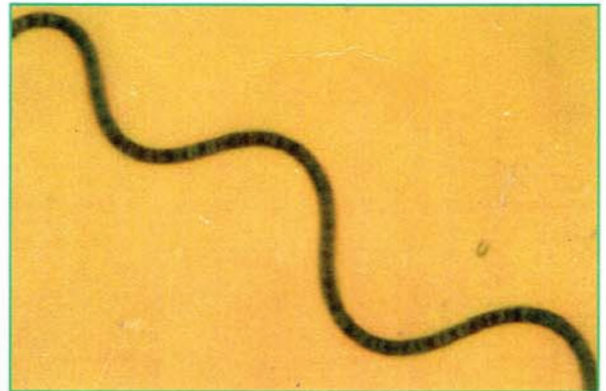
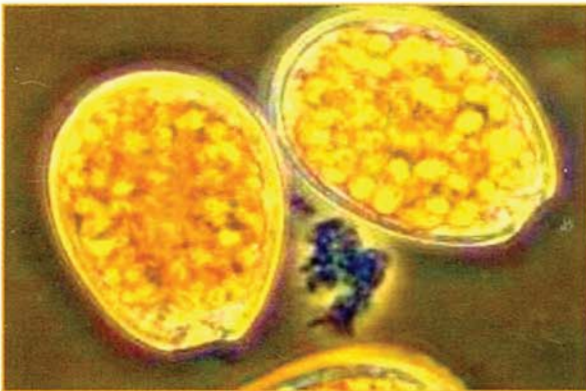
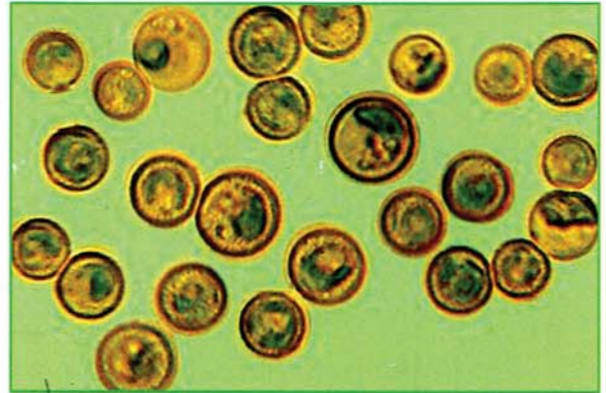
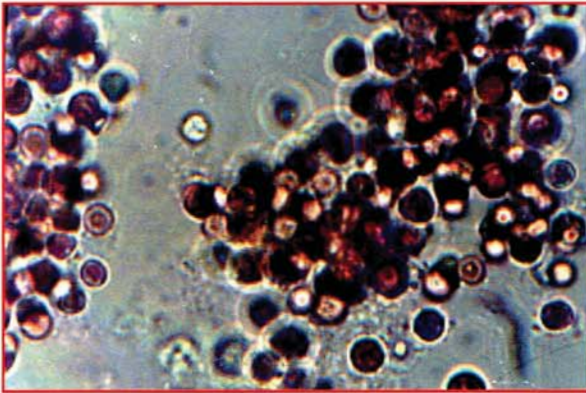
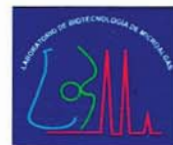


MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL



Editado por:
Bertha Olivia Arredondo Vega y Domenico Voltolina



MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL

Editado por:

Bertha Olivia Arredondo Vega y Domenico Voltolina

Diseño editorial
Edgar Yuen Sánchez

Diseño de la portada
Gerardo Hernández García

Fotomecánica y pre-prensa
Santiago Rodríguez Álvarez

Impresión y acabados
Santiago Rodríguez Álvarez
Rubén Andrade Velázquez

Descripción fotos portada:

Izquierda a derecha (arriba):

Porphyridium cruentum (microalga marina; rodoficea)

Neochloris oleoabundans (microalga edáfica de ambiente dulceacuícola; cloroficea)

Izquierda a derecha (abajo):

Prorocentrum lima (dinoflagelado marino tóxico; dinoficea)

Spirulina (Arthrospira) maxima (cianobacteria; cianofita)

D.R. © 2007 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita
La Paz, Baja California Sur 23090
México

ISBN 968-5715-51-3

Derechos reservados conforme a la ley

Impreso y hecho en México

CONTENIDO GENERAL

PRESENTACIÓN	v
AGRADECIMIENTOS	vii
1. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS DE MICROALGAS <i>Christine J. Band Schmidt</i>	1
2. CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO <i>Bertha Olivia Arredondo Vega</i> <i>Domenico Voltolina</i>	17
3. DETERMINACIÓN DE PESO SECO Y CONTENIDO ORGÁNICO E INORGÁNICO <i>Bertha Olivia Arredondo Vega</i> <i>Domenico Voltolina</i>	27
4. DETERMINACIÓN DE PROTEINAS POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS <i>Bertha Olivia Arredondo Vega</i> <i>Beatriz Cordero Esquivel</i> <i>Domenico Voltolina</i>	31
5. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS <i>Bertha Olivia Arredondo Vega</i> <i>Beatriz Cordero Esquivel</i> <i>Domenico Voltolina</i>	41
6. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS <i>Jorge Arturo Del Angel Rodríguez</i> <i>Laura Carreón Palau</i> <i>María Olivia Arjona López</i>	47
7. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA <i>Bertha Olivia Arredondo Vega</i> <i>Domenico Voltolina</i>	59
8. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA (HPLC) <i>Francisco Eduardo Hernández Sandoval</i> <i>Lilia Isabel Ibarra Martínez</i>	69
9. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GCMS) <i>Laura Carreón Palau</i> <i>Jorge Arturo Del Angel Rodríguez</i> <i>María Olivia Arjona López</i>	81

PRESENTACIÓN

Esta obra surge de la idea de compartir nuestras experiencias de los últimos diez años de trabajo sobre el cultivo de microalgas que hemos realizado a nivel experimental, y la evaluación indirecta de su calidad mediante el análisis de la composición de su biomasa. En este proceso, han desfilado por nuestros laboratorios investigadores y estudiantes de licenciatura y postgrado procedentes de diferentes instituciones, tanto nacionales como del extranjero.

Durante estos años, con la idea de destacar la importancia de las microalgas para la acuicultura y biotecnología, se organizaron también tres cursos teóricos prácticos sobre tópicos de microalgas, en los cuales tuvimos la oportunidad de compartir nuestro aprendizaje con los participantes y con los investigadores extranjeros y nacionales que invitamos como instructores, como los doctores Concepción Herrero y Julio Abalde de la Universidad de La Coruña, Zvi Cohen de la Ben Gurion University of the Negev, Rafael Vázquez Duhalt del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca y Eugenia Olguín del Instituto de Ecología de Xalapa, que enriquecieron estos cursos con sus conocimientos.

El primer curso que impartimos en colaboración con el CICESE fue en 1997 y lo consideramos como el pionero. Debido a la limitación de nuestra infraestructura de ese tiempo, la parte práctica abarcó solamente el aislamiento de microalgas, la preparación y esterilización de medios, además de técnicas de cultivo y de análisis proximal de la biomasa.

Para los cursos posteriores ya contábamos con el equipo necesario para determinar la composición de las microalgas mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alta resolución, microscopía óptica y de fluorescencia, con los cuales fue posible estandarizar y calibrar la metodología para la extracción y cuantificación de ácidos grasos y pigmentos.

Este documento nace de nuestro interés en compartir estas experiencias sobre el cultivo de microalgas, dejando un poco más explícitos algunos detalles de cada técnica, que a pesar de su importancia no se encuentran en general en los protocolos metodológicos publicados en la literatura científica, y explicando además el fundamento de cada una de las técnicas que se utilizan para evaluar la composición de la biomasa de las microalgas, todo con el único deseo de que este material sea de utilidad para el trabajo experimental de nuestros lectores.

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR),
La Paz, Baja California Sur
Marzo, 2007**

**Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Dr. Domenico Voltolina**

AGRADECIMIENTOS

A todos los participantes y autores de esta obra quienes mantuvieron siempre su espíritu de colaboración y respuesta positiva en pro de mejorar cada vez las ideas descritas en cada capítulo.

Al CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.) por las facilidades y apoyo brindado durante estos 10 años en los que hemos trabajado en colaboración con investigadores, técnicos y estudiantes, pensando siempre en mejorar cada día nuestra labor para dejar un legado para los que en el futuro tomarán las riendas de nuestros laboratorios y líneas de investigación.

A CONACYT, CONABIO, SIMAC por los proyectos autorizados en el pasado (y por supuesto por los que vendrán en el futuro) que nos han permitido dotar de infraestructura nuestros laboratorios, así mismo por el apoyo recibido en becas para estudiantes de licenciatura.

A Lawrence Miller Thayer (co-webmaster) del CIBNOR quien con su espíritu firme de apoyar a la educación siempre ha estado dispuesto a colaborar en toda idea que genere información valiosa para los estudiantes, para la futura generación, enriqueciendo este escrito con la edición de algunas figuras.

Al Ing. Edgar Yuen Sánchez del Centro de Información-Biblioteca CIBNOR, por el diseño editorial.

A Gerardo Hernández García del Departamento de Promoción y Difusión CIBNOR, por la edición de la portada y el diseño digital del logotipo "Célula de Microalga".

A Jorge Del Ángel Rodríguez por el diseño del logotipo "Laboratorio de Biotecnología de Microalgas".

A la Dra. Thelma Castellanos Cervantes del Programa de Posgrado CIBNOR por el apoyo otorgado.

A Santiago Rodríguez Álvarez y Rubén Andrade Velázquez de la Imprenta CIBNOR.

A Agilent Technologies por la autorización para incluir la figura comparativa de los sistemas GC y HPLC.

Y a ti lector de este manuscrito que has sido la principal fuente de inspiración para desarrollar esta obra, nuestro agradecimiento infinito.

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR),
La Paz, Baja California Sur
Marzo, 2007**

**Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Dr. Domenico Voltolina**

CAPÍTULO 1

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS DE MICROALGAS

CHRISTINE J. BAND SCHMIDT

Centro Interdisciplinario de Ciencias del Mar (CICIMAR-IPN). Departamento de Plancton
y Ecología Marina. La Paz, Baja California Sur. México. cbands@ipn.mx

CONTENIDO

1. IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS REGIONALES DE MICROALGAS
2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS
3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO
 - 3.1 AISLAMIENTO CON PIPETA
 - 3.2 DILUCIONES SERIADAS
 - 3.3 AISLAMIENTO EN PLACAS DE AGAR
4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN
 - 4.1 LAVADO POR CENTRIFUGACIÓN
 - 4.2 ULTRASONIDO
 - 4.3 BACTERIOSTÁTICOS
 - 4.4 ANTIBIÓTICOS
 - 4.5 DIÓXIDO DE GERMANIO (GeO₂)
 - 4.6 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA
 - 4.7 CONTROL DE AXENICIDAD
5. MANTENIMIENTO DE UN CEPARIO
 - 5.1 CONDICIONES DE CULTIVO
 - 5.1.1 ILUMINACIÓN
 - 5.1.2 TEMPERATURA
 - 5.1.3 AIREACIÓN Y AGITACIÓN
 - 5.1.4 pH
 - 5.1.5 SALINIDAD
6. ANEXO
7. REFERENCIAS

Palabras clave: aislamiento, purificación, mantenimiento de cepas

1. IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS REGIONALES DE MICROALGAS

Las cepas que se usan para fines comerciales se obtienen en general de colecciones ya

establecidas y conocidas, pero existen varios motivos para seguir aislando especies de microalgas de poblaciones naturales locales, en parte porque se encuentran más adaptadas a las condiciones ambientales dominantes en cada tipo de ambiente, pero también porque existen todavía muchas especies que no son bien conocidas o totalmente desconocidas, cuyo estudio pudiera ser importante para el progreso científico y tecnológico de la humanidad.

Los cultivos de microalgas han permitido obtener un mayor conocimiento sobre la complejidad de los ciclos de vida de diversas especies, generándose información sobre los diferentes estadios, toxicidad, requerimientos nutricionales, fisiología, información genética, biodiversidad, sistemática, entre otros. Aunado a ello, son un apoyo importante para estudios ecológicos y de monitoreo, funcionando como referencias taxonómicas, para la detección de especies productoras de metabolitos tóxicos, estudios de pastoreo. Experimentos *in vitro* permiten describir procesos que en ocasiones son difíciles de realizar en el campo como es la interacción de diferentes estadios del ciclo de vida con variables ambientales que favorecen o inhiben la presencia de especies y cepas en diferentes regiones, así como las adaptaciones específicas que presentan cepas de una misma especie a ambientes particulares.

Es por esto que, en vista de los avances logrados en los más de 30 años desde la publicación del clásico manual de Stein (1973), la Sociedad Ficológica Americana, consideró que era necesario un nuevo manual sobre técnicas de cultivo de microalgas. El resultado son los 25

capítulos del libro editado por Andersen (2005), 12 de los cuales son dedicados al aislamiento, purificación y mantenimiento de micro- y macroalgas y a las diferentes técnicas de preparación de material y medios de cultivo.

La finalidad de este capítulo es hacer una breve recapitulación de las técnicas y de los procedimientos que se usan con mayor frecuencia para aislar y mantener organismos del fitoplancton, aunque hay que mencionar que éstos pueden variar de acuerdo a las características de cada especie, del tipo de muestra y de los medios e instrumentos que cada operador tiene a su disposición.

2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS

Los métodos y los instrumentos que se utilizan para obtener las muestras para el aislamiento de microalgas pueden variar ampliamente, dependiendo del tipo de alga que se pretende aislar, de su abundancia absoluta y relativa en el ambiente en el cual se está colectando y de la finalidad del aislamiento. En todos los casos, todos los materiales deben estar escrupulosamente limpios y libres de sustancias tóxicas o contaminantes.

Cuando se pretende aislar especies rara o poco abundantes, se pueden realizar arrastres de corta duración para no causar daños celulares, utilizando redes de plancton con una malla apropiada (20 μm es probablemente la más indicada). Por otra parte, si son especies abundantes o frecuentes se pueden usar botellas oceanográficas (Niskin, Van Dorn, entre otras) (Fig. 1), o tubos de PVC, o mangueras que permiten obtener muestras integradas en aguas de poca profundidad.

Después de la obtención de la muestra, es recomendable eliminar organismos fitoplanctófagos de tamaño mayor de las microalgas, filtrando la muestra a través de un tamiz con una luz de malla apropiada y proceder al aislamiento en un lapso corto de tiempo. Por otra parte, si esto no fuera posible, es necesario considerar la posibilidad de cambios importantes de la comunidad presente en la muestra. Por este motivo, se recomienda transportarla en una

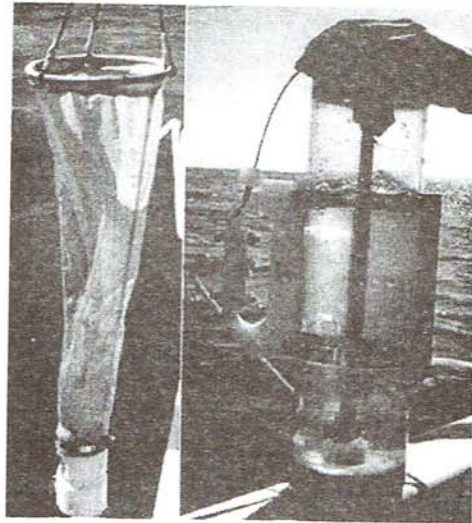


Figura 1. Red de fitoplancton y botella para colecta de plancton.

hielera, evitando el contacto directo con el hielo y la exposición directa a la luz. Algunas especies son delicadas, por lo cual es preferible evitar agitar la muestra manualmente o mediante un burbujeo con aire. Si la muestra se obtuvo con una red de plancton, se recomienda diluirla con agua filtrada.

En ocasiones, se pretende obtener células con alguna característica determinada (crecimiento rápido, tolerancia a alta o baja temperatura, o a alta o baja intensidad de luz, entre otros). En estos casos, es recomendable una incubación previa de la muestra en las condiciones deseadas y aislar posteriormente las especies que resulten dominantes.

3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO

La finalidad de aislar microalgas es la de obtener cultivos monoespecíficos a partir de un solo individuo (célula, filamento o quiste), que en este caso se definen como cultivos clonales, o iniciados con varios individuos de la misma especie. Estos cultivos pueden contener bacterias o ser libres de ellas y en el segundo caso se definen como cultivos axénicos (Pringsheim, 1926, 1946).

Existen varios métodos de aislamiento, que dependen de las dimensiones de las microalgas, de su movilidad y de su morfología. Los más

utilizados son el aislamiento con micropipeta, en placas de agar y con diluciones sucesivas y es recomendable combinar dos o más de estas técnicas, que frecuentemente permite lograr más fácilmente el aislamiento de un solo organismo. En todos los casos, los aislamientos se realizan verificando los resultados de la secuencia de operaciones con la ayuda de un microscopio.

3.1 Aislamiento con pipeta

Este método se utiliza para separar microalgas mayores a $10\ \mu\text{m}$ de diámetro en forma de quistes, células vegetativas, dinoflagelados, formas coloniales o filamentosas (Hoshaw y Rosowski, 1973; Matsuoka y Fukuyo, 2000; Andersen y Kawachi, 2005).

El método consiste en aislar una microalga con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta reducida y/o con un capilar (Fig. 2d - e). Una gota que proviene de una muestra de fitoplancton se coloca en un portaobjeto (laminilla) y se observa al microscopio, bajo el cual las células de interés se succionan por capilaridad con la micropipeta y se transfieren a un portaobjetos limpio o a una lámina excavada con una gota de agua de mar estéril (Fig. 2i). El procedimiento se repite, "lavando" la célula en medio o agua estéril hasta cuando no se observan contaminantes y la gota contiene un solo tipo de células, que requiere generalmente al menos cinco transferencias sucesivas.

Una vez realizadas las transferencias, la célula aislada se puede colocar en una placa con pocillos múltiples (Figs. 2h, 3) o en un tubo de ensayo con 2 - 5 mL de medio de cultivo estéril (Figs. 2h, 3). Esta técnica se recomienda para microorganismos que no sean sensibles a la manipulación. Se debe tener cuidado de evitar cambios bruscos de las condiciones originales de la muestra, por lo cual la transferencia se debe hacer de manera rápida y cuidadosa. Este método requiere de práctica. Es recomendable antes de iniciar el aislamiento con pipeta, experimentar con algunas microalgas similares a las que se pretenden aislar, para seleccionar la iluminación, magnificación, tipo de laminillas y cantidad de muestra y poder reconocer y capturar a la especie de interés en menos de 10 min.



Figura 2. Material empleado para el aislamiento de células fitoplanctónicas. a) tamiz, b) recipiente de vidrio, c) tubos de vidrio con tapas, d) pipetas capilares, e) pipetas Pasteur, f) pipetas de transferencia, g) recipiente para cultivo de tejidos, h) placa multipozo, i) portaobjeto, j) manguera que se inserta a pipeta capilar o Pasteur para la captura de células, k) caja de Petri.

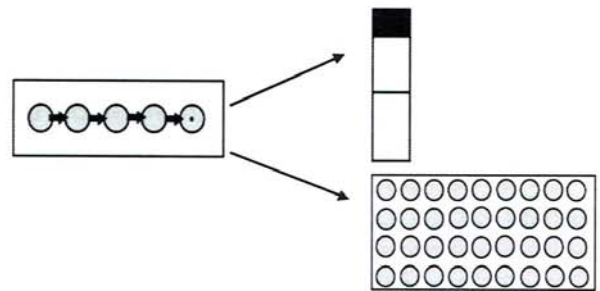


Figura 3. Aislamiento con pipeta. Las células bajo el microscopio se transfieren a un portaobjetos con una gota de medio estéril o en láminas excavadas. Realizadas las transferencias, la célula se coloca en una placa multipozos o en un tubo de ensayo.

3.2 Diluciones seriadas

Este método se utiliza cuando la microalga que se desea aislar tiene un tamaño inferior a $10\ \mu\text{m}$ de diámetro y es muy útil para aislar las especies que son más abundantes en la muestra (Guillard, 1973; Andersen y Kawachi, 2005).

