H ₆₄	2 3	9 6	29.7 1	2.62	-	-	-	-	-	-	-	
2,4-Di-t-butilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	-	-	-	-	4	9	15.3 0	8.11	-	-	-	-
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	C ₁₈ H ₃₆ O	-	-	-	-	2 4	9 9	19.1 6	1.09	-	-	-	-
										2 4	9 6	19.1 5	0.51

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4			Grupo 5			
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
Dibutil ftalato	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	-	-	-	2 5	9 6	21.0 0	1.16	-	-	-	-	-	2 5	9 6	21.02	4.25
1-Octadeceno	C ₁₈ H ₃₆	-	-	-	2 6	9 9	23.4 4	1.39	-	-	-	2 6	9 9	23.4 9	10.8	-	-
Bis(2-etilhexil) éster de ácido hexadecanoico	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	-	-	-	2 7	9 9	26.7 3	11.3 0	-	-	-	-	-	2 7	9 6	26.71	3.10
4-Octil-N-(4-octilfenil)anilina	C ₂₈ H ₄₃ N	-	-	-	2 8	9 5	30.3 1	3.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Amirina	C ₃₀ H ₅₀ O	-	-	-	2 9	9 5	35.6 9	0.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ester metílico de ácido hexadecanoico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	3 0	9 9	20.3 1	7.82	-	-	-	-	-
Ester metílico de ácido graso 9,12-Octadecadienoico	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	3 1	9 9	23.7 7	12.3 4	-	-	-	-	-
Ciclodecano	C ₁₀ H ₂₀	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 2	9 5	14.7 7	0.39	-
Ácido dodecanoico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 3	9 5	15.8 9	0.75	-
Ciclotetradecano	C ₁₄ H ₂₈	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 4	9 8	17.2 0	0.44	-
Ácido tetradecanoico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 5	9 9	18.1 6	1.97	-

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5				
		No. De pico	Calidad (%)	Tempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tempo de retención (min)	% del área bajo la curva	
Ácido pentadecanoico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	3 9 6 9	19.3 6	0.84	-	-	-
Ciclohexadecano	C ₁₆ H ₃₂	-	-	-	-	-	-	-	3 9 2 6	19.6 3	1.27	-	-	-
Ácido palmitoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	3 9 7 9	20.5 8	1.48	-	-	-
Ácido n-Hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	3 9 8 5	21.0 1	10.2 2	-	-	-
Ácido heptadecanoico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	3 9 9 1	23.0 2	0.48	-	-	-
1-Heneicosil formato	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	4 9 0 9	24.3 2	1.94	-	-	-
(9E)-9-ácido octadecanoico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	4 9 1 9	24.3 9	3.97	-	-	-
Ácido octadecanoico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	4 9 2 9	24.7 0	3.81	-	-	-
2-Butoxietil fosfato	C ₆ H ₁₃ O ₅ P	-	-	-	-	-	-	-	4 9 3 5	26.8 4	2.56	4 9 3 3	26.85	7.39
(Z)-9-Octadecenamida	C ₁₈ H ₃₅ NO	-	-	-	-	-	-	-	4 9 4 5	28.9 7	2.67	5 9 2 1	27.74	3.35
β-Amirona	C ₃₀ H ₄₈ O	-	-	-	-	-	-	-	4 9 5 9	30.9 5	2.17	-	-	-

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4			Grupo 5			
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
25-oxo-25-Norcolesterol	C ₂₆ H ₄₂ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	4 6	9 3	32.0 6	3.34	-	-	-	
3β,5α)-Stigmasta-7,25-dien-3-ol	C ₂₉ H ₄₈ O	-	-	-	-	-	-	-	-	4 7	9 5	32.9 4	2.09	-	-	-	
β-Viscol	C ₃₀ H ₅₀ O	-	-	-	-	-	-	-	-	4 8	9 5	34.3 6	8.43	-	-	-	
Clionasterol	C ₂₉ H ₅₀ O	-	-	-	-	-	-	-	-	4 9	9 9	34.7 1	5.64	-	-	-	
Pentadecil acrilato	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 0	9 1	25.96	1.99
Bis(2-etilhexil) ftalato	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 1	9 3	27.63	12.3 0
(Z)-13-Docosenamida	C ₂₂ H ₄₃ NO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 3	9 8	29.07	61.3 4

