



2011



Efectos de estrés abiótico en la producción de lípidos en *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii*, importantes para elaboración de biodiesel



Pabla Ugalde Díaz

**Orientadores**

Luisa Barreira

João Varela

Mestrado em Aquacultura e Pescas  
Faculdade de Ciências e Tecnologias  
Universidade do Algarve, Portugal.

## Agradecimientos

Dedico esta tesis a mi hija Emilia quien me ha acompañado en este camino, siendo el motor fundamental de mi vida.

Agradezco al programa External Cooperation Window Lot 17, Chile, Erasmus Mundus, quienes hicieron posible mi estadía y estudios en Portugal.

Agradezco a todos quienes me ayudaron a lograr realizar mi tesis de una u otra manera, familia, amigos, colegas y profesores.

También agradezco a quienes no me ayudaron, ya que gracias a ellos descubrí la fuerza interior que tengo cuando quiero lograr mis objetivos.

## Summary

Microalgae are a potential resource for biodiesel production and antioxidant compounds. The lipids concentration increase in the late exponential phase, but can also be induced by abiotic stress. In this work, the microalgae *Chlorella* sp. and *Tetraselmis chuii*, were submitted to a light intensity increase, nitrate limitation and iron limitation in the late exponential phase to verify the effect of stress on lipid productivity. The results indicated a significant increase of the lipid concentration in *Chlorella* sp. when was submitted to a light intensity upshift. The other treatments did not induce a significant increase in the lipids concentration. In *T. chuii* the lipid concentration did not increase with any of the different stress assay. The lipid profile of both species under stress was analyzed. The main fatty acids in *Chlorella* sp., were palmitic, palmitoleic and eicosapentaenoic acids. In *T. chuii* palmitic, linoleic and oleic acids were predominant, the latter having great importance for biodiesel production. The antioxidant activity of the microalgal biomass was analyzed as a possible feedstock for the isolation of bioactive compounds with neuroprotective activity. The bioactive compounds were extracted by the nonpolar solvent hexane and the polar solvent dichloromethane (DCM) from both microalgae species. The antioxidant activity was determined by the free radical with DPPH assay, with which both *Chlorella* sp. and *T. chuii*, showed significant differences in radical scavenging activity (RSA) at 1-5 and 10 mg mL<sup>-1</sup>, with the hexane and DCM extract. The higher RSA with hexane extract was 10 mg mL<sup>-1</sup>, and higher RSA at 5 and 10 mg mL<sup>-1</sup>, with the DCM extract, in both species. We conclude that *Chlorella* sp. has a higher lipid concentration than *T. chuii*, although both species contain fatty acids ideal for biodiesel production. On the other hand both microalgae are promising feedstocks containing bioactive compounds with antioxidant activity although still are required further studies are required to identify the compound responsible for the bioactivity.

Key word: microalgae, lipids, biodiesel, bioactive compounds

## Resumen

Las microalgas son un recurso potencial para producir biodiesel y obtener compuestos antioxidantes. El aumento en la concentración de lípidos ocurre en la fase exponencial tardía, aunque también puede ser inducida por estrés abiótico. En este trabajo, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii*, fueron sometidas a incremento en intensidad luminosa, limitación de nitratos y limitación de hierro, en la fase exponencial tardía para verificar el efecto en la productividad lipídica. Los resultados indicaron un aumento significativo de la concentración de lípidos en *Chlorella* sp., aumentando la intensidad de luz. Los otros tratamientos no tuvieron un efecto significativo en la concentración de lípidos. En *T. chuii* no hubo diferencias significativas en la concentración de lípidos con diferentes tipos de estrés. El perfil lipídico de ambas especies sometidas a estrés fue analizado, siendo los ácidos grasos palmítico, palmitoleico y eicosapentaenoico los principales en *Chlorella* sp., y en *T. chuii* los ácidos palmítico, linoleico y oleico, este último de gran importancia para elaboración de biodiesel. Fue analizada la actividad antioxidante de biomasa microalgal como posible recurso de compuestos bioactivos con actividad neuroprotectora. Los compuestos bioactivos fueron extraídos por el solvente apolar hexano y el solvente polar diclorometano (DCM), en *Chlorella* sp., y *T. chuii*. La actividad antioxidante fue determinada a través del ensayo de radicales libres DPPH, siendo en ambas microalgas significativamente diferente la secuestación de radicales libres (RSA) en las concentraciones de 1-5 y 10 mg mL<sup>-1</sup>, con el extracto hexano y DCM. En ambas especies, una alta RSA tuvo la concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup> con el extracto hexano y alta RSA en concentraciones de 5 y 10 mg mL<sup>-1</sup> con DCM. Se puede concluir que *Chlorella* sp presenta una mayor concentración de lípidos que *T. chuii*, aunque ambas especies poseen ácidos grasos ideales para la elaboración de diesel y son promisorias en actividad antioxidante, aunque faltan estudios para identificar la naturaleza de los compuestos.

Palabras clave: microalgas, lípidos, biodiesel, compuestos bioactivos

## Índice

1.	Introducción	11
1.1.	Biodiesel como recurso energético	11
1.2.	Biología de microalgas	18
1.2.1.	La fotosíntesis.	19
1.2.2.	Nutrientes en las microalgas	23
1.2.3.	Lípidos a partir de microalgas	25
1.2.4.	Actividad antioxidante en Microalgas	31
1.3.	Producción de Microalgas a gran escala	35
1.3.1.	Sistemas de cultivo	35
1.3.2.	Obtención de biomasa microalgal	38
1.4.	Biorefinería de microalgas para producción de Biodiesel	40
1.5.	Especies de microalgas utilizadas en este estudio	44
1.5.1.	<i>Chlorella</i> sp.	44
1.5.2.	<i>Tetraselmis chuii</i>	45
1.6.	Objetivos	46
1.6.1.	Objetivos generales	46

1.6.2. Objetivos específicos	46
2. Materiales y Métodos	48
2.1. Cultivo de cepas de microalgas y crecimiento celular	48
2.2. Curva de crecimiento	50
2.3. Determinación del peso seco en biomasa microalgal	53
2.4. Análisis de lípidos totales	53
2.4.1. Método Gravimétrico	53
2.4.2. Determinación de lípidos por fluorescencia	56
2.4.3. Evaluación del perfil lipídico	58
2.5. Estudio de inducción a la producción de lípidos por estrés abiótico	61
2.5.1. Incremento en la intensidad luminosa	63
2.5.2. Depleción de la concentración de Nitrato	63
2.5.3. Depleción de la concentración de Hierro	64
2.6. Evaluación de actividad antioxidante	65
2.6.1. Extracción de compuestos antioxidantes	65
2.6.2. Fase de Evaporación	65

---

2.6.3. Actividad secuestradora de radicales libres (RSA)	66
2.7. Análisis Estadístico	67
3. Resultados	69
3.1. Cultivo de cepas de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Tetraselmis chuii</i>	69
3.1.1. Crecimiento celular	69
3.2. Determinación de lípidos	70
3.2.1. Lípidos Totales	70
3.2.2. Análisis de lípidos a través de La técnica rojo de Nilo	72
3.2.3. Relación entre la concentración lipídica determinada por el método gravimétrico y por fluorescencia (recta de calibración)	75
3.3. Crecimiento celular en microalgas sometidas a estrés abiótico	77
3.3.1. Incremento en la intensidad de luz	77
3.3.2. Depleción de la concentración de Nitrato	79
3.3.3. Depleción de la concentración de Hierro	82
3.4. Estudio de la inducción a la producción de lípidos por estrés abiótico	83

---

3.4.1. Incremento en la intensidad de luz	83
3.4.2. Depleción de la concentración de Nitrato	84
3.4.3. Depleción de la concentración de Hierro	85
3.5. Efectos del estrés abiótico en la producción de lípidos en <i>Chlorella</i> sp., y <i>T.chuii</i>	86
3.5.1. Determinación del porcentaje de lípidos totales con respecto a la biomasa	87
3.6. Evaluación del Perfil Lipídico	89
3.7. Actividad antioxidante de microalgas <i>Chlorella</i> sp. y <i>T. chuii</i>	94
4. Discusión	96
4.1. Crecimiento celular y concentración de lípidos bajo condiciones de estrés	96
4.2. Actividad Antioxidante de microalgas <i>Chlorella</i> sp. y <i>Tetraselmis chuii</i>	105
5. Conclusión	108
6. Referencias	110

## Glosario

**ANOVA** - análisis de varianza

**AD** - Enfermedad de Alzheimer (Alzheimer disease)

**ACh** - Acetilcolina

**AChE** - Acetilcolinesterasa

**ATP** - Adenosina trifosfato

**BHT** - Butil hidroxitolueno

**BHA** - Butil hidroxianisol

**CoA** - Coenzima A

**EE.UU.** - Estados Unidos de Norteamérica

**Fe** - Solución de Hierro

**FAME** - Esteres metílicos de ácidos grasos (Fatty acid metil ester)

**GHG** - Gases invernadero (Green House Gas)

**Mha** - Millones de hectáreas

**NADPH** - Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato oxidada

**Nitrato** - Solución de nitrato

**PUFAs** - Ácidos grasos poliinsaturados

**Redox** - propiedades óxido reducción

**TAG** - Triacilglicéridos

**TFF** - Filtración de flujo tangencial (Tangential flow filtration)

**u.a.** - unidades arbitrarias

**$\mu$**  - tasa de crecimiento específica

## 1. Introducción

### 1.1. Biodiesel como recurso energético

La energía juega un importante rol en nuestras vidas, ya que muchas actividades son realizadas gracias a algún recurso energético. Debido a tal importancia, la energía es un factor vital en el desarrollo socioeconómico de la población humana, siendo por este motivo, un buen estimador del estándar de vida en los países (Demirbas & Demirbas, 2010). Los recursos energéticos pueden ser almacenados, convertidos y amplificados para su uso en una variedad de formas (combustibles líquidos, gas, electricidad, etc.); siendo una constante preocupación para investigadores y políticos. (Demirbas & Demirbas, 2010).

Los recursos energéticos globales pueden ser clasificados en no renovables y renovables. El primer grupo incluye combustibles fósiles (carbón, petróleo, gas natural, alquitrán, aceite de esquisto y arenas de esquisto), y material fisible en que el principal recurso de energía es el uranio y el torio. Las fuentes de energía renovable incluyen, biomasa, agua, calor interno de la Tierra, sol y viento (Gupta & Demirbas, 2010).

Actualmente, más del 70% de los requerimientos globales totales de energía son satisfechos por combustibles fósiles, particularmente en transporte, manufactura y calefacción domestica (Chisti, 2007; Gouveia & Oliveira, 2009; Demirbas & Demirbas, 2010;). Esta dependencia daría lugar al incremento de las emisiones de dióxido de carbono a la atmosfera a través de los productos de la combustión, lo que podría incrementar el efecto de gases invernadero (GHG) (EIA, 2011). Por otro lado, el limitado suministro de

combustibles fósiles ha generado constantes fluctuaciones en su precio, y de esta forma ha incrementado la necesidad de encontrar nuevas alternativas de energía (Chisti, 2007; Fonseca, 2008; Hu *et al*, 2008).

En 1997, fue celebrado el Protocolo de Kyoto en el marco de la Convención de las Naciones Unidas por el Cambio Climático (UNFCCC), el cual reunió a 160 Estados miembros y países en vía de desarrollo. En la convención acordaron algunas medidas para estabilizar los GHG y reducir en un 5,2% las emisiones de gases invernadero, de acuerdo a las emisiones del año 1990. La reducción debería llevarse a cabo desde el año 2008 hasta el año 2012. Algunas de las medidas fueron las siguientes: 1) Reducción de las emisiones domesticas de GHG en países industrializados; 2) Incrementar la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías, eficiencia energética y energía renovable; 3) Imponer tasas por el uso de energía y emisión de GHG; entre otras (Gupta & Demirbas, 2010). De acuerdo a esto, nuevos recursos energéticos podrían ser una solución viable para cumplir los requerimientos del Protocolo de Kyoto, y en este sentido, muchos países han comenzado a demostrar gran interés sobre los diferentes tipos de energías renovables.

Los biocombustibles son un tipo de energía renovable y una prometedora solución alternativa para la disminución de la contaminación provocada por combustibles de origen fósil. Algunos biocombustibles como el biodiesel y el bioetanol tienen mejores propiedades que los combustibles fósiles porque son biodegradables, no tóxicos, esencialmente libres de sulfuros y compuestos aromáticos (Fonseca, 2008). Por esta razón, ha habido varios intentos de producir biocombustibles de origen vegetal. Entre ellos podemos destacar la

colza, soya, palma, girasol, coco, semillas de lino, algodón y jatrofa (Singh & Singh, 2010). Pero estas materias primas, que son llamadas combustibles de primera generación, tienen el problema de competir con la demanda alimentaria de esos u otros vegetales cultivados en terrenos agrícolas (Wijffels & Barbosa, 2010). Esta controversia se debe principalmente al riesgo de aumentar excesivamente los precios de algunos alimentos, causando un impacto en los mercados alimentarios globales y la escasa disponibilidad que pueden provocar, especialmente en las regiones económicamente más vulnerables del mundo. Por otro lado, la demanda por biocombustibles podría causar una sustancial presión adicional en los recursos naturales, con potenciales daños al medio ambiente (p.ej. degradación de terrenos arables) y eventualmente consecuencias sociales (Wijffels & Barbosa, 2010). Una estimación hecha por Brennan & Owende (2010); determinaron que sobre el 1% (14 millones de hectáreas) de terrenos agrícolas disponibles en el mundo, podrían ser usados para la producción de biocombustibles, aunque es suficiente sólo para cumplir con el 1% de los requerimientos necesarios para el transporte mundial. Es evidente que incrementar la producción cerca del 100% es inviable, debido a las graves repercusiones en el suministro de alimentos y las grandes extensiones de terreno requeridas para la producción.

Una evaluación a partir del Programa de las Naciones Unidas (UNEP) en 2010, estimó que la producción de energía renovable suministró alrededor de un 16% del consumo mundial de energía en el año 2009, donde los biocombustibles líquidos proporcionaron aproximadamente el 0,6% del combustible mundialmente requerido (Figura 1.1). Dentro de estos biocombustibles, el bioetanol es el más representativo y llegó a 86 billones de

litros en el año 2010, en comparación a los 19 billones de litros de biodiesel producidos en el mismo año (Figura 1.2). Estas estimaciones incluyen materiales de desecho vegetal, es decir, los biocombustibles de segunda generación.

Los biocombustibles de segunda generación están orientados a la producción de combustibles a partir de materiales de desecho vegetal tanto de plantas utilizadas con fines energéticos como residuos agrícolas, además de residuos de origen forestal y maderero (Fonseca, 2008). Estas materias primas tienen la ventaja de no competir con los cultivos de vegetales para la producción de alimentos y emiten menos gases de efecto invernadero que los combustibles fósiles. Sin embargo, la tecnología para la conversión en la mayoría de los casos no ha alcanzado la escala para la explotación comercial y además, es necesario combustible fósil para convertir la materia prima en biocombustible (Demirbas & Demirbas, 2010).

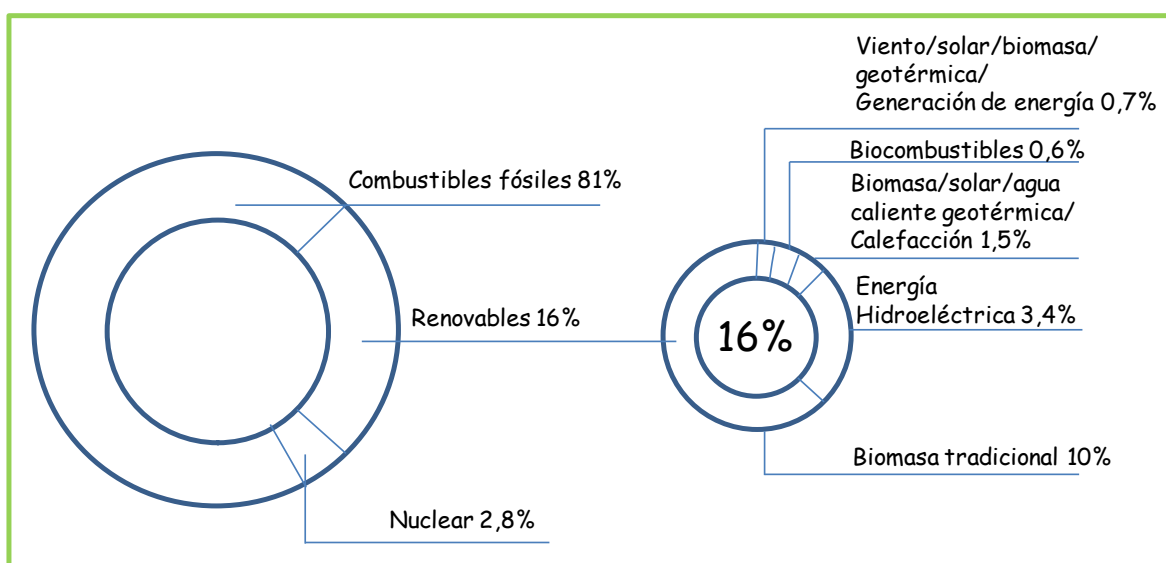


Figura 1.1. Energía Renovable global consumida en el año 2009 (Fuente: [www.unep.org](http://www.unep.org))

Las microalgas son consideradas como fuentes de combustibles de tercera generación y una de las materias primas más prometedoras para la obtención de biocombustibles (Chisti, 2007). La productividad de la conversión de dióxido de carbono en carbonos ricos en lípidos, a través de organismos fotosintetizadores acuáticos, es superior a las obtenidas por cultivos de plantas oleaginosas terrestres (Stephenson *et al.*, 2010). Por otra parte, las algas tienen un rápido crecimiento, mayor que el de las plantas terrestres y algunas pueden llegar a tener hasta el 50% de su peso en lípidos (Stephenson *et al.*, 2010).

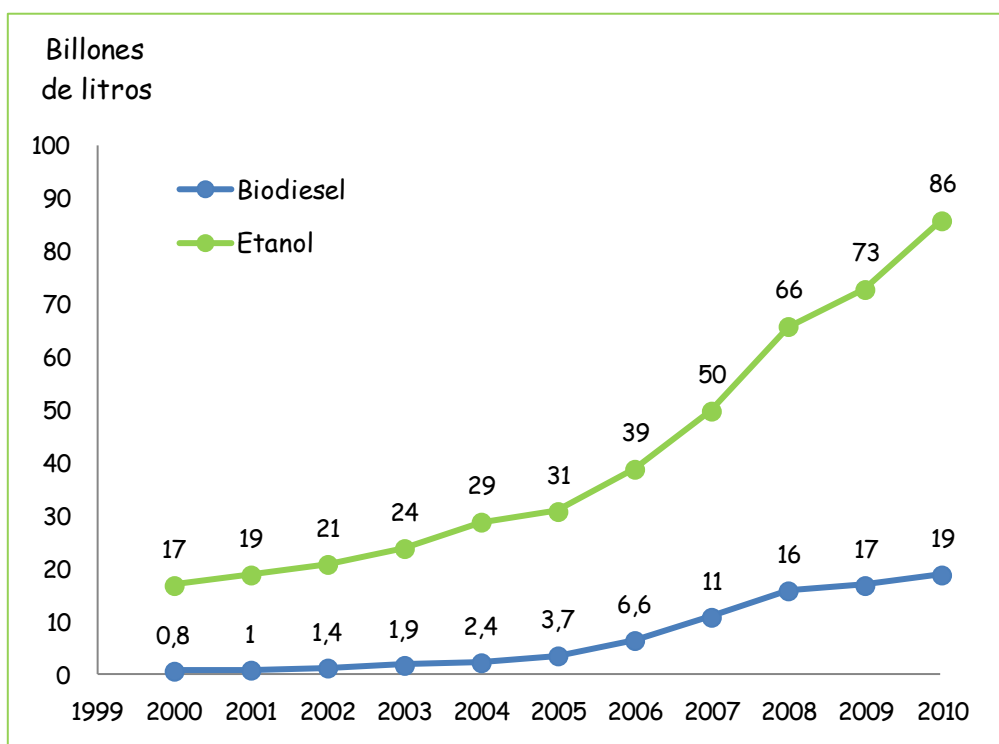


Figura 1.2. Producción de Etanol y Biodiesel entre los años 2000-2010 (Fuente: [www.unep.org](http://www.unep.org))

El rendimiento de lípidos por área de cultivo de microalgas podría ser muy superior al rendimiento de los mejores cultivos de semillas oleaginosas (Rodolfi *et al.*, 2009). Se estima que 40 toneladas de lípidos por hectárea por año, pueden ser producidas a base de diatomeas, que rinden entre 7 y 31 veces más que el mejor rendimiento de aceite vegetal (aceite de palma), y 200 veces superior a la planta de soya en tierras arables (Wijffels & Barbosa, 2010). La Tabla 1.1, adaptada desde Chisti (2007), muestra la productividad de las diferentes fuentes de lípidos para combustible en litros por hectárea. En el caso de las microalgas, la eficiencia en la productividad de lípidos va desde 30 a 70% (peso seco), con un uso de terreno de 4,5 a 2 Mha respectivamente, para satisfacer el 50% del requerimiento de combustible en el transporte de EE.UU. Otras ventajas de las microalgas, en comparación a las plantas superiores son: 1) las microalgas crecen en un medio acuático, pero necesitan menos agua que los cultivos terrestres; 2) las microalgas pueden ser cultivadas en agua dulce, agua salada o salobre en tierras no cultivables, y 3) no compiten por los recursos con la agricultura convencional, además la producción de biomasa de microalgas puede ser combinada con la bio-fijación directa de CO<sub>2</sub> por las mismas microalgas (Rodolfi *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2011).

La desventaja de las microalgas en la actualidad, es la baja productividad de lípidos. De acuerdo con Wijffels & Barbosa (2010), si el biodiesel fuese suministrado a través de microalgas, 9,25 millones de hectáreas (casi la superficie de Portugal) sería necesario para abastecer el mercado europeo, asumiendo una productividad de 40.000 litros por hectárea al año en sistemas de cultivo eficientes. Esta productividad se basa en una conversión de energía solar del 3% de la biomasa (máximo teórico es del 9%) y un contenido de lípidos

del 50% de la biomasa, en las condiciones solares de Portugal. Por esta razón, es necesario encontrar cepas de microalgas con altas concentraciones de lípidos desarrollando tecnologías que ayuden a maximizar su productividad. De esta manera, el aumento de la producción al menos 3 órdenes de magnitud y la disminución de los costos por un factor de 10 (Wijffels & Barbosa, 2010), podría ser una solución para que las microalgas compitan en el mercado de la energía renovable.

Tabla 1.1. Comparación de algunos recursos para biodiesel en productividad de lípidos (L/ha), y área necesaria (M ha). Adaptado de Chisti (2007).

Cultivo	Rendimiento de lípidos (L/ha)	Área de terreno necesario (M ha) <sup>a</sup>
Maíz	172	1540
Soya	446	594
Canola	1190	223
Jatrofa	1892	140
Coco	2689	99
Aceite de palma	5950	45
Microalga <sup>b</sup>	136900	2
Microalga <sup>c</sup>	58700	4,5

a. Para suplir el 50% de todo el transporte necesario en Estados Unidos

b. 70% lípidos (por peso seco) en biomasa

c. 30% lípidos (por peso seco) en biomasa

## 1.2. Biología de microalgas

Las microalgas pueden ser clasificadas como células procariotas (cianobacterias) o eucariotas. Las células procariotas carecen de organelos limitados por membranas (p. ej.: plastidios, vacuolas, núcleos y cuerpos de Golgi; Becker, 1994). Las microalgas eucariotas se clasifican en una variedad de clases definida principalmente por su ciclo de vida, estructura celular básica y su pigmentación (Tomaselli, 2004). La clasificación sistemática de las algas sobre la base de los componentes de sus pigmentos, ha sido reestudiada por Cavalier-Smith (2010), quien propone incluir a todas las algas dentro del reino Chromista, compartiendo como característica común poseer clorofila *c* contenida en plastidios situados en la membrana periplastidica en el interior del lumen del retículo endoplasmático rugoso (RER); y poseer pelos bi o tripartitos en uno o ambos cilios. El reino Chromista estaría dividido en: Heterocontophytas, Haptophytas, Cryptomonadas. Sin embargo, se ha incluido tres grupos más: Alveolata, Rhizaria y Heliozoa (Cavalier-Smith, 2010).