Antes de iniciar las operaciones de aislamiento, es necesario estimar la concentración celular de la especie de interés, con el fin de calcular el número de diluciones necesario para reducir la concentración a unas pocas células/mL. Generalmente se toma 1 mL de la muestra original y se agrega a un tubo de ensayo que contiene

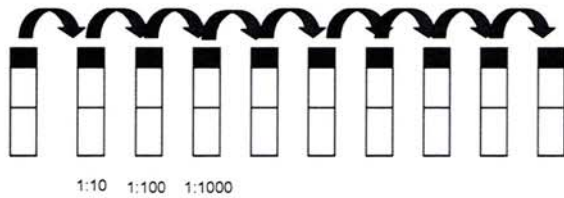


Figura 4. Aislamiento por dilución seriada.

9 mL de medio de cultivo estéril (Figs. 2c, 4), se homogeniza y luego se agrega 1 mL a un segundo tubo con 9 mL de medio, se homogeniza y así sucesivamente. El número de diluciones depende de la concentración de la microalga que se desea aislar y el intervalo de dilución que se utiliza normalmente es de 10^{-3} a 10^{-6} , dependiendo de la concentración poblacional.

Cuando la concentración de la microalga a aislar es baja, se recomienda utilizar placas con pocillos múltiples con capacidad de 250 μ L, y diluciones sucesivas de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Las transferencias se van realizando en cada una de las diluciones, y al mismo tiempo se pueden ir observando los resultados en el microscopio invertido y/o estereoscopio.

En el campo, se recomienda llevar tubos estériles vacíos. La dilución se lleva a cabo hasta que haya un organismo por 8 - 10 mL. Después de 1 a 15 días de incubación se toma una muestra de cada tubo para observarla bajo el microscopio y si es necesario se repite el proceso hasta obtener el cultivo de una sola especie. La presencia de otras especies de algas y hongos se puede detectar al microscopio sobre todo en el caso de periodos largos de incubación.

3.3 Aislamiento en placas de agar

Varias especies de microalgas se pueden aislar mediante la técnica de rayado en estrías en una caja de Petri con agar (Fig. 5). Este método también se emplea para purificar cultivos contaminados con otros microorganismos. No todas las especies se pueden mantener en medio sólido, especialmente especies flageladas y algunas diatomeas (Hoshaw y Rosowski, 1973; Andersen y Kawachi, 2005), pero esta técnica suele dar buenos resultados con especies bentónicas, clorofitas, cocoidales y cianofitas.

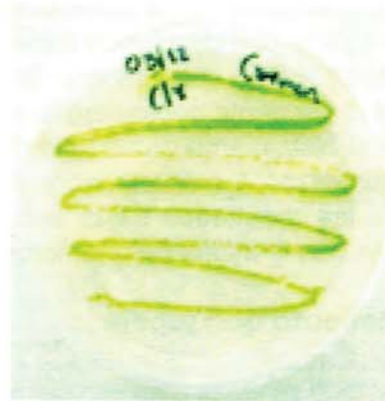


Figura 5. Cultivo de una cepa de microalga en medio sólido.

Se prepara el medio de cultivo apropiado, adicionado entre 0.8 y 2% de agar. Se esteriliza en autoclave a 120°C y 1.1 kg/cm^2 de presión durante 15 min. Posteriormente, se deja a temperatura ambiente y antes que se solidifique se vacía en cajas de Petri estériles.

Se colocan una o dos gotas, en las cajas con medio sólido, que se esparcen con un asa para bacteriología o con una varilla de vidrio doblada, previamente esterilizada. La caja se cubre con su tapa, se invierte y se coloca en un ambiente con temperatura y luz controladas; se incuba durante 4 a 8 días y posteriormente se observa al microscopio invertido y/o estereoscopio y con la ayuda del asa se seleccionan las colonias libres de otros microorganismos, que se transfieren a otra caja de Petri.

Esta tarea se realiza las veces que sea necesario hasta asegurar el éxito del aislamiento de un solo tipo de microalga y para lograrlo con mayor seguridad se recomienda utilizar esta técnica en combinación con la de diluciones seriadas que se indicó anteriormente.

En ocasiones es difícil obtener cultivos monoalgales debido a la contaminación con otras algas como cianofitas o diatomeas. El crecimiento de las diatomeas no deseables se puede controlar agregando 1 - 10 mg/L de dióxido de germanio (Ge_2O). Las cianofitas se pueden eliminar utilizando antibióticos (ej. 25 mg/L de estreptomicina). Es recomendable probar diferentes concentraciones y tiempos de exposición para cada especie.

4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN

Estos métodos se utilizan para eliminar o por lo menos diluir otros microorganismos, generalmente bacterias, presentes en la muestra o en las cepas ya aisladas. La forma más sencilla es mediante la separación de las células algales y de las bacterias por medio de centrifugación. Es recomendable probar este método antes de utilizar otras técnicas, que son más susceptibles de causar daños celulares.

4.1 Lavado por centrifugación

Se llena un tubo estéril con un cultivo en crecimiento exponencial. Se centrifuga a 2000 rpm/45-90 seg. El tiempo y la velocidad de centrifugación pueden variar dependiendo de la especie y del organismo contaminante. La centrifugación debe permitir que sedimente una parte de las células más pesadas (microalgas), mientras que las células de menor peso (bacterias) permanecen en suspensión (Guillard, 2005). Se elimina el sobrenadante y las algas se resuspenden en agua o medio estéril. Este procedimiento se repite varias veces (Alfonso y Leal, 1998; Guillard, 2005). Después del último lavado se descarta el líquido y las células se resuspenden en 1 mL de medio estéril. Pequeñas porciones se transfieren con una pipeta Pasteur estéril en una caja de Petri con agar o en un tubo con medio de cultivo. En la caja de Petri el material se distribuye con un asa de platino previamente calentada. Después de 7 - 8 días de incubación a las condiciones de temperatura e iluminación recomendadas para la especie de interés, se observa el crecimiento y las colonias mejores se pueden transferir a un medio líquido o sólido. Este método es más efectivo si se combina con el método de ultrasonido.

2.2 Ultrasonido

Este método fue descrito por Brown y Bischof (1962) y se basa en utilizar ultrasonido de baja frecuencia (90 kciclos/seg) manteniendo el cultivo en un baño de agua durante 2 seg a 20 min. La sonicación permite remover células bacterianas

que pudieran estar adheridas a la pared celular del organismo que se pretende liberar de la presencia de microorganismos. Una sonicación muy intensa puede provocar daños intracelulares y romper las células (Guillard, 2005). El tiempo y la intensidad de sonicación varían con cada especie y se determinan observando las células bajo el microscopio compuesto para constatar cualquier daño celular (González *et al.*, 1995). Este método es muy efectivo si se combina con otros métodos de separación (tamizado, centrifugación, micropipeta), además para aislar microalgas bentónicas, especies adheridas a pastos, macroalgas o para separar colonias o filamentos.

2.3 Bacteriostáticos

Un agente bacteriostático es una sustancia química o un agente biológico que detiene o evita la reproducción de bacterias. El telurito de potasio (K_2TeO_3) es uno de los agentes bacteriostáticos más utilizados y su uso fue descrito por Ducker y Willoughby (1964) y por Rosowski y Hoshaw (1970). El procedimiento consiste en preparar cajas de Petri con medio sólido al cual se agregan 10 mg/L de K_2TeO_3 . Dos o tres gotas del cultivo unialgal con bacterias se siembran en las cajas de Petri, que se incuban por 4 a 8 días en las condiciones de temperatura y luz seleccionadas. Después del periodo de incubación, se revisa el cultivo con la ayuda de un microscopio y se verifica la ausencia de bacterias. Se puede comprobar que el cultivo ha quedado axénico sembrándolo en medio solidificado con agar y adicionado con glucosa al 2%. Después de incubarse a temperatura ambiente de 24 a 72 h se puede observar a simple vista o con la ayuda del microscopio si existe crecimiento bacteriano. El telurito de potasio también se puede emplear en medio líquido a la misma concentración de 10 mg/L.

En lugar del telurito se pueden usar otros agentes bacteriostáticos y antimicrobianos, que se han utilizado con diversos organismos y que varían en su estructura química y modo de acción, como sulfonamidas, cafeína, lauril sulfato de sodio, enzimas, entre otros. La dosis a emplear varía en cada caso y depende además de la susceptibilidad de la microalga a cada producto,

pero la metodología general es la misma descrita para el telurito de potasio (Guillard, 2005).

4.4 Antibióticos

Un antibiótico es un compuesto químico que resulta letal para ciertas clases de bacterias. En general, los antibióticos lesionan de forma selectiva la membrana celular de hongos o bacterias o son letales porque inhiben la síntesis de diferentes compuestos celulares esenciales para el metabolismo.

Se han utilizado varios antibióticos y mezclas de ellos para la purificación de cultivos algales (Tabla 1). Se sugiere probar diferentes concentraciones con el fin de verificar cual es la concentración mínima efectiva, ya que también las microalgas pueden resultar susceptibles a este tipo de tratamiento. Después de incubar los cultivos de microalgas de 24 a 48 h bajo condiciones adecuadas, se transfiere aseptícamente a medio de cultivo estéril y sin antibióticos y se observan los cultivos

regularmente durante 2 a 3 semanas, para comprobar si están exentos de bacterias (González *et al.*, 1995).

La solución concentrada de la mezcla de antibióticos o del producto seleccionado debe prepararse inmediatamente antes de su utilización o se puede mantener en refrigeración inmediatamente después de la esterilización por filtración.

4.5 Dióxido de germanio (GeO₂)

Algunas veces los cultivos de microalgas vienen acompañados de diatomeas que pueden propagarse con mayor rapidez que la especie de interés. El crecimiento de diatomeas se puede controlar añadiendo al medio de cultivo líquido una concentración de 1 - 10 mg/L de dióxido de germanio (GeO₂) (Lewin, 1966; Andersen y Kawachi, 2005). Este compuesto es poco soluble en agua, por lo cual es indispensable agregar NaOH cuando se está preparando la solución concentrada que se utiliza para la preparación del medio de cultivo.

Tabla 1. Algunos antibióticos empleados para purificar cultivos de microalgas.

ANTIBIÓTICOS	mg/ L	MICROALGAS	REFERENCIAS
Penicilina G	100	Tolerado por varias especies	Guillard, 2005
Sulfato de dihidrostreptomina	25		
Sulfato de gentamicina	25		
Eritromicina	700	<i>Chorella</i>	Tomisek <i>et al.</i> , 1957
Neomicina	5	<i>Chlamydomonas</i> <i>Nostoc</i> <i>Scenedesmus</i>	Foter <i>et al.</i> , 1953
Penicilina	0.1 2	<i>Anabaena</i> <i>variabilis</i> <i>Microcystis</i>	Galloway y Kraus, 1959 Palmer y Maloney, 1955
Estreptomina	0.1 10 2-4	<i>A. variabilis</i> <i>Chlamydomonas</i> <i>Nitzschia</i>	Galloway y Kraus, 1959 Foter <i>et al.</i> , 1953
Penicilina G potásica	47		Leal, 1990
Estreptomina	23		
Penicilina	0.166		Castellvi, 1971
Estreptomina	0.050		

4.6 Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta (UV) tiene efectos letales sobre muchos organismos por su efecto mutagénico. Algunas especies son muy sensibles a bajos niveles de radiación y otras son muy resistentes. Aunque la mayoría de las algas eucariotas son más resistentes a los efectos letales de la luz UV que las células bacterianas, es recomendable usar exposiciones de tiempo corto ya que las radiaciones UV pueden causar una reducción de las tasas fotosintética y de crecimiento de microalgas (Vonshak, 1986; Villafaña *et al.*, 2004). El daño mayor de radiación UV ocurre en el límite menor del rango de UV-B o de UV-C (< 280 nm) (Guillard, 2005). Esta técnica ha tenido buenos resultados con algas que tienen matrices gelatinosas o para eliminar bacterias que se encuentran en la superficie celular (Guillard, 2005). Una lámpara UV-C (= 2750 Å) se coloca a 25 cm de distancia de los cultivos por un tiempo de 8 - 16 min (Alfonso y Leal, 1998). La efectividad de este método se confirma con la prueba que se describe a continuación.

4.7 Control de axenicidad

Mantener un cultivo axénico es difícil, pero es necesario para muchos estudios en los cuales se pretende estudiar la fisiología de la microalga en cultivo sin la interferencia de las bacterias presentes. Para verificar si un cultivo está contaminado con bacteria, se puede agregar al medio sólido o líquido un sustrato orgánico como acetato, glucosa, sacarosa, peptona al 0.1%, ó al 1-2% (p/v). Los cultivos se incuban entre 24 h a 2 semanas. En presencia de bacterias, los cultivos líquidos se enturbian y en el caso de los sólidos se observan colonias visibles (González *et al.*, 1995).

Esta técnica puede ser utilizada para verificar si un cultivo está excesivamente contaminado, en vista de que es importante mantener las cepas de colección axénicas o por lo menos con una baja concentración bacteriana, ya que las bacterias pudieran interferir con la fisiología de las microalgas, por lo cual los cultivos del cepario pudieran resultar poco viables a pesar de su renovación periódica. Por este motivo, verificar

el estado de su contaminación después de aplicar uno de los métodos de purificación es necesario para garantizar la supervivencia de la cepa.

5. MANTENIMIENTO DE UN CEPARIO

Es importante mantener los cultivos en condiciones apropiadas para garantizar que las cepas se encuentren en un buen estado, ya que el colapso de las colecciones de microalgas no sólo causa la pérdida de las cepas, sino una pérdida de resultados sobre las investigaciones que se estén realizando. A continuación, se detallan algunas de las condiciones de mantenimiento básicas que son útiles para la mayoría de las especies, aunque en ocasiones es necesario modificarlas dependiendo de los requerimientos de la especie de interés.

El mantenimiento de las cepas se puede hacer en medio líquido o sólido (Fig. 6; ver Anexo 1). Los cultivos líquidos de las cepas se mantienen en recipientes de volumen pequeño, en matraces Erlenmeyer de 20 - 100 mL o en tubos de ensaye (25 - 50 mL).

La transferencia de los cultivos se realiza generalmente cada 15 - 20 días, dependiendo del crecimiento de la cepa. Las inoculaciones se hacen bajo una atmósfera estéril en un cuarto de

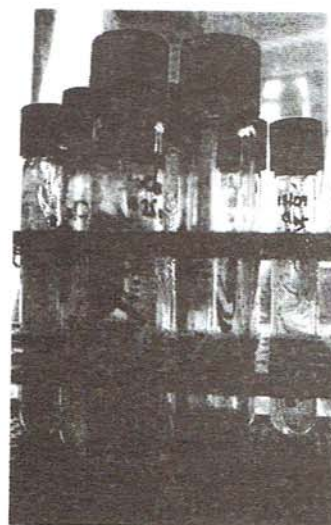


Figura 6. Cepas de microalgas en medio sólido y líquido.

siembra, en una campana de flujo laminar o en una mesa en presencia de dos mecheros de gas. El área donde se hace la transferencia debe estar perfectamente limpia. La mesa del cuarto de cultivo se limpia previamente con alguna solución desinfectante (etanol 70%, fenol 5%, cloro 4‰, benzal, lysol 3.5%). En caso de tener una campana de flujo laminar se deja con luz UV de 20 a 40 W por espacio de 10 - 20 min antes de usarla. Se recomienda que las transferencias se hagan a baja temperatura, en un cuarto aislado y sin circulación de aire.

Con fines de seguridad, se recomienda mantener cada cepa por triplicado y llevar un control bacteriológico, inoculando una pequeña gota de la cepa en una caja de Petri con agar y 2% de glucosa (ver sección 4.7).

Es necesario rotular los recipientes con el nombre y origen de la especie, fecha de inoculación y tipo de medio de cultivo. Finalmente se colocan en condiciones favorables de luz y temperatura para su crecimiento. Antes de iniciar la resiembra es necesario revisar el estado del cultivo al microscopio. Después de esta operación, es recomendable mantener el cultivo anterior hasta la resiembra siguiente.

5.1 Condiciones de cultivo

El mantenimiento de un cepario no tiene fines de producción, pero su objetivo es la de garantizar la disponibilidad continua de cepas de alta calidad que ofrezcan todas las garantías de éxito al momento de iniciar un cultivo para fines experimentales o comerciales. Por este motivo, es importante que la sala o el ambiente en el cual se mantienen estos cultivos estén en condiciones adecuadas para garantizar tal disponibilidad.

En los incisos siguientes se revisan algunas de las condiciones que permiten mantener el cepario en condiciones adecuadas.

5.1.1 Iluminación

Para el mantenimiento de las cepas, es recomendable utilizar luz artificial, ya que es posible controlarla de acuerdo a las necesidades del cultivo. La intensidad luminosa que se utiliza puede variar con el volumen, concentración

celular del cultivo y con la especie. Si se usan matraces Erlnemeyer es suficiente una iluminación de $13.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ para la mayoría de las microalgas, pero para volúmenes mayores se requiere una intensidad luminosa de 67.5 a $135 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$. Las lámparas fluorescentes más utilizadas son del tipo "cool-white" de 40 W, aunque también se pueden emplear lámparas "day-light", "warm-white" o "Gro-lux" (Abalde *et al.*, 1995).

El fotoperiodo que se usa normalmente es 10:14 o 12:12 h de luz:oscuridad, aunque la mayoría de las especies crecen bien bajo una iluminación continua. El mantener un cultivo con fotoperiodo favorece la sincronización del cultivo, que es recomendable para estudios fisiológicos. La división celular en muchas especies ocurre en periodos de oscuridad.

5.1.2 Temperatura

Para el mantenimiento de las cepas es recomendable mantener temperaturas de $18 - 22^\circ\text{C}$, aunque se pueden usar temperaturas menores para disminuir la frecuencia de las diluciones de mantenimiento. Para fines de reproducción, los cultivos se mantienen a la temperatura más conveniente para acelerar la tasa de crecimiento, la cual depende de los límites de tolerancia de cada especie.

Es necesario recordar que el sistema de alumbrado es también una fuente de calor, por lo cual las salas que se usan para el mantenimiento de cepas deben considerar la necesidad de un sistema confiable de control térmico, con un sistema adicional de seguridad.

5.1.3 Aireación y agitación

En cultivos de volúmenes pequeños (1 - 2 L) no es necesario una aireación, una agitación manual diaria es suficiente. En cultivos a mayor escala, la aireación debe ser leve durante la fase inicial de crecimiento (hasta 1 - 2 días después de la inoculación) que puede ser aumentada, dependiendo de la sensibilidad de la especie. Cuando aumenta la concentración celular del cultivo con esto se logra una dispersión efectiva de los nutrientes, se mejora la disponibilidad de

luz para las células y se aporta CO_2 ayudando a estabilizar el pH. Así mismo, se mantienen en suspensión las algas, evitando una estratificación térmica y el cultivo es más uniforme al momento de la cosecha.

El aire puede ser distribuido por un compresor. Para distribuir el aire en los sistemas de cultivo es común utilizar líneas de PVC con válvulas. Es recomendable usar filtros. En el mercado existen diferentes tipos de filtros que se pueden emplear: millipore, de fibra, de tierra de diatomeas, geles de acrilamida, empaques de algodón y carbón activado. Además de los filtros comerciales, una manera confiable, barata y sencilla de hacer un filtro es utilizando un tubo de PVC, relleno de algodón en sus extremos y carbón activado en el centro. El uso de filtros ayuda a disminuir la carga bacteriana y partículas que entren evitando así el contacto con el cultivo.

5.1.4 pH

El pH del medio de cultivo determina la solubilidad del CO_2 y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono, influyendo directa e indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Patrick, 1968).

El pH tiene un efecto sobre la solubilidad de varios compuestos metálicos; un aumento de pH

puede ocasionar una deficiencia en algunos elementos traza. El crecimiento fotosintético de las microalgas provoca cambios en el pH del medio, si éste aumenta hasta un pH de 9, el carbonato puede precipitar lo que implica que los nutrientes no se encuentren disponibles (Abalde *et al.*, 1995).

5.1.5 Salinidad

La concentración de sales minerales disueltas tanto en agua dulce como en agua de mar, puede afectar el crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica. El efecto de la salinidad adquiere mayor influencia cuando se relaciona con otras variables, como temperatura, luz, fuente de nitrógeno y concentración de nutrientes (Fábregas *et al.*, 1984, 1985, 1986).