Tabla A.3.4. Compuestos identificados en el Grupo 3, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1			Cepa P2			Cepa P3					
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	No. De pico	Calidad (%)	No. De pico	Calidad (%)
2-Butoxietil fosfato	C ₆ H ₁₃ O ₅ P	-	-	-	-	36	95	27.01	1.04	-	-	-	-
(2Z)-2-Heptenal	C ₇ H ₁₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	20	90	5.67	1.39
2-Etil-3-metilmaleimida	C ₇ H ₉ NO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	22	97	11.50	1.01
n-Butil butanoato	C ₈ H ₁₆ O ₂	-	-	-	-	33	91	13.71	1.23	-	-	-	-
(2E)-2-Decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	-	-	-	-	-	-	-	-	23	90	11.99	1.22
2,2,4-Trimetil-1,3-pentanediol 1-isobutirato	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	1	91	13.71	5.01
Ciclotetradecano	C ₁₄ H ₂₈	-	-	-	-	-	-	-	-	19	90	4.15	14.10
Ácido mirístico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	24	99	18.33	1.68
Ácido n-Hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	30	99	21.37	7.98	-	-	-	-	27	99	21.38	26.01
1-Hexadeceno	C ₁₆ H ₃₂	-	-	-	-	34	95	23.85	2.70	-	-	-	-
1-Heptadeceno	C ₁₇ H ₃₄	29	98	4.19	23.75	-	-	-	-	-	-	-	-
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona	C ₁₈ H ₃₆ O	-	-	-	-	-	-	-	-	26	94	19.45	0.92

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1				Cepa P2				Cepa P3			
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	No. De pico	Calidad (%)	No. De pico	Calidad (%)
Ácido octadecanoico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	29	84	28.02	1.10
9,12-Diepoxi Etil estereato	C ₂₀ H ₃₆ O ₄	-	-	-	-	37	90	27.16	1.78	-	-	-	-
Neofitadieno	C ₂₀ H ₃₈	-	-	-	-	-	-	-	-	25	91	19.36	3.88
Bis(2-etilhexil) éster de ácido hexadecanoico	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	31	95	26.91	41.25	35	94	26.91	4.93	28	90	26.90	1.47
Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	-	-	-	-	38	99	33.94	6.58	30	91	33.90	2.32
Clionasterol	C ₂₉ H ₅₀ O	-	-	-	-	39	98	35.37	26.79	31	99	35.31	8.25
Hexacloroetano	C ₂ Cl ₆	-	-	-	-	1	95	8.55	2.82	21	94	8.55	2.15