Se ha estimado que existe alrededor de 300.000 especies de microalgas y su diversidad es mucho mayor que las plantas terrestres (Scott *et al.*, 2010). Se desarrollan en diversos hábitats, tales como agua dulce, agua salobre, y agua de mar. También pueden adaptarse a diferentes temperaturas y condiciones extremas de pH, además muchas microalgas presentan un rápido crecimiento en condiciones óptimas (Chen *et al.*, 2009). Las microalgas poseen diversas características, tales como ser ricas en almidones, lípidos, proteínas, siendo capaces de acumular metabolitos secundarios como son los carotenoides

(Lee, 2008) y algunos quimiopreventivos de cáncer (Amin, 2008, Custódio *et al.*, 2012).

Las microalgas pueden ser autotróficas, heterotróficas o mixotróficas (Lee, 2004). Las formas autotróficas requieren sólo compuestos inorgánicos tales como  $CO_2$ , sales (nitratos, fosfatos, microelementos y oligoelementos), y una fuente de energía luminosa para el crecimiento. Las especies heterotróficas no fotosintéticas, requieren de una fuente externa de compuestos orgánicos como fuente de energía. Las especies mixotróficas pueden adquirir energía tanto de la fotosíntesis como de nutrientes orgánicos exógenos (que podría ser glucosa) y de forma simultánea fijar carbono inorgánico ( $CO_2$ ) como fuente de energía (Lee, 2004, Xiong *et al.*, 2010).

Algunas especies de microalgas tienen la capacidad de cambiar de estilo de vida, desde autotrofia a heterotrofia y en algunos casos a mixotrofia (Lee & Shen, 2004; Kumar *et al.*, 2010).

### **1.2.1. La fotosíntesis.**

La luz del sol es la fuente más común de energía para las microalgas. En las algas verdes autotróficas (*Chlorophyta*), la fotosíntesis es clave para la supervivencia (Masojídek *et al.*, 2004). Fundamentalmente, en el proceso de fotosíntesis, la radiación solar y el  $CO_2$  absorbido por los cloroplastos es convertido en adenosina trifosfato (ATP) y  $O_2$ , que es energía utilizable en respiración a nivel celular, para elaboración de macromoléculas (carbohidratos,

proteínas, lípidos, etc.) y en último término, para llevar a cabo el crecimiento (Brennan & Owende, 2010).

El mecanismo para realizar la fotosíntesis es a través del cloroplasto, que contiene una serie de vesículas aplanadas o tilacoides y en algunos casos uno o más pirenoides. Las reacciones luminosas fotosintéticas se encuentran en las membranas de los tilacoides (Masojídek *et al.*, 2004) donde existe una serie de pigmentos tales como, clorofila *a*, clorofila *b* y xantófilas (carotenoides oxigenados) (Lee, 2008). Los tilacoides se componen principalmente de dos lípidos: mono y digalactosilglicerol, dispuestos en una doble capa, donde las proteínas se encuentran embebidas formando un mosaico líquido (Masojídek *et al.*, 2004; Lee, 2008).

La fotosíntesis se realiza generalmente en dos etapas separadas: la fase luminosa y la fase oscura. En la fase luminosa, los fotones de luz solar son capturados directamente por la clorofila y pigmentos accesorios. La luz produce las reacciones de transporte de electrones provenientes del agua, desde un estado energético más alto hacia uno más bajo, hasta ser convertidas en ATP, NADPH<sub>2</sub> reducido y oxígeno molecular (Chen *et al.*, 2009).

En la fase oscura, el CO<sub>2</sub> se convierte en hexosa con ayuda de la energía en forma de ATP y el NADPH generados durante la fase luminosa, siguiendo los pasos que aparecen en la Figura 1.3.

En general, en las algas existen dos vías de carboxilación para convertir el CO<sub>2</sub> en carbono orgánico: la vía C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>. En la vía C<sub>3</sub>, la enzima RuBisCo (ribulosa-bifosfato carboxilasa-oxigenasa) cataliza la reacción de ribulosa

bifosfato (RuBP) +  $\text{CO}_2$  +  $\text{HO}_2$  a 2 ácido fosfoglicérido (PGA), un compuesto de 3 carbonos que entra en el ciclo de Calvin, convirtiéndose en carbohidrato (Raven *et al.*, 1996; Masojídek *et al.*, 2004). La mayoría de las algas y las plantas superiores, estudiadas, emplean la vía C3 para fijar el carbono inorgánico (Raven *et al.*, 1996). Algunas algas y plantas evolucionaron a la vía alternativa C4 donde el  $\text{CO}_2$  se convierte primero en un compuesto de cuatro carbonos que libera  $\text{CO}_2$  para la fijación glicerofosfato por la acción de la enzima RuBisCo (Figura 1.3). Posterior, a la conversión del  $\text{CO}_2$  en carbohidratos, otras vías de síntesis pueden llevarse a cabo, como la lipogénesis que por la vía del acetyl CoA puede transformar las cadenas de carbono en ácidos grasos y posteriormente en triacilgliceridos (Masojídek *et al.*, 2004; Lee, 2008).

Las microalgas tienen una gran capacidad de fijar  $\text{CO}_2$  desde la atmósfera, desde algunos gases emanados por los procesos químicos industriales y desde algunos carbonatos solubles (por ejemplo,  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Kumar *et al.*, 2010).

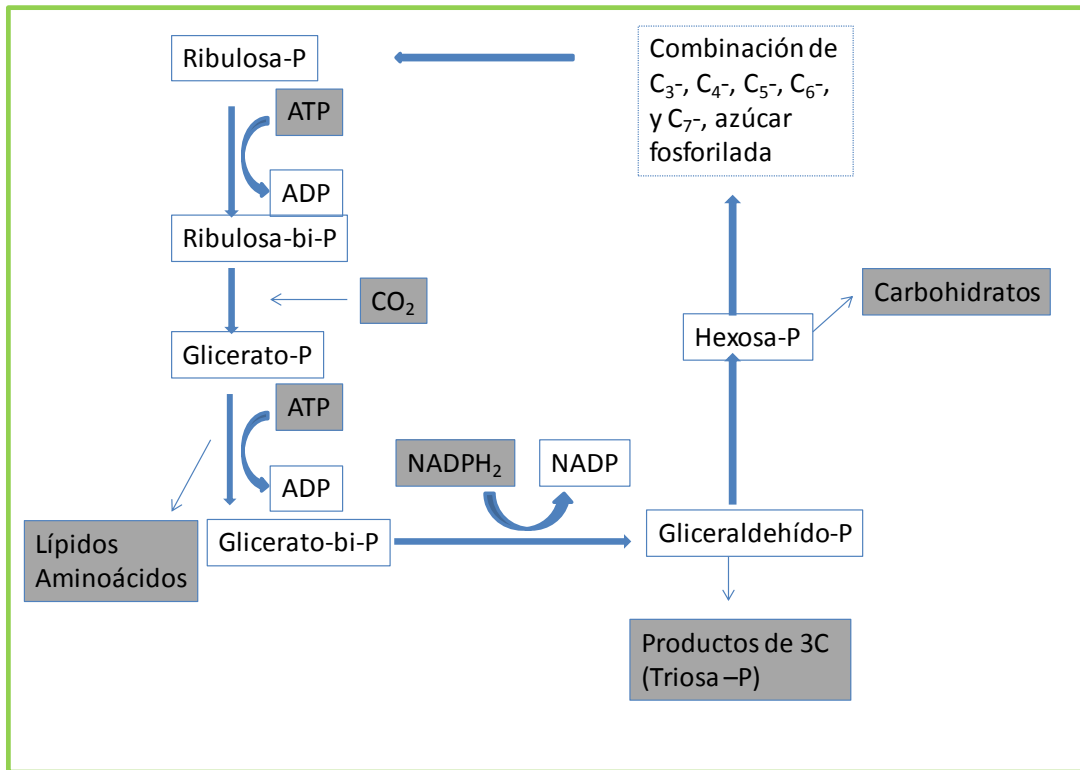


Figura 1.3. Fase oscura en el Ciclo de Calvin-Benson. La Ribulosa-P es fosforilada por el ATP. A continuación, un  $\text{CO}_2$  se incorpora para formar Glicerato-P, se transfiere otro P a partir de ATP y forma Glicerato-bi-P. El  $\text{NADPH}_2$  incorpora un  $\text{H}_2$  y forma gliceraldehído-P, donde se divide en Triosa-P para formar cualquier carbohidrato (Adaptado de Masojídek *et al.*, 2004).

En condiciones heterotróficas o mixotróficas, algunas especies de microalgas pueden metabolizar carbonatos a partir de una variedad de compuestos orgánicos, incluyendo glucosa, como el caso de *Chlorella protothecoides* (Xiong *et al.*, 2010), melaza y ácido acético, así como los compuestos presentes en las aguas residuales y el petróleo (Lee, 2004; Kumar *et al.*, 2010)

### 1.2.2. Nutrientes en las microalgas

Los nutrientes en las microalgas son esenciales para el correcto desarrollo y crecimiento celular. Los nutrientes pueden dividirse en oligoelementos, microelementos y vitaminas (Grobbelaar, 2004).

El nitrógeno es un importante componente para el crecimiento de las microalgas y puede ser incorporado a través de amonio o nitratos disueltos en el medio. El nitrógeno forma parte de los ácidos nucleicos y de las proteínas, además está directamente relacionado con el metabolismo primario (Grobbelaar, 2004). En cianobacterias cultivadas bajo condiciones limitadas de nitrógeno, el efecto más llamativo es la degradación activa y específica de los ficobilisomas (Grossman *et al.*, 1993), causando finalmente la disminución del crecimiento celular (Damiani *et al.*, 2010). Sin embargo, varios estudios demuestran que la limitación o privación de nitrógeno en cultivos de microalgas de varios grupos taxonómicos, causan una mayor biosíntesis y acumulación de lípidos (Illman *et al.*, 2000; Gouveira & Oliveira, 2009; Converti *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011).

La limitación de nitrógeno podría causar tres cambios: la disminución del contenido celular en la membrana de los tilacoides, la activación de la acil hidrolasa que puede degradar glicolípidos, y la estimulación de la hidrólisis de fosfolípidos (Xin *et al.*, 2010). Estos cambios pueden activar la diacilglicerol acil-transferasa, que convierte acil-CoenzimaA en triglicéridos (TAG), aumentando el contenido intracelular de los ácidos grasos (Takagi *et al.*, 2000). Sin embargo, la estrategia para cultivar microalgas con un aporte inicial de nitrógeno suficiente para el crecimiento, seguido de la privación de nitrógeno

en el medio de cultivo, sólo se probó recientemente en *Chlorella minutissima*, por Tang *et al.*, (2011) para obtener una alta generación de biomasa y un alto contenido de lípidos. Este enfoque podría ser una buena estrategia para lograr un alto rendimiento en la producción de lípidos.

El fósforo es otro nutriente muy importante en el crecimiento de microalgas (Grobbelaar, 2004). Juega un papel principal en procesos metabólicos celulares como la incorporación de ortofosfato (Pi) para la formación de nucleótidos trifosfatos (ATP) altamente energéticos, generados por fotofosforilación en los cloroplastos, fosforilación oxidativa en las mitocondrias y el transporte de electrones de esos organelos (Cembella *et al.*, 1984). Además el fósforo participa en la formación de enzimas, proteínas, polisacaridos, polinucleótidos, glicerolípidos, glicolípidos, fosfolípidos y otros componentes estructurales necesarios para el crecimiento y desarrollo normal de las microalgas (Cembella *et al.*, 1984). Sin embargo, no todos los componentes del fósforo son biodisponibles (p. ej., aquellos en combinación con iones de metal) y por lo general deben ser suministrados en el medio de cultivo (Lee, 2004).

El agotamiento del fósforo en el medio de cultivo ha sido reportado como un aumento de  $\beta$ -caroteno en células de *Dunaliella* (Phadwal & Singh, 2003), aunque este aumento no es superior en comparación con el aumento reportado por la deficiencia de nitrógeno.

El hierro es un oligoelemento esencial y desempeña un papel importante en la composición bioquímica celular debido a sus propiedades oxido-reducción (Raven *et al.*, 1996; Lee, 2004). Tiene una implicancia en procesos

fundamentales, como la fotosíntesis, la respiración, la fijación de nitrógeno y la síntesis de ADN. El exceso de hierro se cree que genera estrés oxidativo (Estevez *et al.*, 2001), pero la limitación de hierro está asociada con una amplia reorganización del sistema fotosintético estudiada en *Dunaliella salina* (Varsano *et al.*, 2003), produciendo la contracción de los cloroplastos y la disminución de las membranas de tilacoides apiladas. También la C-ficocianina y la clorofila *a*, pueden ser degradadas cuando el hierro es limitante (Lee, 2004). Pocos estudios se han realizado para demostrar si el agotamiento de hierro aumenta la concentración de lípidos en las microalgas (Liu *et al.*, 2008), pudiendo ser un elemento clave en dicho aumento.

Otros metales traza (Mg, Ca, Mn, Zn Cu y Mb) y vitaminas, suelen complementar el medio de cultivo para reforzar el crecimiento de las microalgas (Lee, 2004).

### **1.2.3. Lípidos a partir de microalgas**

Las microalgas son capaces de adaptarse en un amplio rango de condiciones ambientales y esto se refleja en la excepcional variedad de patrones lipídicos, así como en la serie de compuestos inusuales que pueden sintetizar (Hu *et al.*, 2008; Harwood & Guschina, 2009).

Los lípidos son clasificados de acuerdo a su polaridad: los no-polares (lipofílicos), que dependen solo de las cadenas de carbono (ácidos grasos); y los polares (hidrofílicos) con grupos relacionados (grupos carboxílicos, alcoholes, carbohidratos, etc.; Griffiths & Harrison, 2009). No obstante, dentro de los

lípidos se pueden incluir, ésteres de cera, esteroides e hidrocarburos, así como derivados de isoprenos, tales como tocoferoles, carotenoides, terpenos, quinonas y pigmentos que contienen pirrol, como las clorofilas (Raven *et al.*, 1996; Griffiths & Harrison, 2009).

El grupo más importante para el consumo humano y producción de biodiesel son los lípidos no polares (lípidos neutros), donde podemos encontrar los triglicéridos y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), mientras que los lípidos polares son esencialmente glicéridos en que uno o más ácidos grasos han sido sustituidos por un grupo polar, por ejemplo; fosfolípidos y glicolípidos. En algas eucariotas es posible encontrar cadenas de carbonos muy largas (>20C), tales como los ácidos grasos poliinsaturados eicosapentaenoico, docosahexaenoico y el ácido araquidónico (Harwood & Guschina, 2009). También se encuentran los ácidos grasos de cadena media (10C -14C), y de cadena larga (16C -18C), importantes para la producción de biocombustibles.

La biosíntesis de ácidos grasos ocurre principalmente en el cloroplasto (Hu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009), cuyo paso principal es la carboxilación de acetil CoA dependiente de ATP para su conversión en malonil-CoA (Figura 1.4). La reacción está catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa clave en el proceso, ya que compromete el aporte de acetil-CoA hacia la biosíntesis de lípidos. La reacción anterior es seguida por ciclos de adición descarboxilativa de malonil-CoA a unidades acilo y  $\beta$ -reducción, catalizados por el sistema ácido graso sintetasa, hasta producir moléculas de 16C y 18C saturadas (Garibay Hernández *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010).

Los ácidos palmítico (16:0) y oleico (18:1*cis*-9) son los precursores de las moléculas poliinsaturadas, producidas mediante mecanismos de desaturación aerobia y elongación.

Por otro lado, ha sido propuesto que la biosíntesis de triacilglicéridos (TAG) en las algas, sucede en el citosol y en el retículo endoplásmico, esencialmente a través de la catálisis de acil-transferasas (Hu *et al.*, 2008; Garibay Hernández *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010).

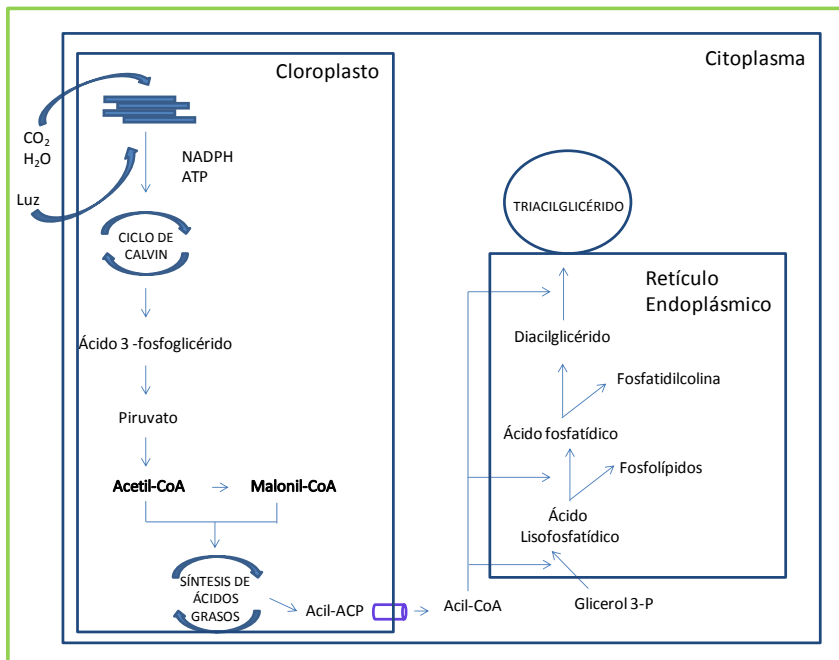


Figura 1.4. Síntesis de ácidos grasos en los cloroplastos y triacilglicéridos en el citoplasma. Adaptado a partir de Garibay Hernández *et al.* (2009).

Los ácidos grasos producidos en el cloroplasto son transferidos de manera secuencial desde la CoA a las posiciones 1, 2 del glicerol-3-fosfato, resultando en la formación de ácido fosfatídico (Figura 1.5), el cual es hidrolizado por la enzima fosfatidil fosfatasa para formar diacilglicerol (DAG), y finalmente con la transferencia a la posición 3 de un ácido graso proveniente de la CoA, se completa la formación de TAG (Hu *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010).

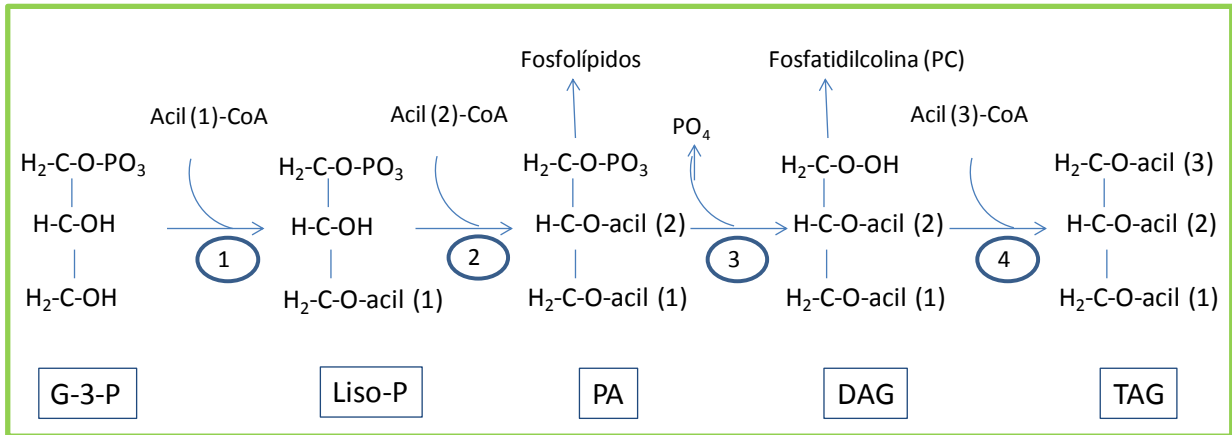


Figura 1.5. Esquema simplificado que muestra la ruta de biosíntesis de triglicéridos en las algas catalizada por las enzimas: (1) glicerol-3-fosfato aciltransferasa citosólica; (2) ácido liso-acil fosfatídico transferasa; (3) ácido fosfatídico fosfatasa; y (4) diacilglicerol acil -transferasa. Adaptado de Roessler *et al.*, 1994 en Huang *et al.*, (2010).

En condiciones normales de crecimiento, los lípidos de microalgas en su mayoría están presentes en forma de fosfolípidos en las membranas celulares (Griffiths, & Harrison, 2009). Sin embargo, algunas microalgas cuando son expuestas a condiciones de estrés (p. ej., falta de nutrientes o alta intensidad de luz) podrían acumular lípidos en forma de triglicéridos en los llamados glóbulos lipídicos (Wijffels & Barbosa, 2010).

A pesar de haber sido reportados altos contenidos lipídicos en algunas cepas de microalgas (Tabla 1.2), la eficiencia en la producción de biodiesel aun debe ser mejorada (Chisti, 2007). Por este motivo, el aumento de la concentración lipídica mediante estrés abiótico (luz, temperatura, nutrientes, etc.) es una alternativa promisorio que actualmente está siendo evaluada por varios autores (Gouveira & Oliveira, 2009; Hu *et al.*, 2008; Converti *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2011).

Tabla 1.2. Especies de microalgas marinas y de agua dulce con potencial en biodiesel. Adaptado de Rodolfi *et al.*, (2009).

<b>Microalga</b>	<b>Contenido lipidico (% biomasa)</b>
<b>Especies marinas</b>	
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M35	12,9
<i>Tetraselmis sp.</i> F&M-M34	14,7
<i>Nannocloropsis sp.</i> F&M-M24	30,9
<i>Ellipsoidion sp.</i> F&M-M31	27,4
<i>Isochrysis sp.</i> (T-ISO) CS 177	22,4
<i>Pavlova lutheri</i> CS 182	35,5
<i>Skeletonema sp.</i> CS 252	31,8
<i>Thalassiosira pseudonana</i> CS 173	20,6
<i>Skeletonema costatum</i> CS 181	21,1
<i>Chaetoceros muelleri</i> F&M-M43	33,6
<i>Chaetoceros calcitrans</i> CS 178	39,8
<b>Especies de agua dulce</b>	
<i>Chlorococcum sp.</i> UMACC 112	19,3
<i>Scenedesmus sp.</i> DM	21,1
<i>Chlorella sorokiniana</i> IAM-212	19,3
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11b	19,2
<i>Monodus subterraneus</i> UTEX 151	16,1

#### 1.2.4. Actividad antioxidante en Microalgas

La producción de radicales libres (p. ej. superóxido, óxido nítrico y radicales hidroxilo) y otras especies reactivas (p. ej. peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, y el ácido hipocloroso), ocurre en las células eucariotas, principalmente como resultado del metabolismo aeróbico (Fang *et al.*, 2002; Perry *et al.*, 2002). Los radicales libres son especies químicas altamente inestables por la presencia de un electrón impar en una de sus órbitas y generalmente están compuestas de oxígeno (Fang *et al.*, 2002). Cumplen funciones críticas en los organismos, tales como la transducción de señales, la transcripción de genes y la regulación de guanilato ciclasa soluble. Además, los radicales oxidativos y precursores oxidativos en forma de  $O_2$  y  $H_2O_2$  respectivamente, son altamente tóxicos, estando encargados de unirse y dar muerte a agentes extraños (ej. bacterias y virus) (Cheeseman & Slater, 1993). Otro ejemplo es el óxido nítrico (NO), que es una de las moléculas de señalización más extendida y participa en prácticamente todas las funciones celulares en el cuerpo (Fang *et al.*, 2002). Los niveles fisiológicos de NO producidos por las células endoteliales son esenciales para la regulación de la relajación y la proliferación de células vasculares en la musculatura lisa, la adhesión de leucocitos, la agregación plaquetaria, la angiogénesis, la trombosis, el tono vascular, y la hemodinámica. También el NO producido por las neuronas actúa como un neurotransmisor, y el NO generado por macrófagos activados es un importante mediador de la respuesta inmune (Fang *et al.*, 2002). Sin embargo, los radicales libres y otras especies reactivas, actúan como oxidantes e inhibidores de las enzimas que contienen un núcleo de hierro-azufre, causando la oxidación de biomoléculas como proteínas, aminoácidos, lípidos y

ADN, lo que conduce a la lesión celular y muerte (Cheeseman & Slater, 1993; Perry *et al.*, 2002, Fang *et al.*, 2002). No obstante, las células han desarrollado una gama completa de defensas antioxidantes para prevenir el aumento en la formación de radicales libres o limitar sus efectos perjudiciales. Algunas de ellas son: enzimas para descomponer peróxidos, proteínas para metales de transición y una serie de compuestos que inhiben la acción de los radicales libres (Fang *et al.*, 2002).