La membrana plasmática de células microalgales es permeable al agua pero no a solutos. En un sistema de estrés salino, las células deben equilibrar su presión osmótica con el exterior aumentando la síntesis de solutos o la incorporación de éstos. Las microalgas son capaces de sintetizar varios solutos, como la glicerina, manitol y sorbitol, así como también prolina, manosa, sacarosa o isofloridósido (Greenway y Setter, 1979; Band *et al.*, 1992). Esta respuesta osmoreguladora es un factor fundamental para la supervivencia.

6. ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

Existe una gran variedad de medios de cultivo, la mayoría son modificaciones de fórmulas anteriormente establecidas. Para elegir un medio de cultivo adecuado a las necesidades de la especie a cultivar, es necesario considerar: la salinidad, la composición y concentración de iones, fuente de nitrógeno, fuente de carbono, pH, elementos traza y vitaminas.

Los medios de cultivo pueden ser naturales o sintéticos. Los medios naturales están preparados

con agua enriquecida con sales minerales. Los medios sintéticos se preparan con agua destilada, sales minerales y se adicionan los componentes naturales del agua de mar o del agua dulce (Alfonso y Leal, 1998). Los medios que se utilizan generalmente para la propagación de microalgas es el f/2 (Guillard y Ryther, 1962). Otros medios utilizados son el K (Keller *et al.*, 1987), ES (Harrison *et al.*, 1980), GP (Loeblich y Smith, 1968) y el GSe (Blackburn *et al.*, 2001).

Medio f/2: Guillard y Ryther (1962); Guillard (1975).

A 950 mL de agua de mar filtrada añadir:

Compuesto	Sol. Stock	Cantidad
NaNO ₃	75 g/L H ₂ O dest	1 mL
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	5 g/L H ₂ O dest	1 mL
Sol. metales traza		1 mL
Sol. vitaminas		0.5 mL

Llevar a 1 L de agua de mar filtrada y esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² (1.1 kg/cm²) de presión durante 15 min, excepto las vitaminas que se esterilizan por filtración.

Solución de metales traza:

A 950 mL de agua destilada añadir:

Compuesto	Sol. stock	Cantidad
Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O		4.36 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O		3.15 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	9.8 g/L	1 mL
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22 g/L	1 mL
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10 g/L	1 mL
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180 g/L	1 mL
Na ₂ MoO ₄ · 7H ₂ O	6.3 g/L	1 mL

Llevar a un volumen final de 1 L con agua destilada, calentar para disolver y esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² (1.1 kg/cm²) durante 15 minutos. Mantener en refrigeración.

NOTA: Para los dinoflagelados, se recomienda añadir una cuarta parte de la concentración de cobre descrito en esta formulación. El selenio se ha visto que favorece el crecimiento.

Solución de vitaminas

A 950 mL de agua destilada añadir:

Compuesto	Sol. stock	Cantidad
Vitamina B ₁₂	1 g/L H ₂ O dest	1 mL
Biotina	0.1 g/L	10 mL
Tiamina-HCl	200 mg	

Esterilizar por filtración y mantener en un frasco ámbar en refrigeración.

Medio K: Keller *et al.*, (1987)

Este medio se recomienda para fitoplancton oceánico. Está altamente quelado para reducir la toxicidad de metales y contiene amonio y fosfato orgánico (Keller *et al.*, 1987).

A 950 mL de agua mar añadir:

Compuesto	Sol. Stock	Cantidad
NaNO ₃	75 g/L H ₂ O dest	1 mL
NH ₄ Cl	2.68 g/L H ₂ O dest	1 mL
b-glicerofosfato	2.16 g/L H ₂ O dest	1 mL
H ₂ SeO ₃	1.29mg/mL H ₂ O dest	1 mL
Sol. metales traza		1 mL
Sol. vitaminas f/2		0.5 mL

Llevar a 1 L de agua de mar filtrada y esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² (1.1 kg/cm²) durante 15 min excepto la solución de vitaminas que se esteriliza por filtración.

Solución de metales traza:

A 900 mL de agua destilada añadir:

Compuesto	Sol. Stock	Cantidad
Na ₂ -EDTA· 2H ₂ O		41.6 g
FeCl ₃ · 6H ₂ O		3.15 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	6.3 g/L H ₂ O dest.	1 mL
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	22 g/L H ₂ O dest.	1 mL
CoCl ₂ · 6H ₂ O	10 g/L H ₂ O dest.	1 mL
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180 g/L H ₂ O dest	1 mL
CuSO ₄ · 5H ₂ O	9.8 g/L H ₂ O dest	0.5 mL

Llevar a un volumen final de 1 L con agua destilada, calentar para disolver y esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² (1.1 kg/cm²) durante 15 minutos. Mantener en refrigeración.

Medio ES (e.g. ESAW): D'Agostino y Provasoli, (1968); Provasoli, (1968); Harrison *et al.*, (1980)

El medio ES consiste en agua de mar enriquecida (D'Agostino y Provasoli 1968; Provasoli, 1968). Harrison *et al.* (1980) desarrollaron el medio ESAW, un medio de agua de mar artificial, y también formularon el medio ESNW, que es un medio de agua de mar enriquecida (Harrison *et al.*, 1980). Este medio se recomienda para especies que provengan de ambientes oceánicos.

A 100 mL de agua destilada añadir:

Compuesto	Sol. stock	Cantidad
NaNO ₃	10 mL/L	700 mg
Glicerofosfato	10 mL/L	100 mg
Sol. férrica		5 mL/L
Sol. PII		5 mL/L

Solución férrica:

A 500 mL de agua destilada añadir:

Compuesto	Cantidad
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	350 mg
Na ₂ -EDTA	330 mg

Solución PII:

A 500 mL de agua destilada añadir:

Compuesto	Cantidad
FeCl ₃ · 6H ₂ O	25 mg
Na ₂ -EDTA	500 mg
H ₃ BO ₃	570 mg
MnSO ₄	62 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1 mg
CuSO ₄ · 7H ₂ O	2.5 mg

Esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² (1.1 kg/cm²) durante 15 min. Mantener en refrigeración.

Medio GP: Loeblich y Smith (1968)

A 750 mL de agua de mar añadir:

Compuesto	Cantidad
Sol. stock nitratos	2 mL
Sol. stock vitaminas	1 mL
Mezcla de metales PII	5 mL
Agua destilada	250 mL

Esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² de presión durante 15 min, excepto las vitaminas que se esterilizan por filtración.

Solución stock:

Compuesto	Cantidad
KNO ₃	100 g/L
K ₂ HPO ₄	34.8 g/L

Esterilizar el fosfato por separado para evitar la precipitación. Posteriormente agregar 1 mL de esta solución a 3 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² de presión durante 15 min, dejar enfriar y añadir asepticamente al agua de mar ya estéril.

Solución de vitaminas:

Compuesto	Cantidad
Vitamina B12	0.1 mg/100mL
Tiamina-HCl	100 mg/100 mL
Biotina	0.2 mg/100 mL

Esterilizar por filtración. Mantener en frasco ámbar en refrigeración. Preparar cada 3 meses.

Mezcla de metales PII:

Compuesto	Cantidad
Na ₂ -EDTA· 2H ₂ O	6 g/L
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.29 g/L
H ₃ BO ₃	6.85 g/L
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.86 g/L
ZnCl ₂	0.06 g/L
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.026 g/L

Esterilizar en autoclave a 120°C y 15 lb/in² de presión durante 15 min, dejar enfriar y mantener en refrigeración.

Medio GSe: Blackburn *et al.*, (2001)

Modificación del medio GP. Este medio contiene selenio. Se recomienda para el cultivo de dinoflagelados y diatomeas.

A 750 mL de agua de mar añadir:

Compuesto	Cantidad
Sol. stock nitratos	2 mL
Sol. stock vitaminas	1 mL
Mezcla de metales PII	5 mL
Extracto de suelo	5 mL
Agua destilada	250 mL

Extracto de suelo: se parte de 1 kg de tierra seca que se mezcla en 2 L de agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 120°C y 15 lb/in² (1.1 gk/cm²) durante 60 min. Se deja enfriar toda la noche y se filtra en papel Whatman No. 2. El filtrado se distribuye en matraces de 50 mL y se esteriliza en las mismas condiciones pero durante 15 min. Se mantiene en frascos estériles en el refrigerador. Las soluciones de vitaminas y metales PII se preparan como se indicó en el medio GP.

Medio L1: Guillard y Hargraves (1993)

A 950 mL de agua de mar filtrada agregar:

Compuesto	Cantidad
Sol. stock nitratos	1 mL
Sol. stock de fosfatos	1 mL
Sol. stock de silicatos	1 mL
Sol. stock de metales traza	1 mL
Sol. stock vitaminas	0.5 mL

Aforar a 1 L con agua de mar filtrada y esterilizar en autoclave.

Soluciones stock:

Compuesto	Cantidad
NaNO ₃	75 g/L
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5 g/L
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	30 g/L

Al medio L1 normalmente no se le agrega silicato porque causa excesiva precipitación. Preparar cada solución por separado, aforar a 1 L con agua destilada y esterilizar en autoclave.

Solución de metales traza:

A 950 mL de agua mar agregar:

Compuesto	Cantidad	Solución stock
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3.15 g	-
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	4.36 g	-
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25 mL	2.45 g/L
Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	3 mL	19.9 g/L
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1 mL	22 g/L
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1 mL	10 g/L
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1 mL	180 g/L
H ₂ SeO ₃	1 mL	1.3 mg/L
NiSO ₄ · 6H ₂ O	1 mL	2.7 g/L
Na ₃ VO ₄	1 mL	1.84 g/L
K ₂ CrO ₄	1 mL	1.94 g/L

Aforar a 1 L con agua de mar filtrada.

Solución de vitaminas:

Compuesto	Cantidad
Vitamina B ₁₂	0.1 mg/100mL
Tiamina-HCl	100 mg/100 mL
Biotina	0.2 mg/100 mL

Esterilizar por filtración. Mantener en frasco ámbar o viales de plástico en refrigeración. Preparar cada 3 meses.

7. REFERENCIAS

- ABALDE, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E. y Herrero, C. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidade da Coruña, España, 210 págs.
- ALFONSO, E. y Leal, S. (1998). *Creación y Mantenimiento de un Cepario de Microalgas*. Centro de Investigaciones Marinas. Universidad de La Habana, Cuba, 21 págs.
- ANDERSEN, R.A. y Kawachi, M. (2005). Traditional Microalgae Isolation Techniques. *En*: Andersen, R.A. (ed.), *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. E.U.A., 83-100 pp.
- BAND, C.J., Arredondo-Vega, B.O., Vázquez-Duhalt, R. y Greppin, H. (1992). Effect of a salt-osmotic upshock on the edaphic microalga *Neochloris oleoabundans*. *Plant Cell and Environment* 15:129-133.
- BEN-AMOTZ, A. y Avron, M. (1989). The Biotechnology of Mass Culturing *Dunaliella* for Products of Commercial Interest. *En*: *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Cresswell, R.C., Rees, T.A.V. y Shah, N. (eds.), Longman Scientific and Technical Press. London.
- BLACKBURN, S.I., Bolch, C.J.S., Haskard, K.A. y Hallegraeff, G.M. (2001). Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*. 40: 78-87.
- BOROWITZKA, M.A. y Borowitzka, L.J. (1988). *Dunaliella*. *En*: Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.), *Microalgal Biotechnol.* Cambridge University Press. 27-58 pp.
- BROWN, M.R., Jeffrey, S.W. y Garland, C.D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Marine Laboratories, Report 205. Australia. 44 pp.
- BROWN, R. M. y Bischoff, H.W. (1962). A new and useful method for obtaining axenic cultures of algae. *Phycological Society of America New Bulletin* 15: 43-44.
- CASTELLVI, J. (1971). Contribución a la biología de *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *Investigaciones Pesqueras* 35: 365-520.
- DUCKER, S.C. y Willoughby, L.G. (1964). Potassium telurite as bacteriostatic agent in isolating algae. *Nature* 202: 210.
- FÁBREGAS, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. y Viega, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
- FÁBREGAS, J., Herrero, C., Abalde, J. y Cabezas, B. (1985). Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture* 50: 1-11.
- FÁBREGAS, J., Herrero, C., Cabezas, B., Liaño, R. y Abalde, J. (1986). Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* to nutrient concentration and salinity variations in batch cultures. *Journal of Plant Physiology* 125: 475-484.
- FOTER, M.J., Palmer, C.M. y Maloney, T.E. (1953). Antialgal properties of various antibiotics. *Antibiotics and Chemotherapy* 3 (305): 505-508.
- GALLOWAY, R.A. y Kraus, R.W. (1959). The differential action of chemical agents on certain alga, bacteria and fungi. *Annals of Journal Botanic* 46 (40).
- GONZÁLEZ, M.A., Parra, O.O. y Cifuentes, A.S. (1995). Técnicas de Cultivo de Microalgas en Laboratorio. *En*: *Manual de Métodos Ficológicos*. Alveal, K., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C. y Sar, E. (eds.), Universidad de Concepción, Chile, 219-250 págs.
- GREENWAY, H. y T.L. Setter. (1979). Accumulation of proline and sucrose during the first hours after transfer of *Chlorella emersonii* to high NaCl. *Australian Journal of Plant Physiology* 138: 85-91.
- GUILLARD, R.R.L. (1973). Methods for Microflagellates and Nanoplankton. *En*: *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Stein, J.R. (ed.), Cambridge University Press, UK, 69-85 pp.
- GUILLARD, R.R.L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *En*: Smith, W.L. y Chanley, M.H. (eds.). *Cultures of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, 26-60 pp.
- GUILLARD, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea*

- (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.
- GUILLARD, R.R.L. (2005). Purification Methods for Microalgae. *En: Algal Culturing Techniques*. Andersen, R.E. (ed.), Elsevier Academic Press, China, 117-132 pp.
- HARRISON, P.J., Waters, R.E. y Taylor, F.J.R. (1980). A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology* 16: 28-35.
- HOSHAW, R.W. y Rosowski, J.R. (1973). Methods for Microscopic Algae. *En: Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Stein, J.R. (ed.), Cambridge University Press, UK, 53-68 pp.
- IAÑEZ, E.P. (1998). Curso de Microbiología General. Variaciones hereditarias no asociadas con transferencia de material genético. Mutación, Supresión. http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/20_micro.htm
- KELLER, M.D., Selvin, R.C., Claus, W. y Guillard, R.R.L. (1987). Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *Journal of Phycology* 23: 633-638.
- LEAL, S. (1990). Tamaño celular y concentración de cinco especies de microalgas marinas tratadas con antibióticos. *Revista de Investigaciones Marinas* 11(1): 51-62.
- LEWIN, J. (1966). Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of growth. *Phycologia* 6:1-12.
- LOEBLICH, A.R. y Smith, V.E. (1968). Chloroplast pigments of the marine dinoflagellate *Gyrodinium resplendens*. *Lipids*. 3: 5-13.
- MATSUOKA, K. y Fukuyo, Y. (2000). Guía Técnica para el Estudio de Quistes de Dinoflagelados Actuales. WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC. Japón, 30 págs.
- PALMER, C. y Maloney, T.E. (1955). Preliminary screening for potential algicides. *Ohio Journal of Science* 55:1-18.
- PATRICK, R. (1968). The structure of diatom communities on similar conditions. *Annals Nature* 102:173-183.
- PRINGSHEIM, E.G. (1926). Methoden und Erfahrungen. *Beiträge zur Biologie*. 14: 283.
- PRINGSHEIM, E.G. (1946). Pure Cultures of Algae. Their Preparation and Maintenance. Cambridge University Press, 119 pp.
- ROSOWSKI, J.R. y Hoshaw, R.W. (1970). Cultivation of filamentous alga in quantity on agar plates. *Journal of Phycology* 6: 220-222.
- STEIN, J.R. (ed.) (1973). Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, UK, 448 pp.
- SUTHERLAND, T.F., Leonard, C. y Taylor, F.J.R. (1992). A segmented pipe sampler for integrated profiling of the upper water column. *Journal of Plankton Research* 14: 915-923.
- TOMISEK, A., Reid, R.M., Short, W.A. y Skipper, H.E. (1957). Studies on the photosynthesis reaction. III. The effects of various inhibitors upon growth and carbonate-fixation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiology* 32: 7-10.
- VILLAFÁÑE, V. E., Marcoval, M. A. y Helbling, E.W. (2004). Photosynthesis vs. irradiance characteristics in phytoplankton assemblages off Patagonia (Argentina): Temporal variability and solar UVR effects, *Marine Ecology Progress Series* 284: 23-34.
- VONSHAK, A. (1986). Laboratory Techniques for the Cultivation of Microalgae. *En: CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond, A. (ed.), CRC Press. Florida, E.U.A., 117-146 pp.
- WALSH, D.T., Withstandley, C.A., Kraus, R.A. y Petrovits, E.J. (1987). Mass culture of selected marine microalgae for the nursery production of bivalve seed. *Journal of Shellfish Research*, 6: 71-77.

CAPÍTULO 2

CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO

BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. La Paz, Baja California Sur. México. kitty04@cibnor.mx

DOMENICO VOLTOLINA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Laboratorio de Estudios Ambientales UAS-CIBNOR. Mazatlán, Sinaloa, México. voltolina@mzt.megared.net.mx

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. RECUENTO CELULAR
 - 2.1 CÁMARAS DE RECUENTO
 - 2.2 CÁLCULOS DE RECUENTO CELULAR
 - 2.3 PROTOCOLO PARA EL RECUENTO CELULAR CON CÁMARA DE 0.1 mm (NEUBAUER)
3. DENSIDAD ÓPTICA
 - 3.1 PROTOCOLO PARA DETERMINAR LA DENSIDAD ÓPTICA
4. CURVA DE CRECIMIENTO
 - 4.1 ECUACIONES QUE DEFINEN EL CRECIMIENTO
 - 4.2 FASES DE CRECIMIENTO
 - 4.3 PARÁMETROS POBLACIONALES
 - 4.4 NÚMERO TOTAL DE DIVISIONES CELULARES ($\Sigma\mu$)
5. REFERENCIAS

Palabras clave: recuento celular, curva de crecimiento, número total de divisiones celulares

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de un cultivo de microalgas se expresa como el incremento de biomasa ya sea en forma de número de células (cél/mL), en peso seco (total u orgánico), cantidad de proteína, de pigmentos, medidos directamente o en unidades

arbitrarias de fluorescencia, volumen de las células o carbono celular total, calculado para un período de tiempo o una fase de crecimiento específica (Arredondo-Vega *et al.*, 1997).

Este incremento puede ser estimado por diferentes métodos, entre los cuales los más utilizados en los laboratorios son el **recuento celular** a través del microscopio o mediante contadores de partículas (aunque éstos son generalmente costosos, por lo cual su uso estará supeditado a la posibilidad de adquirirlos), la determinación de los cambios de **densidad óptica del cultivo** por espectrofotometría o finalmente la cuantificación de la biomasa en peso seco, total u orgánico, o de sus componentes bioquímicos que son de interés para los fines de un cultivo en particular (proteínas, pigmentos o ácidos grasos, entre otros).

De estos métodos, el **recuento celular** es el más utilizado por ser un método sencillo y poco costoso, el cual permite además un mejor seguimiento del cultivo mediante su inspección visual. Es necesario remarcar que la correspondencia entre la concentración celular y la información proporcionada por los otros métodos (como la cantidad de pigmentos o de otros componentes celulares, que son más laboriosos y requieren de tiempo, material y equipamiento más costoso) no es constante, ya que éstos dependen del estado fisiológico de las células, de la fase de crecimiento y de las condiciones ambientales a las cuales está sometido el cultivo (Alfonso y Leal, 1998).

Para obtener resultados confiables, es recomendable aplicar algunos métodos simultáneamente, incluyendo observaciones microscópicas cualitativas para evitar errores debido a la contaminación de los cultivos. En esta primera sección se describen las técnicas de recuento celular y de determinación de la densidad óptica.

2. RECUENTO CELULAR

1.1 Cámaras de recuento

Una de las dificultades para el recuento al microscopio es obtener una buena reproducibilidad, por lo cual es importante saber seleccionar el tamaño de la muestra, la dilución, el tipo de cámara de recuento, el objetivo del microscopio y la técnica de llenado de la cámara. En algunos casos, puede ser necesario corroborar el volumen de la cámara que se está utilizando.