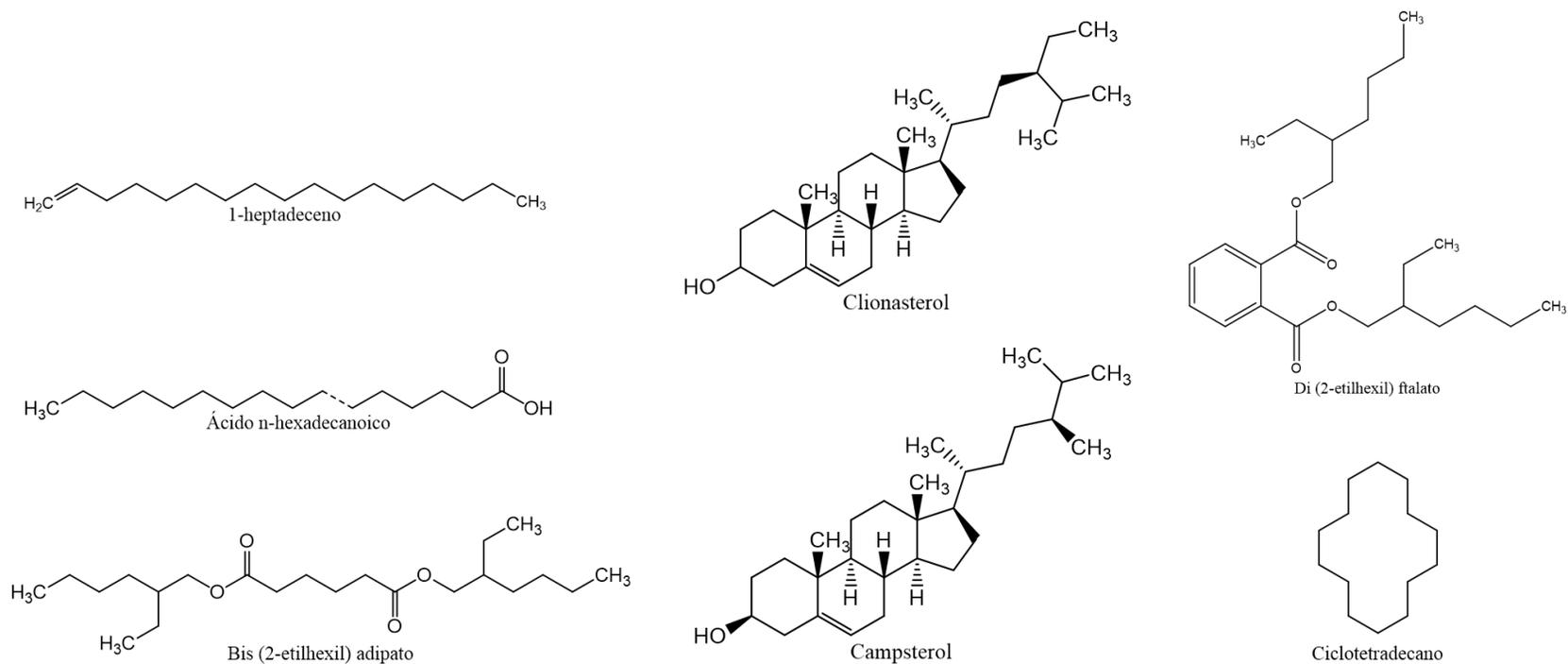


Figura A.3.3. Compuestos identificados en el Grupo 3, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.

Tabla A.3.5. Compuestos identificados en el Grupo 4, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1				Cepa P2				Cepa P3			
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	No. De pico	Calidad (%)	No. De pico	Calidad (%)
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	34	90	5.94	1.14	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Hidroxi-ácido butanoico	C ₄ H ₈ O ₃	33	91	5.51	10.78	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Butoxietil fosfato	C ₆ H ₁₃ O ₅ P	51	93	27.01	1.33	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	32	97	4.26	0.95	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Etil-3-metilmaleimida	C ₇ H ₉ NO ₂	36	97	11.50	0.67	-	-	-	-	-	-	-	-
3,5-Octadieno-2-ol	C ₈ H ₁₄ O	35	94	7.76	0.86	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Oxononanal	C ₉ H ₁₆ O ₂	37	90	11.74	0.97	-	-	-	-	-	-	-	-
1,3-Pentanediol, 2,2,4-trimetil-, 1-isobutirato	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	38	91	13.71	0.60	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclododecano	C ₁₂ H ₂₄	39	97	14.98	0.49	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil 10-metilundecanoato	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	40	97	15.62	0.47	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciclotetradecano	C ₁₄ H ₂₈	42	98	17.42	0.55	-	-	-	-	-	-	-	-
Meristaldehido	C ₁₄ H ₂₈ O	44	97	19.06	1.86	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	41	97	16.53	0.63	-	-	-	-	-	-	-	-