El aumento de radicales libres en las células humanas causado por estrés oxidativo, puede deberse al envejecimiento celular, la contaminación ambiental, el tabaquismo, la exposición a la radiación solar, las dietas ricas en grasas saturadas y pobres en proteínas, vitaminas y minerales (Fang *et al.*, 2002). El estrés oxidativo podría estar asociado a muchas enfermedades neurodegenerativas crónicas (p. ej., demencia con cuerpos de Lewy, Parkinson, Huntington, Alzheimer, etc.), principalmente en la población anciana (Li *et al.*, 2007; Pulok *et al.*, 2007). Por otra parte, enfermedades cardiovasculares, cáncer y cataratas han evidenciado experimental y epidemiológicamente la participación de radicales libres (Li *et al.*, 2007).

Con respecto a las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer disease*, AD), el daño histopatológico del estrés oxidativo, se debe a la sobrerregulación de las enzimas antioxidantes (Perry *et al.*, 2002). Las características patológicas de la AD incluyen los depósitos del péptido beta amiloide ( $A\beta$ ) en el plasma de plaquetas seniles, la formación de nudos de neurofibrillas intracelulares, y la pérdida de neuronas basales colinérgicas del cerebro anterior, dando lugar a reducciones en los marcadores colinérgicos, como los niveles de acetilcolina, la

acetilcolintransferasa y receptores muscarínicos y nicotínicos de acetilcolina (Weinreb *et al.*, 2011). La función principal de la acetilcolinesterasa (AChE) es poner término a la transmisión de impulsos nerviosos en la sinapsis colinérgica por la rápida hidrólisis de la acetilcolina (ACh); por lo tanto, la intervención de la acción de la acetilcolinesterasa y sus efectos mediante compuestos antioxidantes, serviría como una estrategia para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (AD), entre otras enfermedades neurodegenerativas (Fang *et al.*, 2002; Pulok *et al.*, 2007).

La medicina actual basada en la inhibición de la AChE, posee ciertos efectos adversos sobre los pacientes, como disturbios gastrointestinales y problemas con la biodisponibilidad (Pulok *et al.*, 2007). Por este motivo, algunos estudios han sido enfocados en la pesquisa de antioxidantes capaces de contrarrestar los efectos de los radicales libres en perjuicio de la actividad de la acetilcolina y sin causar efectos adversos (Custodio *et al.*, 2012)

Un antioxidante sintético ampliamente utilizado, es el BHT o butil hidroxitolueno (E-321) procedente de la industria petrolera. Se utiliza prácticamente siempre mezclado con el BHA (Li *et al.*, 2007; Sasidharan & Menon, 2011). Actualmente ha sido detectado su posible toxicidad y potencial efecto cancerígeno. Por este motivo, existe un interés en todo el mundo por encontrar nuevos y seguros antioxidantes provenientes de fuentes naturales, principalmente de origen vegetal y recientemente de algas y microalgas (Li *et al.*, 2007), por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados,  $\beta$ -caroteno, vitaminas, compuestos fenólicos y otros pigmentos, los cuales poseen

importantes propiedades antioxidantes (Miranda *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2007; Ibañez *et al.*, 2008).

Las microalgas tienen un amplio potencial de compuestos antioxidantes, debido a su gran diversidad, siendo mayor que el de plantas terrestres. Actualmente las microalgas forman parte del grupo de alimentos funcionales por la presencia de compuestos con propiedades antibacteriales, antivirales, antifúngicas y además con actividad antioxidante (Ibañez *et al.*, 2008). No todos los grupos de microalgas pueden ser usados como fuentes naturales de antioxidantes, debido a su gran variación en la concentración de compuestos objetivo, rendimiento, facilidad de cultivo, entre otros factores (Li *et al.*, 2007). Existen pocos estudios acerca de la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos en microalgas (Li *et al.*, 2007, Custodio *et al.*, 2012), siendo los compuestos fenólicos de mucha importancia en el control de enfermedades como el Alzheimer (Dillard & German, 2000). Sin embargo, la relación entre la concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en microalgas no ha sido bien establecida (Custodio *et al.*, 2012).

### 1.3. Producción de Microalgas a gran escala

#### 1.3.1. Sistemas de cultivo

La producción masiva de biomasa microalgal sin duda tiene un costo económico mayor que la producción de otros recursos vegetales para producir biocombustibles (Chisti, 2007). Principalmente el cultivo de microalgas ha sido llevado a cabo bajo dos tipos de sistemas de cultivo: sistemas abiertos o tanques de cultivo y sistemas cerrados o fotobiorreactores (Jorquera *et al.*, 2010; Harun *et al.*, 2010).

Dentro de los sistemas abiertos existe una gran variedad de piscinas o tanques de cultivo, de diverso material y diseño (Figura 1.6). Un ejemplo son los que tanques tipo canal que se caracterizan por poseer baja profundidad y paletas, que ayudan a la mezcla para evitar puntos anóxicos y poca disponibilidad de la luz dentro del sistema. Alrededor del 90% de la producción comercial mundial de microalgas se hace a través de sistemas abiertos, debido al bajo costo (Van Beilen, 2010). Sin embargo, los sistemas abiertos son menos favorables por proporcionar poco control frente a la contaminación por polvo, microorganismos, etc. (Tredici, 2004).



Figura 1.6. Sistemas de cultivo abiertos: A) Tanques tipo canales; B) Tanques circulares; C) Tanques sin agitación. Adaptado de *Chen et al.*, (2009)

Los sistemas cerrados o fotobiorreactores (Figura 1.7), generalmente son tubos o placas planas en los cuales pueden ser controlados parámetros como nutrientes, temperatura,  $CO_2$  disuelto y pH (*Chen et al*, 2009), siendo en este sentido, la ventaja comparativa frente a los sistemas abiertos.



Figura 1.7. Sistemas de cultivo tipo fotobiorreactores de paneles: A) sumergidos, prototipo de Bélgica. B) sumergidos, prototipo de USA. C) Paneles verdes, prototipo de Italia. Adaptado de *Wijffels & Barbosa* (2010).

A pesar de que los fotobiorreactores son más caros que los sistemas abiertos, son capaces de tener una mayor productividad por área de cultivo tal como se observa en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Productividad comparada entre sistemas de cultivo cerrado (fotobiorreactor) y sistema de cultivo abierto (estanques tipo canal). Adaptado de Chisti., (2007)

Variable	Fotobiorreactor	Tanques tipo Raceway
Producción anual de biomasa (kg)	100000	100000
Productividad volumetrica (kg m <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	1,535	0,117
Concentración de biomasa en medio de cultivo (kg m <sup>-3</sup> )	4	0,14
Rendimiento lipidico (m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> )	136,9 <sup>a</sup> 58,7 <sup>b</sup>	99,4 <sup>a</sup> 42,6 <sup>b</sup>
Area necesaria (m <sup>2</sup> )	5681	7828

<sup>a</sup> Basado en 70% de lípidos por peso de biomasa seca

<sup>b</sup> Basado en 30% de lípidos por peso de biomasa seca

### 1.3.2. Obtención de biomasa microalgal

Actualmente existen varios métodos para la extracción parcial o total del medio de cultivo en que crecen las microalgas (deshidratación) donde el producto final es una pasta (Figura 1.8). Las pastas de microalgas son usadas con fines extractivos de compuestos bioactivos para la industria farmacéutica, compuestos nutricionales para la industria alimenticia y lípidos para la industria de biocombustibles. Entre los métodos de deshidratación más usados se encuentran la floculación, centrifugación y filtración (Harun *et al.*, 2010).

La floculación es un método de deshidratación el cual funciona bajo un diferencial de cargas, ya que las células microalgales están cargadas negativamente (Molina Grima *et al.*, 2003). El medio de cultivo de microalgas es cargado catiónicamente por adición de un medio químico conocido como floculante. Este compuesto químico catiónico, coagula las algas sin afectar la composición y toxicidad del producto. Algunos tipos de floculantes incluyen  $Al_2(SO_4)_3$  (sulfato de aluminio),  $FeCl_3$  (cloruro de hierro) y  $Fe_2(SO_4)_3$  (sulfato férrico) (Harun *et al.*, 2010).

La centrifugación es el método preferido para el manejo de células algales (Molina Grima *et al.*, 2003). La centrifugación involucra la aceleración centrípeta para separar la biomasa algal del medio de cultivo. Una vez separados, la biomasa algal puede ser drenada para eliminar el exceso de medio de cultivo (Harun *et al.*, 2010). La centrifugación siendo un método eficiente de separar la biomasa del medio de cultivo, tiene sus limitaciones. Las altas fuerzas gravitatorias en el proceso de centrifugación, pueden causar daño a la estructura celular, y por otra parte el proceso tiene asociado un gran gasto de

energía cuando los volúmenes son muy altos (Molina Grima *et al.*, 2003; Harun, *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010).

La filtración es el método de manejo que puede ser más competitivo en comparación al resto. Existen varias formas de filtración, como la filtración de punto final, microfiltración, ultrafiltración, filtración por presión, filtración al vacío y filtración de flujo tangencial (TFF). Generalmente, en la filtración el medio algal traspasa una membrana o filtro dejando a la biomasa atrapada, el líquido es drenado y eliminado, obteniendo como producto final una pasta de alga (Molina *et al.*, 2003; Harun *et al.*, 2010).



Figura 1.8. Pasta de microalga separada de su medio de cultivo en una cinta transportadora. Pertenece a Cyanotech Corporation y adaptada desde Chisti, (2007)

#### 1.4. Biorefinería de microalgas para producción de Biodiesel

La Biorefinería es una instalación que integra los procesos de conversión de biomasa a través de tecnología especializada para producir combustibles y productos químicos de valor agregado, a partir de biomasa: un concepto análogo a las refinerías de petróleo actuales (Taylor, 2008).

Gran parte de los compuestos provenientes de microalgas y algas pueden ser convertidos en diferentes formas de combustibles, así como biogás, combustibles líquidos y gaseosos para transporte, keroseno, etanol, combustible para aviación y biohidrógeno, a través de la implementación de tecnologías de proceso como digestión anaeróbica, pirolisis, gasificación, disrupción catalítica y transesterificación enzimática o química (Subhara, 2010).

El concepto de biorefineria funciona con la noción de que varios productos de alto valor incrementen su rentabilidad, y así productos como el biodiesel, ayuden a disminuir los costos energéticos de los procesos de otros productos y las emisiones de GHG relativos a las instalaciones de plantas convencionales (Subhara, 2010).

Los pasos claves para la elaboración de biodiesel parten de la extracción de lípidos crudos desde la biomasa, usando solventes apolares como *n*-hexano y también otros solventes que pueden ser *n*-butanol, etanol, etc., los cuales pueden cambiar levemente la eficiencia lipídica extraída (Tran *et al.*, 2010). Posteriormente, los ácidos grasos existentes en forma de triacilglicéridos (TAG) son transformados en ésteres metílicos de la sigla en inglés (FAME), en

un proceso llamado transesterificación (Figura 1.9). En este proceso, los TAG reaccionan con un alcohol (metanol o etanol) para producir glicerol y ésteres metílicos. Para esta reacción puede ser usado un álcali, un ácido, una enzima o metanol supercrítico como catalizador (Harun *et al.*, 2010).

En una transesterificación alcalina, el catalizador utilizado puede ser KOH ó NaOH disuelto en metanol por agitación, siendo esta mezcla bombeada dentro de un reactor que contiene lípidos. El reactor es mantenido a 70°C por 2 horas con agitación vigorosa hasta terminar la transesterificación. Posterior a este periodo, se obtienen dos fases, en las cuales, la fase inferior corresponde a glicerol y la fase superior a ésteres metílicos. Seguidamente a la etapa de separación de las fases (que puede durar hasta 20 horas), los ésteres metílicos son cuidadosamente lavados con agua a un 5,5% de su volumen, bajo agitación. Un nuevo lavado se realiza con agua mas 1 g L<sup>-1</sup> de ácido tánico, a un 28% del volumen de los ésteres. El lavado es agitado suavemente con aire, que cuidadosamente se introduce en el fondo de la capa acuosa. El proceso continúa hasta que la capa de ésteres se puede distinguir claramente. Después de esto, la solución acuosa se elimina, y se añade agua a 28% del volumen de ésteres para el lavado final. En este momento, se obtiene el producto final o biodiesel (Gupta & Demirbas, 2010).

Siendo la catálisis básica el proceso más usado en la industria del biodiesel, uno de los inconvenientes que surgen al utilizar KOH ó NaOH, es que en presencia de agua los TGA pueden causar la reacción de saponización con los cationes K<sup>+</sup> ó Na<sup>+</sup>, formando jabón. El resultado es la reducción de la eficacia

del catalizador y la baja conversión de biomasa a biodiesel (Ehimen *et al.*, 2010).

Entre los catalizadores ácidos se encuentran el ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido sulfónico, los cuales tienen variados tiempos de reacción (Gupta & Demirbas, 2010). Al igual que en la transesterificación básica, el catalizador ácido se disuelve en metanol por agitación vigorosa y es bombeada al reactor que contiene los lípidos. La reacción se lleva a cabo típicamente entre 30 a 35°C y desde 1 hasta 6 horas.

Tran *et al.*, (2010) realizaron la transesterificación ácida para *Chlorella protothecoides*, utilizando diferentes concentraciones de ácido sulfúrico como catalizador (desde 255% a 100% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, basado en el peso real de los lípidos) y razones molares de metanol:lípidos desde 30:1 a 56:1. La temperatura en que se llevó a cabo la reacción fue de 90°C. Sin embargo, los resultados no fueron óptimos ya que según el autor la elevada concentración del ácido y la alta temperatura, podrían haber oxidado algunos de los lípidos.

Además de los métodos convencionales de transesterificación, también existe la transesterificación *in situ*, que según Chen *et al.* (2009), tiene la ventaja de ser directa sin tener que extraer y separar los lípidos de la biomasa previamente. La transesterificación *in situ* es más efectiva cuando los lípidos vienen de biomasa seca, y baja la eficiencia cuando la biomasa es más húmeda (Chen *et al.*, 2009). Un estudio realizado por Ehimen *et al.*, (2010), en *Chlorella* spp., indicó que al realizar una transesterificación ácida *in situ*, obtuvo una inhibición en el proceso cuando la biomasa presentó un contenido de agua de 115% (w/w) con respecto al peso de los lípidos, por el contrario, obtuvo buenos

rendimientos a partir de biomasa con una deshidratación del 73%. Debido a estos antecedentes, el proceso de biorefinería de microalgas para la conversión a biodiesel puede ser mejorado.

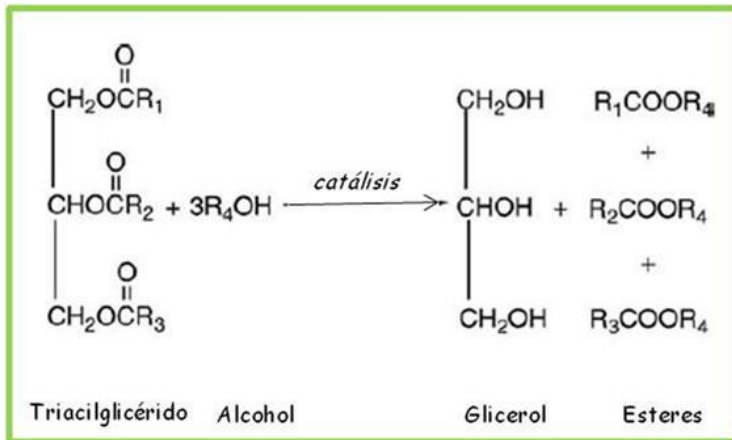


Figura 1.9. Proceso de transesterificación a través de catálisis. Adaptado de Gupta & Demirbas (2010).

## 1.5. Especies de microalgas utilizadas en este estudio

### 1.5.1. *Chlorella* sp.

Esta microalga perteneciente al dominio Eukaryota, fila Chlorophyta, orden Chlorellales y género *Chlorella*, es una microalga de color verde unicelular microscópica que mide entre 2 a 10  $\mu\text{m}$ . Poseen paredes lisas que contienen glucosamida (quitosano) y las células solitarias tienen un aspecto globoso o elipsoidal (Tomaselli, 2004).

La reproducción es asexual por autoesporas divididas entre dos y ocho por célula y son liberadas por la ruptura de la pared celular de sus progenitores. La reproducción sexual aún se desconoce (Tomaselli, 2004).

El género *Chlorella* se encuentra en todos los hábitats acuosos, tanto en agua dulce como agua marina. Estas microalgas han sido cultivadas por su buena adaptabilidad a diferentes ambientes. Por ejemplo, en aguas residuales municipales (Bhatnagar *et al*, 2010), en condiciones heterotróficas y mixotróficas (Heredia-Arroyo *et al.*, 2010). Además presentan un rápido crecimiento y elevados niveles de lípidos (entre 25 y 35%) (Tran *et al.*, 2010; Figura 1.10A).

### 1.5.2. *Tetraselmis chuii*

Esta especie perteneciente a la fila Chlorophyta, orden Chlorodendrales y al género *Tetraselmis*, es una microalga de color verde, unicelular y flagelada, de dimensiones entre los 10 y 20  $\mu\text{m}$ . Las células son más o menos comprimidas y ligeramente ovaladas. En el extremo anterior posee una invaginación de donde

salen cuatro flagelos formados en pares. Posee un solo cloroplasto (rara vez son dos cloroplastos) en forma de copa y por lo general con un pirenoide central. Sólo una mancha ocular está presente y se encuentra en uno de los lados aplanados de la célula (Lee, 2008).

La reproducción es asexual en la etapa en que las células no son móviles. Esta especie ha sido principalmente cultivada como alimento para pequeños crustáceos (Velázquez *et al.*, 2001), y para moluscos; como bioindicadores de metales pesados y agentes tóxicos (Cordero *et al.*, 2005). En los últimos años se ha convertido en una especie promisoriosa para la obtención de lípidos que podrían ser favorables para la producción de biodiesel y otros compuestos bioactivos de interés biotecnológico (Li *et al.*, 2007; Figura 1.10B).

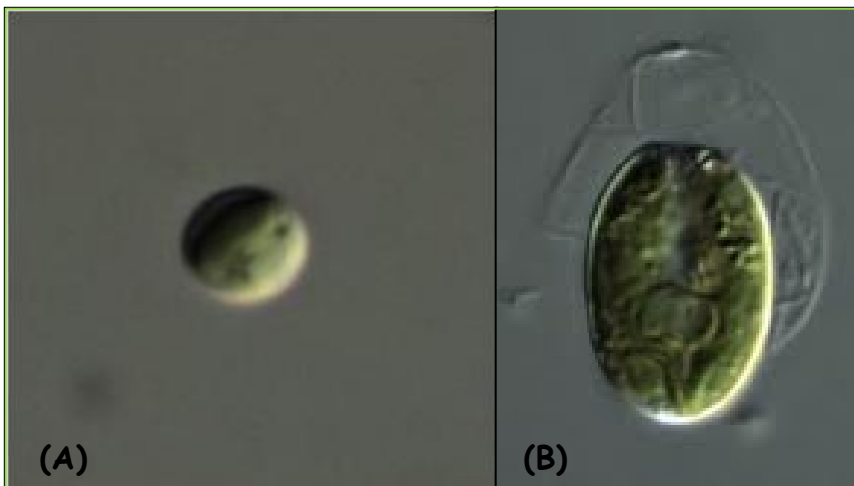


Figura 1.10. Especies utilizadas en este estudio: **A)** *Chlorella* sp.; **B)** *Tetraselmis chuii*. (Fuente: Marbiotech-CCMAR, UALG)

## 1.6. Objetivos

### 1.6.1. Objetivos generales

Estudiar los efectos de estrés abiótico en la producción de lípidos en *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii*, importantes para elaboración de biodiesel. Por otro lado, evaluar la actividad antioxidante de ambas especies, relevante en el tratamiento de enfermedades que involucren estrés oxidativo provocado por radicales libres.

### 1.6.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración celular de *Chlorella* sp., y *Tetraselmis chuii* cultivadas en sistemas tipo *batch*, para evaluar el crecimiento celular en el tiempo, identificando las distintas fases de la curva de crecimiento.

- En cada fase de crecimiento, determinar la concentración lipídica y el peso de biomasa seca. La concentración lipídica será evaluada a través del método directo o gravimetría. Además, en cada etapa de crecimiento será evaluada la concentración de lípidos neutros a través del método de tinción por fluorescencia rojo de Nilo en diferentes concentraciones celulares.

- Determinar la recta de calibración de lípidos, relacionando ambos métodos (método gravimétrico y método por tinción de fluorescencia rojo de Nilo), para obtener resultados de concentración de lípidos totales a partir de la detección de lípidos por el método indirecto rojo de Nilo.

- Someter a las microalgas *Chlorella* sp., y *T. chuii* a estrés abiótico en la fase exponencial tardía de cada ciclo de cultivo tipo *batch*, para determinar diferencias en los resultados de crecimiento celular, concentración de lípidos totales, perfil lipídico y peso de biomasa seca, comparados con sus respectivos controles.

- Por otra parte, se determinará el porcentaje de actividad antioxidante de las microalgas *Chlorella* sp. y *T. chuii*, a través de la secuestración de radicales libres, con la prueba de DPPH. Además, se determinará la máxima concentración media (IC<sub>50</sub>) en que los compuestos bioactivos reducen en un 50% la acción de radicales libres, involucrados en diversas enfermedades neurodegenerativas.

## 2. Materiales y Métodos

En el laboratorio "MarBiotech" de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Algarve, Portugal; fue realizado el presente trabajo, el cual fue dividido en las siguientes etapas:

- Cultivo de cepas de microalgas y crecimiento celular
- Análisis de lípidos totales
- Inducción a la producción de lípidos por estrés abióticos
- Evaluación del perfil lipídico
- Evaluación de actividad antioxidante

### 2.1. Cultivo de cepas de microalgas y crecimiento celular

Las cepas de *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii* fueron obtenidas desde cultivos unialgales pertenecientes a CCMAR-UALG.

El cultivo de *Chlorella* sp. y *T. chuii* fue iniciado en concentraciones de  $1 \times 10^6$  y  $2 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> respectivamente, debido a estimaciones previas sobre concentración mínima de crecimiento celular en cada especie. Ambos cultivos fueron iniciados en botellas transparentes con un volumen de 4 L. El cultivo de ambas microalgas fue mantenido bajo un flujo de densidad fotónica de  $35 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  y a 21°C (Figura 2.1).