Para realizar el recuento celular se han diseñado diferentes cámaras que contienen un volumen determinado de muestra entre una lámina y una laminilla rígida (cubreobjeto especial) colocada sobre plataformas laterales a una altura establecida (Alfonso y Leal, 1998). La que se usa con mayor frecuencia para cultivos de

microalgas es el hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer, que se reproduce en la Figura 1.

Para microalgas de mayores dimensiones, como muchos dinoflagelados, los tipos de cámara que se utilizan más comúnmente son: de Sedgwick-Rafter o el hematocitómetro de 0.2 mm de profundidad con reglilla de Fuchs-Rosenthal.

En la Tabla 1 se dan las principales características de las cámaras más comunes y posteriormente se especifican los cálculos para obtener la concentración celular.

En la mayoría de los laboratorios, la cámara de recuento que se utiliza es el hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer, la cual consta de 9 cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 0.9 mm^2), cada uno de los cuales corresponde a un volumen de $0.1 \mu\text{L}$. Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm^2 ($0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm}$), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños (Fig. 1).

Para células más grandes de $6 \mu\text{m}$ y con cultivos relativamente poco concentrados, se aconseja que el recuento se haga en los cuatro cuadros marcados como **A**, **B**, **C** y **D**, aunque en varios laboratorios se prefiere contar por lo menos un cuadro adicional, seleccionado cada vez al

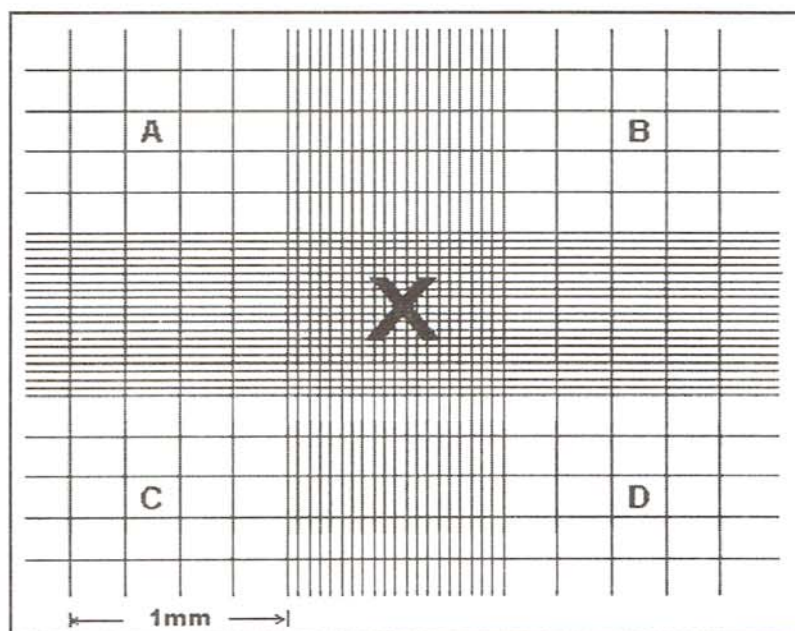


Figura 1. Reglilla de Neubauer de 9 mm^2 .

Tabla 1. Nombre comercial, volumen útil de recuento, profundidad, objetivos usados más frecuentemente, tamaño de las células en la muestra e intervalo de concentraciones aconsejadas para las cámaras más comunes utilizadas para el recuento celular de microorganismos (Guillard y Sierracki, 2005).

Nombre	Volumen (μL)	Profundidad (mm)	Área (mm ²)	Objetivos	Tamaño celular (μm)	cél/mL
Petroff Hauser	0.2	0.02	10	40 - 100	0.5 - 5	10 ⁶ - 10 ⁸
Speirs Levy	0.4	0.2	2	10 - 20	5 - 75	10 ⁴ - 10 ⁶
Hematocitómetro (Neubauer)	0.9	0.1	9	20 - 40	2 - 30	10 ⁴ - 10 ⁷
Hematocitómetro (Fuchs-Rosenthal)	3.2	0.2	16	10 - 20	5 - 75	10 ⁴ - 10 ⁶
Palmer Maloney	100	0.4	250	10 - 45	5 - 150	10 ² - 10 ⁵
Sedgwick-Rafter	1000	1	1000	2.5 - 10	50 - 500	30 - 10 ⁴

azar. Cuando las células son pequeñas y la concentración de los cultivos es muy alta, es preferible utilizar cinco cuadros menores del cuadro central marcado con **X**.

1.2 Cálculos de recuento celular

Si se contaron todas las células presentes en los 4 cuadros de 1 mm² marcados como **A**, **B**, **C** y **D**, la concentración celular se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$C = N \cdot 10^4 \cdot \text{dil}$$

En donde:

C = cél/mL

N = promedio de células presentes en 1 mm² (0.1 μL)

dil = factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra. Es importante aclarar que si se usó 1 mL de muestra y 9 mL de agua sin células, el volumen total es 10 mL y el factor de dilución es = 10. Esta dilución se define como uno en diez -1:10-. **NOTA:** Esta aclaración se debe a nuestra observación que frecuentemente se agregan 10 mL de agua a 1 mL de muestra y se usa 10 como factor de dilución lo que esto no es correcto).

10⁴ = factor de conversión de 0.1 μL a 1 mL

Si las células se contaron en el cuadro central (25 cuadros) considerando solo los 5 cuadros

menores del cuadro central marcado con **X**, la concentración celular se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C = [(N / (4 \cdot 10^{-6}))] \cdot \text{dil}$$

En donde:

C = cél/mL

N = promedio de células presentes en los 5 cuadros pequeños del cuadro central

4 · 10⁻⁶ = corresponde al volumen de la muestra expresado en cm³ (mL) sobre el área de los cuadros pequeños la cual equivale a 0.004 mm³ (0.004 μL) (0.2 x 0.2 x 0.1)

dil = factor de dilución

Para el caso del hematocitómetro de 0.2 mm de profundidad, los cálculos son los mismos pero, considerando que la profundidad es doble, es decir, 1 mm² corresponde a un volumen contado de 0.2 μL y el factor de conversión de μL a mL es 5 · 10³.

La cámara Sedgwick-Rafter consta de un portaobjetos con un marco rectangular de 50 x 20 mm y 1 mm de profundidad. Con el fin de facilitar el recuento, los modelos actuales tienen una regilla con 20 columnas y 50 líneas. Para un cultivo muy concentrado de una especie unicelular se sugiere diluir, como por ejemplo 1:1000 y contar toda la cámara. En este caso, los cálculos para determinar la concentración celular (cél/mL) es:

$$C = N \cdot \text{dil}$$

En donde:

C = cél/mL

N = células contadas en toda la cámara

dil = factor de dilución

Es necesario recordar que independientemente del tipo de cámara, la precisión de los recuentos depende de la distribución al azar de las partículas (células) sedimentadas. Por este motivo, en el caso de especies que forman cadenas se deben contar las cadenas (que son las que se distribuyen al azar) y posteriormente determinar el promedio del número de células por cadena, con el cual se puede calcular el número total de células de esa especie presente en la muestra.

1.3 Protocolo para el recuento celular con cámara de 0.1 mm (Neubauer)

- a) Agitar el cultivo para permitir que las células tengan una distribución homogénea.
- b) Tomar una muestra de 1 mL y colocarla en un tubo previamente lavado y seco. Agregar una gota de lugol para fijar las células. (**Solución A**: pesar 10 g de KI y disolver en 100 mL de agua destilada. **Solución B**: pesar 5 g de I_2 cristalino y disolver en 10 mL de CH_3COOH . Mezclar ambas soluciones (A+B), agitar bien y mantener en frasco ámbar).
- c) Cuando el cultivo está muy concentrado ($>10^6$ cél/mL) se diluye la muestra con agua de mar o destilada (según sea el caso). **NOTA**: Generalmente una dilución 1:10 es suficiente, pero es necesario verificar que la concentración resultante sea suficiente para obtener una precisión adecuada, la cual depende del número de células presentes en promedio en 1 mm^2 , de acuerdo con la fórmula $\mu = x \pm 2\sqrt{x}$ en la cual μ es la media poblacional, calculada a partir del estimador x el cual es el promedio de células contadas en 1 mm^2 (Lund *et al.*, 1958). Por lo anterior, si se cuentan en promedio 25 células en 1 mm^2 , la precisión de ese recuento es $25 \pm 2\sqrt{25} = 25 \pm 10$.
- d) El tubo se agita y se succiona una muestra con una pipeta Pasteur.
- e) Se llena la cámara con el cubreobjeto ya puesto, colocando la punta de la pipeta Pasteur en la muesca en forma de V que tiene la cámara, cuidando que el volumen depositado sea suficiente para que una parte llegue hasta los canales laterales, pero sin inundarlos completamente. Si esto sucede, se seca y limpia la parte inferior de la cámara y se observa al microscopio para verificar que las células tengan una distribución adecuada (no agrupada). Para los modelos que no tienen muesca, colocar la gota cerca del margen del cubreobjeto, procurando que no se expanda a la parte superior del mismo. Una alternativa aceptable es colocar la gota en uno de los canales laterales, verificando que el exceso llegue hasta el otro canal lateral.
- f) Generalmente se enfoca la cámara con el objetivo **10X** aunque en ocasiones cuando se trata de células pequeñas se utiliza el de **40X**. Esto facilita la identificación de las células, discriminando los residuos y demás objetos con tamaño similar a la especie que se está cultivando.
- g) El registro se hace contando las células que quedan dentro de cada una de las cuadrículas marcadas como **A, B, C** y **D** indicadas en la Figura 1. En el caso de las células que tocan las líneas de demarcación entre cuadros, se cuentan solamente las que tocan dos de los cuatro lados, seleccionados al azar.
- h) Para tener un recuento más preciso, se usan tres o más submuestras de cada muestra y con éstas se calcula la concentración media. Para calcular la concentración celular (cél/mL) se utiliza la fórmula indicada anteriormente.
- i) Con los datos de concentración celular (cél/mL) de cada recuento en tiempos sucesivos (generalmente a intervalos de 24 h) se obtiene la curva de crecimiento graficando en el eje de las "Y" los valores de concentración celular y en el eje de las "X" el tiempo (en días). También es importante determinar la tasa de crecimiento (μ), el tiempo de generación (t_g) y el número de duplicaciones (n) (Schoen, 1998).

3. DENSIDAD ÓPTICA

La concentración celular puede ser estimada indirectamente usando la densidad óptica del cultivo, que es una técnica menos precisa del recuento directo, pero permite una evaluación rápida de la concentración microalgal, en especial si se cuenta con una curva de calibración entre la concentración celular de una especie determinada, evaluada directamente, y las lecturas de densidad óptica de uno o más cultivos de esa especie. Uno de sus inconvenientes es que la contaminación bacteriana y/o de otro tipo (basura, residuos), dará lecturas erróneas, por lo que hay una tendencia a evitarla.

La mencionamos en este capítulo, ya que todavía se usa en algunos laboratorios para reconocer rápidamente las fases de crecimiento de los cultivos, por lo cual permite tomar decisiones inmediatas sobre los tiempos de cosecha o de dilución. Algunos autores proponen el uso de una **longitud cercana al pico de absorción de la clorofila (675 nm)**, lo cual permite obtener una lectura aún cuando la concentración celular es baja, mientras que para otros ésta se debe acercar al mínimo de absorción. Esto se debe al hecho de que el contenido celular de clorofila puede variar de acuerdo a la cantidad de luz disponible, la cual cambia de acuerdo a las condiciones experimentales y a la edad del cultivo por lo cual, como nosotros, **sugieren leer a 550 nm**.

3.1 Protocolo para determinar la densidad óptica

- 1) Agitar el cultivo ya sea recién inoculado y/o en la fase de crecimiento que se haya seleccionado, para permitir que las células se distribuyan homogéneamente.
- 2) Colocar el volumen necesario de muestra (en el caso que el cultivo esté muy concentrado, hacer una dilución) en una celda de volumen y camino óptico apropiados, dependiendo del tipo de instrumento del cual se disponga en el laboratorio, agitar nuevamente y medir rápidamente la transmitancia o la absorbancia (densidad óptica) en el colorímetro o espectrofotómetro, usando la longitud de onda

seleccionada. Previamente, el equipo se calibra con agua destilada o de mar (aunque en general hay diferencias mínimas entre los dos tipos de agua), dependiendo si la microalga es de agua dulce y/o marina.

- 3) Con los datos de densidad óptica se obtiene la curva de crecimiento graficando los valores de densidad óptica (**DO**) en el eje de las "Y" con el tiempo en el eje de las "X", recordando que cuando se usa la transmitancia (**T = %** de la luz incidente recibida por el fotodetector), es necesario utilizar la transformación: **DO = 100 - T**

4. CURVA DE CRECIMIENTO

De la misma manera que bacterias y levaduras, las microalgas se reproducen principalmente por división celular, que es binaria en la mayoría de los casos, por lo cual presentan un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones adecuadas.

En general, las condiciones ambientales cambian con la edad del cultivo, por lo cual se modifica también la velocidad de crecimiento poblacional. Esto permite reconocer diferentes fases de crecimiento, que sirven para describir la forma en la cual cambia la concentración celular o de biomasa.

Para esto se utilizan principalmente los parámetros poblacionales definidos como *velocidad específica de crecimiento*, también conocida como *tasa de crecimiento* (μ) y el tiempo de duplicación o de generación (t_g).

4.1 Ecuaciones que definen el crecimiento (Guillard, 1973)

La velocidad específica de crecimiento o tasa de crecimiento (μ) está definida por la siguiente ecuación:

$$\mu = dx / dt \cdot 1/x$$

En donde:

x = concentración de la biomasa (número de células/mL)

t = tiempo en días

En una curva de crecimiento como la que se presenta en la Figura 2 se pueden reconocer las diferentes fases (Vonshak y Maske, 1982), las cuales se definen a continuación:

4.2 Fases de crecimiento

1. Fase lag: o fase de adaptación: el comportamiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo, de las cuales depende también el éxito del nuevo cultivo. Cuando las células del inóculo no se encuentran en condiciones metabólicas adecuadas se presenta una fase de retardo del crecimiento, por lo cual el cultivo no será exitoso. Los cambios de las condiciones ambientales como temperatura, iluminación y pH también pueden causar un retardo del crecimiento en la fase inicial de un cultivo.

2. Fase de aceleramiento: en esta fase, diferentes componentes estructurales se incrementan secuencialmente, iniciando con el RNA (por sus iniciales en inglés ácido ribonucleico), seguido de las proteínas y del peso individual. La concentración celular es generalmente la última que muestra este incremento.

3. Fase exponencial: durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor

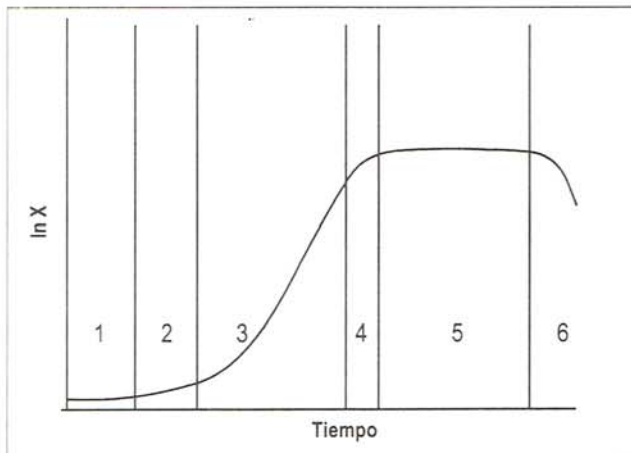


Figura 2. Curva de crecimiento típica, en la cual se muestran las diferentes fases, marcadas como: 1 fase lag; 2 fase de aceleramiento; 3 fase exponencial; 4 fase de desaceleración del crecimiento; 5 fase estacionaria; 6 fase de muerte.

máximo y, en vista de la falta de factores limitantes, permanece aproximadamente constante. Por este motivo, la concentración celular aumenta rápidamente, aunque en general no se alcanzan valores muy elevados.

4. Fase de desaceleración: en esta fase se empieza a notar el efecto de una menor disponibilidad de uno de los factores que regulan el crecimiento, por lo cual las condiciones de cultivo son sub-óptimas. En consecuencia, la tasa de división celular disminuye aunque, en vista del alto número de células, la concentración celular alcanza su máximo valor. En este periodo la composición bioquímica de la biomasa cambia de manera opuesta a la mencionada para la fase de aceleración.

5. Fase estacionaria: durante esta fase las condiciones de cultivo son limitantes y la natalidad es igual a la mortalidad, por lo cual la concentración celular y los componentes de la biomasa permanecen sin cambios relevantes. Este comportamiento se debe a la baja concentración de algún nutriente esencial o al alto valor del pH, con consiguiente poca disponibilidad de sustrato fotosintético, o a una excesiva concentración de oxígeno, aunque con frecuencia el motivo más importante es la pobre penetración de la luz causada por la alta concentración celular (**efecto de autosombreado**). Otro factor que puede limitar el crecimiento es la excreción de productos catabólicos al medio de cultivo.

6. Fase de muerte: la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, por lo cual la concentración disminuye. Además se registra una disminución de la biomasa unitaria como resultado de un incremento en la proporción entre respiración y fotosíntesis y a la ausencia de nutrientes, que conlleva a la muerte o lisis celular.

4.3 Parámetros poblacionales

Independientemente de la fase de crecimiento en la cual se pueda encontrar, los cambios de concentración celular o de biomasa de un cultivo son una función del valor registrado en la

evaluación anterior (es decir, se trata de una variable concentración-dependiente), por lo cual su crecimiento poblacional puede ser descrito mediante la ecuación:

$$N_{t_1} = N_{t_0} \cdot K^{[(N-M) \cdot t]}$$

En donde:

N_{t_0} y N_{t_1} = son los valores de concentración celular registrados al inicio y al final del intervalo de tiempo que pasó entre dos tiempos sucesivos de evaluación de la velocidad de crecimiento ($t = t_1 - t_0$)

N y M = son las tasas de natalidad y de mortalidad, cuya diferencia describe globalmente la tasa de crecimiento poblacional ($N - M = \mu$)

K = base de los logaritmos usados para resolver la ecuación la cual, utilizando logaritmos naturales (base e), se despeja como sigue:

$$\mu_e = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

En donde:

X_2 y X_1 = concentración celular determinada en los tiempos t_2 y t_1

De acuerdo a las propiedades de los logaritmos, la ecuación anterior se puede escribir:

$$\mu_e = \ln (X_2 / X_1) / (t_2 - t_1)$$

En vista de que la mayoría de las microalgas se reproduce mediante división binaria, la tasa de crecimiento se puede obtener directamente en número de divisiones celulares o de duplicaciones diarias de biomasa, utilizando en la ecuación anterior logaritmos en base 2 de acuerdo a la fórmula:

$$\mu_2 = [\ln (X_2 / X_1) / \ln 2] / (t_2 - t_1)$$

El tiempo de duplicación y/o de generación (t_g), es el tiempo necesario para que se duplique la población. Cuando se usan logaritmos naturales, el tiempo de duplicación puede ser calculado como:

$$t_g = \ln 2 / \mu_e = 0.693 / \mu_e$$

O si se usaron logaritmos en base 2:

$$t_g = 1 / \mu_2$$

Como se mencionó, cuando se experimenta con cultivos de microalgas, es importante conocer su curva de crecimiento en las condiciones en las cuales se está trabajando, ya que este dato podrá ser utilizado para establecer los tiempos en los cuales es necesario cosechar la biomasa, lo cual permite comparar organismos en fases de crecimiento conocidas. Por lo tanto, diferencias en su composición o en sus características de calidad pueden ser atribuidas al tipo de tratamiento que se utilizó en ese experimento en particular.

Un ejemplo de una curva de crecimiento obtenida en nuestro laboratorio en condiciones controladas, se muestra en la Figura 3 y una forma sencilla y rápida de reconocer las fases de crecimiento de un cultivo se ilustra en la Tabla 2.

4.4 Número total de divisiones celulares ($\sum \mu$)

Uno de los objetivos principales en experimentos de crecimiento de cultivos de microalgas es demostrar que un determinado tratamiento rendirá mayor concentración que el procedimiento estándar, lo cual implica seleccionar el momento más adecuado para la cosecha.