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1				Cepa P2				Cepa P3			
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	No. De pico	Calidad (%)	No. De pico	Calidad (%)
Ácido n-Hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	30	99	21.35	4.18	41	95	21.33	3.98	-	-	-	-
Éster metílico de ácido hexadecanoico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	27	98	20.67	2.45	-	-	-	-	-	-	-	-
Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	43	92	18.82	0.67	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Pentadecanona, 6,10,14-trimetil-	C ₁₈ H ₃₆ O	45	98	19.45	5.29	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido octadecanoico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-	-	-	-	42	99	24.90	2.86	-	-	-	-
Metil estereato	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	49	95	24.48	0.62	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Palmitoilglicerol	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	52	91	27.56	9.94	-	-	-	-	-	-	-	-
Neofitadieno	C ₂₀ H ₃₈	-	-	-	-	40	91	19.37	53.76	33	93	19.36	54.05
1-Heneicosanol	C ₂₁ H ₄₄ O	48	95	23.84	1.32	-	-	-	-	-	-	-	-
Bis(2-etilhexil) éster de ácido hexadecanoico	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	31	94	26.90	3.94	-	-	-	-	34	95	26.90	10.95
Hexacloroetano	C ₂ Cl ₂	-	-	-	-	1	94	8.56	1.94	-	-	-	-

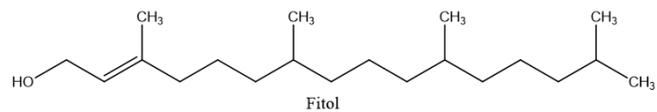
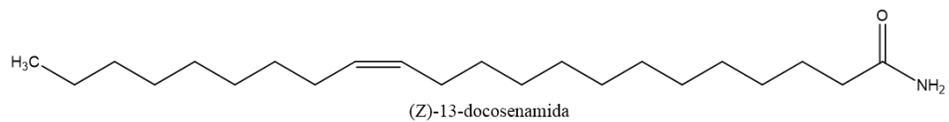
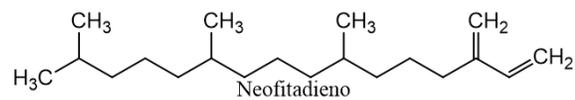
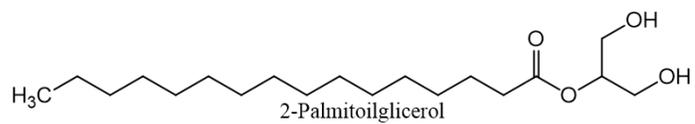
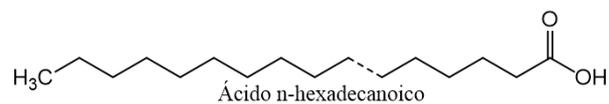
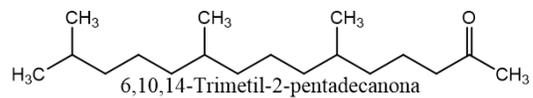
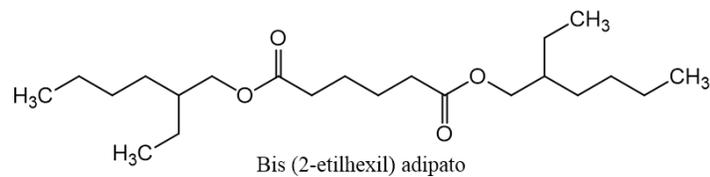
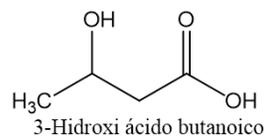


Figura A.3.4. Compuestos identificados en el Grupo 4, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.

Tabla A.3.6. Compuestos identificados en el Grupo 5, de los extractos de las cepas P1, P2 y P3.