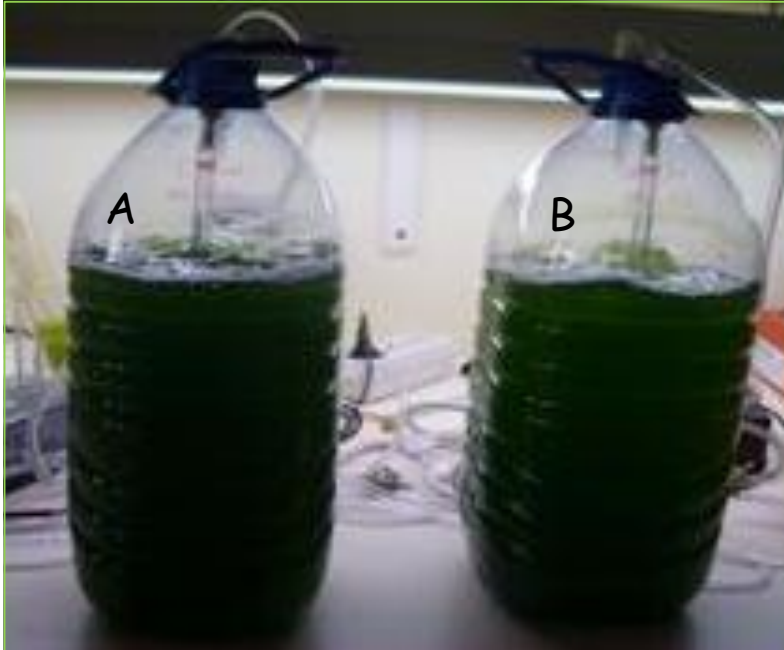


Figura 2.1. Microalgas cultivadas en condiciones normales de laboratorio: **A)** *Tetraselmis chuii*; **B)** *Chlorella* sp. (Fuente: Marbiotech-CCMAR, UAlg)

La aireación se mantuvo constante y el suministro de aire fue filtrado. El medio de cultivo utilizado fue Algal modificado de Fábregas *et al.* (1984), cuya composición se presenta en la Tabla 2.1. Cada solución de micronutrientes, macronutrientes y solución de Fe, fue preparada en agua destilada y autoclavada por separado a 120 °C, durante 20 minutos. Posteriormente, las soluciones fueron mezcladas para producir el medio de cultivo o solución de trabajo Algal. El agua de mar necesaria para el cultivo microalgal, fue esterilizada en una autoclave a 120 °C, durante 20 minutos.

Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo Algal, modificado de Fábregas *et al.*, (1994).

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
<b>Solución de micronutrientes</b>	
ZnCl <sub>2</sub>	1 mM
ZnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1 mM
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.1 mM
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.1 mM
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.1 mM
EDTA-Na	6.4 mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2 mM
<b>Solución de Fe</b>	
FeCl <sub>3</sub>	20 mM
EDTA-Na	20 mM
<b>Solución de macronutrientes</b>	
NaNO <sub>3</sub>	2 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM

## 2.2. Curva de crecimiento

Para obtener la curva de crecimiento y determinar el ciclo de cultivo de ambas cepas de microalgas, fue extraída una muestra de 1 mL cada dos días, con el fin de hacer el recuento celular en un hemocitómetro Neubauer mejorado, a través de un microscopio estereoscópico. La concentración celular fue determinada por la siguiente fórmula:

- Concentración celular (cel/mL) = (N° cel/0,4μL) × (10<sup>3</sup> μl/mL) × factor de dilución, para *T. chuii*
- Concentración celular (cel/ml) = (N° cel/0,1μL) × (10<sup>3</sup> μl/mL) × factor de dilución, para *Chlorella sp.*

La diferencia en el cálculo de concentración celular se debe a que las células de *T. chuii* fueron contadas en los cuadrantes (A) y las células de *Chlorella* sp., sólo en el cuadrante central (B), debido a su menor tamaño celular (Figura 2.2)

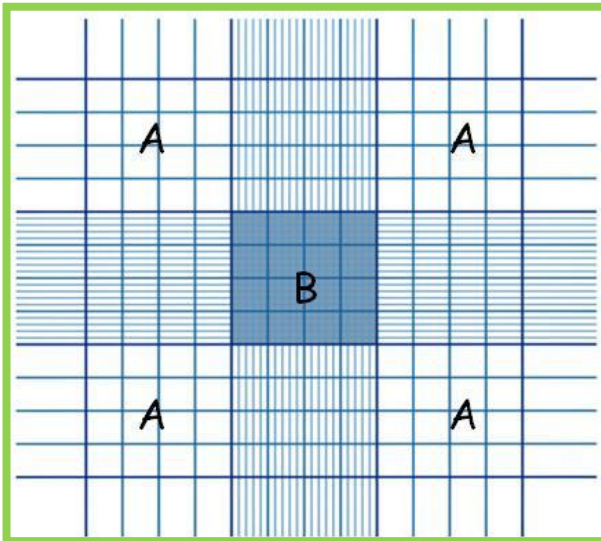


Figura 2.2. Cuadrantes de conteo celular en hemocitómetro. El cuadrante central (B) contiene  $25 \times 16 = 400$  pequeños cuadrantes. El área del cuadrante mayor (A) es:  $400 \times 0,0025 \text{ mm}^2 = 1 \text{ mm}^2$ . El volumen sobre cada cuadrante (A ó B) es:  $1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ } \mu\text{l}$

La tasa de crecimiento (Lee & Shen, 2004), fue calculada de acuerdo a cada fase de crecimiento celular (Figura 2.3), con la siguiente fórmula:

$$\mu = (1/n) * \ln (X_m/X_0)$$

Donde:

n= número de días de cultivo celular

$X_m$ = concentración celular final

$X_0$ = concentración celular inicial

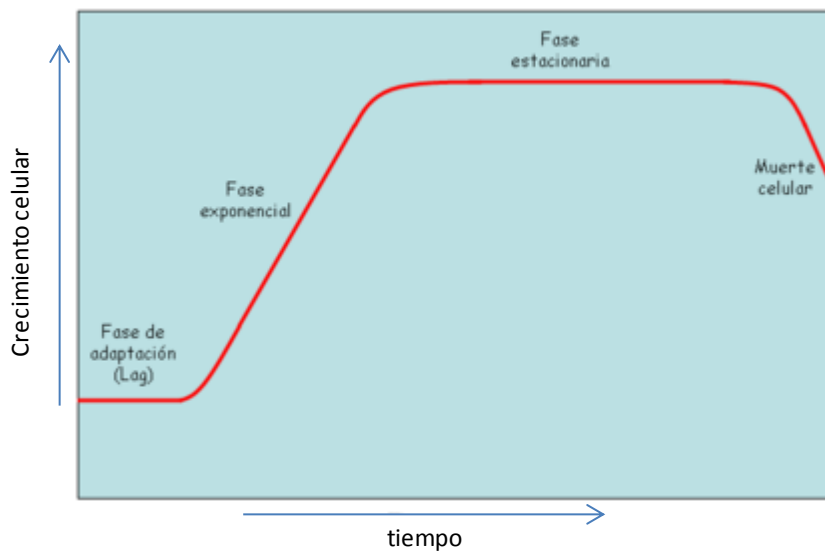


Figura 2.3. Esquema sobre la curva de crecimiento celular en microalgas, identificando las diferentes fases de crecimiento.

### 2.3. Determinación del peso seco en biomasa microalgal

Fue determinado el peso seco de biomasa para las especies en cultivo a través del método de filtración.

Un inóculo de volumen conocido fue tomado a partir de cada cultivo de microalga, y filtrado a través de papel filtro de fibra de vidrio (1 µm de poro), previamente lavado con agua destilada y secado a 60 °C durante al menos 3 horas, y desecado por 10 min. La experiencia se realizó en triplicado y se evaluó el peso seco de la microalga filtrada en el papel, (secada a 60 °C por 72 horas, hasta que su peso quedara uniforme, y desecada por 10 min), en una balanza analítica (0,0001 g de precisión). La diferencia en el peso seco fue estimada por la siguiente fórmula:

$$\text{Peso seco (g/L)} = \frac{\text{peso seco final} - \text{peso seco inicial}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

Donde: Peso seco final = papel filtro con células de microalgas

Peso seco inicial = papel filtro sin células de microalgas

### 2.4 Análisis de lípidos totales

#### 2.4.1 Método Gravimétrico

Para la determinación y análisis de lípidos totales, fue utilizado el método gravimétrico de Bligh & Dyer (1959) y modificado en el Centro de

Acuicultura SINTEF, en Trondheim, Noruega. En este método los lípidos son extraídos a través de los solventes metanol, cloroformo y agua (Smedes & Thomasen, 1996).

Desde el cultivo microalgal de *T. chuii* y *Chlorella* sp., descritos en el capítulo 2.1; fueron tomadas cuatro muestras con 50 mL cada una, en la fase *lag*, exponencial, exponencial tardía, estacionaria y estacionaria tardía (ver Figura 2.3). Cada muestra en tubos falcon de 50 mL de capacidad, fueron centrifugados a  $5000 \times g$  por 10 min. Eliminado el sobrenadante, la biomasa fue congelada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que las muestras fueran tratadas.

Posteriormente las muestras se descongelaron y adicionaron 0,8mL de agua destilada para disolver la biomasa, por un periodo de 20 min aprox. Cada muestra fue traspasada a tubos de extracción de lípidos (15 mL de capacidad y material de vidrio).

Los siguientes pasos fueron realizados secuencialmente: Se adicionaron 2 mL de metanol y 1 mL de cloroformo. Dentro de un recipiente con hielo, las muestras en los tubos de extracción fueron enfriadas y homogenizadas a velocidad máxima en un dispersador IKA Ultra-Thurrax por 60s; enseguida se adicionó 1 mL de cloroformo y nuevamente fueron homogenizadas por 30s. Se adicionó 1 mL de agua destilada y homogenizó durante 30s. Luego, las muestras fueron centrifugadas a  $2000 \times g$  y a temperatura ambiente por 10 min.

Al término de la centrifugación, las muestras presentaron dos fases: en la parte superior el metanol, agua y restos de microalgas, y en la parte inferior los lípidos en cloroformo presentando un color verde translúcido. El extracto

de lípidos fue removido cuidadosamente por medio de una pipeta hacia nuevos tubos de vidrio (15 mL de capacidad).

Paralelamente, los tubos para pesaje de lípidos (1,5 mL de capacidad y material de vidrio) fueron secados en un baño seco VWR-Digital, a 60 °C por al menos 3h. A continuación, los tubos fueron desecados por 3h más, y pesados en una balanza analítica con 0,001 mg de precisión.

Fue removido 1 mL de cada extracto de lípido hacia los tubos previamente pesados (1,5 mL de capacidad). Los extractos fueron secados en un baño seco VWR-Digital Heating, a 60 °C por 3h. Una vez que el cloroformo fue totalmente evaporado, las muestras fueron llevadas a un desecador por 3 h y pesadas en una balanza analítica 0,001 mg de precisión. El porcentaje de lípidos fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ lipidos totales } = \frac{((\text{peso final} - \text{peso inicial}) * (\text{Volumen de la muestra}/2)) * 100}{\text{peso biomasa seca}}$$

Donde:

Peso final = tubo de pesaje de lípidos con lípidos (mg),

Peso inicial = tubo de pesaje de lípidos sin lípidos (mg),

Volumen de la muestra = que corresponde a 1 mL de lípidos disueltos en cloroformo. (Nótese que el volumen total de lípidos en cloroformo fue 2 mL),

Peso biomasa seca = biomasa seca total de microalgas

### 2.4.2. Determinación de lípidos por fluorescencia

Los lípidos fueron determinados a través de la tinción de fluorescencia liposoluble rojo de Nilo (Figura 2.4), que consiste en la penetración celular de la tinción por medio de DMSO, un compuesto capaz de atravesar las paredes celulares. Una vez dentro de la célula, la tinción tiene gran afinidad por los lípidos apolares.

Para determinar la concentración de lípidos fue preparada una solución madre de rojo de Nilo (R.N.) en DMSO ( $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ) a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  (0,08 M).

Desde la solución stock y bajo oscuridad se preparó una solución de trabajo con un 25% de DMSO y 74% de agua destilada.

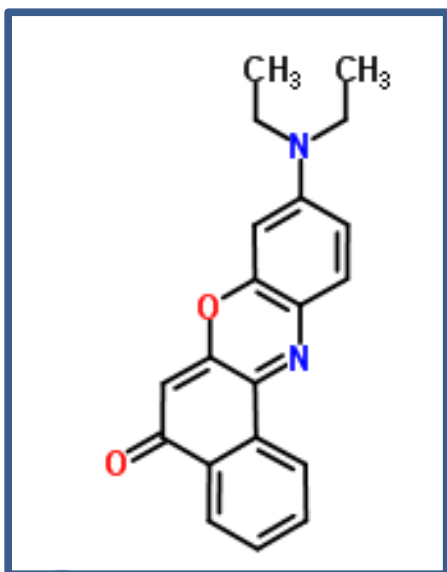


Figura 2.4. Estructura química de la molécula rojo de Nilo (<http://www.chemspider.com>)

Los inóculos de ambas microalgas fueron obtenidos desde los cultivos descritos en el capítulo 2.1 y en las mismas etapas en que fue realizada la determinación de lípidos por gravimetría. Los inóculos fueron diluidos en medio de cultivo a diferentes concentraciones (1:10, 1:5, 1:1, 1) y puestos en una placa negra de 96 pozos. Seguidamente, cada muestra en 3 replicados, fueron diluidas en la solución de trabajo de R.N. en una proporción de 1:6, para completar 300  $\mu\text{L}$  en la placa de 96 pozos (50  $\mu\text{L}$  de microalga diluida y 250  $\mu\text{L}$  de solución R.N.). Además, fue realizado un control negativo que consistió en medio de cultivo y solución R.N. y un control positivo que consistió en microalga y medio de cultivo. Este último control mediría la autofluorescencia de las microalgas. La placa fue homogenizada en un vortex (120 rpm) por 10 min, e incubada a 60 °C por 10 min.

La lectura de fluorescencia fue realizada en un lector de microplacas (Biotek Synergy 4) en un espectro de 530 nm de excitación y 580 nm de emisión.

Los resultados de concentración de lípidos obtenidos por el método gravimétrico y rojo de Nilo, fueron correlacionados para obtener una recta de calibración. A partir de esta recta de calibración se podría extrapolar los valores de concentración de lípidos a partir de fluorescencia, para obtener resultados de concentración de lípidos totales en células microalgales de ensayos posteriores.

### 2.4.3 Evaluación del perfil lipídico

El perfil lipídico fue evaluado por medio de cromatografía gaseosa con espectrofotometría de masa (GC-MS). Todo el material usado fue previamente descontaminado con 2% de Hextran MA01 (detergente alcalino) y el material de plástico fue descartado.

Un volumen equivalente a 0,1 g de peso seco fue extraído y centrifugado a  $5000 \times g$  por 5 min a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego, fueron adicionados 1,5 mL de solución de derivatización (metanol y cloruro de acetilo, 20:1 v/v) y transferidos a viales de derivatización. Cada vial fue colocado dentro de un recipiente con hielo para desagregar las células por medio de un dispersador IKA Ultra-Thurrax por 1,5 min. Al término de este periodo, 1 mL hexano fue adicionado. Los viales fueron bien cerrados y puestos en un baño húmedo a  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 min.

Las muestras fueron enfriadas en hielo y transferidas a frascos de centrifugación (50 mL de capacidad). Se adicionó 1 mL de agua destilada y se agitó en un vortex por 1,5 min. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a  $1000 \times g$ ,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Dos fases separadas fueron visibles (fase acuosa y fase orgánica). La fase orgánica fue extraída y transferida hacia nuevos frascos de vidrio (15 mL capacidad). Se adicionaron 3 mL más de hexano, se agitó en un vortex por 1,5 min y se centrifugó a  $1000 \times g$ ,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Este procedimiento fue repetido hasta retirar todo el extracto. Cada muestra fue realizada en triplicado y guardadas a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta un posterior tratamiento.

En un evaporador rotatorio IKA RV 10 Digital-VWR, las muestras fueron reducidas y transferidas a nuevos viales (20 mL). El exceso de agua fue

removido con sulfato de sodio y subsecuentemente, las muestras fueron filtradas con un filtro de jeringa (0,45 mm de poro), hacia los viales para cromatografía previamente pesados. Las muestras concentradas con una suave corriente de nitrógeno evaporaron el hexano totalmente. Los viales fueron pesados nuevamente con la fracción total de lípidos.

La identificación y cuantificación de ésteres metílicos fue llevada a cabo por GC-MS (Cromatografía Gaseosa con Espectrofotometría de Masa) "Agilent Technologies 6890 Network GC System, 5973 Inert Mass Selective Detector". La separación de diferentes compuestos se obtuvo usando un programa de temperatura específico para ésteres metílicos de ácidos grasos (Figura 2.5). La cuantificación se efectuó con rectas de calibración efectuadas con un patrón de calibración de ésteres metílicos de ácidos grasos conocidos (Tabla 2.2).

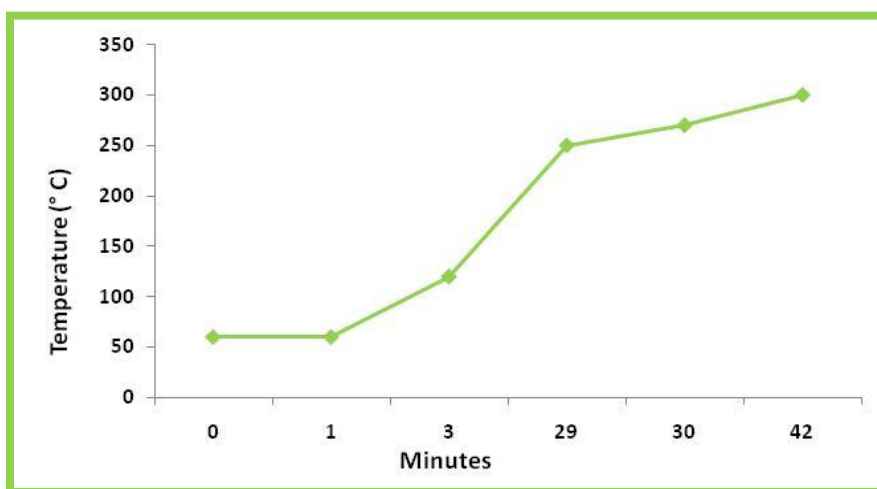


Figura 2.5. Programa de temperatura para GC-MS

Tabla 2.2. Patrón de calibración con ecuación de la recta, coeficiente de determinación  $R^2$  y tiempo de retención.

Compuesto	Ecuación	$R^2$	Tiempo de retención (min)
<b>C6:0</b>	$y = 1E+09x - 366811$	0,9978	3,019
<b>C8:0</b>	$y = 2E+09x + 203279$	0,9965	4,595
<b>C10:0</b>	$y = 2E+09x - 347253$	0,9983	7,059
<b>C11:0</b>	$y = 2E+09x - 525781$	0,999	8,732
<b>C12:0</b>	$y = 2E+09x - 624370$	0,9983	10,625
<b>C13:0</b>	$y = 2E+09x - 617972$	0,9987	12,627
<b>C14:1</b>	$y = 2E+09x - 1E+06$	0,9986	14,397
<b>C14:0</b>	$y = 2E+09x - 829068$	0,9984	14,665
<b>C15:1</b>	$y = 2E+09x - 1E+06$	0,9988	16,429
<b>C15:0</b>	$y = 2E+09x - 879453$	0,9987	16,691
<b>C16:1</b>	$y = 2E+09x - 1E+06$	0,9984	18,237
<b>C16:0</b>	$y = 2E+09x - 1E+06$	0,9984	18,675
<b>C17:1</b>	$y = 2E+09x - 1E+06$	0,9989	20,165
<b>C17:0</b>	$y = 2E+09x - 1E+06$	0,9982	20,585
<b>C18:3n6</b>	$y = 1E+09x - 2E+06$	0,9995	21,474
<b>C18:2n6</b>	$y = 1E+09x - 1E+06$	0,9989	21,796
<b>C18:1n9 c</b>	$y = 3E+09x - 4E+06$	0,9982	21,936
<b>C18:1n9 t</b>	$y = 2E+09x - 1E+06$	0,9983	22,058
<b>C18:0</b>	$y = 2E+09x - 1E+06$	0,9981	22,429
<b>C20:4n6</b>	$y = 9E+08x - 2E+06$	0,9996	24,692
<b>C20:5n3</b>	$y = 8E+08x - 1E+06$	0,9987	24,747
<b>C20:3n3/C20:3n6</b>	$y = 9E+08x - 1E+06$	0,9999	24,991
<b>C20:2n6</b>	$y = 1E+09x - 2E+06$	0,9934	25,343
<b>C20:1n9</b>	$y = 2E+09x - 2E+06$	0,9985	25,453
<b>C20:0</b>	$y = 1E+09x - 2E+06$	0,9974	25,915
<b>C21:0</b>	$y = 1E+09x - 1E+06$	0,9986	27,558
<b>C22:6n3</b>	$y = 4E+08x - 1E+06$	0,9975	27,814
<b>C22:1n9</b>	$y = 8E+08x - 1E+06$	0,9995	28,684
<b>C22:0</b>	$y = 8E+08x - 863254$	0,9643	29,14
<b>C23:0</b>	$y = 6E+08x - 779356$	0,9987	30,308
<b>C24:1</b>	$y = 4E+08x - 753105$	0,999	31,16
<b>C24:0</b>	$y = 5E+08x - 1E+06$	0,9995	31,471

## 2.5. Estudio de inducción a la producción de lípidos por estrés abiótico

Ambas especies de microalgas fueron sometidas a diferentes tipos de estrés abiótico con el fin de aumentar la producción de lípidos:

- Incremento en la intensidad luminosa
- Depleción en la concentración de nitratos
- Depleción en la concentración de hierro

El estrés fue aplicado en la fase exponencial tardía del ciclo de crecimiento para ambas microalgas, correspondiendo al día 14, para *Chlorella* sp. y día 10 para *T. chuii*, luego de iniciado el cultivo. Un control fue realizado en óptimas condiciones de luz, concentración de nitratos y concentración de hierro.

Todos los ensayos fueron llevados a cabo en una cámara de ambiente controlado (ClimaCell-MMM), para asegurar la estabilidad de luz y temperatura (25 °C y 32  $\mu\text{mol s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ).

Los ensayos se realizaron en tubos de 100 mL de capacidad y en triplicado (Figura 2.6), usando medio de cultivo Agal descrito anteriormente, con las modificaciones necesarias para cada estrés. La concentración celular inicial fue  $1 \times 10^6$  y  $2 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> para *Chlorella* sp. y *T. chuii*, respectivamente, en un volumen máximo de 70 mL por cada tubo.

Los tubos de ensayo fueron cerrados con tapones de goma perforados con dos agujas de jeringa para asegurar la entrada y salida de aire. La entrada de aire fue provista por una bomba de acuario (2 W) conectada a una manguera de acuario (6 mm de diámetro). El aire de entrada fue esterilizado a través de un filtro de jeringa (0.45  $\mu\text{m}$  de poro). Las burbujas de aire fueron

uniformemente distribuidas dentro de cada tubo de ensayo por medio de micro tubos y micro capilares conectados a la aguja de jeringa esterilizada.

Cada dos días el agua evaporada fue reemplazada por agua destilada y se tomaron alícuotas de 1 mL para determinar la concentración celular y concentración de lípidos por fluorescencia. En el último día de cultivo fue determinado el peso seco. La tasa de crecimiento específica, salinidad, pH y perfil lipídico, también fueron determinados de acuerdo a lo descrito en el capítulo 2.3.

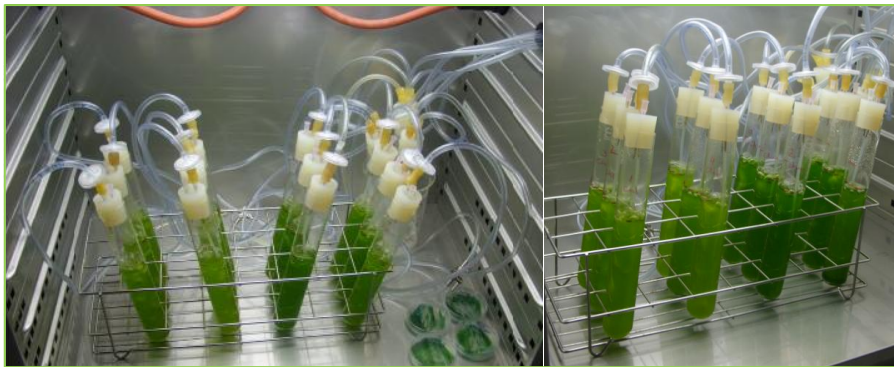


Figura 2.6. *Chlorella* sp. y *T. chuii* fueron cultivadas en seis tubos de ensayo en una cámara con ambiente controlado. Ambas fotografías muestran el mismo ensayo pero en diferente ángulo.

### 2.5.1 Incremento en la intensidad luminosa

Para evaluar el efecto del incremento en la intensidad de la luz, tres tubos de ensayo fueron mantenidos en las condiciones descritas anteriormente (capítulo 2.4). En la etapa exponencial tardía (día 14 de cultivo), la intensidad de luz fue aumentada a  $59 \mu\text{mol s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  dentro de la cámara de ambiente controlado para ambas especies hasta la etapa estacionaria tardía. El resto de los parámetros se mantuvieron constantes y la toma de muestras para conteo celular, fluorescencia, peso seco, tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), salinidad, pH y perfil lipídico fueron realizados como describe el capítulo 2.3.