Para esto, es necesario determinar con seguridad el inicio y el final de cada fase de

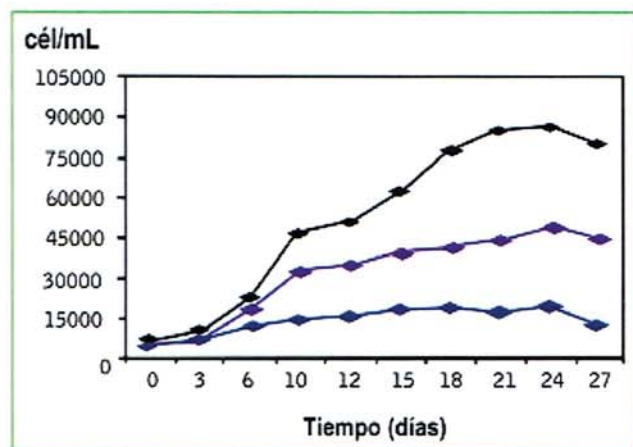


Figura 3. Curva de crecimiento de *Prorocentrum lima* cultivada en medios diferentes: K (●), S (▲) y f/2 (▲) (Heredia-Tapia, 2005).

Tabla 2. Recuento celular, \ln de la concentración celular, tasa de crecimiento (μ_2 calculada a partir de \log_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de un cultivo de *Pavlova lutheri* (Hernández-Espinosa, 1999) cultivada en un sistema batch (por lote) a $125 \mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962).

Tiempo (días)	N (cél/mL)	Ln N	μ_2	$\Sigma\mu_2$
0	16.670	9.721	--	
1	75.000	11.225	2.1696	2.1696
2	320.000	12.676	2.0931	4.2627
3	1,321,650	14.094	2.0461	6.3088
4	3,625,806	15.104	1.4560	7.7648
5	4,480,622	15.315	0.3054	8.0702
6	4,805,000	15.385	0.1008	8.1710

crecimiento, que no es fácil reconocer utilizando las curvas de dispersión de concentración celular graficada contra el tiempo. Para facilitar esta selección, sugerimos graficar contra el tiempo la suma progresiva de las tasas de crecimiento diario ($\Sigma\mu$), ya que cualquier cambio de la pendiente de esta nueva curva de dispersión indica una variación de la velocidad de duplicación.

Para ejemplificar lo anterior, en la Tabla 2 se indican los datos correspondientes a un cultivo de *Pavlova lutheri*, y en la Figura 4 se dan las gráficas de dispersión contra el tiempo de la concentración celular y de la suma progresiva de las tasas de división. La segunda indica que el crecimiento exponencial terminó a partir del día 3, después del cual la pendiente de la $\Sigma\mu$ disminuyó, como consecuencia de la menor velocidad de división celular (fase de desaceleración), mientras que la falta de aumento del valor de la $\Sigma\mu$ en los días siguientes indica que en esos días los cultivos ya se encontraban en la fase estacionaria.

5. REFERENCIAS

ALFONSO, E. y Leal, S. (1998). Creación y Mantenimiento de un Cepario de Microalgas. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana. Habana, Cuba. 21 págs.

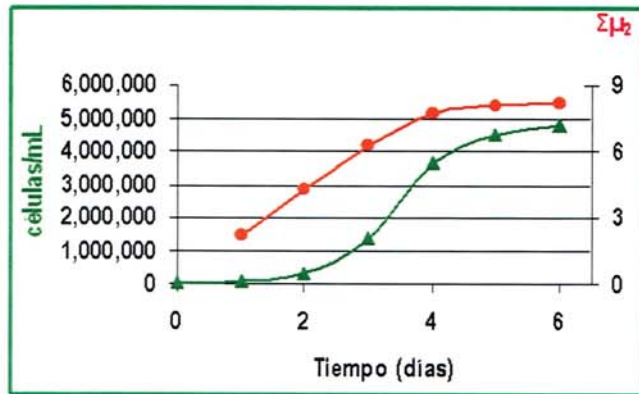


Figura 4. Crecimiento de un cultivo de *Pavlova lutheri* en cél/mL ▲ y como suma progresiva de duplicaciones celulares ● (Hernández-Espinosa 1999).

ARREDONDO VEGA, B.O., Cordero Esquivel, B., Herrero, C. y Abalde, J. (1997). Manual de Técnicas Bioquímicas Aplicadas en Ficología. Manual de Prácticas del 1^{er}. Curso Teórico Práctico: Aplicaciones Biotecnológicas del Cultivo de Microalgas. La Paz, Baja California Sur, México. Septiembre 1-5, 1997. 40 págs.

GUILLARD, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.

GUILLARD, R.R.L. (1973). Division rates. *En: Handbook of Phycological Methods*. Stein, J.R. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 289-312 pp.

GUILLARD, R.R.L. y Sieracki, M.S. (2005). Counting cells in cultures with the light microscope. *En: Algal Culturing Techniques*. Andersen, R.A. (ed.). Elsevier Academic Press, 239-252 pp.

HEREDIA-TAPIA, A. (2005). Aislamiento, cultivo y caracterización parcial del dinoflagelado marino *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge de la isla El Pardito, Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS). La Paz, Baja California Sur, México, 78 págs.

HERNÁNDEZ-ESPINOSA, D. (1999). Variabilidad bioquímica de la microalga marina *Pavlova lutheri* en condiciones autotróficas y

- mixotróficas en un sistema de cultivo estático. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, D.F. 51 págs.
- LUND, J.W.G., Kipling, C. y LeCren, E.D. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers, and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia* 11: 143-170.
- SCHOEN, S. (1988). Cell counting. *En: Experimental Phycology. A Laboratory Manual.* Lobban, C.S., Chapman, D.J. y Kremer B.P. (eds). Cambridge University Press. 16-22 pp.
- VONSHAK, A. y Maske, H. (1982). Algae: Growth Techniques and Biomass Production. *En: Techniques in Bioproducity and Photosynthesis.* Coombs, J. y Hall, D.O. (eds). Pergamon Press. Section 3. 62-77 pp.

CAPÍTULO 3

DETERMINACIÓN DE PESO SECO Y CONTENIDO ORGÁNICO E INORGÁNICO

BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. La Paz, Baja California Sur. México. kitty04@cibnor.mx

DOMENICO VOLTOLINA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Laboratorio de Estudios Ambientales UAS-CIBNOR. Mazatlán, Sinaloa, México. voltolina@mzt.megared.net.mx

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA SECA, TOTAL Y ORGANICA
 - 2.1 PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PESO SECO TOTAL Y CENIZAS
 - 2.2 ECUACIONES PARA EL CÁLCULO DE PESO SECO TOTAL Y CENIZAS
3. PESOS UNITARIOS
4. REFERENCIAS

Palabras clave: peso seco, peso orgánico, cenizas, *Pavlova lutheri*.

1. INTRODUCCIÓN

El valor dietético de una microalga depende de su composición y de su contenido energético, el cual se relaciona con la cantidad de materia orgánica presente en su biomasa. Ésta se determina con las técnicas tradicionales que se describen en los apartados siguientes.

2. DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA SECA, TOTAL Y ORGÁNICA

El peso seco total de la biomasa microalgal presente en un cultivo se determina usando muestras de volumen y concentración celular

conocidos que se concentran en filtros de peso seco conocido y se secan en una estufa hasta peso constante. La cantidad de biomasa total (orgánica e inorgánica) presente en ese cultivo se calcula como la diferencia entre el peso inicial del filtro y el peso del filtro con la muestra, dividida entre el volumen de la muestra filtrada.

Es importante considerar que especialmente, pero no exclusivamente, en el caso de microalgas marinas, esta determinación se verá afectada por la cantidad de sales presentes en el filtro, en los espacios intercelulares y en la superficie celular, por lo cual es indispensable eliminarlos mediante un procedimiento de lavado (Zhu y Lee, 1997).

Esta precaución es un paso importante para la determinación de los pesos seco total y libre de cenizas (peso orgánico). No obstante, existen en la literatura varios trabajos en los cuales no se menciona si la muestra fue lavada, lo cual da lugar a dudas sobre la cantidad real de biomasa (Ben-Amotz *et al.*, 1985; Chu *et al.*, 1994; Reitan *et al.*, 1994). De la misma manera, hay autores que reportan el uso de diferentes soluciones de lavado, como formato de amonio (Wikfors *et al.*, 1992; Brown y Farmer, 1994), cloruro de sodio 0.9% (López-Alonso *et al.*, 1993; Hu y Richmond, 1995), HCl 0.5 N (Molina-Grima *et al.*, 1994), agua acidificada a pH 4 (Vonshak 1997), agua destilada (Craigie *et al.*, 1992) y/o medio de cultivo fresco en agua destilada (Spriharán *et al.*, 1991). Otros han usado la combinación de formato de amonio y cloruro de sodio (Henderson *et al.*, 1988).

En nuestros laboratorios hemos estandarizado el uso de filtros de fibra de vidrio, cuya porosidad nominal depende del tamaño de la microalga en cultivo, y de una solución de lavado de formato de amonio al 3% (0.5 M) en el caso de microalgas marinas, mientras que para las de agua dulce usamos agua destilada y en el caso de cianobacterias, agua acidificada a pH 4 (Vonshak, 1997).

2.1 Protocolo para la determinación del peso seco total y de cenizas

Los cultivos de microalgas se cosechan en la fase de crecimiento de interés para el estudio que se está realizando.

a) Lavar con agua destilada los filtros con la porosidad nominal seleccionada y prequemarlos en la mufla a 490°C por 6 h. Colocar los filtros prequemados en el desecador durante 1.5 h y pesarlos hasta verificar que el peso permanece constante.

NOTA: guardar estos filtros en sobres de papel aluminio previamente numerados con lápiz, cuidando utilizar suficiente presión para que el número aparezca en relieve.

b) Tomar un volumen conocido del cultivo de microalga (homogenizar bien la muestra antes de proceder) y filtrar en los filtros de peso conocido.

c) Lavar la muestra filtrada con 10 mL de formato de amonio 3% (0.5 M), filtrar nuevamente y guardar en el sobre.

d) Colocar los sobres (entreabiertos) con filtro en una estufa a temperatura entre 65 y 70°C durante por lo menos 12 h (el tiempo de secado depende del tipo de estufa y de la humedad ambiental, además del volumen de la muestra).

e) Pasar los filtros a un desecador, verificando que el silicagel esté libre de humedad. Aplicar vacío y dejar en el desecador durante 1.5 h.

f) Pesar rápidamente los filtros en una balanza analítica de 5 dígitos (sacando los filtros uno por uno del desecador y cerrándolo cada vez) hasta cuando la lectura se estabiliza.

g) Regresar los filtros a la estufa y repetir la operación los dos días siguientes o hasta asegurarse que se logró peso constante.

h) Por diferencia entre el peso del filtro lavado con agua destilada y seco con respecto al peso del filtro con la muestra seca dividido entre el volumen de cultivo filtrado, se obtiene el **PESO SECO TOTAL** ($\mu\text{g/mL}$ o mg/L) (Fig. 1).

i) El filtro con la biomasa seca y pesada se incinera en una mufla a 490°C durante por lo menos 6 h.

j) Colocar el filtro con las cenizas en un desecador cerrado al vacío durante 1.5 h.

k) Pesar rápidamente los filtros con las cenizas (sacando del desecador uno a uno y cerrando cada vez) en una balanza analítica de 5 dígitos, hasta cuando la lectura se estabiliza.

l) Regresar los filtros a la mufla y repetir la operación los dos días siguientes o hasta asegurarse que se logró peso constante.

m) Por diferencia del peso entre el filtro vacío y el filtro con las cenizas, se obtiene el **PESO INORGÁNICO** o **PESO DE CENIZAS** ($\mu\text{g/mL}$ o mg/L).

n) Por diferencia entre el peso del filtro con la muestra seca y el filtro con las cenizas, se obtiene el **PESO ORGÁNICO**.

2.2 Ecuaciones para el cálculo de peso seco (total y orgánico) y cenizas (Arredondo Vega *et al.*, 1997).

$$\text{PST } (\mu\text{g/mL}) = [(\text{PSFM}) - \text{PSF}] / \text{VF}$$

$$\text{PSI } (\mu\text{g/mL}) = (\text{PSC} - \text{PSF}) / \text{VF}$$

$$\text{PSO } (\mu\text{g/mL}) = \text{PST} - \text{PSI}$$

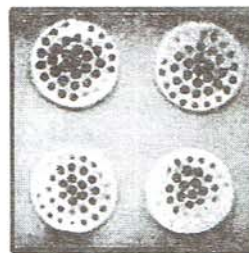


Figura 1. Muestras de la microalga *Pavlova lutheri* filtrada en filtros de fibra de vidrio (Hernández-Espinosa, 1999).

En donde:

PST, PSI y PSO son los pesos seco total, inorgánico (cenizas) y orgánico, en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

PSF, PSFM y PSC son los pesos secos del filtro sin muestra, del filtro con muestra y del filtro con la muestra incinerada.

VF = Volumen de muestra filtrado.

(NOTA: las lecturas de las balanzas analíticas son generalmente en gramos, por lo cual deben ser multiplicadas por 10^6 para obtener los pesos secos en μg).

En la Tabla 1 se reportan los valores de peso seco, orgánico y cenizas de la microalga *Pavlova lutheri* cultivada en condiciones autótrofa (medio f/2) y mixótrofa (medio f/2 adicionado con acetato de sodio). El sistema de cultivo fue batch (o por lote) en condiciones controladas de temperatura, pH e intensidad luminosa. La biomasa se cosechó a los 7 días y se lavó con 10 mL de formato de amonio al 3% (Hernández-Espinosa, 1999).

3. PESOS UNITARIOS

Es frecuente notar que un determinado tratamiento proporciona concentraciones celulares significativamente mayores, pero que no existen diferencias importantes en producción de biomasa. Asimismo, se pueden registrar incrementos de biomasa, aún cuando la concentración celular permanece constante. Ambas situaciones se deben a cambios en el peso celular unitario que es una información importante para interpretar los resultados de los experimentos, en especial cuando están dirigidos a investigar el efecto de diferentes técnicas o medios de cultivo sobre la productividad de los

Tabla 1. $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peso seco y orgánico y % de cenizas de la microalga *Pavlova lutheri* cultivada en el sistema batch y en condiciones autótrofa (f/2) y mixótrofa (f/2 + acetato de sodio). La biomasa se cosechó a los 7 días (Hernández-Espinosa, 1999).

Medio de cultivo	Peso seco ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Peso orgánico ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Cenizas (%)
f/2	561.77	284.33	49.39
+ 0.25 g/L acetato Na	457.66	267.33	41.59
+ 0.50 g/L acetato Na	780.33	257.66	66.98
+ 0.75 g/L acetato Na	835.53	383.20	54.14
+ 1.0 g/L acetato Na	403.33	293.00	27.35

sistemas de producción o a definir el momento más apropiado para la cosecha.

Esta información se consigue mediante las ecuaciones:

$$\text{PSTU} = \text{PST} / \text{N}$$

$$\text{PSOU} = \text{PSO} / \text{N}$$

En donde:

PSTU y **PSOU** son los pesos secos total y orgánico de una célula, **PST** y **PSO** son las cantidades de biomasa en un mL.

N es la concentración celular en el mismo volumen de cultivo.

(NOTA: en general la biomasa presente en un mL se expresa en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el peso unitario se obtiene en $\text{pg}/\text{cél}$ ($\text{pg} = 10^{-12} \text{ g}$) multiplicando **PSTU o **PSOU** x 10^6).**

4. REFERENCIAS

- ARREDONDO-VEGA, B.O., Cordero-Esquivel, B., Herrero, C. y Abalde, J. (1997). Manual de Técnicas Bioquímicas Aplicadas en Ficología. CIBNOR, CICESE, Universidade Da Coruña, España, 41 págs.
- BEN-AMOTZ, A. Tornabene, T.G. y Thomas W.H. (1985). Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology* 21: 71-81.
- BROWN, M.R. y Farmer, C.L. (1994). Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycology* 6:61-65.
- CHU, W-L., Phang, S-M. y Goh, S-H (1994). Studies on the production of useful chemicals, especially fatty acids, in the marine diatom *Nitzschia conspicua* Grunow. *Hydrobiologia* 285: 777-786.
- CRAIGIE, J.S., Correa, J.A. y Gordon, M.E. (1992). Cuticles from *Chondrus crispus* (Rodophyta). *Journal of Phycology* 28: 777-786.
- FABREGAS, J., Abalde, J., Cabezas, B. y Herrero, C. (1989). Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) by nitrogen concentration as nitrate, nitrite and urea. *Aquacultural Engineering* 8: 223-239.

- HENDERSON, R.J., Leftley, J.W. y Sargent, J.R. (1988). Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Cryptocodinium conorii*. *Phytochemistry* 27: 1679-1683.
- HERNÁNDEZ-ESPINOSA, D. (1999). Variabilidad bioquímica de la microalga marina *Pavlova lutheri* en condiciones autotróficas y mixotróficas en un sistema de cultivo estático. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México, D.F. 51 págs.
- HU, Q. y Richmond, A. (1994). Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoors in a glass column photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 6: 391-396.
- LÓPEZ-ALONSO, D., Sánchez-Pérez, J.A., García-Camacho, F., García-Sánchez, J.L. y Molina-Grima, E. (1993). Improvement of eicosapentaenoic acid content in isolates of *Isochrysis galbana*. *Journal of Marine Biotechnology* 1: 147-149.
- MOLINA-GRIMA, E., Sánchez-Pérez, J.A., García-Camacho, F., García-Sánchez, J.L., Acién-Fernández, F. G. y López-Alonso, D. (1994). Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII4 in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 37: 159-166.
- REITAN, K.I., Rainuzzo, J.R. y Olsen, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology* 30: 972-979.
- SHIFRIN, N. S. y Chisholm, S. W. (1981). Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *Journal of Phycology* 17: 374-384.
- SPRIHARAN, S., Bagga, D. y Nawaz, M. (1991). The effects of nutrients and temperature on biomass, growth, lipid production, and fatty acid composition of *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin and Guillard. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28/29: 317-326.
- TADROS, M.G. y Johansen, J.R. (1988). Physiological characterization of six lipid-producing diatoms from the southern United States. *Journal of Phycology* 24: 445-452.
- WIKFORS, G.H., Ferris, G.E. y Smith, B.C. (1992). The relationship between gross biochemical composition of cultured algal foods and growth of the clam, *Mercenaria mercenaria* (L.). *Aquaculture* 108: 135-154.
- SOROKIN, C. (1973). Dry weight, packed cell volumen and optical density. *En: Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurement*. Stein, J.R. (ed.) Cambridge University Press. Cambridge, 321-343 pp.
- SPOEHR, H.A. y Milner, H.W. (1949). The chemical composition of *Chlorella*: effect of environmental conditions. *Plant Physiology* 24: 120
- VONSHAK, A. (1997). Appendices. *En: Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. Vonshak, A. (ed). Taylor and Francis. 213-215 pp.
- ZHU, C.J. y Lee, Y.K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 9: 189-194.

CAPÍTULO 4

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. La Paz, Baja California Sur. México. kitty04@cibnor.mx

BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California, México. bcordero@cicese.mx

DOMENICO VOLTOLINA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Laboratorio de Estudios Ambientales UAS-CIBNOR. Mazatlán, Sinaloa, México. voltolina@mzt.megared.net.mx

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. METODOS DE ANÁLISIS
 - 2.1 MÉTODOS UTILIZADOS PARA CUANTIFICAR PROTEÍNAS
 - 2.2 CURVA DE CALIBRACIÓN UTILIZANDO BSA
 - 2.3 CONSIDERACIONES PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
 - 2.4 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
 - 2.5 ECUACIONES PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE PROTEÍNAS EN UNA MUESTRA DE MICROALGA
3. REFERENCIAS

Palabras clave: microalgas, nitrógeno, proteínas, métodos espectrofotométricos

1. INTRODUCCIÓN

El componente cuantitativamente más importante de la biomasa orgánica de la mayoría de las microalgas son las proteínas, las cuales pueden representar hasta más del 50% del peso seco total y que, sumadas a los lípidos y a los carbohidratos constituyen hasta el 90% del peso seco total, mientras que los minerales, los ácidos

nucleicos, los pigmentos y los demás componentes menores suman el restante 10%. La excepción son las diatomeas que tienen una pared celular protegida por bióxido de silicio por lo cual, dependiendo de la especie y de su forma de vida (planctónica o bentónica), su contenido de compuestos inorgánicos puede representar entre el 30 y el 45% del peso seco total (Tabla 1).