Nombre del compuesto (IUPAC)	Formula molecular	Cepa P1				Cepa P2				Cepa P3			
		No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva	No. De pico	Calidad (%)	Tiempo de retención (min)	% del área bajo la curva
Ácido n-hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-	-	-	-	41	98	21.2837	10.05	-	-	-	-
Ácido octadecanoico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-	-	-	-	42	97	24.6433	5.42	-	-	-	-
6,10,14-Trimetil-2- pentadecanona	C ₁₈ H ₃₆ O	-	-	-	-	-	-	-	-	91	19.4479	2.56	-
Neofitadieno	C ₂₀ H ₃₈	-	-	-	-	40	99	19.3673	10.46	94	19.3581	7.05	-
Bis(2-etilhexil) éster de ácido hexadecanoico	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	95	27.7901	16.79	-
Hexacloroetano	C ₂ Cl ₆	-	-	-	-	1	91	8.5578	3.94	-	-	-	-

ANEXO 4
Absorciones IR mezcla de estándares de fosfolípidos

Tabla A.4.1. Espectro de absorción IR mezcla estándares de fosfolípidos [99].

Número de onda (cm ⁻¹)	Tensión	Grupo funcional
	P=O	
1000-1300	va-PO ₂ - P-O-C	Fosfodiéster y fosfolípidos (-OH +- PO ₄ ³⁻)
	δa-CH ₂	Metileno
1300-1620	δs-CH ₂	CH ₂ , CH ₃ y COO ⁻
	v-C=C	Carboxílico
1700-1780	v-C=O éster	Ester de lípidos y ácidos grasos
2600 y 3100	vs-CH ₃ y vs-CH ₂	Metilo y metileno
(pico ancho)	va-CH ₃ y va-CH ₂ v-OH y v-NH	Amino e hidroxilo

Abreviaciones: v, vibración de estiramiento; va, vibración de estiramiento asimétrico; vs, vibración de estiramiento simétrico; δ, vibración de tensión; δa, vibración de tensión asimétrico; δs, vibración de tensión simétrico.

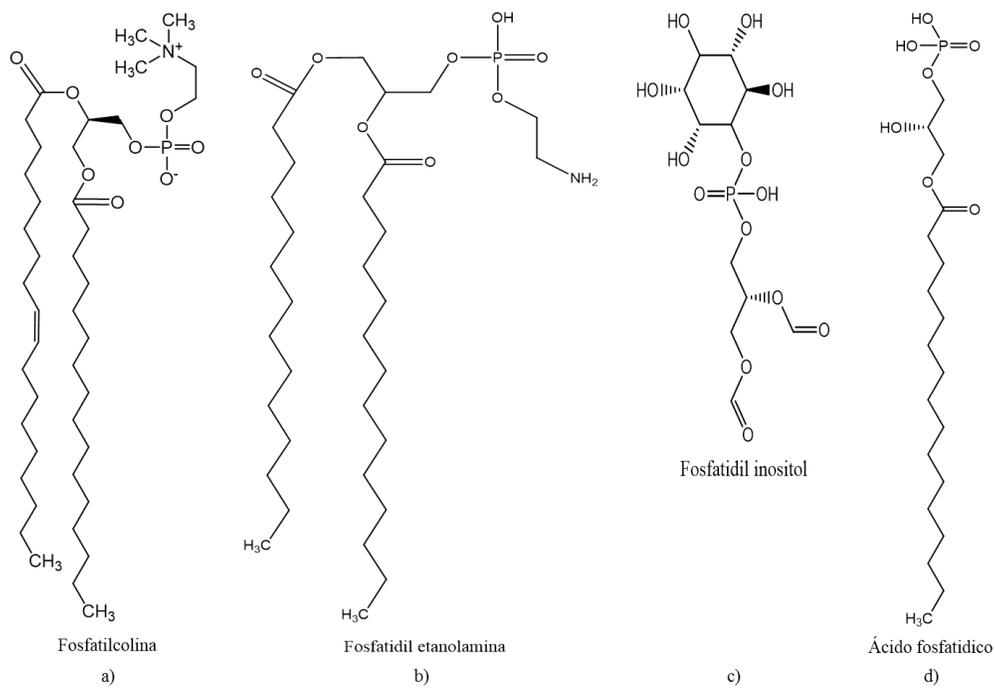


Figura A.4.1. Fosfolípidos identificados en la lecitina de soya [98].