### 2.5.2 Depleción de la concentración de Nitrato

El mismo procedimiento descrito en el capítulo 2.3., fue realizado para el ensayo "depleción de nitratos" en ambas especies, hasta la fase exponencial tardía del ciclo de cultivo. En este punto, cada tubo de ensayo fue centrifugado a  $1000 \times g$  por 5 min para eliminar el medio de cultivo, el cual fue reemplazado por un nuevo medio de cultivo en el mismo volumen. Tres tubos fueron reemplazados con medio de cultivo normal (ensayo "control nitrato"), y tres tubos fueron reemplazados por medio de cultivo con un 1/4 de nitratos de la concentración normal (ensayo "estrés nitrato"). El resto de los parámetros se mantuvieron constantes y la toma de muestras para conteo celular, fluorescencia, peso seco, tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), salinidad, pH y perfil lipídico fueron realizados como describe el capítulo 2.3.

La concentración de nitratos fue analizada a través de absorvancia para ambas especies *Chlorella* sp. y *T. chuii*, en la fase exponencial tardía y fase estacionaria tardía. El sobrenadante de cada muestra fue obtenido por centrifugación a  $5000 \times g$ , for 10 min y transferidos  $100 \mu\text{L}$  a tubos eppendorf en triplicado. Posteriormente, fueron adicionados  $900 \mu\text{L}$  NaCl (13%) y  $20 \mu\text{L}$  HCl (1M). Las muestras fueron traspasadas a cubetas de cuarzo y leídas en un espectofotómetro con una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 220 y 275 nm. El cálculo fue realizado con las siguientes formulas:

Absorbancia (A) = 220 nm - 275 nm

Concentración de Nitratos (mM) =  $(0,3558 * (A - 0,0093)) * 10$

### 2.5.3. Depleción de la concentración de Hierro

El mismo procedimiento del ensayo control fue llevado a cabo hasta la fase exponencial tardía del ciclo de cultivo (capítulo 2.3), en ambas especies de microalgas. En este punto, cada tubo fue centrifugado a  $1000 \times g$  por 5 min para eliminar el medio de cultivo, el cual fue reemplazado en el mismo volumen, por un nuevo medio de cultivo. Tres tubos fueron reemplazados con medio de cultivo Algal- $1,5 \mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ + EDTA-Na  $6 \mu\text{M}$  (ensayo "control Fe"), y otros tres fueron reemplazados por medio de cultivo Algal- $1,5 \mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ + EDTA-Na  $6 \mu\text{M}$  más un quelante de Fe, deferroxamine (DFB) Sigma-Aldrich, Inc., a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  (ensayo "estrés Fe"). El resto de los parámetros se mantuvieron constantes y la toma de muestras para conteo celular y

determinación de lípidos neutros fueron realizados. El peso seco, tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), salinidad y pH fueron determinadas.

## **2.6. Evaluación de actividad antioxidante**

### **2.6.1. Extracción de compuestos antioxidantes**

La extracción de compuestos antioxidantes provenientes de las microalgas *Chlorella* sp. y *T. chuii*, fue realizada con hexano (solvente apolar, constante dieléctrica: 2,0) y diclorometano (DCM) (polaridad intermedia, constante dieléctrica: 9,1).

Previamente las microalgas fueron liofilizadas y 3 g se diluyeron en 30 mL de cada solvente. Los extractos se realizaron en triplicado y tratados en un dispersador IKA Ultra-Thurrax para la desagregación celular por 2 min. Seguidamente, las muestras fueron agitadas con un agitador vortex por 1 min y centrifugadas a  $5000 \times g$  por 15 min. El sobrenadante fue filtrado con papel filtro (Whatman nº 4). Previamente, cuatro frascos de evaporación limpios fueron pesados para contener la solución filtrada.

### **2.6.2. Fase de Evaporación**

Cada extracto fue concentrado en un evaporador rotatorio IKA RV 10 Digital -VWR. Los extractos con solvente hexano fueron evaporados a 60 °C y los extractos con solvente DCM a 40 °C. Una vez evaporado todo el solvente de las muestras, cada frasco fue pesado nuevamente para obtener la fracción

total del extracto. Posteriormente cada extracto fue diluido en una solución con DMSO (50mg/mL).

### **2.6.3. Actividad secuestradora de radicales libres (*Radical scavenging activity, RSA*)**

La actividad secuestradora de radicales libres (RSA) fue determinada por el radical estable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) de acuerdo al método de Brand-Williams *et al.*, (1995) y adaptado a escala de microplaca por Moreno *et al.*, (2006), en donde el radical DPPH se reducirá por medio de un agente antioxidante a testear.

Desde la solución stock (50 mg/mL) fueron extraídas muestras (22  $\mu$ L) diluidas en tres concentraciones: 10- 5 y 1 mg mL<sup>-1</sup>; y mezcladas con 200  $\mu$ L de una solución de DPPH (120  $\mu$ M) en metanol. La mezcla (222  $\mu$ L) fue llevada a una placa con 96 pozos de microtitulación. También fue realizado un control negativo (22  $\mu$ L DMSO + 200  $\mu$ L DPPH), un control positivo (22  $\mu$ L hidroxitolueno butilado (BHT) + 200  $\mu$ L DPPH) y un blanco de color (22  $\mu$ L muestra de cada concentración + 200  $\mu$ L DMSO).

La placa de 96 pozos fue incubada en oscuridad por 30 min y la absorbancia fue medida a 517 nm en un lector de microplacas (Biotek Synergy 4).

Los resultados fueron expresados como actividad antioxidante (%) relativo al control negativo. El porcentaje de inhibición fue calculado y expresado por la siguiente fórmula:

Actividad antioxidante (AA) =  $Abs_{517nm} - CB$

% de inhibición =  $100 - ((AA/NC) * 100)$

Donde:

$Abs_{517nm}$  = Absorbancia de cada muestra,

CB = Blanco de color,

NC = Control negativo

## 2.7. Análisis Estadístico

El crecimiento celular entre cada estrés y su control, fue analizado por un test de medias paramétrico Test *t-Student*.

La concentración de lípidos totales y fluorescencia de lípidos neutros, fueron relacionados a través de una correlación de Pearson, seguidamente la influencia de una variable con respecto a la otra (lípidos totales vs fluorescencia de lípidos neutros) fue analizada por una regresión lineal.

Los tratamientos de estrés abióticos fueron representados como la media  $\pm$  desviación estándar de la media (DS) y evaluados estadísticamente a través del test de medias Test *t-student* para determinar si no existieron diferencias significativas en cada fase de cultivo con respecto a su ensayo control ( $p < 0,05$ ).

Todos los análisis se realizaron por medio del software SPSS 17.0 Inc.

Los resultados de actividad antioxidante, fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (ES) y se analizaron por el test paramétrico ANOVA de un factor para evaluar si existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre y dentro de los porcentajes de actividad antioxidante en las tres concentraciones de extractos, con ambos solventes (hexano y DCM). Las diferencias significativas entre medias fueron analizadas por el test de comparaciones múltiples, Scheffe. Los análisis fueron realizados por medio del software SPSS 17.0, Inc. Además fue calculada la máxima concentración media ( $IC_{50}$ ) a través de una regresión no lineal con el software GraphPad Prism 5.0 ®.

### 3. Resultados

#### 3.1. Cultivo de cepas de *Clhorella* sp. y *Tetraselmis chuii*

##### 3.1.1 Crecimiento celular

El crecimiento celular de *Clhorella* sp., fué medido durante 23 días. La fase de latencia o fase "Lag", tuvo una corta duración (< 24 h), aumentando su crecimiento de forma exponencial hasta el día 16, en que comenzó la fase estacionaria (Figura 3.1A). Una muestra visual del declinar del cultivo, fue su aspecto, el cual se tornó de un color verde-amarillento. La tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), medida durante la fase exponencial de cultivo, fue de 0,13 d<sup>-1</sup>. El pH inicial y final fue 8,4 y 7,9; respectivamente. La salinidad fue constante en 35‰.

El crecimiento celular de *Tetraselmis chuii* fue medido durante 16 días en los cuales se observa una fase de latencia o fase "Lag" en los dos primeros días, luego comienza la fase exponencial hasta el día 12 en que entra a la fase estacionaria (Figura 3.1B). La tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ), medida durante la fase exponencial del ciclo de cultivo, fue de 0,25 d<sup>-1</sup>. El pH inicial fue de 8,2 y final de 7,6. La salinidad fue de 35‰.

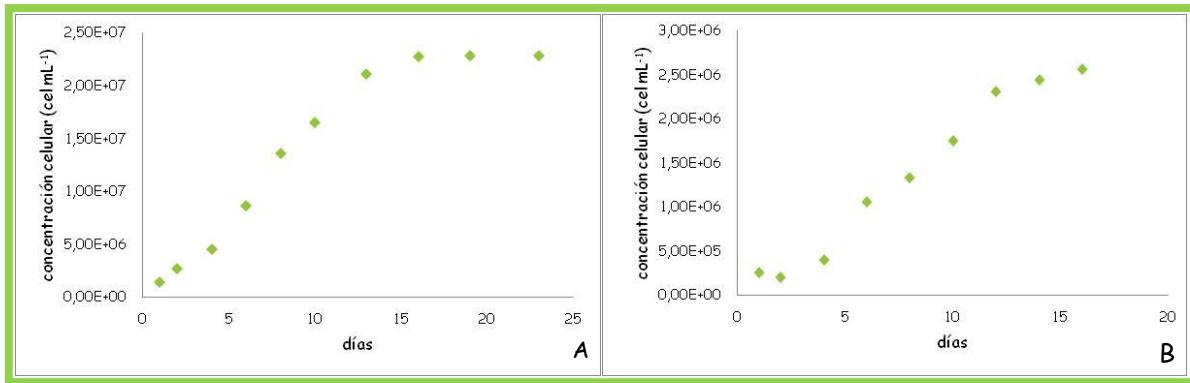


Figura 3.1. Crecimiento celular en: *Chlorella* sp., durante 23 días de cultivo (A), y *Tetraselmis chuii*, durante 16 días de cultivo (B).

## 3.2. Determinación de lípidos

### 3.2.1. Lípidos Totales

La cuantificación de lípidos totales en *Chlorella* sp., por el método gravimétrico, presentó la máxima concentración de lípidos en el día 23 del ciclo de crecimiento celular, correspondiente a la fase estacionaria tardía con un 2,4% de lípidos totales por peso de biomasa seca (Figura 3.2).

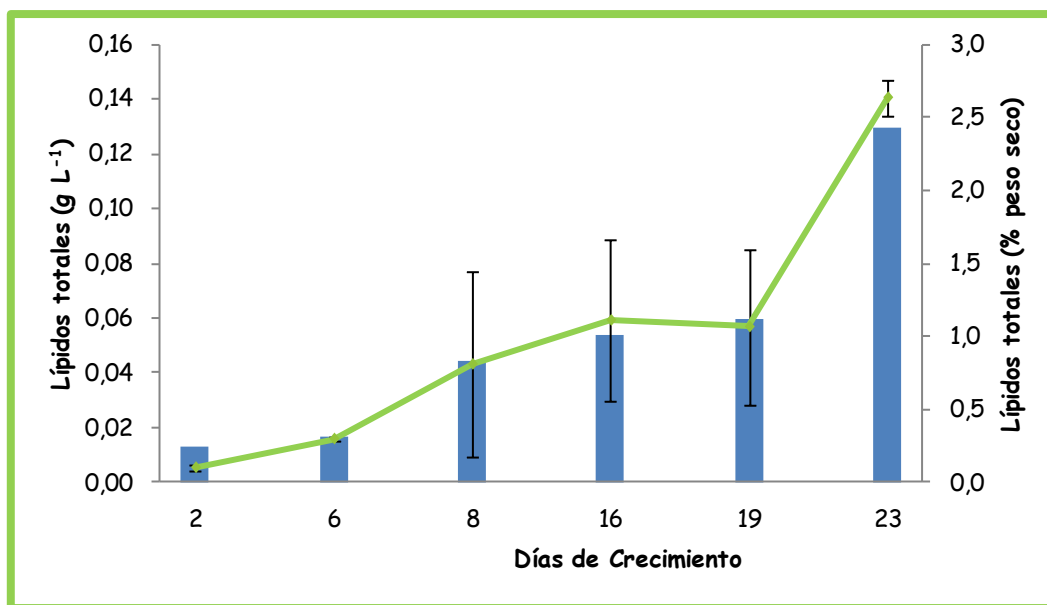


Figura 3.2. Lípidos totales de *Chlorella* sp., durante el ciclo de crecimiento. La línea muestra las medias de lípidos totales en (g L<sup>-1</sup>) y sus desviaciones estándar, las barras muestran el porcentaje de lípidos por peso seco de biomasa.

Para *T. chuii*, la mayor concentración de lípidos totales cuantificados por el método gravimétrico durante el ciclo de crecimiento celular, estuvo presente en el día 12, correspondiente a la fase estacionaria con un 0,7% de lípidos por peso seco de biomasa (Figura 3.3).

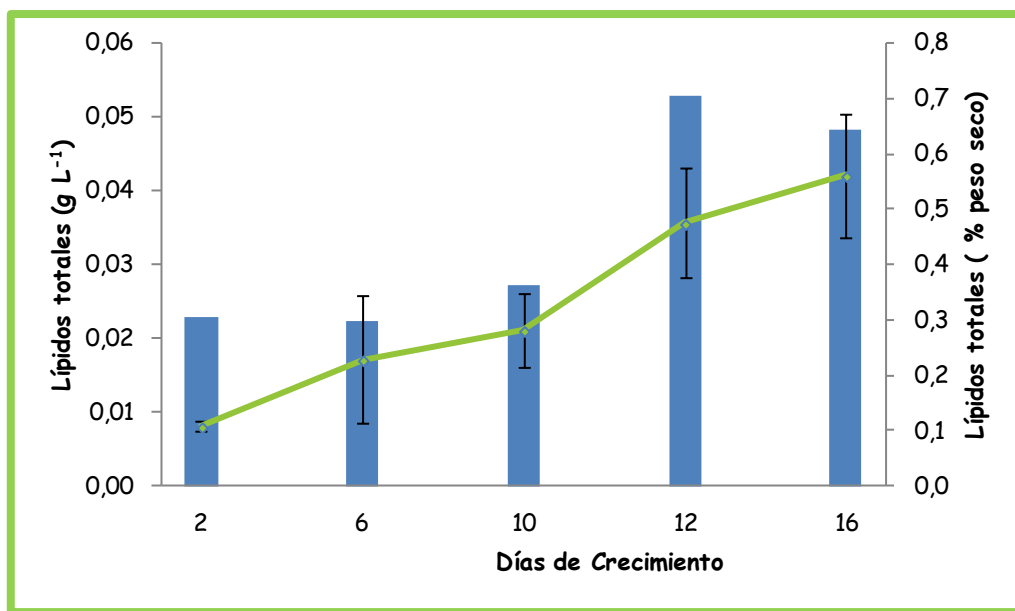


Figura 3.3. Lípidos totales de *Tetraselmis chuii*, durante el ciclo de crecimiento. La línea muestra lípidos totales promedio y sus desviaciones estándar en ( $\text{g L}^{-1}$ ). Las barras muestran el porcentaje de lípidos por peso seco de biomasa.

### 3.2.2. Análisis de lípidos a través de la técnica rojo de Nilo

Según los resultados, se puede observar en *Chlorella* sp., valores de fluorescencia entre  $80 \pm 30$  y  $154 \pm 5$  unidades arbitrarias (*u.a.*); el día 2, correspondiente a la fase de latencia "Lag" y el día 8, correspondiente a la fase exponencial intermedia, respectivamente (Figura 3.4; Tabla 3.1). Luego, en el día 16 de la fase exponencial tardía, presenta un aumento en el valor de la fluorescencia de  $1563 \pm 20$  *u.a.* El máximo valor de fluorescencia fue  $2804 \pm 49$  *u.a.*, en el día 23 de la fase estacionaria tardía de crecimiento celular (Figura 3.4; Tabla 3.1).

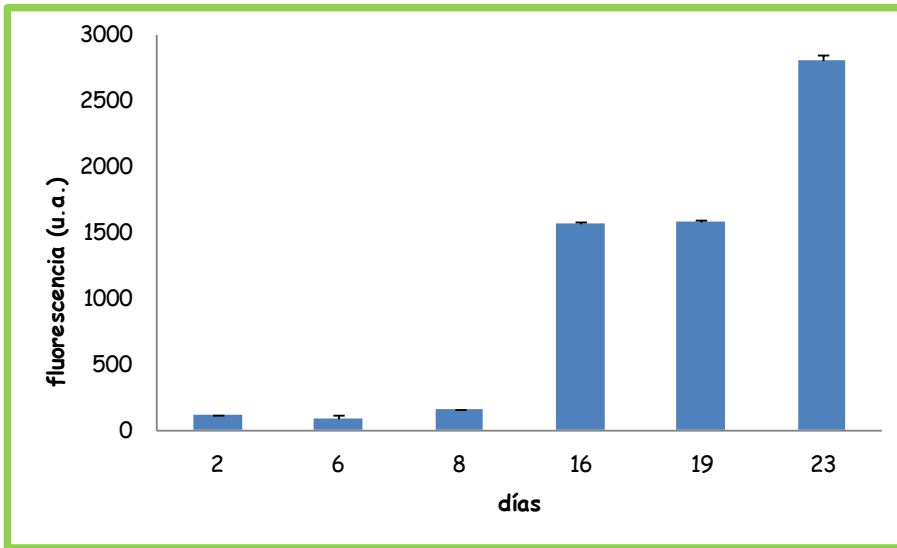


Figura 3.4. Fluorescencia (*u.a.*) durante los días del ciclo de cultivo en *Chlorella* sp.

En *T. chuii* se observaron valores entre  $52 \pm 38$  y  $330 \pm 24$  *u.a.* de fluorescencia, entre el día 2 y 16 de cultivo celular (Figura 3.5; Tabla 3.1).

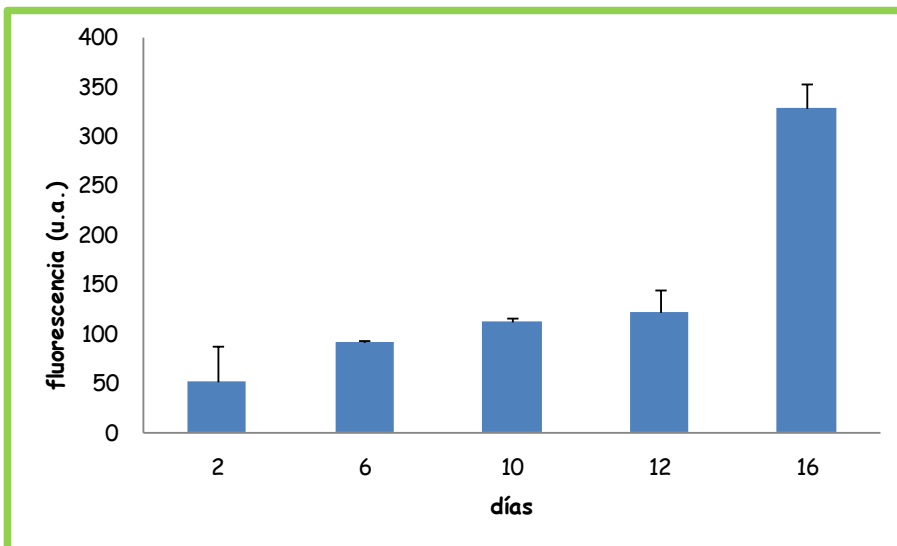


Figura 3.5. Fluorescencia (*u.a.*) durante los días del ciclo de cultivo en *T. chuii*

El valor mínimo de fluorescencia correspondió al día 2 de la fase Lag en *T. chuii*, y el máximo valor al día 16 de la fase estacionaria tardía del cultivo celular (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar de fluorescencia (*u.a.*) a través de la técnica rojo de Nilo para *Chlorella* sp., y *T. chuii* en cada etapa del ciclo de crecimiento celular.

<b>Etapas de crecimiento</b>	<b>Lag</b>	<b>Exponencial temprana</b>	<b>Exponencial intermedia</b>	<b>Exponencial tardía</b>	<b>Estacionaria</b>	<b>Estacionaria tardía</b>
<i>Chlorella</i> sp	110 $\pm$ 4	80 $\pm$ 30	154 $\pm$ 5	1563 $\pm$ 20	1580 $\pm$ 17	2804 $\pm$ 49
<i>T. chuii</i>	52 $\pm$ 38	91 $\pm$ 2	-	112 $\pm$ 4	122 $\pm$ 23	330 $\pm$ 24

### 3.2.3. Relación entre la concentración lipídica determinada por el método gravimétrico y por fluorescencia con rojo de Nilo (recta de calibración)

Los resultados indicaron que existe una correlación positiva ( $R = 0,862$ ) entre los lípidos totales y fluorescencia de lípidos neutros en *Chlorella* sp., además de una relación directa significativa ( $p = 0,000$ ), con un  $R^2 = 0,87$  entre el aumento de la fluorescencia (concentración de lípidos neutros) y el aumento de la concentración de lípidos totales (Figura 3.6).

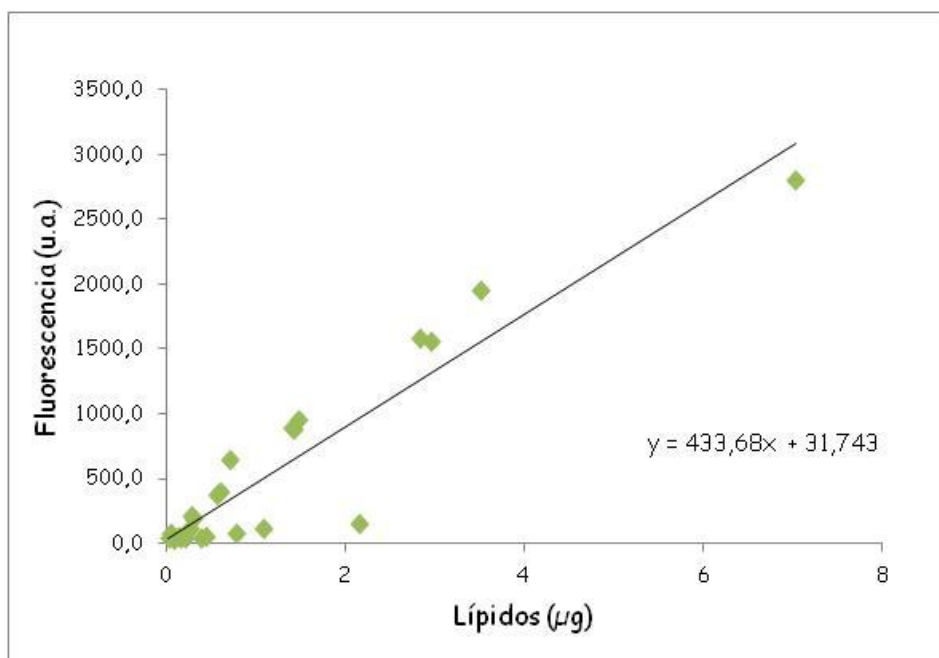


Figura 3.6. Representación gráfica de la regresión lineal y ecuación de la recta, entre fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.) y lípidos totales en microgramos ( $\mu\text{g}$ ), para *Chlorella* sp.

*T. chuii*, presentó una correlación positiva entre los lípidos totales y fluorescencia de lípidos neutros ( $R = 0,831$ ). La regresión lineal presentó una relación directa significativa ( $p = 0,000$ ) entre el aumento de concentración de lípidos totales y el aumento de la fluorescencia de lípidos neutros ( $R^2 = 0,69$ ) (Figura 3.7).