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Se han descrito varios métodos para la determinación de la concentración de proteínas (Bergmeyer y Grabl, 1983) pero, aunque éstas tienen varias propiedades comunes, difieren en otras, como secuencia y perfil de aminoácidos y peso molecular, lo cual explica las discrepancias que se pueden encontrar en literatura cuando se compara la composición de la biomasa microalgal determinada con metodologías diferentes (Harrison y Thomas, 1988).

2.1. Métodos utilizados para cuantificar proteínas

Muchos de los datos relativos al contenido de proteínas de diferentes organismos están basados en la cuantificación del nitrógeno

Tabla 1. Composición química (en % del peso seco total) de diferentes microalgas de agua dulce y marina (Brown *et al.*, 1989; Becker, 1994).

ESPECIE	PROTEÍNAS	CARBOHIDRATOS	LÍPIDOS
AGUA DULCE			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 -56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
MARINAS			
<i>Isochrysis</i> sp. T-ISO	44	9	25
<i>Isochrysis galbana</i>	41	5	21
<i>Pavlova lutheri</i>	49	31	12
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	33	17	10
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	33	24	10
<i>Skeletonema costatum</i>	37	21	7
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	29	17	10
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	9
<i>Tetraselmis suecica</i>	39	8	7

orgánico total después de su digestión y transformación cuantitativa a sales de amonio mediante el método de Kjeldahl (Hiller *et al.*, 1948). Después de determinar la cantidad de amonio presente en la muestra digerida, las proteínas se calculan multiplicando el resultado por el factor 6.25 (FAO/WHO, 1970), que se basa en el supuesto que en promedio el contenido de nitrógeno de las proteínas es de aproximadamente el 16% (Coombs *et al.*, 1988; Tacon, 1990).

Sin embargo, en las microalgas aproximadamente el 10% de nitrógeno es no proteínico, contenido principalmente en los ácidos nucleicos, en las glucosamidas, en las membranas celulares, o presente como aminoácidos libres y ficobiliproteínas (Becker, 1994), por lo cual el uso del factor 6.25 conlleva frecuentemente a una sobreestimación del

contenido proteínico celular. A título de ejemplo, el 12% del nitrógeno determinado en *Scenedesmus* con el método Kjeldahl corresponde a nitrógeno no proteínico y en *Dunaliella* y *Spirulina* los respectivos porcentajes son de 6 y del 11% (Becker, 1994).

Con base en esta consideración, Gnaiger y Bitterlich (1984) sugieren que cuando se utiliza el método de Kjeldahl para cuantificar proteínas en muestras de origen marino, ya sea de **algas, bacterias, protozoos o invertebrados**, el factor más apropiado es **5.8**, aunque Laws (1991) sugirió que **6.0** es el valor más cercano al real en el caso de las **diatomeas**. Adicionalmente, si bien el método Kjeldahl es utilizado para la determinación del contenido de proteínas en alimentos, es relativamente complicado y requiere de cantidades de muestras mayores de las que se pueden utilizar con los métodos que se mencionan

con mayor frecuencia para la determinación de proteínas en microalgas, que son los métodos de Lowry *et al.* (1951) y de Bradford (1976).

El primero de estos métodos se basa en la determinación espectrofotométrica de la intensidad de color obtenido con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-túngstico: FMT), después de un tratamiento con solución alcalina de cobre. El FMT oxida los aminoácidos aromáticos como tirosina y triptofano presentes en la mayoría de las proteínas, reduciéndose a heteropolimolibdeno azul. Esta reacción es catalizada por el cobre y da como resultado un color azul, cuya intensidad depende del contenido de tirosina y/o triptofano en la muestra (Peterson, 1979).

A partir del año de su publicación, el método de Lowry ha sido ampliamente utilizado, y se ha sugerido a través de los años diferentes modificaciones a la técnica original, y su popularidad queda demostrada por las 275,669 citas hasta enero del 2004, que lo ubican en primer lugar entre los 50 artículos con el mayor número de citas sobre temas bioquímicos (Thomson, 2006).

El método de Bradford es también ampliamente utilizado y citado. En este caso, las proteínas se tiñen con el colorante Azul Brillante de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue) y su cuantificación se basa en el cambio del pico de máxima absorción del colorante, que vira progresivamente entre 465 y 595 nm, en paralelo con la combinación del colorante con los grupos amínicos de las proteínas. Para ambos métodos la curva de calibración se realiza con sero albúmina de bovino (BSA, por sus iniciales en inglés), que es el estándar más utilizado para todo tipo de proteína, tanto de origen vegetal como animal.

Ambos métodos tienen ventajas y desventajas: el método de Bradford es rápido y sencillo, debido a que se utiliza un solo reactivo y es además aproximadamente 4 veces más sensible que el de Lowry, pero tiene algunas limitaciones importantes (Bergmeyer y Grabl, 1983): la curva de calibración no es lineal para todas las proteínas, en especial si su contenido en la muestra es superior a 60 $\mu\text{g/mL}$. Esto se debe a la sobreposición de los espectros de las

dos especies (forma libre y combinada) del reactivo, ya que el valor de referencia disminuye a medida que el colorante se une a la proteína. Además, el valor de absorbancia varía con la edad del colorante (Harrison y Thomas, 1988). Otra de las desventajas de este método es que la lectura de absorbancia se debe realizar entre 5 y 20 minutos después de agregar el reactivo, para evitar subestimar el contenido de proteínas de las muestras a causa de la pérdida gradual de color (Kochert, 1978).

Un problema común a estos métodos, basados en colorantes que se enlazan a los aminoácidos de las proteínas, es que la respuesta varía en dependencia del tipo de proteína. En este sentido, el método de Lowry es más conveniente ya que en un estudio previo realizado en 1988, los autores observaron que la desviación estándar de la concentración de proteínas calculada en pruebas realizadas para cuantificar 23 proteínas diferentes, se mantuvo, mientras que con el método de Bradford resultó ser dos veces mayor que con el método de Lowry (Harrison y Thomas, 1988).

Resulta claro que la única manera de obviar a esta dependiente entre la respuesta y el tipo de estándar es el de utilizar un estándar que dé un color semejante al de la proteína de la muestra que se está analizando. Por otra parte, esto pudiera causar problemas para la comparación entre los resultados obtenidos con estándares diversos y una forma de eliminarlo es la de seleccionar el estándar más apropiado y disponible para todos los investigadores que usan el mismo método de determinación. En el caso del método de Bradford, el BSA no se considera el estándar ideal, ya que con éste se obtiene una intensidad de color mayor que con las proteínas de otras fuentes naturales. Con el fin de evitar esta fuente de error, se sugiere utilizar como estándar la gamma globulina bovina (BGG por sus iniciales en inglés; BioRad, 1979).

Por otra parte, el método de Lowry da una curva de calibración casi lineal hasta 150 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas, la absorbancia se lee a 750 nm, a la cual se minimiza la interferencia de las clorofilas, aunque otras sustancias como detergentes, carbohidratos, glicerina, EDTA, compuestos de potasio, magnesio y calcio son

posibles fuentes de interferencias. Este método es sensible a concentraciones de hasta 10 µg/mL de proteína.

Considerando las ventajas y las desventajas de los dos métodos mencionados, decidimos que para cuantificar las proteínas en muestras de microalgas el más apropiado es el método de Lowry, por lo cual en la parte siguiente de este capítulo solamente se describe este protocolo.

2.2. Curva de calibración utilizando BSA

La curva de calibración se prepara con una solución concentrada de 300 µg/mL de sero albúmina de bovino (BSA), a partir de la cual se hace un gradiente de concentración desde 0 a 150 µg/mL (Tabla 2). Todas las diluciones se realizan por triplicado y, una vez que se tienen las diferentes concentraciones de BSA, se continúa la curva con los reactivos que se describen a continuación (a partir del 2.4, i).

Los datos anteriores se grafican y se ajustan por mínimos cuadrados a una ecuación lineal, obteniendo la "r²", el valor de la pendiente (m),

utilizando el intercepto (b) igual a cero. El valor de r² deberá ser superior a 0.98. Si se obtiene un valor inferior, se repite la calibración con una nueva serie de diluciones y, si el resultado es similar, entonces se recomienda preparar soluciones nuevas.

Dado que al momento de realizar la cuantificación de proteínas en las muestras de microalgas solo conoceremos el valor de la absorbancia, entonces los datos de A_{750nm} obtenidos en la curva de calibración, se utilizarán como variable independiente y como variable dependiente la concentración de BSA (Fig. 1). A partir de esta ecuación la concentración de proteínas en las muestras de microalgas se calcula como:

$$\text{Proteínas} = m \cdot A_{750\text{nm}}$$

Siguiendo este ejemplo, en este caso se obtuvo la ecuación:

$$\text{Proteínas} = 228.13 \cdot A_{750\text{nm}} \\ r^2 = 0.9877$$

Tabla 2. Elaboración de la curva de calibración de proteínas utilizando BSA como estándar. **NOTA:** observe que el volumen total de cada tubo (volumen de BSA + volumen de agua destilada) es de 1 mL por lo cual, después de realizar la extracción de proteínas en las muestras de microalgas, se utilizará también 1 mL del extracto alcalino total obtenido de cada muestra. Las lecturas de absorbancia que se reportan se obtuvieron en un experimento realizado "ex profeso" para este manual.

TUBO	VOLUMEN BSA (300 µg/mL) (µL)	VOLUMEN H ₂ O DESTILADA (µL)	CONCENTRACIÓN DE BSA (µg/mL)	ABSORBANCIA 750 nm
Blanco	0	1000	0	0
1	50	950	15	0.102
2	100	900	30	0.163
3	150	850	45	0.229
4	200	800	60	0.280
5	250	750	75	0.325
6	300	700	90	0.390
7	350	650	105	0.476
8	400	600	120	0.540
9	450	550	135	0.577
10	500	500	150	0.618

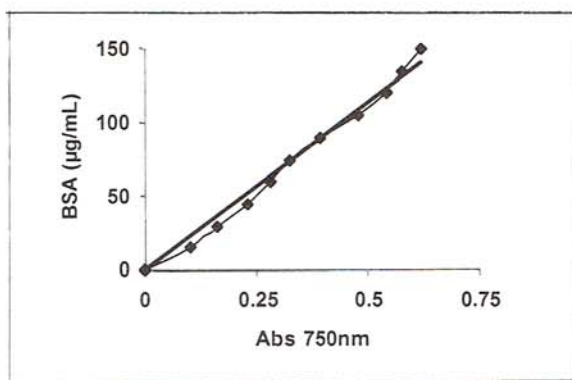


Figura 1. Curva de calibración de proteínas utilizando la [BSA] como variable dependiente.

2.3 Obtención del extracto alcalino para la cuantificación de proteínas

Previo a la determinación de proteínas, es necesario realizar su extracción cuantitativa, para lo cual diversos autores han evaluado las condiciones que permiten optimizar el método de extracción, considerando principalmente la composición de la pared celular de diferentes clases de microalgas, que pueden dificultar el proceso de extracción. En general, se sugieren diferentes concentraciones de NaOH, con

diferentes temperaturas y tiempos de extracción (Rausch, 1981).

Con base en nuestras experiencias y en las de varios colegas, recomendamos el uso de **NaOH 0.1 N** para la mayoría de las especies de microalgas pero, para las que tienen una pared celular rígida (ej. aplanosporas de *Haematococcus*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Nannochloropsis*) se puede utilizar NaOH 1N y en este caso o cuando se usan normalidades de 0.25 o superiores, el pH del extracto resulta demasiado alcalino por lo cual es necesario diluir con H₂O destilada, para evitar interferencias con el desarrollo del color en la muestra.

(NOTA: en el caso de haber diluido con agua el extracto, ésta deberá ser considerada al momento de los cálculos finales).

La extracción se realiza en calor, en un termo-baño y el tiempo puede variar desde 10 hasta 60 min. y temperaturas de 60 a 100 °C. En la Tabla 3 se indican condiciones óptimas de extracción para algunas especies de microalgas. Una vez seleccionada las condiciones de extracción de la(s) microalga(s) en experimentos previos, se continúa con la extracción.

NOTA: es recomendable realizar una segunda o a veces hasta una tercera extracción y en

Tabla 3. Ejemplo de condiciones óptimas de extracción de proteínas para ocho especies de microalgas (modificado de López Elías *et al.*, 1992).

ESPECIE	CONCENTRACIÓN DE NaOH (N)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
<i>Pavlova lutheri</i>	0.1	80	10
<i>Isochrysis sp.</i>	0.1	80	10
<i>Tetraselmis sp.</i>	0.1	100	10
<i>Dunaliella sp.</i>	0.1	100	60
<i>Chaetoceros sp.</i>	0.1	100	10
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	0.1	100	20
<i>Skeletonema costatum</i>	0.2	90	20
<i>Nitzschia sp.</i>	0.2	100	20
<i>Amphora sp.</i>	0.2	100	20
<i>Exuviella sp.</i>	0.1	100	30
<i>Haematococcus sp.</i>	1.0	100	60

este caso la cantidad total de NaOH utilizado en estas extracciones se deberá considerar en los cálculos finales. Otra sugerencia para facilitar la extracción de proteínas (así como de otros componentes celulares), es utilizar una fuente de ultrasonido (sonicador) para romper las paredes celulares de las microalgas que así lo requieran, como es el caso de *Haematococcus* sp., de las clorofíceas como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Nannochloropsis* y de algunas diatomeas bentónicas (Flores-Vergara com. pers.).

2.4. Protocolo para la extracción y cuantificación de proteínas por el método de Lowry *et al.*, (1951)

- a) Pesar 5 mg de muestra liofilizada y pulverizada, o tomar directamente la muestra del cultivo (los mL a utilizar dependerán de la concentración celular de microalgas). En el segundo caso, se concentra la biomasa en filtros de fibra de vidrio GF de 25 o 47 mm de diámetro. Los filtros con las microalgas se doblan con cuidado y se colocan en papel aluminio o en tubos eppendorf y se almacenan en congelación, preferentemente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su análisis.
- b) La muestra liofilizada o el filtro con la muestra se coloca en un tubo de vidrio limpio, previamente lavado con jabón libre de fosfatos y con HCl al 10%, enjuagado con abundante agua destilada y secado. Todos los tubos deberán estar etiquetados con marcador indeleble o con etiquetas adhesivas y, en el segundo caso, se recomienda colocar cinta adhesiva transparente alrededor de la etiqueta para evitar su desprendimiento durante el tratamiento en el termo-baño.
- c) En el caso de muestras liofilizadas, se agrega 5 mL de NaOH 0.1 N o de la normalidad seleccionada. Para muestras concentradas en filtro, agregar 1 mL de la solución de NaOH a la normalidad adecuada, macerar con una varilla de vidrio y agregar posteriormente los restantes 4 mL de NaOH, lavando con éstos la extremidad de la varilla. Tapar la boca del tubo con papel aluminio.
- d) Someter a hidrólisis alcalina la (s) muestra (s) en un termo-baño a la temperatura y el tiempo determinado en los ensayos preliminares. Transcurrido este tiempo, los tubos se retiran y se dejan enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- e) Centrifugar a 3,000 rpm por 15 min a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si la pastilla celular es rígida y está totalmente adherida al fondo del tubo, se decanta y se recupera el extracto alcalino que se coloca en otro tubo limpio y etiquetado con la misma información que se utilizó para el tubo donde se realizó la extracción. **NOTA: En caso de que queden partículas suspendidas después de la centrifugación (como sucede con *Spirulina -Arthrospira-*), el extracto alcalino se filtra pasando éste a través de una pipeta Pasteur limpia con un tapón de fibra de vidrio y recibiendo el extracto libre de partículas en otro tubo limpio y seco.** Es necesario medir y anotar el volumen del extracto, para realizar la corrección correspondiente al momento de realizar los cálculos para la cuantificación de proteínas, en el caso de observar una pérdida.
- f) Si el paquete celular muestra una **coloración amarillenta**, se recomienda hacer una segunda extracción, con la concentración de NaOH correspondiente y siguiendo la misma metodología que en la primera extracción (temperatura, tiempo y centrifugación). Para la segunda extracción, se puede utilizar la misma cantidad, o un volumen menor de NaOH que en la primera extracción. **NOTA: el total de mL de NaOH dependerá de la concentración celular (cél/mL) de la muestra. Para cultivos muy concentrados, se puede utilizar hasta un total de 10 mL de NaOH.**
- g) Colocar el extracto alcalino obtenido en la segunda extracción en el mismo tubo donde está el de la primera extracción. Mezclar en un vortex.
- h) Del extracto alcalino total obtenido, se recomienda tomar 3 volúmenes diferentes, midiendo con una micropipeta 250, 500 y 750 μL y completando a 1 mL con NaOH 0.1 N (cada volumen en un tubo de cristal, debidamente etiquetado). Estas muestras se agitan con el vortex para su total homogenización, y sirven para asegurar que

con al menos una de las concentraciones se obtendrá una absorbancia en el intervalo de los valores obtenidos en la curva de calibración.

- i) Preparar la solución de Na_2CO_3 al 2% (p/v) en NaOH 0.1 N (**solución A**).
- j) Preparar la mezcla 1:1 de CuSO_4 al 0.5% en tartrato de K al 1% y agitar (**solución B**). Esta mezcla es una suspensión, por lo cual se deja en reposo y se usa el sobrenadante claro.
- k) Agregar a la muestra (extracto alcalino) 5 mL de la mezcla de NaCO_3 al 2% en NaOH 0.1 N + CuSO_4 al 5% y tartrato de K al 1% en una proporción de 50:1 (**solución C**), mezclar en el vortex y dejar reposar 15 min. **NOTA: la solución C se prepara al momento de usarse.**
- l) Agregar 500 μL de la solución 1:1 de Folin: H_2O destilada (**solución D**), agitar en el vortex y dejar reposar en la oscuridad por 40 min.
- m) Leer en el espectrofotómetro a 750 nm calibrando el equipo con un blanco preparado usando el mismo tratamiento que el de las muestras, pero utilizando 1 mL de NaOH 0.1 N en lugar de muestra (blanco de reactivos).
- n) La determinación de la concentración de proteínas totales en las muestras de microalgas, se realiza a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración (Tabla 1) que se elabora con BSA en un rango de concentración de 0 – 150 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1).

2.5 Ecuaciones para determinar el porcentaje de proteínas en una muestra de microalga

Considerando los datos de peso de la muestra de microalga liofilizada, el volumen total del extracto alcalino, el volumen del extracto alcalino utilizado para la cuantificación de proteínas y el valor de la pendiente de la ecuación de la recta de la curva de calibración, se hacen los cálculos para obtener el % de proteínas totales de la microalga en estudio. A continuación se da un ejemplo de estos cálculos usando datos obtenidos en un experimento realizado en nuestro laboratorio (López-Hernández, 2003).

- a) Se partió de un cultivo del dinoflagelado marino *Prorocentrum lima* cultivado en el medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) y en condiciones controladas de laboratorio. Las muestras se fueron cosechando a lo largo de la curva de crecimiento para evaluar el contenido de proteínas en cada fase (López-Hernández, 2003).
- b) El dato que a continuación se utilizará corresponde a la fase lag que ocurrió a los 17 días de cultivo. La biomasa se cosechó por centrifugación y se liofilizó. Del total de la biomasa liofilizada se pesó 6.6 mg que se utilizó para la extracción y cuantificación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951). Datos importantes para el cálculo:

- a) Peso seco (biomasa liofilizada) (P_s) = 6.6 mg
- b) Volumen de extracto alcalino (V_E) = 5 mL
- c) Volumen muestra (V_m) = 100 μL (0.1 mL)
- d) $A_{750\text{nm}}$ = 0.135
- e) "m" = 228.13

La ecuación para la cuantificación de proteínas es:

$$\% \text{ Proteínas} = [[(m \cdot A_{750\text{nm}}) / V_m] \cdot V_E] / P_s \cdot 100$$

Sustituyendo de manera desglosada en la ecuación anterior tenemos:

$$\text{Proteínas} = 228.13 \cdot 0.135 = 30.79755 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Proteínas} = (30.79755 \mu\text{g/mL} / 0.1 \text{ mL}) \cdot 5\text{mL} = 1539.8775 \mu\text{g}$$

$$\text{Proteínas} = 1539.8775 \mu\text{g} / 1000 \text{ mg} = 1.5398775 \text{ mg}$$

$$\text{Proteínas} = 1.53987 \text{ mg} / 6.6 \text{ mg} = 0.2333 \text{ mg/mg}$$

$$\% \text{ Proteínas} = 0.2333 \text{ mg/mg} \cdot 100 = 23.33\%$$

Para los cálculos de la concentración de proteínas en muestras filtradas, se procede de la misma forma, después de obtener previamente el peso seco de la biomasa presente en 1 mL del cultivo, filtrando volúmenes conocidos del mismo cultivo, del cual se obtuvieron las muestras para los análisis bioquímicos. Una vez obtenido el peso seco (mg/mL), se calcula el peso seco de la biomasa presente en el volumen filtrado para estos análisis.

3. REFERENCIAS

- BECKER, E.W. (1994). *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge Press. 293 pp.
- BERGMEYER, J. y Grabl, M. (1983). *Methods in Enzymatic Analysis (3rd edition) Volume I. Fundamentals*. Verlag Chemie, Weinheim, 84-99 pp.
- BIO-RAD (1979). Bio-Rad protein assay. Bio-Rad Bulletin 1069 EG, *Bio-Rad Laboratory*, Richmond, California, 10 pp.
- BROWN, M.R., Jeffrey, S.W. y Garland, C.D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture. A literature review. CSIRO Marine Reports, No. 205. 44 pp.
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- COOMBS, J., Hind, G., Leegood, R.C., Tieszen, L.L. y Vonshak A. (1988). Técnicas Analíticas. Cap. 17. *En: Técnicas en Fotosíntesis y Bioproductividad*. Coombs, J., Hall, D.O., Long, S.P. y Scorlock, J.M. (eds.). Colegio de Graduados. Chapingo, Edo. de México. 358 págs.
- FAO/WHO (1970). *Aminoacid Content of Foods and Biological Data on Proteins*. FAO Nutritional Studies. No. 24. Roma, Italy. 295 pp.
- GNAIGER, E. y Bitterlich, G. (1984). Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia* 62 : 289-298.
- GUILLARD, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.
- HARRISON, P.J. y Thomas, T.E. (1988). Biomass Measurements: Protein Determination. *En: Experimental Phycology. A Laboratory Manual*. Lobban, C.S., Chapman, D.J., Kremer, B.P. (eds). Cambridge University Press. 27-34 pp.
- HILLER, A., Plazin, J. y van Slyke, D. D. (1948). A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 176: 1401-1420.
- KOCHERT, G. (1978). Protein determination by dye binding. Cap. 9. *En: Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biological Methods*. Hellebust J.A. y Craigie J.S. (eds.). Cambridge University Press. 91-93 pp.
- LAWS, E.A. (1991). Photosynthetic quotients, new production and net community production in the open ocean. *Deep-Sea Research* 38: 143-167.
- LÓPEZ-ELÍAS, J.A., Báez-Dueñas, M. del C., y Huerta Aldaz, N. (1992). *Manual de Técnicas Analíticas Aplicadas al Cultivo de Microalgas*. CICTUS. Publicaciones Académicas No. 5. Serie Ciencias Marinas. 47 págs.
- LÓPEZ-HERNÁNDEZ, S. (2003). Análisis de los constituyentes celulares de la microalga marina *Prorocentrum lima* durante la curva de

- crecimiento. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de La Paz. La Paz, Baja California Sur. 57 págs.
- LOWRY, O.H., Rosenbrough N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry* 193: 265-272.
- PETERSON, G.L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosenbrough, Farr and Randall. *Analytical of Biochemistry* 100: 201-220.
- RAUSCH, T. (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomasa. I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia* 78: 237-251.
- TACON, A.G.J. (1990). Standard methods for the nutrition and feed of farmed fish and shrimp. Volume 2. Nutrient sources and composition. Argent Laboratories Press. Redmond, WA. 129 pp.
- THOMSON. (2006). The most highly cited works in web of science. Tomado de la Red Mundial en septiembre 2006. (<http://www.thomsonisi.com/wosbackfiles/mostcited.html#top>).

CAPÍTULO 5

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. La Paz, Baja California Sur. México. kitty04@cibnor.mx

BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada Baja California, México. bcordero@cicese.mx

DOMENICO VOLTOLINA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Laboratorio de Estudios Ambientales UAS-CIBNOR. Mazatlán, Sinaloa, México. voltolina@mzt.megared.net.mx

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES
 - 2.1 CURVA DE CALIBRACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES UTILIZANDO GLUCOSA
 - 2.2 PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES
 - 2.3 ECUACIONES PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE CARBOHIDRATOS EN UNA MUESTRA DE MICROALGA
3. REFERENCIAS

Palabras clave: microalgas, composición, carbohidratos

1. INTRODUCCIÓN

El contenido de carbohidratos de las microalgas puede variar ampliamente, dependiendo de las condiciones de cultivo, entre aproximadamente el 10 y el 50% de la biomasa orgánica seca cuando el crecimiento no está limitado. Estos porcentajes tienden a aumentar en condiciones de limitación por nutrientes o como resultado de un cambio en la tasa de crecimiento, con un incremento de lípidos y carbohidratos en

relación con las proteínas cuando el crecimiento cambia de fase exponencial a estacionaria (Granum *et al.*, 2002).

Los carbohidratos se dividen en estructurales y de reserva: los primeros se encuentran como componentes principales de las paredes celulares y los segundos se acumulan principalmente en los cloroplastos, con tasas de acumulación mayores en condiciones de limitación por nutrientes o de saturación de luz (Geider y La Roche, 2002). De acuerdo a Whyte (1987), las diatomeas tendrían un mayor contenido de carbohidratos de las demás microalgas, mientras que varios otros autores no encuentran tal diferencia. En general, existe un consenso que los polisacáridos son la fracción cuantitativamente más importante y que los azúcares principales son glucosa, galactosa, manosa y ribosa (Webb y Chu, 1983; Brown *et al.*, 1989).

2. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES

Los procedimientos más utilizados para la determinación cuantitativa de carbohidratos son los métodos colorimétricos del fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) o de la antrona (Yemm y Willis, 1954; Parsons *et al.*, 1984). En

ambos, el H_2SO_4 hidroliza los enlaces glucosídicos y el fenol o la antrona reaccionan con el monosacárido resultante para producir un producto coloreado. Los dos métodos miden solamente los carbohidratos totales y destruyen el biopolímero en el proceso de hidrólisis, pero ninguno mide la concentración del anión.

El fenol es un alcohol altamente reactivo que reacciona con los azúcares reductores. Este proceso requiere una gran cantidad de energía, proporcionada por la reacción entre el ácido sulfúrico y el agua. El producto resultante es un compuesto amarillo-marrón, con pico de absorción a **485 nm**, longitud a la cual la relación entre la concentración y la intensidad del color es lineal.

El método de Dubois *et al.* (1956) fue originalmente descrito como una técnica no específica para carbohidratos, pero posteriormente fue comparado con el método de la antrona y con el de N-etilcarbazol (Handa, 1966) y se encontró que era el más adecuado para el análisis de carbohidratos totales (Gerchakov y Hatcher, 1972).

Este método permite determinar concentraciones de entre 5 y 100 $\mu\text{g/mL}$, es sensitivo a una amplia variedad de carbohidratos, incluyendo azúcares, azúcares metilados y polisacáridos

ácidos y neutrales; es poco sensible a la interferencia con proteínas y el color producido es muy estable (Kochert, 1978). Su único inconveniente es la interferencia de las pentosas de los ácidos nucleicos, pero por su gran simplicidad es el de uso más extendido en las investigaciones con especies microalgales.

La determinación se hace usando un extracto ácido diluido convenientemente, que se obtiene por ultrasonido o mediante calentamiento de las células cosechadas por centrifugación o por filtración, en un termo-baño, o también de la biomasa seca o liofilizada y resuspendida en agua destilada.

2.1. Curva de calibración de carbohidratos totales utilizando glucosa

La curva de calibración se obtiene usando un gradiente de concentración de glucosa anhidra preparadas a partir de una solución de 120 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 1). Todas las diluciones se preparan por triplicado y una vez que se tienen las diferentes concentraciones de glucosa, se continúa la curva de calibración, utilizando los reactivos que se describen a partir del inciso 2.2 del apartado siguiente.

Tabla 1. Curva de calibración de carbohidratos, como estándar se utilizó glucosa anhidra. **NOTA:** observe que el volumen total de cada tubo (volumen de glucosa + volumen de agua destilada) es de 1 mL por lo cual, después de realizar la extracción de carbohidratos en las muestras de microalgas, se utilizará también 1 mL del extracto ácido total obtenido de cada muestra. Las lecturas de absorbancia que se reportan se obtuvieron en un experimento realizado "ex profeso" para este manual.

TUBO	SOL. GLUCOSA (120 $\mu\text{g/mL}$) (μL)	H_2O DESTILADA (μL)	CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA ($\mu\text{g/mL}$)	ABSORBANCIA 485 nm
Blanco	0	1000	0	0
1	100	900	12	0.171
2	200	800	24	0.284
3	300	700	36	0.321
4	400	600	48	0.378
5	500	500	60	0.567
6	600	400	72	0.632
7	700	300	84	0.715
8	800	200	96	0.848
9	900	100	108	0.990
10	1000	0	120	1.009

Los datos anteriores se grafican y se ajustan por mínimos cuadrados a una ecuación lineal, obteniendo la "r²", el valor de la pendiente (**m**), utilizando el intercepto (**b**) igual a cero. El valor de r² deberá ser superior a 0.98. Si se obtiene un valor inferior, se repite la calibración con una nueva serie de diluciones y, si el resultado es similar, entonces se recomienda preparar soluciones nuevas.

Dado que al momento de realizar la cuantificación de carbohidratos en las muestras de microalgas solo conoceremos el valor de la absorbancia, los datos de A_{485nm} obtenidos en la curva de calibración, se utilizarán como variable independiente y como variable dependiente la concentración de glucosa (Fig. 1). A partir de esta ecuación la concentración de carbohidratos en las muestras de microalgas se calcula como:

$$\text{Carbohidratos} = m \cdot A_{485\text{nm}}$$

Siguiendo este ejemplo, en este caso se obtuvo la ecuación:

$$\text{Carbohidratos} = 111.49 \cdot A_{485\text{nm}} \\ r^2 = 0.9847$$

2.2. Protocolo para la determinación de carbohidratos totales (Dubois *et. al.*, 1956)

Mediante este ensayo se cuantifican las hexosas, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y derivados metilados que tienen un grupo reductor libre o potencialmente libre. El método no mide glucosamina y galactosamina, pero incluyen pentosas y metil-pentosas (Kochert, 1978). Antes de proceder a la determinación de los carbohidratos, es importante que todo el material a utilizarse, debe estar lavado con ácido clorhídrico al 10%, enjuagado con suficiente agua destilada y secado en estufa, para posteriormente proceder con el siguiente protocolo:

a) Si se utilizan muestras concentradas o filtradas, es necesario conocer el peso seco de la biomasa, determinado a partir de muestras del mismo cultivo después de su lavado con formato de amonio (revisar el Capítulo 3). Si

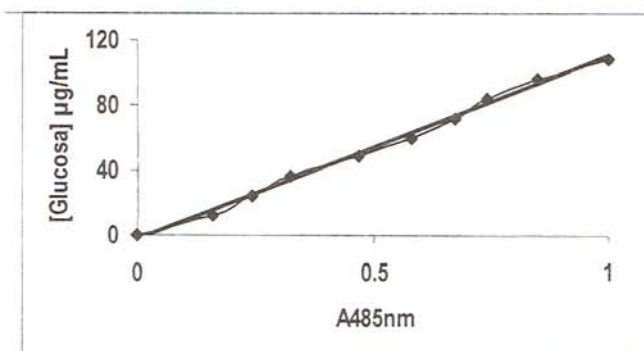


Figura 1. Curva de calibración de carbohidratos utilizando la concentración de glucosa como variable dependiente.

se parte de muestras liofilizadas, se pesan 5 mg de biomasa. En ambos casos, el filtro y la biomasa liofilizada se colocan en un tubo de ensayo con tapón de rosca.

- b) Agregar 1 mL de H₂SO₄ 1.0 M (Whyte, 1987) y mantener a temperatura ambiente hasta que todos los tubos contengan el ácido.
- c) Macerar el filtro con una varilla limpia, y/o en el caso de usar biomasa liofilizada en polvo, sonicar durante 5 min.
- d) Agregar otros 4 mL de H₂SO₄ 1.0 M (en total se tendrán 5 mL de H₂SO₄ 1.0 M). Si se usa un volumen diferente, es necesario considerarlo en los cálculos finales.
- e) Colocar los tubos tapados individualmente con papel aluminio en un termo-baño a 100°C durante 1 h.
- f) Retirar los tubos del baño y dejar en reposo hasta que alcancen la temperatura ambiente.
- g) Centrifugar a 4000 rpm/10°C por 15 min.
- h) Separar el extracto ácido con una pipeta Pasteur limpia, teniendo cuidado de no resuspender la pastilla celular adherida al fondo del tubo, medir el volumen total y pasarlo a un tubo limpio.
- i) Tomar 1 mL del extracto ácido (si es necesario diluir, considerar el factor de dilución).
- j) Agregar 1 mL de fenol al 5% y mezclar.
- k) Dejar reposar 40 minutos.
- l) Agregar lentamente 5 mL de H₂SO₄ concentrado. **NOTA: realizar esta operación en una campana de extracción. El tubo debe estar inclinado al agregar el ácido**

concentrado y es necesario mezclar con una varilla de vidrio para que no exista pérdida por evaporación (López-Elías *et al.*, 1992).

- m) Enfriar a temperatura ambiente.
n) Leer a 485 nm, calibrando el espectrofotómetro con un blanco que se prepara de la misma manera, sustituyendo el extracto ácido de la muestra con 1 mL de H₂SO₄ 1M.

La concentración de carbohidratos totales en la muestra de microalgas se calcula a partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración (Tabla 1).

2.3. Ecuaciones para determinar el porcentaje de carbohidratos (CHO) en una muestra de microalga

Los cálculos necesarios para obtener el contenido total absoluto (µg/mL) o relativo (% de

peso seco) se realizan considerando los datos de peso de la muestra de microalga liofilizada, el volumen total del extracto ácido, el volumen del extracto ácido utilizado para la cuantificación de los carbohidratos y la ecuación de la recta de calibración. A continuación se da un ejemplo de estos cálculos usando datos reales obtenidos por López Hernández (2003), a partir de un cultivo del dinoflagelado *Prorocentrum lima* cultivado en laboratorio en medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962).

El dato que se usa a continuación como ejemplo corresponde a la fase de aceleramiento que ocurrió a los 24 días de cultivo. La biomasa se cosechó por centrifugación a 3000 rpm / 10 min. y se liofilizó. Del total de la biomasa liofilizada se pesaron 5 mg que se utilizaron para la extracción y cuantificación de carbohidratos de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente. Datos importantes para el cálculo:

a) Peso seco (biomasa liofilizada) (P _s)	= 5 mg
b) Volumen extracto ácido (V _E)	= 5 mL
c) Volumen muestra (V _m)	= 100 µL (0.1 mL)
d) "m"	= 111.49
f) A _{485nm}	= 0.195

La ecuación para la cuantificación de carbohidratos es la siguiente:

$$\% \text{ Carbohidratos} = [[(m \cdot A_{485nm}) / V_m] \cdot V_E] / P_s \cdot 100$$

Sustituyendo de manera desglosada en la ecuación anterior tenemos:

$$\text{Carbohidratos} = 111.49 \cdot 0.195 = 21.74055 \text{ µg/mL}$$

$$\text{Carbohidratos} = (21.74055 \text{ µg/mL} / 0.1 \text{ mL}) \cdot 5 \text{ mL} = 1087.0275 \text{ µg}$$

$$\text{Carbohidratos} = 1087.0275 \text{ µg} / 1000 \text{ mg} = 1.087027 \text{ mg}$$

$$\text{Carbohidratos} = 1.087027 \text{ mg} / 6.6 \text{ mg} = 0.164701 \text{ mg/mg}$$

$$\% \text{ Carbohidratos} = 0.164701 \text{ mg/mg} \cdot 100 = 16.47\%$$

NOTA: CHO µg/mL es la cantidad de carbohidratos en 1 mL de extracto. Para conocer el contenido de carbohidratos en 1 mL de cultivo, utilizar el valor de biomasa seca determinado con la metodología descrita en el Capítulo 3.

3. REFERENCIAS

- BROWN, M.R., Jeffrey, S.W. y Garland, C.D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: A Literature Review. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Marine Laboratories (CSIRO), Report. 205, 44 pp.
- DUBOIS, M., Gilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- GEIDER, R. J. y La Roche, J. (2002). Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology* 37:1-17.
- GERCHAKOV, S. M., y Hatcher, P. G. (1972). Improved technique for analysis of carbohydrates in sediments. *Limnology and Oceanography* 17 (6): 938-943.
- GRANUM, E., Kirkvold, S. y Myklestad, S.M. (2002). Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology and Progress Series* 242: 83-94.
- GUILLARD, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.
- HANDA, N. (1966). Examination of the applicability of the phenol sulfuric acid method to the determination of dissolved carbohydrate in seawater. *Journal of the Oceanographic Society of Japan* 22:79-85.
- KOCHERT, G. (1978). Carbohydrates determination by the phenol-sulfuric acid method. Cap. 10. En: Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biological Methods. Hellebust J.A. y Craigie J.S. (eds.). Cambridge University Press. Cambridge, 512 pp.
- LÓPEZ-ELIAS, J.A., Báez-Dueñas, M. del C., y Huerta Aldaz, N. (1992). Manual de Técnicas Analíticas Aplicadas al Cultivo de Microalgas. CICTUS. Publicaciones Académicas No. 5. Ciencias Marinas. 47 págs.
- LÓPEZ HERNÁNDEZ, S. (2003). Análisis de los constituyentes celulares de la microalga marina *Prorocentrum lima* durante la curva de crecimiento. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de La Paz. La Paz, Baja California Sur. 57 págs.
- PARSONS, T.R., Maita, Y. y Lalli C.M. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press. 173 pp.
- WEBB, K.L. y Chu F.L.. (1982). Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. En: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. Pruder, G.D., Langdon, C. y Conklin D. (eds.). World Mariculture Society Special Publication 2, Baton Rouge, Louisiana. 272-291 pp.
- WHYTE, J. N. C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture* 60: 231-241.
- YEMM, E. W. y Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry* 57: 508-514.

CAPÍTULO 6

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

JORGE DEL ANGEL RODRÍGUEZ, LAURA CARREÓN PALAU Y
MARÍA OLIVIA ARJONA LÓPEZ

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur, 23000, México.
delangelj@gmail.com, lcarreon@cibnor.mx, oarjona04@cibnor.mx

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES
 - 2.1 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE ACUERDO A LOS OBJETIVOS DE ESTUDIO
 - 2.2 MÉTODO DE BLIGH Y DYER ADAPTADO PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS DE MICROALGAS
 - 2.3 FRACCIONAMIENTO DE LÍPIDOS
 - 2.4 PROCEDIMIENTO PARA OBTENER LÍPIDOS POLARES Y NO POLARES
3. CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES
 - 3.1 MÉTODO GRAVIMÉTRICO
 - 3.2 MÉTODOS DESTRUCTIVOS
 - 3.2.1 MICRODETERMINACIÓN DE LÍPIDOS
 - 3.2.2 MÉTODO DE CALCINACIÓN
4. ANEXOS
 1. TIPOS DE LÍPIDOS
 2. PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN MICROALGAS MODIFICADO DEL MÉTODO DE BLIGH Y DYER
 3. PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POR EL MÉTODO DE MARSH Y WEINSTEIN
5. REFERENCIAS

Palabras clave: lípidos, extracción, separación, cuantificación

1. INTRODUCCIÓN

Una de las mayores fuentes de energía en las cadenas tróficas acuáticas se encuentra

almacenada en forma de lípidos dentro de las microalgas. De acuerdo con Christie (2003), los lípidos incluyen principalmente a los ácidos grasos, que normalmente se encuentran unidos por un enlace éster a la glicerina, o a otros alcoholes como el colesterol, o por enlaces amida a bases de cadena larga (o bases esfingoides) y ocasionalmente a otras aminas.