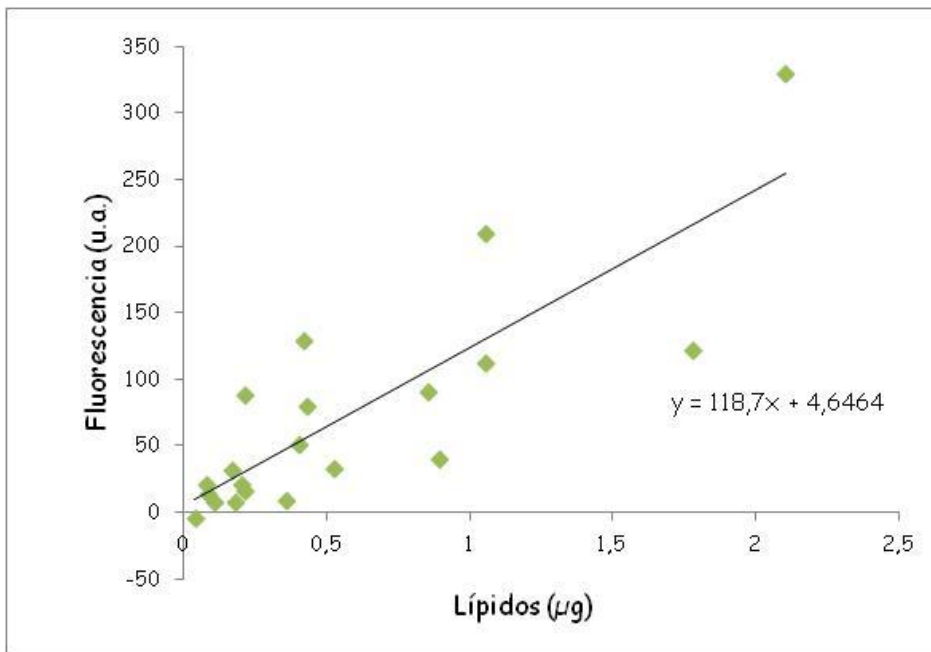


Figura 3.7. Representación gráfica de la regresión lineal y ecuación de la recta, entre fluorescencia unidades arbitrarias: (u.a.) y lípidos totales en microgramos ( $\mu\text{g}$ ), para *T. chuii*

Los datos de fluorescencia analizados en los distintos factores de dilución (1:10; 1:5; 1:2 y 1:1) en ambas microalgas, fueron relacionados con respecto a la concentración de lípidos totales en todas las fases de crecimiento en ambas microalgas (Figuras 3.6 y 3.7). Por consiguiente, las ecuaciones de la recta resultantes para *Chlorella* sp y *T. chuii*, fueron utilizadas para determinar en experiencias posteriores, la concentración de lípidos totales a partir de fluorescencia por medio del método indirecto rojo de Nilo.

### **3.3. Crecimiento celular en microalgas sometidas a estrés abiótico**

#### **3.3.1. Incremento en la intensidad de luz**

Para *Chlorella* sp., hubo diferencias significativas en la concentración celular entre el ensayo "estrés luz" y el ensayo control, Test t-Student;  $p < 0,05$  (Figura 3.8A). La tasa de crecimiento ( $\mu$ ), fue de  $0,58 \text{ d}^{-1}$  para el ensayo control y  $0,33 \text{ d}^{-1}$  para el ensayo "intensidad de luz" en la fase exponencial de crecimiento celular. Luego del día 14, o comienzo de la fase estacionaria, la  $\mu$  en el ensayo control fue de  $0,04 \text{ d}^{-1}$  y  $0,05 \text{ d}^{-1}$  en el ensayo "estrés luz".

En *Chlorella* sp., el pH inicial para el ensayo control fue 8,9 y final de 8,2. Para el ensayo "intensidad de luz" el pH inicial fue 8,5 y final fue de 8,2. La salinidad se mantuvo constante en 35‰.

En cuanto a *T. chuii*, la concentración celular fue significativamente mayor en el tratamiento control, con respecto al ensayo "estrés de luz" (Test t-Student;  $p < 0,05$ ; Figura 3.8B). La tasa de crecimiento en el ensayo control

fue  $0,32 \text{ d}^{-1}$  y de  $0,22 \text{ d}^{-1}$  para el ensayo "estrés de luz" analizada en la fase exponencial de cada tratamiento. Luego del día 10 en que fue aplicado el estrés, la tasa de crecimiento en el ensayo control fue de  $0,06 \text{ d}^{-1}$  y  $0,05 \text{ d}^{-1}$  para el ensayo "estrés luz".

En *T. chuii*, el pH inicial para el ensayo control fue 8,8 y final 7,6. Para el ensayo "intensidad de luz" el pH inicial fue 8,5 y final 8,2. La salinidad se mantuvo constante en 35‰.

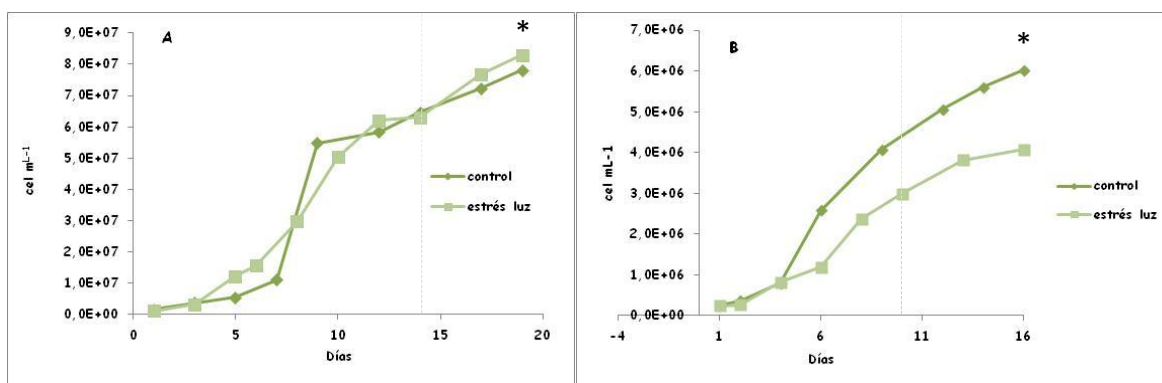


Figura 3.8. Concentración celular ( $\text{cel mL}^{-1}$ ), A) *Chlorella* sp., y B) *T. chuii*, en ensayo "estrés de Luz" y su respectivo control. La línea punteada indica el inicio del estrés y \* indica diferencias significativas (t-Student;  $p < 0,05$ ).

### 3.3.2. Depleción de la concentración de Nitrato

Para *Chlorella* sp., no hubo diferencias significativas en la concentración celular entre el ensayo "estrés nitrato" y el ensayo "control nitrato" (Test t-Student;  $p > 0,05$ ; Figura 3.9A). La tasa de crecimiento para el ensayo "estrés nitrato" fue de  $0,28 \text{ d}^{-1}$ , y  $0,29 \text{ d}^{-1}$  para el ensayo "control nitrato", evaluados en la fase exponencial. Luego del día 14 en que fue aplicado el estrés, la  $\mu$  fue de  $0,46 \text{ d}^{-1}$  hasta el día 15 y decayó a una tasa de  $-0,09 \text{ d}^{-1}$  en el ensayo "estrés nitrato". En el ensayo "control nitrato" luego del día 14, la  $\mu$  aumentó a  $0,51 \text{ d}^{-1}$  y disminuyó a partir del día 15 a  $-0,06 \text{ d}^{-1}$  hasta el final del ensayo (Figura 3.9A).

En *Chlorella* sp., el pH inicial del ensayo "estrés nitrato" fue 8,5 y final 8,2. Para el ensayo "control nitrato" el pH inicial fue 8,5 y final 8,2. La salinidad se mantuvo en 36‰, para ambos ensayos.

Para *T. chuii*, la depleción de nitratos en el medio de cultivo, presentó diferencias significativas en la concentración celular luego de la fase estacionaria (Test t-Student;  $p < 0,05$ ; Figura 3.9B). La tasa de crecimiento durante la fase exponencial para el ensayo "estrés nitrato" y "control nitrato", fue de  $0,32 \text{ d}^{-1}$  y  $0,28 \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Luego del día 10 en que fue aplicado el tratamiento de estrés, la  $\mu$  en el ensayo "estrés nitrato" fue de  $0,30 \text{ d}^{-1}$  hasta el día 15 y decrece a  $-0,01 \text{ d}^{-1}$  hasta el final del ensayo. En el ensayo "control nitrato" la  $\mu$  aumenta a  $0,40 \text{ d}^{-1}$  hasta el día 15 y decrece a  $-0,03 \text{ d}^{-1}$  hasta el final de la experiencia (Figura 3.9B).

En *T. chuii*, el pH inicial para el ensayo "estrés nitrato" fue 8,6 y final 6,8. Para el ensayo "control nitrato" el pH inicial fue 8,6 y final 7,2. La salinidad para ambos ensayos se mantuvo constante en 36‰.

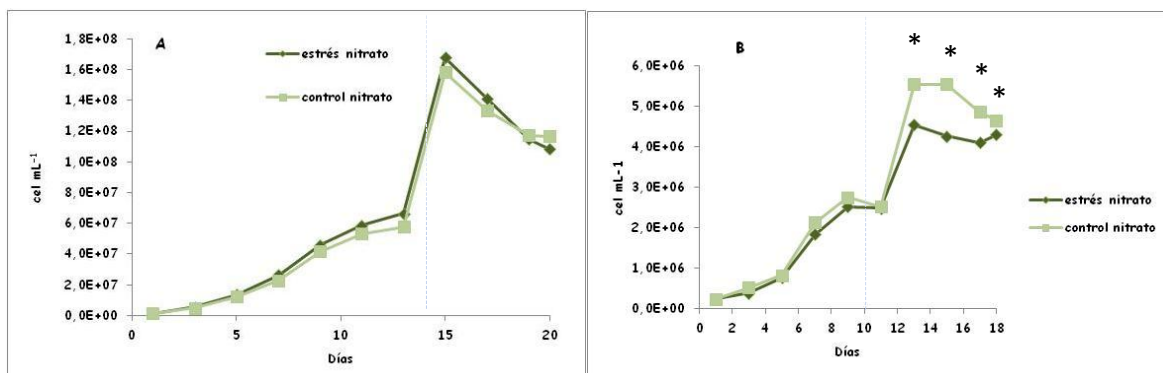


Figura 3.9. Concentración celular (cel mL<sup>-1</sup>), A) *Chlorella* sp., y B) *T. chuii*, en ensayo "estrés nitrato" y su respectivo control. La línea punteada indica el inicio del estrés y \* indica diferencias significativas (t-Student; p<0,05).

Por otra parte, la concentración de nitratos (mM) en *Chlorella* sp., disminuyó a una razón de 5 entre la fase exponencial tardía (antes de la aplicación del estrés abiótico) y la fase estacionaria tardía (final de la experiencia), en el ensayo "estrés nitrato". En cambio, en el ensayo "control nitrato", la disminución fue a una razón de 2 (Tabla 3.2).

La evaluación de la concentración de nitratos (mM) en *T. chuii*, indicó que hubo una disminución de 1,7 veces en el ensayo "estrés nitrato" y 1,4 veces en el ensayo "control nitrato", desde la fase exponencial tardía (antes de la aplicación de cada tratamiento), y hasta la fase estacionaria tardía y final de cada experiencia (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Concentración de Nitratos (mM) en los ensayos "Control Nitrato" y "Estrés Nitrato", para *Chlorella* sp. y *T.chuii*.

		Inicio *	Exponencial tardía **	Estacionaria tardía
<i>Chlorella</i> sp.	Control Nitrato	2	0,08	0,04
	Estrés Nitrato	2	0,12	0,02
<i>T. chuii</i>	Control Nitrato	2	0,16	0,11
	Estrés Nitrato	2	0,17	0,10

\* valor estimado a partir del medio de cultivo Algal

\*\*antes de ser aplicado el tratamiento

### 3.3.3. Depleción de la concentración de Hierro

La depleción en la concentración de Fe en el medio de cultivo de *Chlorella* sp., tuvo diferencias significativas (Test t-Student;  $p < 0,05$ ) en el aumento en la concentración celular, con respecto al ensayo "control Fe" en la fase estacionaria tardía (Figura 3.10A). La tasa de crecimiento  $\mu$ , para el ensayo "estrés Fe" fue de  $0,27 \text{ d}^{-1}$  y  $0,26 \text{ d}^{-1}$  para el ensayo "control Fe" durante la fase exponencial. Luego de aplicado el estrés, la  $\mu$  aumenta  $0,10 \text{ d}^{-1}$  en el ensayo "estrés Fe" y  $0,13 \text{ d}^{-1}$  en el ensayo "control Fe", hasta el día 15. Desde el día 15 y hasta el final de cada experiencia, la  $\mu$  aumenta en  $0,15 \text{ d}^{-1}$  para el ensayo "estrés Fe" y  $0,10 \text{ d}^{-1}$  para el ensayo "control Fe" (Figura 3.10A).

El pH inicial fue 8,05 en ambos ensayos de *Chlorella* sp. El pH final para el ensayo "estrés Fe" fue 8,39 y para el ensayo "control Fe" 8,37. La salinidad se mantuvo constante en 35,5‰.

*T. chuii*; no tuvo diferencias significativas (Test t-Student;  $p=0,839$ ) en la concentración celular entre el ensayo "estrés Fe" y "control Fe" (Figura 3.10B). La tasa de crecimiento específica en la fase exponencial del ensayo "estrés Fe", fue de  $0,29 \text{ d}^{-1}$  y  $0,38 \text{ d}^{-1}$  en el ensayo "control Fe". Luego de aplicado el estrés, la  $\mu$  aumenta  $0,46 \text{ d}^{-1}$  en el ensayo "estrés Fe" y  $0,47 \text{ d}^{-1}$  en el ensayo "control Fe", hasta el día 15. Desde el día 15 y hasta el final de cada experiencia, la  $\mu$  aumenta  $0,04 \text{ d}^{-1}$  en el ensayo "estrés Fe" y  $0,06 \text{ d}^{-1}$  en el ensayo "control Fe" (Figura 3.10B).

El pH inicial para ambos ensayos en *T. chuii* fue 8,2 y el pH final en el ensayo "estrés Fe" fue 8,34 y 8,2 para el ensayo "control Fe". La salinidad se mantuvo constante en 35,5‰.

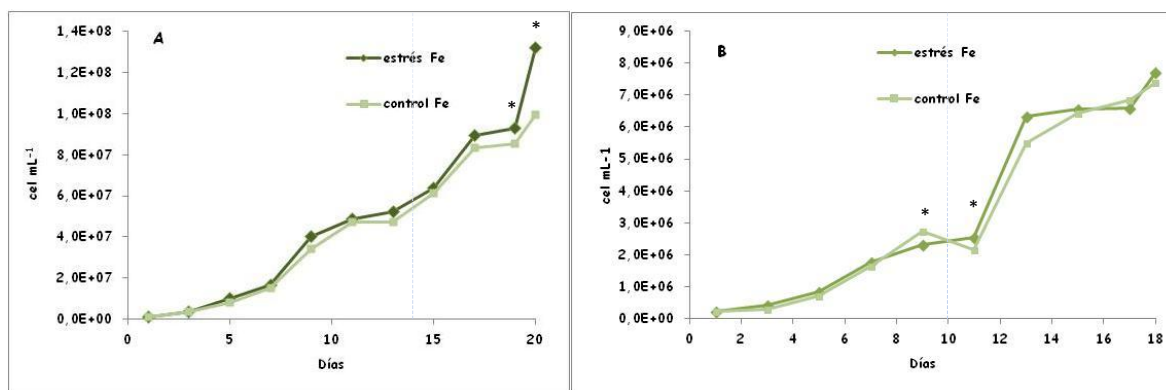


Figura 3.10. Concentración celular ( $\text{cel mL}^{-1}$ ), A) *Chlorella* sp., y B) *T. chuii*, para los ensayos "estrés Fe"; y su respectivo control. La línea punteada indica el inicio del estrés y \* indica diferencias significativas (t-Student;  $p < 0,05$ ).

### 3.4. Estudio de la inducción a la producción de lípidos por estrés abiótico

#### 3.4.1. Incremento en la intensidad de luz

*Chlorella* sp., presentó concentraciones lipídicas significativamente mayores en el ensayo "estrés de luz" en comparación al ensayo control desde el día 3 al día 19 de cultivo (Test *t-student*,  $p < 0,05$ ). La máxima concentración lipídica en el ensayo "estrés intensidad de luz" se presentó en el día 14 ( $1473 \pm 235 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), y en el día 19 y final de la experiencia ( $1400 \pm 232 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). En el ensayo control, la máxima concentración lipídica ( $943 \pm 138 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) correspondió al día 17 del ciclo de cultivo (Figura 3.11A).

*T. chuii* presentó concentraciones lipídicas significativamente superiores en el ensayo "estrés de luz" en comparación al ensayo control, en el primer día de cultivo (Test *t-student*,  $p < 0,05$ ). En el día 2, 12 y 14 de cultivo celular, las concentraciones lipídicas fueron significativamente inferiores en el ensayo "estrés luz" en comparación al ensayo control (Test *t-student*,  $p < 0,05$ ). La

concentración de lípidos en *T. chuii* tuvo la máxima concentración lipídica ( $395 \pm 127 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en el día 16 del tratamiento "estrés intensidad de luz". Para el tratamiento control, la máxima concentración lipídica ( $377 \pm 82 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) fue observada en el día 16 y final del ciclo de cultivo (Figura 3.11B).

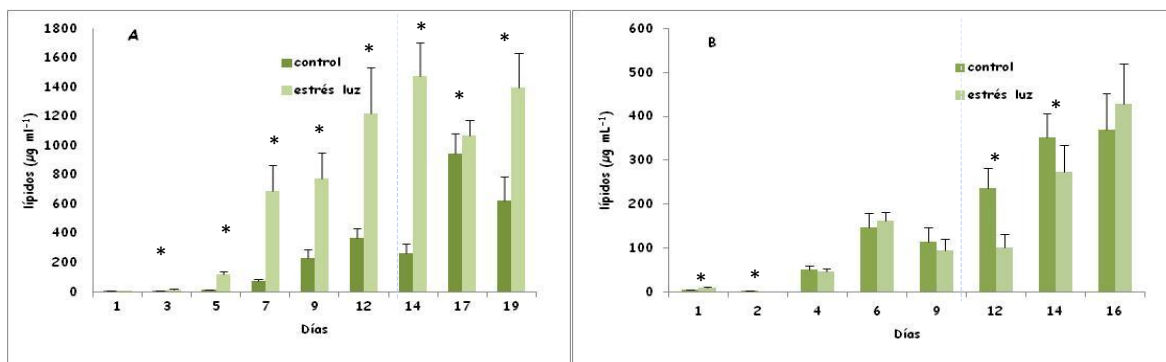


Figura 3.11. Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de lípidos (media  $\pm$  desviación estándar) para: A) *Chlorella* sp., y B) *T. chuii*, "estrés de Luz" y ensayo control. La línea punteada indica el inicio del estrés y \* indica diferencias significativas (t-Student;  $p < 0,05$ ).

### 3.4.2. Depleción de la concentración de Nitrato

*Chlorella* sp., tuvo diferencias significativas en la concentración de lípidos en los días 5 y 7 de cultivo celular (Test t-Student;  $p < 0,05$ ). Luego, en el día 15, 17 y 19 de cultivo celular presentó concentraciones lipídicas significativamente superiores en el ensayo "estrés Nitrato" con respecto al ensayo "control Nitrato" (Test t-Student;  $p < 0,05$ ). El ensayo "estrés nitrato" en *Chlorella* sp., tuvo su máxima concentración de lípidos el día 19 del ciclo de cultivo con un valor de  $988 \pm 130 \mu\text{g mL}^{-1}$ . El ensayo "control nitrato" tuvo su

máximo valor el día 13 del ciclo de cultivo, con un valor de  $415 \pm 48 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 3.12A).

*T. chuii*, presentó concentraciones lipídicas significativamente superiores en el ensayo "estrés Nitrato" con respecto al ensayo "control Nitrato", el día 13 y 18 de crecimiento celular (Test t-Student;  $p < 0,05$ ). La máxima concentración de lípidos para *T. chuii* en el ensayo "estrés nitrato" fue el día 18 de cultivo con un valor de  $472 \pm 95 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En el ensayo "control nitrato", la máxima concentración de lípidos se encontró en el día 18 y final de cultivo con un valor de  $309 \pm 81 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 3.12B).

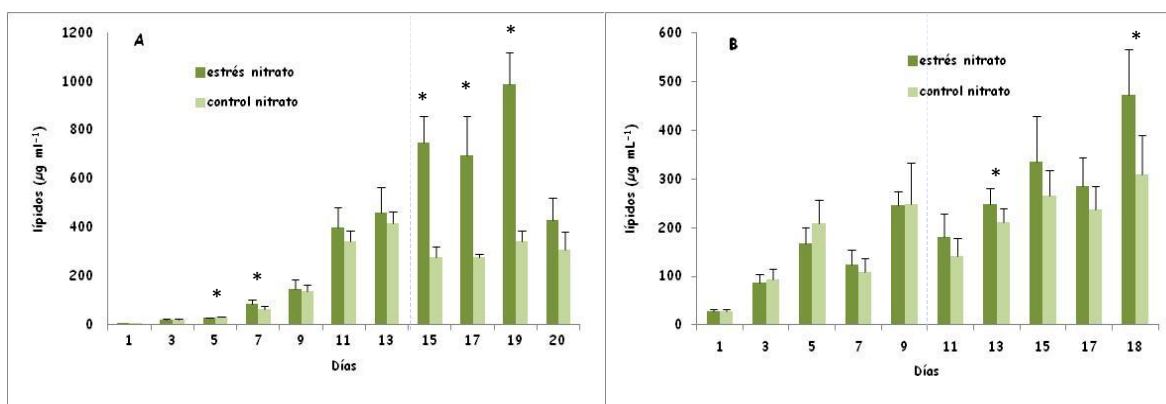


Figura 3.12. Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de lípidos (media  $\pm$  desviación estándar) para: A) *Chlorella* sp., y B) *T. chuii*, en ensayo "estrés nitrato" y su respectivo control. La línea punteada indica el inicio del estrés y \* indica diferencias significativas (t-Student;  $p < 0,05$ ).

### 3.4.3. Depleción de la concentración de Hierro

La concentración lipídica en *Chlorella* sp., fue significativamente superior en el ensayo "estrés Fe" el día 7 de cultivo y significativamente superior en el

ensayo "control Fe" el día 19. La máxima concentración de lípidos en *Chlorella* sp., en el ensayo "estrés Fe" se observó el día 20 de cultivo y final, con un valor de  $386 \pm 72 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para el ensayo "control Fe", la máxima concentración de lípidos igualmente fue observada el día 20 y final de cultivo, con un valor de  $379 \pm 46 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 3.13A).

En *T. chuii*, la concentración lipídica fue significativamente diferente desde el día 11 hasta el día 18 de cultivo (Test *t-student*;  $p < 0,05$ ). El máximo valor de concentración de lípidos en *T.chuii*, fue  $348 \pm 55 \mu\text{g mL}^{-1}$  para el ensayo "estrés Fe", el día 16 y final de la experiencia, y  $348 \pm 85 \mu\text{g mL}^{-1}$  para el ensayo "control Fe", el día 11 del ciclo de cultivo (Figura 3.13B).

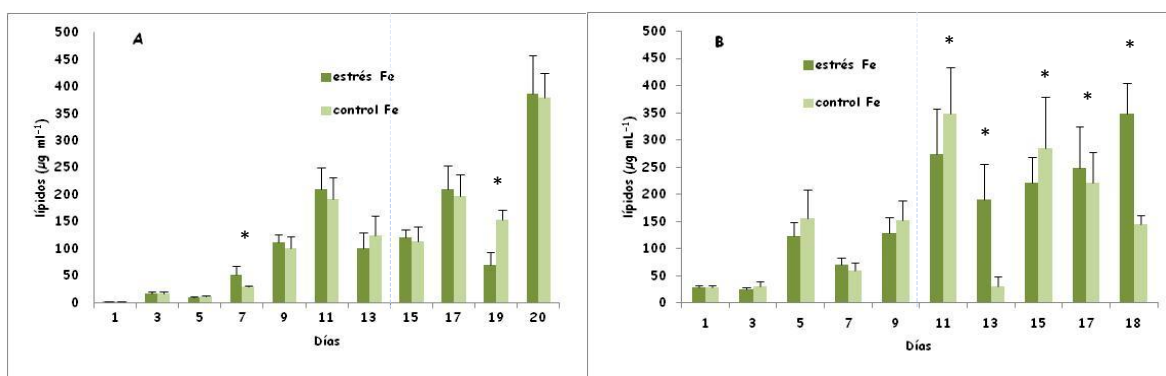


Figura 3.13. Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de lípidos (media  $\pm$  desviación estándar) para: A) *Chlorella* sp., y B) *T. chuii*, en ensayo "estrés Fe" y su respectivo control. La línea punteada indica el inicio del estrés y \* indica diferencias significativas (t-Student;  $p < 0,05$ ).

### 3.5. Efectos del estrés abiótico en la producción de lípidos en *Chlorella* sp., y *T. chuii*

La inducción a estrés abiótico tuvo un efecto significativo en la producción de lípidos al final de cada experiencia, en *Chlorella* sp. (ANOVA;  $p = 0,000$ ), siendo el ensayo "intensidad de luz" quien presentó un aumento

significativo de la concentración lipídica con respecto al ensayo control (Scheffe;  $p = 0,00$ ; Tabla 3.3).

En *T. chuii*, la inducción a estrés abiótico tuvo un efecto significativo en la producción de lípidos al final de cada experiencia (ANOVA;  $p = 0,002$ ). La significancia estuvo representada por el ensayo "control Fe", con respecto al ensayo "intensidad de luz" (Scheffe,  $p = 0,03$ ; Tabla 3.3), y con respecto al ensayo "estrés nitrato" (Scheffe,  $p = 0,005$ ; Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Fluorescencia (media  $\pm$  error estándar de la media) evaluada al final de cada tratamiento (ANOVA 1 factor; 95% de significancia)

	Control	Estrés luz	Estrés Nitrato	Control Nitrato	Estrés Fe	Control Fe
<i>Chlorella</i> sp.	578 $\pm$ 209 <sup>a</sup>	1400 $\pm$ 232 <sup>b</sup>	429 $\pm$ 92 <sup>a</sup>	308 $\pm$ 73 <sup>a</sup>	386 $\pm$ 72 <sup>a</sup>	380 $\pm$ 46 <sup>a</sup>
<i>T. chuii</i>	377 $\pm$ 82	395 $\pm$ 127 <sup>a</sup>	472 $\pm$ 95 <sup>c</sup>	309 $\pm$ 81	348 $\pm$ 56	145 $\pm$ 17 <sup>bd</sup>

Valores marcados con letras diferentes (a b; y c d), indican diferencias significativas entre tratamientos (test de comparaciones múltiples, Scheffe;  $p < 0,05$ ).

### 3.5.1. Determinación del porcentaje de lípidos totales con respecto a la biomasa.

La concentración de lípidos por peso de biomasa seca al final de cada experiencia, inducida a través de estrés abiótico, en *Chlorella* sp., fue de 28,4% en el ensayo estrés luz y 10,4% en el ensayo control. En el ensayo control nitrato el porcentaje de lípidos fue de 6,0% y 7,9% en el ensayo "estrés nitrato". En el ensayo "control Fe" el porcentaje de lípidos por peso de biomasa seca, fue 6,7% y 6,3% en el ensayo "estrés Fe" (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Estimación de la concentración de lípidos (media  $\pm$  desviación estándar) y porcentaje de lípidos por peso seco de biomasa para *Chlorella* sp.

<i>Chlorella</i> sp. Tratamiento	Concentración (cel/ mL)	Peso seco Biomasa (g /L)	Estimación Peso Lípidos (g/L)*	Lípidos (% P.S.)
Control	7,81E+07	6,03 $\pm$ 0,25	0,58 $\pm$ 0,16	10,4
Estrés Luz	8,30E+07	4,93 $\pm$ 0,34	1,40 $\pm$ 0,23	28,4
Control Nitrato	1,17E+08	5,13 $\pm$ 0,36	0,31 $\pm$ 0,07	6,0
Estrés Nitrato	1,08E+08	5,44 $\pm$ 0,16	0,43 $\pm$ 0,09	7,9
Control Fe	9,96E+07	5,70 $\pm$ 0,40	0,38 $\pm$ 0,05	6,7
Estrés Fe	1,32E+08	6,14 $\pm$ 0,21	0,39 $\pm$ 0,07	6,3

\* Estimación a partir de la ecuación de la recta de calibración  $y = 433,68x + 31,743$

Para *T. chuii*, se observa que el porcentaje de lípidos con respecto a la biomasa seca medida al final de cada ensayo, es de 7,6% en el ensayo estrés luz y 5,5% en el ensayo control. En el ensayo "estrés nitrato" tuvo un porcentaje de 7,9% y el "control nitrato" un porcentaje de 5,2%. En el ensayo "estrés Fe" la concentración de lípidos con respecto al peso seco de biomasa, medida al final de cada ensayo, fue de 5,5% y 2,3% en el ensayo "control Fe" (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Estimación de la concentración de lípidos (media  $\pm$  desviación estándar) y porcentaje de lípidos por peso seco de biomasa para *T. chuii*.

<i>T. chuii</i> Tratamiento	Concentración (cel/ mL)	Peso seco Biomasa (g /L)	Estimación Peso Lípidos (g/L)*	Lípidos (% P.S.)
Control	6,03E+06	6,72 $\pm$ 0,36	0,37 $\pm$ 0,08	5,5
Estrés Luz	4,09E+06	5,65 $\pm$ 0,18	0,43 $\pm$ 0,09	7,6
Control Nitrato	4,65E+06	5,89 $\pm$ 0,27	0,31 $\pm$ 0,08	5,2
Estrés Nitrato	4,29E+06	5,98 $\pm$ 0,37	0,47 $\pm$ 0,10	7,9
Control Fe	7,39E+06	6,37 $\pm$ 0,38	0,15 $\pm$ 0,02	2,3
Estrés Fe	7,72E+06	6,31 $\pm$ 0,23	0,35 $\pm$ 0,06	5,5

\* Estimación a partir de la ecuación de la recta de calibración  $y = 118,7x + 4,6464$

### 3.6. Evaluación del Perfil Lipídico

De acuerdo al perfil lipídico los principales ácidos grasos metil esteres (EMAG), correspondieron a cadenas entre 10 y 20 carbonos en *Chlorella* sp., siendo arriba de un 93,2% aptos para la producción de diesel en todos los ensayos excepto en el ensayo "estrés de luz" donde no existen datos disponibles (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Resumen de la naturaleza de los EMAG (%), de *Chlorella* sp., en los tratamientos analizados y su potencial uso en biocombustibles

<i>Chlorella</i> sp.	Control	Estrés Luz	Control Nitrato	Estrés Nitrato	Control Fe	Estrés Fe
Saturados (%)	38,4	n/d	38,7	42,9	38,8	25,2
Mono-insaturados (%)	36,0	n/d	29,8	30,7	32,5	36,8
Poli-insaturados (%)	25,6	n/d	31,6	26,4	28,7	38,0
<b>Derivado de lípidos</b>						
Queroseno (C9-C16) (%)	68,9	n/d	64,1	67,9	63,9	52,3
Diesel (C15-C25) (%)	93,9	n/d	94,0	93,2	94,1	96,0

*T. chuii* presentó EMAG con cadenas entre los 14 y 20 carbonos, además casi el 100% de los EMAGs identificados fueron favorables para la elaboración de biodiesel, en todos los tratamientos analizados, excepto en el ensayo estrés de luz, donde no hubieron datos disponibles (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Resumen de la naturaleza de los EMAG (%), de *T. chuii*, en los tratamientos analizados y su potencial uso en biocombustibles

<i>T. chuii</i>	Control	Estrés Luz	Control Nitrato	Estrés Nitrato	Control Fe	Estrés Fe
Saturados (%)	34,7	n/d	39,2	51,2	38,7	35,8
Mono-insaturados (%)	14,6	n/d	22,4	34,1	28,2	33,1
Poli-insaturados (%)	50,6	n/d	38,4	14,7	33,0	31,1
<b>Derivado de lípidos</b>						
Queroseno (C9-C16) (%)	39,9	n/d	47,9	55,8	48,8	45,8
Diesel (C15-C25) (%)	100,0	n/d	100,0	98,9	100,0	99,6

Los principales ácidos grasos encontrados en *Chlorella* sp., para todos los tratamientos analizados, fueron el ácido palmítico, el ácido palmitoleico y el ácido eicosapentaenoico. El ácido palmítico tuvo porcentajes de 32,4% en el ensayo "control nitrato" y 34,2% en el ensayo "estrés nitrato", además del ensayo control con un porcentaje de 30,9%. En el ensayo "estrés luz" no hubo datos disponibles. El ácido palmítico tuvo un porcentaje de 18,8% en el ensayo "control Fe" y 27,5% el ensayo "estrés Fe" (Tabla 3.8). El ácido palmitoleico tuvo un porcentaje de 25,6% en el ensayo "control nitrato" y 26,1% en el ensayo "estrés nitrato". En el ensayo control, el ácido palmitoleico tuvo un porcentaje de 31,2%. El ensayo "estrés luz" no tuvo datos disponibles. En el ensayo "control Fe" el ácido palmitoleico tuvo un porcentaje de 28,5% y en el ensayo "estrés Fe" de 29,0% (Tabla 3.8). El ácido eicosapentaenoico tuvo porcentajes de 22% en el ensayo "control nitrato" y 16,3% en el ensayo "estrés nitrato". En el ensayo control tuvo un porcentaje de 16,4%, y en el ensayo estrés de luz no hubo datos disponibles. En el ensayo "control Fe", el ácido eicosapentaenoico tuvo un porcentaje de 20,8% y el ensayo "estrés Fe" un porcentaje de 12,6% (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Porcentajes (%) de Ácidos Grasos Metil Ester encontrados en los diferentes tratamientos en *Chlorella* sp. (n indica el número de réplicas analizadas)

<i>Chlorella</i> sp. Compuesto		Control (n=2)	Estrés Luz (n=0)	Control Nitrato (n=2)	Estrés Nitrato (n=1)	Control Fe (n=3)	Estrés Fe (n=2)
Cáprico	C10:0				0,1		
Laurico	C12:0	0,3			0,3	0,1	0,3
Tridecanoico	C13:0			4,1		4,0	
Mirístico	C14:0	5,8		2,0	6,4	1,7	3,6
Pentadecanoico	C15:0	0,6		0,2	0,9	1,9	0,5
Palmitoleico	C16:1	31,2		25,6	26,1	28,5	29,0
Palmitico	C16:0	30,9		32,3	34,2	27,5	18,8
Margánico	C17:0	0,2		0,1	0,4	0,2	0,4
Linoleico	C18:2n6	5,5		7,7	6,0	6,3	13,4
Oleico	C18:1n9	4,7		4,2	4,6	4,0	7,8
Esteárico	C18:0	0,6			0,6	3,2	1,5
Araquidónico	C20:4n6	3,7		1,9	4,1	1,7	12,1
Eicosapentaenoico	C20:5n3	16,4		22,0	16,3	20,8	12,6

En *Tetraselmis chuii*, los principales ácidos grasos encontrados fueron el ácido palmítico, el ácido linoleico y más atrás lo sigue el ácido oleico. El porcentaje de ácido palmítico en el ensayo "control nitrato" fue de 38,8% y en el ensayo "estrés nitrato" de 46,3%. En el ensayo "control Fe", el porcentaje de ácido palmítico fue de 37,7% y en el ensayo "estrés Fe" de 31,1%. En el ensayo control, la concentración de ácido palmítico fue de 34%, sin embargo en el ensayo "estrés luz" no hubo datos disponibles (Tabla 3.9). El porcentaje de ácido linoleico en el ensayo "control nitrato" fue de 19,5% y en el ensayo "estrés nitrato" de 7,5%. En el ensayo "control Fe", el porcentaje de ácido linoleico fue de 13,2% y en el ensayo "estrés Fe" de 12,7%. En el ensayo

control, la concentración de ácido linoleico fue de 41,2%, sin embargo en el ensayo "estrés luz" no hubo datos disponibles (Tabla 3.9). Para el ácido oleico, el porcentaje en el ensayo "control nitrato" fue de 13,4% y de 23,6% en el ensayo "estrés nitrato". En el ensayo "control Fe", el porcentaje de ácido oleico fue de 19,8% y en el ensayo "estrés Fe" de 21,6%. En el ensayo control, la concentración de ácido oleico fue de 9,5%, y en el ensayo "estrés luz" no hubo datos disponibles (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Porcentajes (%) de Ácidos Grasos Metil Ester encontrados en los diferentes tratamientos en *T. chuii* (n indica el número de réplicas analizadas)

<i>T. chuii</i>		Control	Estrés	Control	Estrés	Control	Estrés Fe
Compuesto		(n=2)	Luz (n=0)	Nitrato (n=2)	Nitrato (n=3)	Fe (n=1)	(n=3)
Mirístico	C14:0				1,1		0,4
Hexadecadienoico	C16:3					3,0	
Hexadecenoico	C16:2	0,7		1,1		0,8	4,5
Palmitoleico	C16:1	5,1		7,9	8,5	7,3	9,9
Palmitico	C16:0	34,0		38,8	46,3	37,7	31,1
Linoleico	C18:2n6	41,2		19,5	7,5	13,2	12,7
Oleico	C18:1n9	9,5		13,4	23,6	19,8	21,6
Esteárico	C18:0	0,7		0,4	3,9	1,1	4,3
Araquidónico	C20:4n6	7,3		3,9	2,7	3,2	2,9
Eicosapentaenoico	C20:5n3	1,3		13,9	4,5	12,8	11,0
Eicosenoico	C20:1n9			1,1	2,0	1,1	1,6

### 3.7. Actividad antioxidantes de microalgas *Chlorella* sp. y *T. chuii*

De acuerdo a los resultados, una alta actividad antioxidante presentó *Chlorella* sp. El extracto con hexano tuvo su mayor porcentaje de actividad antioxidante en la concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup> con un porcentaje de 65,7 ± 2,1%. Estadísticamente la actividad antioxidante fue significativamente diferente entre las concentraciones evaluadas (ANOVA,  $p = 0,000$ ; Tabla 3.10). El extracto con DCM tuvo su máxima actividad en la concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup> con un valor de 81,6 ± 1,4%, y fue significativamente diferente con respecto a las otras concentraciones (ANOVA,  $p = 0,000$ ; Tabla 3.10).

*T.chuii* presentó un porcentaje de actividad antioxidante de 46,4 ± 2,0% con el solvente hexano, a una concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup>, además presentó la menor actividad antioxidante con una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup> de 10,8 ± 2,1%. Estadísticamente, los extractos con hexano a diferentes concentraciones presentaron diferencias significativas (ANOVA;  $p = 0,000$ ; Tabla 3.12). *T.chuii* con DCM presentó alta actividad antioxidante en las concentraciones de 5 mg mL<sup>-1</sup> y 10 mg mL<sup>-1</sup> con respecto a la actividad de la concentración 1 mg mL<sup>-1</sup>. Estadísticamente presentaron diferencias significativas (ANOVA,  $p = 0,000$ ; Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Actividad antioxidante (%) de extractos de microalga en tres concentraciones, presentados como la media  $\pm$  error estándar de la media.

		1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
<i>Chlorella</i> sp.	Hexano	12,2 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	34,5 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	65,7 $\pm$ 2,1 <sup>c</sup>
	DCM	21,7 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	56,7 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	81,6 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>
<i>T. chuii</i>	Hexano	10,8 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	35,9 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	46,4 $\pm$ 2,0 <sup>c</sup>
	DCM	10,5 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	68,3 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	87,7 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>
	BHT	86,6 $\pm$ 0,4		

<sup>a,b,c</sup> en la misma línea indican diferencias significativas entre las medias analizadas con el test de comparaciones múltiples de Scheffe  $p < 0,05$ .

BHT es el control positivo.

La concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ) para extractos de *Chlorella* sp., con el solvente hexano, fue 6,9 mg mL<sup>-1</sup> y 3,4 mg mL<sup>-1</sup> con el solvente DCM. El  $IC_{50}$  para extractos de *T. chuii* con el solvente hexano fue 12,4 mg mL<sup>-1</sup> y 3,3 mg mL<sup>-1</sup> con el solvente DCM.

## 4. Discusión

### 4.1 Crecimiento celular y concentración de lípidos bajo condiciones de estrés

En el presente estudio, se pudo observar una concentración celular mayor en los tubos de ensayos control para ambas especies, con respecto a los cultivos iniciales en volúmenes de 4 L. Ambos sistemas de cultivo (tubos 100 mL y botellas de 4 L), tuvieron condiciones similares, aunque no fueron cultivadas en el mismo sitio. En *Chlorella* sp., la concentración celular final fue de  $2,5 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup> en botellas de 4 L y  $8,7 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>; en tubos de 100 mL. En *T. chuii* la concentración celular final fue  $2,5 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> en botellas de 4 L, y  $6 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> en tubos de 100 mL. Estos resultados podrían deberse al material y volumen de los reactores utilizados, también a las condiciones lumínicas en que se desarrolló cada cultivo, ya que uno de los principales factores que afectan al crecimiento celular en cultivos fotoautotróficos, es la luz (Tang *et al.*, 2011). Según algunos autores (Masojídek *et al.*, 2004; Chisti, 2007), la naturaleza y disponibilidad de luz en sistemas de cultivo, produce variaciones en el crecimiento celular y la concentración de lípidos.

De acuerdo a los resultados presentados en este estudio, *Chlorella* sp, tuvo una tasa de crecimiento ( $\mu$ ), menor que *T. chuii* en condiciones normales de crecimiento, calculada durante la fase exponencial ( $0,13 \text{ d}^{-1}$  y  $0,25 \text{ d}^{-1}$  respectivamente). *T. chuii*, en condiciones normales de crecimiento, entró en la fase estacionaria luego del día 10 de cultivo y *Chlorella* sp., luego del día 14. En el caso de *T. chuii*, el día 16 de cultivo llegó a una biomasa de  $0,62 \text{ g L}^{-1}$ , en cambio *Chlorella* sp., sólo en el día 19 llegó a la misma concentración ( $0,62 \text{ g L}^{-1}$ ). En términos de costos de producción, una especie con un crecimiento lento

sería menos eficiente que una especie con rápido crecimiento celular y producción de biomasa (Griffiths & Harrison, 2009). Ahora bien, la eficiencia de una especie también depende de la productividad lipídica, la cual está relacionada con la tasa de crecimiento y el contenido de lípidos en la biomasa (Chisti, 2007; Rodolfi *et al.*, 2009). En *T. chuii*, la concentración de lípidos por biomasa seca alcanzados en el día 16 de cultivo, fue menor a lo alcanzado por *Chlorella* sp., en el mismo día y posteriores (0,6% para *T. chuii*; y 1% para *Chlorella* sp.), por lo tanto, en este caso, la disminución de la tasa de crecimiento en microalgas estaría relacionada con el aumento en la productividad lipídica (Rodolfi *et al.*, 2009; Converti *et al.*, 2009).

En el presente estudio, la concentración máxima de lípidos por peso de biomasa seca en *Chlorella* sp., fue de 2,4% y 0,7% en *T. chuii*, en condiciones normales de crecimiento. Estos resultados estuvieron muy por debajo en ambas especies, comparados con estudios previos en especies del mismo género no sometidas a estrés (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Porcentaje de lípidos por peso seco de biomasa en especies del género *Chlorella* y *Tetraselmis*, evaluadas por diferentes autores

Microalga	Contenido lipídico (% biomasa)	Autor
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23	Chisti, 2007
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M24	12,9	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
<i>Tetraselmis sp.</i> F&M-M34	14,7	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella sp.</i>	28-32	Chisti, 2007
<i>Chlorella sorokiniana</i> IAM-212	19,3	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/11b	19,2	Rodolfi <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>	18	Illman <i>et al.</i> , 2000
<i>Chlorella emersonii</i>	29	Illman <i>et al.</i> , 2000
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,9	Converti <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>	14 - 56	Gouveia and Oliveira, 2009
<i>Chlorella minutissima</i>	57	Gouveia and Oliveira, 2009

La técnica de fluorescencia utilizada en este estudio fue modificada desde Chen *et al.*, (2009), variando la temperatura de incubación. El óptimo encontrado por el autor fue 40°C de temperatura de incubación, dando valores de fluorescencia superiores a 500 unidades arbitrarias (*u.a.*), y a 60°C inferiores a 100 *u.a.*, al testear el método sin muestra de microalga. En este trabajo se usó 60°C de temperatura de incubación, siendo los valores de fluorescencia entre 100 y 200 *u.a.*, en el control sin muestra de microalga. Estos valores indicarían que la temperatura no tuvo efectos negativos en la cuantificación de la concentración de lípidos por fluorescencia por rojo de Nilo en la microalga, siguiendo una correlación positiva con respecto a la concentración de lípidos determinados por el método gravimétrico (*Chlorella sp.*:  $R^2 = 0,87$ ; *T. chuii*:  $R^2 = 0,69$ ). Las ecuaciones de la recta de cada especie

de microalga estudiada en el presente trabajo, fueron utilizadas para determinar la concentración lipídica a partir de valores de fluorescencia. Algunos estudios han utilizado la técnica de fluorescencia para identificar y cuantificar lípidos neutros en células de microalgas, con diferentes protocolos y calibraciones, con longitudes de ondas variables de emisión y excitación, además de la utilización de diferentes solventes (Elsley *et al.*, 2007). Según algunos autores, la penetración de la tinción rojo de Nilo, dependería entre otros factores de la elección del solvente, la temperatura y tiempo de incubación, rigidez de la pared celular en algunas especies de microalgas, la presencia de pigmentos, entre otras (Elsley *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009).

Los resultados de estrés fisiológico por factores abióticos en el presente estudio para ambas especies, presentaron valores altos en el control en comparación a los cultivos iniciales no sometidos a estrés (2,4% versus 10,4% en *Chlorella* sp., y 0,6% versus 5,5% en *T.chuii*). La variación en estos porcentajes pudo deberse a las altas concentraciones celulares en los ensayos estrés y alta fluorescencia que presentaron ambas especies provenientes de cultivos en tubos de 100 mL.

Luego de ser aplicado cada tipo de estrés, sólo el efecto de la depleción de nitratos aumentó significativamente la concentración de lípidos con respecto al ensayo control, en *Chlorella* sp. En el ensayo estrés de luz, se presentaron altos valores de concentración de lípidos en toda la experiencia, aunque estos valores no pueden ser atribuidos al efecto de la luz. En *T. chuii* hubo un aumento significativo estadísticamente en la concentración de lípidos en el ensayo "stress nitratos" con respecto al ensayo "control nitratos". Estos

resultados concuerdan con los reportados por Damiani *et al.*, (2010), quienes sometieron a estrés de luz y depleción de nitrógeno a la especie *Haematococcus pluvialis*, presentando aumento significativo de la concentración de lípidos en los ensayos sometidos a ambos tipos de estrés.

Varios estudios han demostrado que el efecto de la depleción de nitratos en el medio de cultivo disminuye la tasa de crecimiento celular y aumenta la concentración de lípidos (Illman *et al.*, 2000; Converti *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009; Damiani *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2010). En este estudio, cada estrés fue aplicado en forma bifásica, es decir, cada estrés comenzó solo desde la fase exponencial tardía. Los ensayos "estrés nitrato", "control nitrato", "estrés Fe" y "control Fe", fueron sometidos a centrifugación y recambio del medio de cultivo en la fase exponencial tardía. Este recambio puede haber inducido al aumento parcial de la concentración celular, debido a la renovación total de los componentes del medio de cultivo, excepto el componente de prueba. En el caso de la depleción de nitratos, la concentración disminuida no fue del 100%, sino del 75%. Esta fracción de nitratos en el medio pudo haber ayudado a las células en un corto plazo a seguir con sus procesos normales de crecimiento.

En cuanto al estrés por depleción de Fe, muy pocos estudios se han realizado al respecto, aunque en todos concuerdan que niveles elevados de Fe en el medio provoca estrés oxidativo y bajo crecimiento celular (Estevez *et al.*, 2001; Shcolnick *et al.*, 2009). Un estudio realizado por Liu *et al.* (2008), reportaron que bajas concentraciones de  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{Fe}^+$  quelado, no indujeron a la producción de lípidos en *Chlorella vulgaris*, en cambio concentraciones de

$1,2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>, si indujo a la producción de lípidos en *C. vulgaris*. En el presente estudio, la depleción de FeCl<sub>3</sub> no indujo al aumento en la concentración lipídica con respecto al ensayo "control Fe". Si hubo un aumento parcial en la concentración celular, y un declive luego que ambos ensayos fueran sometidos a centrifugación y recambio del medio de cultivo. Estos resultados podrían deberse a la presencia de Fe intracelular, ya que el medio de cultivo utilizado en toda la experiencia fue rico en macronutrientes y reforzado en FeCl<sub>3</sub> (Pereira, 2009).

Especies sometidas a un estrés abiótico utilizarían la energía disponible para acumular lípidos en vez de ser utilizada para crecimiento celular, así presentarían una disminución en su tasa de crecimiento y aumentaría la producción lipídica por peso de biomasa seca. De acuerdo a esto, la aplicación de estrés fisiológico a una cepa de microalga, ha sido el interés actual de varios autores (Liu *et al.*, 2008; Converti, *et al.*, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009; Damiani *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). En el presente estudio, los resultados de estrés abióticos en los ensayos, "estrés nitrato" y "estrés Fe", en *Chlorella* sp., y *T. chuii*, no presentaron diferencias significativas en el crecimiento celular con respecto a su correspondiente control. Además, la tasa de crecimiento tuvo leves variaciones luego de que ambas especies fueran sometidas a estrés en la fase exponencial tardía de cada ciclo de cultivo, no pudiendo ser relacionada su disminución con el aumento en la concentración lipídica. A pesar de que en ambas especies estudiadas, hubo un aumento en la concentración de lípidos por peso seco, en los ensayos estrés (excepto en el ensayo estrés Fe de la especie *Chlorella* sp.), sólo el ensayo "estrés Nitrato" tuvo un aumento significativo luego de ser aplicado el estrés. Converti *et al.*

(2009), analizaron la tasa de crecimiento específica en *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata*, al ser sometidas a estrés de temperatura y  $\text{NaNO}_3$ . En *C. vulgaris*, la tasa de crecimiento específica no fue afectada en comparación al control, al ser sometidas a temperaturas entre los 25 y 30°C, tampoco al ser privadas de  $\text{NaNO}_3$ , aunque sí fue incrementada su concentración lipídica en ambos casos. En cuanto a *N. oculata*, no hubo una relación entre la disminución de la tasa de crecimiento específica y el aumento de la concentración lipídica al disminuir la temperatura; en cambio, si hubo una disminución en la tasa de crecimiento específica al ser sometida a privación de  $\text{NaNO}_3$  con respecto al control, y su concentración lipídica aumentó significativamente. Estos antecedentes demuestran que microalgas sometidas a estrés fisiológico, no siempre responden a la relación entre la disminución de la tasa de crecimiento y el aumento en la concentración lipídica.

Los principales ácidos grasos encontrados en algas verdes son aquellos con cadenas entre 16 y 18 carbonos (Hu *et al.*, 2008, Damiani *et al.*, 2010), tal como indican los resultados del presente trabajo. Los ácidos grasos pueden ser divididos por su composición química en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, dependiendo de los dobles enlace en las cadenas de carbono. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son los ideales para la obtención de biodiesel debido a la alta volatilidad y mayor afinidad con los motores convencionales (Amin 2008; Basha *et al.*, 2009), y principalmente favorables para el transporte aeronáutico (Brenan & Owende, 2010). Los principales ácidos grasos encontrados en *Chlorella* sp., fueron el ácido palmítico, palmitoleico y eicosapentaenoico. En *T. chuii*, los principales ácidos grasos encontrados fueron el ácido palmítico, el ácido linoleico y el ácido oleico,

este último, considerado el ácido graso ideal para la elaboración de biodiesel (Knothe, 2005). En el presente trabajo, el ácido palmítico tuvo las mayores concentraciones en ambas microalgas y con los distintos tipos de estrés, exceptuando el estrés de "intensidad de luz", el cual no tuvo datos disponibles en el presente estudio para ambas especies. En *Chlorella* sp., el ácido palmítico aumenta desde 32,3% en el ensayo "control nitrato" a 34,4% en el ensayo "estrés nitrato". En *T. chuii*, el ácido palmítico aumenta desde un 38,8% en el ensayo "control nitrato" a un 46,3% en el ensayo "estrés nitrato". En el ensayo "estrés Fe" no presenta un aumento y en el ensayo "intensidad de luz" no se encuentran datos disponibles. Según Damiani *et al.* (2010), el ácido palmítico se ve afectado en su concentración cuando las microalgas son sometidas a estrés, lo cual se ve correspondido en el ensayo "estrés nitrato" para ambas especies de microalgas.

En *T. chuii*, el ácido oleico presenta un aumento de 13,4% en el ensayo "control nitrato" a un 23,6% en el ensayo "estrés nitrato", y de un 19,8% en el ensayo "control Fe" a un 21,6% en el ensayo "estrés Fe". En este estudio, ambas microalgas presentaron altos porcentajes de estos ácidos grasos ideales para la elaboración de biodiesel, aunque no todos los ácidos grasos presentan la misma eficiencia y calidad requerida por los estándares mundiales. Una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) están presentes generalmente en microalgas (Harwood & Guschina, 2009). Estos ácidos grasos, generalmente son menos eficientes para la fabricación de biodiesel por la inestabilidad que poseen producto de sus dobles enlaces. Para cumplir con los requisitos de las normas europeas sobre estándar de calidad de biodiesel para vehículos (EN 14214), uno de los principales requerimientos son la estabilidad

del biodiesel frente a la oxidación, siendo el ácido linoleico y linolénico, quienes presentarían una susceptibilidad especial a la oxidación cuando el biodiesel debe ser almacenado (Knothe, 2005). En el presente estudio, *T. chuii* presentó el segundo más alto porcentaje en la concentración de ácido linoleico, con porcentaje de 41,2% en el ensayo control. En el ensayo "control nitrato" el porcentaje disminuyó desde un 19,5%, a un 7,5% en el ensayo "estrés nitrato". En el ensayo "control Fe" el porcentaje disminuyó desde un 13,2% a un 12,7%, en el ensayo "estrés Fe". En *Chlorella* sp., los porcentajes de ácido linoleico fueron menores al 13,4% de la composición total de ácidos grasos. En cuanto a los estándares europeos permitidos de ácido linoleico en biodiesel para vehículos (EN 14214), este ácido graso puede alcanzar un porcentaje de 12% (mol/mol), además el contenido de EMAG con más de cuatro dobles enlaces, sólo puede alcanzar el 1% (mol/mol), en el biodiesel para vehículos, según la norma europea.

Los PUFA's poseen un gran potencial nutricional tanto para animales como para humanos. Según información recopilada por Harwood & Guschina (2009), los PUFA'S como el ácido linoleico, el ácido araquidónico (ARA), el ácido eicosapentaenoico (EPA), y el ácido docosahexaenoico (DHA), son usados como suplementos nutricionales en formulaciones infantiles, además el EPA y DHA, son ampliamente utilizados en la nutrición de organismos de acuicultura. Por otra parte, los EPA y DHA, forman parte de los ácidos grasos esenciales en seres humanos, por lo cual su deficiencia en los organismos, estaría vinculado a una propensión en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. *Chlorella* sp., tuvo un alto porcentaje de EPA en el presente estudio, con valores de 16,4% en el ensayo control, en el ensayo "control nitrato", presentó

un valor de 22%, y un valor de 16,3% en el ensayo "estrés nitrato". En el ensayo "control Fe", tuvo un porcentaje de 20,85% y 12,6% en el ensayo "estrés Fe". En *T. chuii*, los porcentajes de EPA estuvieron por debajo del 13,9% del total de ácidos grasos. Estos resultados indican que tanto *Chlorella* sp., como *T. chuii*, al ser sometidas a estrés aumentan la concentración de ácidos grasos ideales para la elaboración de biodiesel y disminuyen la concentración de aquellos ácidos grasos que afectan su elaboración, por otra parte poseen un perfil de ácidos grasos ideales para la obtención de compuestos nutricionales.

#### **4.2 Actividad Antioxidante de microalgas *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii***

De acuerdo a los resultados presentados en este estudio, la actividad antioxidante presentada por los extractos de *Chlorella* sp. y *T. chuii* con el solvente apolar hexano tuvo diferencias significativas entre las concentraciones analizadas en este estudio. Estos resultados se acercan a los encontrados por Custodio *et al.*, (2012) para microalgas *Tetraselmis chuii* y *Chlorella minutissima*, aunque los porcentajes de actividad antioxidante obtenidos en la concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup> en este estudio para la especie *T. chuii*, son menores en comparación a los resultados presentados por el autor (46,4 ± 2% versus 68,1 ± 2,3%; respectivamente).

Los resultados mostrados por el solvente de polaridad intermedia diclorometano (DCM), presenta alta actividad en ambas microalgas para concentraciones de 5 y 10 mg ml<sup>-1</sup>, con porcentajes superiores al 50%. Además, la actividad antioxidante en la concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup>, es similar a la producida por el antioxidante sintético BHT, con porcentajes por sobre el

80%. Resultados similares en la actividad antioxidante con DCM fueron encontrados para las microalgas *Isochrysis. galbana* y *Chaetoceros calcitrans*, mostrando altos porcentajes  $97,1 \pm 0,1\%$  y  $97,4 \pm 0,4\%$  frente a la peroxidación del ácido linoleico (Natrah *et al.*, 2007). La concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ) para el extracto *Chlorella* sp., con hexano resultó ser  $6,9 \text{ mg mL}^{-1}$ , en cambio con DCM fue de  $3,4 \text{ mg mL}^{-1}$ , Para *T.chuii* el  $IC_{50}$  con el solvente hexano registró una concentración de  $12,1 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $3,3 \text{ mg mL}^{-1}$  con el solvente DCM. Estos resultados indicarían que los extractos de microalgas *Chlorella* sp. y *T.chuii*, poseen una alta actividad antioxidante de compuestos de polaridad intermedia y apolares en los cuales estarían ubicados derivados de ácidos grasos y terpenoides (ej. Carotenoides, entre otros) (Herrero *et al.*, 2006). Según Custodio *et al.* (2012), la actividad antioxidante en microalgas por solventes apolares no puede ser atribuida a compuestos fenólicos, importantes antioxidantes y sequestradores de radicales libres en enfermedades neurodegenerativas, debido a que estos radicales libres poseen alta afinidad por solventes polares.

Las microalgas representan un recurso promisorio de antioxidantes naturales. Sin embargo, no todos los grupos de microalgas se pueden utilizar como fuentes naturales de antioxidantes, debido a su variado contenido en compuestos objetivo, variabilidad en la tasa de crecimiento, facilidad de cultivo o el rendimiento de sus compuestos (Li *et al.*, 2007). El presente estudio sólo estuvo enfocado en los compuestos bioactivos de naturaleza apolar, importantes antioxidantes con amplios beneficios para la salud humana.

Estudios posteriores debieran enfocarse en la identificación y aislamiento de compuestos bioactivos de naturaleza apolar importantes para la nutrición y salud de diversos organismos, incluyendo humanos.

## 5. Conclusión

En el presente estudio *Chlorella* sp., cultivada en condiciones normales de laboratorio y sistema tipo *batch*, tuvo mejores rendimientos lipídicos en comparación a *T. chuii*.

En los ensayos de estrés abiótico, el "estrés de luz" tuvo mejores resultados en cuanto a la concentración lipídica en *Chlorella* sp., aunque un aumento significativo solo puede ser atribuido al estrés nitrato, luego de ser aplicado dicho estrés. En *Tetraselmis chuii*, la concentración de lípidos fue superior significativamente en el ensayo estrés nitrato con respecto a su control, luego de ser aplicado dicho estrés.

El perfil lipídico mostró que los principales ácidos grasos encontrados en *Chlorella* sp., fueron el ácido palmítico, ácido palmitoleico y ácido eicosapentenoico, y en *T. chuii*, fueron los ácido palmítico, linoleico y oleico, este último importante para la elaboración de biodiesel. Los resultados estuvieron basados en el porcentaje de la concentración de cada ácido graso, por la concentración total en cada ensayo. Todos los ácidos grasos determinados en el perfil lipídico tienen propiedades tanto para la fabricación de biodiesel, como para nutrición animal y humana.

El porcentaje de actividad antioxidante en las microalgas *Chlorella* sp. y *T. chuii*, a través de la técnica de DPPH, presentó diferencias significativas utilizando distintas concentraciones de extractos, siendo las concentraciones mayores quienes presentaron mejores porcentajes de actividad. El IC<sub>50</sub> tuvo mejores resultados con el solvente de polaridad intermedia DCM, para ambos

extractos de microalgas. Estudios posteriores se deberían enfocar en identificar los compuestos bioactivos responsables de la actividad antioxidante

## 6. Referencias

Amin, A., 2008. Chemopreventive effect of *Chlorella* on the antioxidant system in 7, 12-Dimethylbenz[a] Anthracene-induced oxidative stress in liver. *International Journal of Pharmacology*, **4**: 169-176.

Basha, S. A., K. R. Gopal & S. A. Jebaraj, 2009. Review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **13**: 1628-1634.

Becker, E.W., 1994 *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, 291 pp.

Bhatnagar, A., M. Bhatnagar, S. Chinnasamy, & K. C. Das, 2010. *Chlorella minutissima*: A promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **161**:523-536.

Brennan, L., & P. Owende, 2010. Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**: 557-577.

Campbell, P K., T. Beer, & D. Batten, 2011. Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae in ponds. *Bioresource Technology*, **102**: 50-56.

Cavalier-Smith, T., 2010. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biology Letters*, **6**: 342-345

Cembella, A.D., N.J. Antia, & P.J. Harrison, 1984. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: A

multidisciplinary perspective. *CRC -Critical Reviews in Microbiology*, **10** (4):317-91.

Chen, W., C. Zhang, L. Song, M. Sommerfeld, & Q. Hu, 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, **77**: 41-47.

Chen, M., H., Tang, H. Ma, T. C. Holland, K.Y. Simon Ng, & S. O. Salley, 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae. *Bioresource Technology*, **102**: 1649-1655.

Cheeseman, K. H. & T. F. Slater, 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, **49** (3): 481-493.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**: 294-306.

Converti, A., A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, & M. Del Borghi, 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, **48**: 1146-1151.

Cordero, J., M. Guevara, E. Morales, & C. Lodeiros, 2005. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, **53**: 3-4.

Custodio, L., T. Justo, L. Silvestre, A Barradas, C. Vizetto Duarte, H. Pereira, L. Barreira, A. P. Rauter, F. Alberício, & J. Varela, 2012. Microalgae of

different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry*, **131** (1): 134-140.

Damiani, M. C., C. A. Popovich, D. Constenla, & P. I. Leonardi, 2010. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, **101**: 3801-3807.

Demirbas, A. & M. F. Demirbas, 2010. *Algae energy: algae as a new source of biodiesel*. Springer, 204 pp.

Dillard, C. J., & J. B. German, 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 1744-1756.

Ehimen, E.A., Z.F. Sun, & C.G. Carrington, 2010. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, **89**: 677-684.

Else, D., D. Jameson, B. Raleigh, & M. J. Cooney, 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, **68**: 639-64

EIA, 2011. U.S. Energy Information Administration. Annual energy outlook. [http://www.eia.gov/forecasts/aeo/MT\\_emissions.cfm#ghg](http://www.eia.gov/forecasts/aeo/MT_emissions.cfm#ghg)

Estevez, M. S., G. Malanga, & S. Puntarulo, 2001. Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Plant Science*, **161**: 9-17

Fábregas, J., J. Abalde, C. Herrero, B. V. Cabezas, & M. Veiga, 1984. Growth on the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations; *Aquaculture*; **42**: 207-215.

Fang, Y. Z., S. Yang, & G. Wu, 2002. Regulation of physiological systems by nutrients: free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18**:872- 879.

Fonseca, D. R., 2008; *Biomass to Liquid Biofuels Processes*. Tesis para optar al título de Mestre Integrado em Engenharia Química. Universidade do Porto. 83 pp.

Garibay Hernández, A., R. Vázquez-Duhalt, M. Sánchez Saavedra, L Serrano Carreón, & A. Martínez Jiménez, 2009. Biodiesel a partir de microalgas. *Biotecnología*, **13** (3): 38-61.

Gouveira, L., & A. C. Oliveira, 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology*, **36**:269-274

Griffiths, M. J., & S. T. L. Harrison, 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, **21**:493-507.

Grobbelaar, J.U., 2004. *Algal Nutrition: Mineral Nutrition*. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology Ed. Amos Richmond. Blackwell Publishing, Ltd. 577 pp.

Grossman, A., M. R. Schaefer, G. G. Chiang & J Colliers, 1993. The Phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiological Reviews*, **57**: (3) 725-749.

Gupta, R. B., & A. Demirbas, 2010. Gasoline, diesel, and ethanol biofuels. Cambridge University Press, 246 pp.

Harun, R., M. Singh, G. M. Forde, & M. K. Danquah, 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**: 1037-1047.

Harwood, J. L. & I. A. Guschina, 2009. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, **91**: 679-684.

Heredia-Arroyo, T., W. Wei, & B. Hu, 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, **162**:1978-1995.

Herrero, M. L Jaime, P. J. Martín-Álvarez, A. Cifuentes & E. Ibáñez, 2006. Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, **54** (15): 5597-5603.

Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert & A. Darzins, 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, **54**: 621-639.

Huang, G., F. Chen, D. Wei, X. W. Zhang, & G. Chen, 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, **87**: 38-46.

Ibañez, E., J. A. Mendiola, I. Rodríguez-Meizoso, F.J. Señoráns, G. Reglero, & A. Cifuentes, 2008. Antioxidants in plant foods and microalgae extracted using compressed fluids. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **7**(8): 3301-3309.

Illman, A. M., A. H. Scragg, & S. W. Shales, 2000. Increase in *Chlorella* strains caloric values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microbiology and Technology*, **27**:631-635.

Jorquera, O., A. Kiperstok, E. A. Sales, M. Embiruçu, & M. L. Ghirardi, 2010. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, **101**: 1406-1413.

Kumar, A., S. Ergas, X. Yuan, Ashish Sahu, Q. Zhang, J. Dewulf, F. X. Malcata, & H. van Langenhove, 2010. Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, **28** (7): 371-380.

Knothe, G., 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, **86**: 1059- 1070.

Lee, Y. K., 2004. *Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition*. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Amos Richmond. Blackwell Publishing, Ltd. 577 pp.

Lee, Y. K., & H. Shen, 2004. *Basic culturing techniques*. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Amos Richmond. Blackwell Publishing, Ltd. 577 pp.

Lee, R.E., 2008. Phycology. Cambridge University Press. 561 pp.

Li, H. B, K. W. Cheng, C. C. Wong, K. W. Fan, F. Chen, & Y. Jiang, 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102**:771-776.

Liu, Z. Y., G. C. Wang, & B. C. Zhou, 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, **99** (11): 4717-4722

Masojídek, J., M. Koblížek, & G. Torzillo, 2004. *Photosynthesis in Microalgae*. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Amos Richmond. Blackwell Publishing, Ltd. 577 pp.

Miranda, M.S., R.G. Cintra, S.B.M. Barros, & J. Mancini-Filho, 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **31** (8): 1075-1079.

Molina Grima, E, E. Belarbi, F. Ación Fernández, A. Robles Medina, & Y. Chisti, 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, **20**:491-515.

Moreno, S., T. Scheyer, C. Romano, & A. Vojnov, 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, **40**: 223-231.

Natrah, F. M. I., F. M. Yusoff, M. Shariff, F. Abas & N. S. Mariana, 2007. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal Applied Phycology*, **19**:711-718.

Pereira, H., 2009. *Desenvolvimento e optimização de um meio de cultura para produção de biomassa algal em larga escala*. Tese para optar al grado de Mestre em Aquacultura e Pescas, Universidade do Algarve, Portugal. 77 pp.

Perry, G., A. D. Cash, & M. A. Smith, 2002. Alzheimer disease and oxidative stress. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2** (3): 120-123.

Phadwal, K, & P. K. Singh, 2003. Effect of nutrient depletion on  $\beta$ -carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Bioresource Technology*, **90**: 55-58

Pulok, K. M., K. Venkatesan, M. Mainak, & P. J. Houghton, 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, **14**: 289-300.

Raven, H.P.; R.F. Evert, & S.E. Eichhorn, 1996. *Biologia Vegetal*. 5<sup>ta</sup> ed. Río de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 738 pp.

Rodolfi, L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, & M. R. Tredici, 2009. Lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **102** (1): 100-112.

Sasidharan, I. & N. Menon, 2011. Effects of temperature and solvent on antioxidant properties of curry leaf (*Murraya koenigii* L.). *Journal Food, Science and Technology*, **48**(3):366-370.

Scott, S. A., M. P Davey, J. S. Dennis, I. Horst, C. J. Howe, D. J Lea-Smith, & A. G. Smith, 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, **21**:1-10.

Shcolnick, S., T. C. Summerfield, L. Reytman, L. A. Sherman, & N. Keren, 2009. The mechanism of Iron homeostasis in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its relationship to oxidative stress. *Plant Physiology*, **150**: 2045-2056

Singh, S.P. & D. Singh, 2010. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**: 200-216.

Smedes, F., & T.K. Thomasen, 1996. Evaluation of the *Bligh & Dyer* lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, **32**: 681-688.

Stephenson, A. L., E. Kazamia, J. S. Dennis, C. J. Howe, S. A. Scott, & A. G. Smith, 2010. Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: a comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. *Energy Fuels*, **24**: 4062-4077.

Subhara, B. G., 2010. Sustainability of algal biofuel production using integrated renewable energy park (IREP) and algal biorefinery approach. *Energy Policy*. 38 (10): 5892-5901.

Takagi, M., K. Watanabe, K. Yamaberi, & T. Yoshida, 2000. Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **54**: 112-117.

Tang, H., M. Chen, M.E.D. Garcia, N. Abunasser, K.Y. Simon, & S. O. Salley, 2011. Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. *Biotechnology and Bioengineering*, **108** (10): 2280-2287.

Taylor, G., 2008. Biofuels and Biorefinery concept. *Energy Policy*, **36**: 4406-4409.

Tomaselli, L., 2004. *The Microalgal Cell*. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Amos Richmond. Blackwell Publishing, Ltd. 577 pp.

Tran, N.H., J.R. Bartlett, G.S.K. Kannangara, A.S. Milev, H. Volk, & M.A. Wilson, 2010. Catalytic upgrading of biorefinery oil from micro-algae. *Fuel*, **89**: 265-274.

Tredici, M., 2004. *Mass Production of Microalgae: Photobioreactors*. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Amos Richmond. Blackwell Publishing, Ltd. 577 pp.

Varsano, T., D. Kaftan & U. Pick, 2003. Effects of Iron Deficiency on Thylakoid Membrane Structure and Composition in the Alga *Dunaliella salina*. *Journal of Plant Nutrition*, **26**:10-11.

Van Beilen, J. B., 2010. Why microalgal biofuels won't save the internal combustion machine. *Biofuels, Bioproducts and Biorefinery*, **4**:41-52.

Velázquez, A., J. Rosas, T. Cabrera, J. Millán, & M. Hernández, 2001. Efecto de *Tetraselmis chuii*, *Nannochloris oculata* y *Dunaliella salina* sobre el crecimiento poblacional de *Apocyclops distans* (Copepoda, Cyclopoidae) en diferentes condiciones de temperatura e iluminación. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **36**(2): 189-197.

Verma, N. M., S. Mehrotra, A. Shukla & B. Nath Mishra, 2010. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology*, **9** (10): 1402-1411.

Weinreb, O., S. Mandel, O. Bar-Am, & T. Amit, 2011. Iron-chelating Backbone coupled with monoamine oxidase inhibitory moiety as novel pluripotential therapeutic agents for Alzheimer's disease: A tribute to Moussa Youdim. *Journal of Neural Transmission*, **118**: 479-492.

Wijffels, R. H. & M. J. Barbosa, 2010. An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*, **329**: 796-799.

Xin, L., H. Hong-Ying, G. Ke, S. Ying-Xue, 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, **101**: 5494-5500.

Xiong, W., C. Gao, D. Yan, C. Wu, Q. Wu, 2010. Double CO<sub>2</sub> fixation in photosynthesis-fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production. *Bioresource Technology*, **101**: 2287-2293