De acuerdo con este autor, los derivados de los ácidos grasos y las sustancias relacionadas biosintética o funcionalmente con ellos también deben ser considerados dentro de los lípidos. Los derivados naturales incluyen a los ésteres y las amidas; mientras que los compuestos relacionados con estos a través de vías biosintéticas incluyen a los prostanoïdes y a los éteres alifáticos o alcoholes. Finalmente, las sustancias relacionadas funcionalmente incluyen al colesterol y a los ácidos biliares.

De este modo, quedan excluidos de la definición aquellos compuestos con poca relación funcional o estructural con los anteriores como los esteroides, las vitaminas liposolubles, los pigmentos, carotenoides y los terpenos, pero que al ser solubles en disolventes orgánicos como cloroformo, benceno, éteres y alcoholes, solemos incluirlos en la cuantificación de los lípidos totales. Mientras más fina sea la separación de los diferentes compuestos, los datos obtenidos son más realistas.

Los lípidos se dividen en simples y complejos, los simples son aquellos que producen no más de dos productos primarios por mol durante la hidrólisis, mientras que los lípidos complejos producen tres o más productos primarios por mol durante la hidrólisis. Los lípidos simples o neutros

presentes en microalgas y dinoflagelados son fundamentalmente lípidos de reserva energética, e incluyen a las ceras, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, triacilglicéridos o triglicéridos y esteroides. Mientras que los lípidos complejos o polares son lípidos que forman la estructura de las membranas celulares, e incluyen a los glicerofosfolípidos o fosfolípidos, gliceroglicolípidos y esfingolípidos (Ver anexo 1).

2. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES

2.1 Extracción de lípidos totales de acuerdo a los objetivos de estudio

Dependiendo de la finalidad del estudio y del tipo de lípido que se pretende estudiar, es necesario seleccionar el sistema de solventes más adecuado, que permita obtenerlos de una matriz biológica (células, tejidos, fluidos corporales), separándolos de los demás componentes contenidos en esa misma matriz, principalmente de proteínas y de carbohidratos.

Según Kates y Work (1986) los lípidos se encuentran inmersos en los tejidos formando tres tipos de uniones:

- 1) Uniones no polares tipo Van der Waals o hidrofóbicas resultado de la interacción lípido – lípido, por ejemplo: lípidos neutros como ésteres de esteroides, glicéridos, hidrocarburos y carotenoides.
- 2) Uniones electrostáticas y puente de hidrógeno resultado de la interacción lípido-proteína y lípido-carbohidrato, por ejemplo: glicerofosfolípidos, glicolípidos y colesterol unidos a proteínas en las membranas de células, mitocondrias y retículo endoplásmico.
- 3) Asociaciones covalentes resultado de la unión de ácidos grasos y oxiácidos con polisacáridos formando ésteres y amidas. Por ejemplo: lipopolisacáridos de paredes bacterianas.

Dada la naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de los lípidos se utilizan mezclas de disolventes orgánicos de naturaleza polar (metanol, etanol, isopropanol, acetona) y de naturaleza no polar (éter de petróleo, cloroformo, tolueno, xileno, hexano).

El uso de un sistema de disolventes polar / no polar asegura la extracción de la mayoría de los lípidos. En muchos casos se necesita fraccionar los lípidos en polares y no polares pero aunque se pretendiera obtener solamente lípidos neutros el disolvente no polar no puede extraer los lípidos neutros que se encuentran incluidos en moléculas polares como las proteínas y los carbohidratos. Existe una gran diversidad de métodos de extracción, debido a que los tejidos vivos difieren en cuanto a su estructura, textura y contenido de lípidos (Kates y Work, 1986).

En la literatura podemos encontrar una gran cantidad de procedimientos de extracción que aumentan la eficiencia en la recuperación de lípidos de cualquier tipo de organismo, tejidos o células. Sin embargo los más utilizados se basan en el sistema cloroformo/ metanol / agua $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ propuesto por Folch *et al.* (1956) y mejorado por Bligh y Dyer (1959).

Ambas técnicas se basan en la formación de una mezcla monofásica de cloroformo, metanol y agua ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) con la que se asegura la extracción de la mayoría de los lípidos incluyendo aquellos que se encuentran ligados a otras moléculas. Se le agrega agua y cloroformo al extracto resultante de tal manera que se forma una solución bifásica formada por metanol y agua en la parte superior y cloroformo en la parte inferior.

En la técnica de Folch *et al.* (1956) se agregan sales de CaCl_2 y/o MgCl_2 0.003N; NaCl y/o KCl 0.05N al agua, para hacer la fase superior más polar. La fase inferior contiene aproximadamente el 96% de los lípidos, mientras que la fase superior contiene el resto de los lípidos y todas las moléculas no lipídicas. Al remover la fase superior, se elimina la mayor parte de las impurezas, los lípidos que quedaron se recuperan con disolvente puro (CHCl_3). Para mejorar la extracción se realizan lavados con el disolvente puro, el número de lavados depende de la naturaleza del estudio y de las necesidades del investigador.

La extracción de lípidos totales es un paso muy importante ya sea para cuantificarlos directamente o para fraccionarlos en los diferentes tipos. La cromatografía es la herramienta más utilizada para separar y purificar los diversos tipos de lípidos ya sea por columna, o en capa fina (Tabla 1).

Tabla 1. Tipo de cromatografía para separar clases lipídicas en microalgas (Nygberg, 1986).

Tipo de Cromatografía	Sistema de disolventes	Tipo de lípidos
Columna	Cloroformo: metanol (98:2)	Hidrocarburos, pigmentos, esteroides, glicéridos, aldehídos, alcoholes grasos, ceras, ácidos grasos libres.
	Cloroformo: metanol (9:1)	Cerebrósidos esterol-glicósidos, sulfolípidos, cardiolípidos
	Cloroformo: metanol (1:1)	Fosfolípidos
Capa fina (TLC) – FID	Acetona: piridina: cloroformo: agua (40:60:5:4)	Fraccionamiento de lípidos simples o neutros.
	Dietileter: piridina: etanol: amonio (65:30:8:2)	Glicolípidos
	Cloroformo: metanol: amonio: agua (60:35:5:2.5)	Monoglucosildiglicéridos diglucocildiglicéridos

2.2 Método de Bligh y Dyer (1959) adaptado para la extracción de lípidos de microalgas (ver anexo 2)

- Pesar entre 5 y 50 mg de microalgas liofilizada en un tubo de vidrio de 15 mL (tubo 1). Si es muestra fresca debe determinarse la proporción de humedad para referir los resultados a peso seco.
- Adicionar 3 mL de una mezcla de solventes cloroformo: metanol (1:2) sin agua, método de Bligh y Dyer, (1959) modificado para microalgas.
- Agregar una cantidad de antioxidante BHT menor al 1% de los lípidos totales, calcular a partir de una solución de 1 mg/mL de BHT disuelto en CHCl_3 y 10 μL de solución del estándar interno $\text{C}_{17:0}$ (1 mg/mL en CHCl_3).
- Sonicar por 15 min (3 ciclos) en un baño de agua con hielo.
- Incubar los tubos al menos 24 h a 4°C y protegidos de la luz, de esa manera se favorece la extracción completa de los lípidos.
- Sonicar otros 15 min (3 ciclos) en frío antes de centrifugar.
- Centrifugar a 5000 rpm por 20 min. a 5 °C. Recuperar el extracto con una pipeta Pasteur y pasarlo a un tubo de vidrio de 15 mL (tubo 2).
- Agregar 1.5 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2) a la biomasa residual y centrifugar nuevamente a 5000 rpm por 20 min a 5 °C, recuperando el extracto (tubo 2).
- Agregar 2 mL de agua destilada al tubo 2, que contiene el extracto y agitar con vortex. Eliminar el exceso de agua de la capa superior y centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 5°C y separar la fase inferior formada de cloroformo y lípidos.
- Agregar 1 mL de cloroformo y separar la fase inferior (CHCl_3 :lípidos), introduciendo con cuidado una pipeta Pasteur y burbujeando aire hasta el fondo del tubo. Colocar la fase CHCl_3 :lípidos en un tubo de 10 mL (tubo3).
- Lavar la fase acuosa con 1 mL de CHCl_3 , mezclar con el vortex y centrifugar nuevamente a 5000 rpm durante 10 min, recuperar la fase inferior (CHCl_3 :lípidos) y colocarlo en el tubo 3.
- En la campana de extracción, secar la fase CHCl_3 :lípidos (tubo 3) con nitrógeno gaseoso.
- Proceder a la cuantificación de lípidos totales.

2.3 Fraccionamiento de lípidos

Los lípidos simples o neutros se extraen con disolventes relativamente no polares, etil éter,

cloroformo o benceno. Los lípidos complejos o polares asociados a las membranas requieren solventes polares como etanol o metanol a fin de romper los puentes de hidrógeno y las fuerzas electrostáticas que los unen a las proteínas. El alcohol permite romper los puentes de hidrógeno pero también extrae contaminantes como azúcares, aminoácidos y sales, por lo que es necesario lavar el extracto crudo con agua o filtrar con celulosa. Los lípidos altamente polares como los poliglicolípidos sulfatados, gangliósidos y alquilclorosulfatos se quedan en la fase metanol agua.

2.4 Procedimiento para obtener lípidos polares y no polares (Casey, 1969; Niberg, 1985; Palacios, *et al.* 2001; Christie, 2003)

- Quemar sílica gel a 480°C por 4 h, pesarla y agregar 6% de agua.
- Preparar microcolumnas con pipetas Pasteur nuevas con tapón de fibra de vidrio y rellenas con 3.5 cm de la sílica gel previamente preparada.
- Acomodar con vórex hasta que se asiente bien.
- Agregar 0.5 mL del extracto lipídico obtenido por extracción de lípidos totales y agregar 10 mL de la mezcla $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (98:2) con goteo constante utilizando una bureta.
- Recuperar los lípidos neutros en un tubo limpio.
- Agregar a la misma columna 15 mL de metanol para recuperar lípidos polares.

3. CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

La relación muestra: disolvente tiene una gran influencia en los aspectos cuantitativos de la extracción. Una baja proporción del disolvente con respecto a la muestra reduce significativamente la cantidad de lípidos que se extraen, sin embargo, una gran cantidad de disolvente aumenta la cantidad de lípidos, pero también de impurezas. Esta situación se debe al agua del sistema original de disolventes ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$). Eliminando el agua del sistema de disolventes y procurando una relación muestra: disolvente mayor que 1:20, se asegura la extracción

completa de los lípidos y se evita la incorporación de impurezas que trae consigo el agua en las técnicas de Folch así como la de Bligh y Dyer. Para lograr esta relación entre la muestra y el disolvente, sin desperdiciar demasiado disolvente se requiere utilizar cantidades del orden de los miligramos (Nelson, 1991; Nyberg, 1986). La cuantificación de los lípidos se puede realizar como lípidos totales o como las fracciones de neutros y polares dependiendo de los objetivos del estudio.

3.1 Método gravimétrico

En el método gravimétrico el extracto lipídico en CHCl_3 se recupera en tubos previamente pesados y a peso constante; posteriormente se seca con N_2 gaseoso, se colocan en un desecador a peso constante y por diferencia de pesos (tubo con muestra – tubo vacío) se cuantifica el porcentaje de lípidos:

$$\% \text{ Lípidos} = 100 \times [(\text{PTL} - \text{PTV}) / (\text{P})]$$

PTL = Peso del tubo con lípidos (en mg)

PTV = Peso del tubo vacío (en mg)

P = Peso de la muestra (en mg)

La validez de las medidas de porcentaje depende del grado de precisión de la balanza. Es fundamental que esté calibrada y de preferencia conocer el intervalo de incertidumbre del peso. En general se acepta que sea 50 veces el último dígito, por ejemplo para una balanza de 4 dígitos el peso mínimo de lípidos debe ser 5 mg.

3.2 Métodos destructivos

Es importante mencionar que dependiendo del tipo de muestra biológica será el método que se seleccione, que se deberá estandarizar y adecuar. La ventaja de los métodos destructivos es que son generales e inespecíficos, de alta sensibilidad y rápidos. Se basan en la relación directamente proporcional que hay entre la densidad óptica de los lípidos calcinados y su concentración inicial.

Los métodos destructivos consisten en quemar y/o calcinar la materia orgánica (lípidos

totales) con algún agente muy reactivo como el H_2SO_4 concentrado (Marsh y Weinstein, 1966). Otros métodos también utilizados son los que combinan el ácido sulfúrico (H_2SO_4) con K_2CrO_7 - dicromato de potasio- (Pande *et al.*, 1963), o el método de sulfofosfovainillina (Barnes y Blackstock, 1973).

3.2.1 Método de microdeterminación de lípidos (Pande *et al.*, 1963)

El método de Pande *et al.*, (1963) consiste en la oxidación de los lípidos utilizando dicromato de potasio en ácido sulfúrico. El método sirve para analizar diferentes cantidades de muestra:

- 1) Método ultramicro de 2 a 12 μg de lípidos,
- 2) Método micro de 20 a 140 μg de lípidos y
- 3) Método semimicro de 170 μg a 1.33 mg de lípidos. Las cantidades y reactivos de los métodos se describen en la Tabla 2.

Una alícuota de los lípidos extraídos es colocada en un tubo, evaporada con nitrógeno donde los lípidos son oxidados con dicromato de potasio. En los métodos ultramicro y micro la reacción genera un color que es inversamente proporcional a la concentración de lípidos debido a la reducción del dicromato de potasio provocada por los lípidos a bajas concentraciones de dicromato de potasio. En el método semimicro el color generado por la oxidación de los lípidos en altas concentraciones de dicromato de potasio es directamente proporcional a la cantidad de lípidos. Dependiendo de la cantidad de lípidos presente en la muestra se siguen distintos procedimientos.

Método ultra-micro

A la muestra (2 - 12 μg de lípidos) se le agrega 1 mL de dicromato de potasio al 0.034%, en ácido sulfúrico al 97% utilizando un blanco. Calentar a 100°C en un termo-baño por 15 min y enfriar con agua corriente. Agregar 9 mL de agua destilada a los tubos y mezclar. De esta solución tomar 0.5 mL en un tubo y adicionar 4.5 mL de la solución de CdI_2 - almidón, agitando hasta que se desarrolle color por 20 min a temperatura ambiente. Hacer una dilución 1:1 con agua destilada. El blanco se prepara tomando 0.5 mL de ácido sulfúrico 3.6 N más 4.5 mL de la solución de CdI_2 - almidón. Leer inmediatamente a 575 nm.

Método micro

A la muestra (20 - 140 μg) se le agrega 2 mL de dicromato de potasio al 0.15% en ácido sulfúrico al 96%. Calentar a 100°C en un termo-baño por 15 min y enfriar con agua corriente. Agregar 4.5 mL de agua destilada, enfriar y mezclar. En este método se preparan 2 blancos, uno se prepara con los reactivos que se utilizaron en las muestras y otro además se le adiciona 0.1 mL de $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$ al 20% para reducir el dicromato. Leer a 440 nm.

Método semimicro

A la muestra (70 μg - 1.33 mg) se le agrega 3 mL de dicromato de potasio al 2% en ácido

Tabla 2. Reactivos utilizados en los métodos propuestos por Pande *et al.* (1963).

Reactivo	Método ultramicro	Método micro	Método semimicro
Dicromato de potasio	0.034 %	0.15 %	2 %
Ácido sulfúrico	97 %	96 %	98 %
Solución de yoduro de cadmio y almidón	Hervir 1.4 g de $CdCl_2$ en 60-70 mL de agua por 15 a 20 min, por otro lado hervir 0.33 g de almidón en 75 mL agua durante 5 min, mezclar ambas soluciones y aforar a 500 mL de agua destilada	No se usa	No se usa
Sulfito de sodio		20 %	

sulfúrico al 98%. Calentar a 100°C en un termobañero por 15 min y enfriar con agua corriente. Agregar 4.5 mL de agua, enfriar y mezclar. El blanco se prepara con 3 mL de dicromato de potasio al 2% en ácido sulfúrico al 98%. Leer a 590 nm.

3.2.2 Método de calcinación de Marsh y Weinstein (1966) (ver anexo 3)

El método más sencillo es el propuesto por Marsh y Weinstein (1966), dicha técnica tiene la ventaja de tener una alta reproducibilidad y la utilización de un reactivo simple y estable como H_2SO_4 concentrado.

- Resuspender los lípidos totales en 1 mL de cloroformo y pasar una alícuota de 100 μ L a otro tubo.
- Evaporar hasta sequedad con nitrógeno gaseoso.
- Agregar 2 mL de H_2SO_4 concentrado, sellar el tubo con papel aluminio con el fin de evitar contaminación y cerrar con la tapa.
- Calentar a $200 \pm 2^\circ C$ en estufa por 15 min.
- Dejar reposar 5 min a temperatura ambiente.
- Colocar los tubos en un baño de agua con hielo durante 5 min
- Agregar 3 mL de agua destilada
- Mezclar en el vortex y verificar que la mezcla quede homogénea y sin residuos de materia orgánica.
- Leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 375 nm calibrando el equipo con un blanco de ácido sulfúrico que se trata de igual manera que las muestras.

Para calcular el porcentaje de lípidos se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lípidos} = 100 \times [(A/FC) V_e / (P)]$$

A = Absorbancia

FC = Factor de corrección o pendiente de la curva de calibración.

Ve = Volumen del extracto (en mL)

P = Peso de la muestra (en mg)

Curva de calibración

Para calcular la curva de calibración de lípidos utilizando la técnica de Marsh y Weinstein (1966) (Fig. 1), se preparan soluciones de una mezcla de lípidos de concentración conocida de 30, 60, 90, 120, 150 y 180 μ g/mL. Debido a que la pendiente depende del peso molecular de los lípidos se recomienda que queden representados los triglicéridos (triestearina, tripalmitina o triheptadecaína), los esteroides (colesterol) y los fosfolípidos (fosfatidilserina).

En caso de no tener la mezcla de lípidos se recomienda realizar las tres curvas de calibración y obtener el promedio de su pendiente o bien realizar una extracción de los lípidos de la muestra en suficiente cantidad para hacer la curva de calibración particular. La absorbancia se lee a 375 nm con celdas de cuarzo completamente limpias y secas.

Si la intención del estudio es determinar ácidos grasos además de lípidos totales o conocer los ácidos grasos de las fracciones neutra y polar, se recomienda utilizar el mismo extracto. Una vez que se secan los lípidos, se resuspenden en 1 mL y se toma una alícuota de 100 μ L para cuantificar el resto se utiliza para derivatizar y determinar ácidos grasos como se describe en el Capítulo 9.

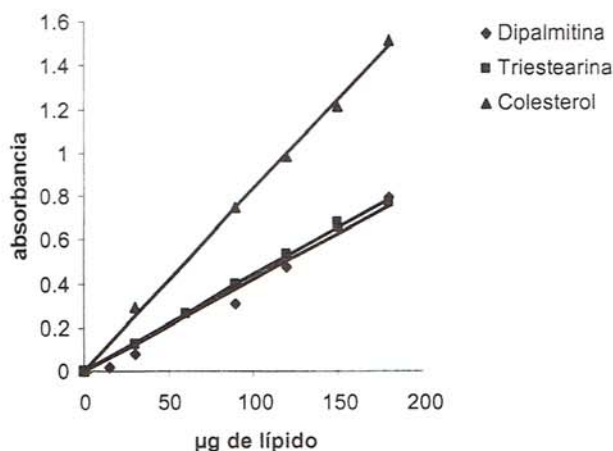


Figura 1. Curva de calibración (Marsh y Weinstein, 1966).

4. ANEXOS

ANEXO 1

Tipos de Lípidos

Lípidos simples

Ceras

Constituidas por un alcohol de cadena larga (de 16 a 22 átomos) que solo tiene un grupo OH con el que se une, mediante un enlace éster, un ácido graso saturado o insaturado (normalmente desde 14 hasta 36 átomos de carbono) (Fig. 1). Usualmente los alcoholes son solo saturados o monoenoicos (un doble enlace), aunque en las ceras marinas se han observado alcoholes altamente insaturados. Las ceras se encuentran en tejidos vegetales y animales así como en microorganismos. En *Euglena* se ha observado la presencia de ceras como forma de almacenamiento de energía.

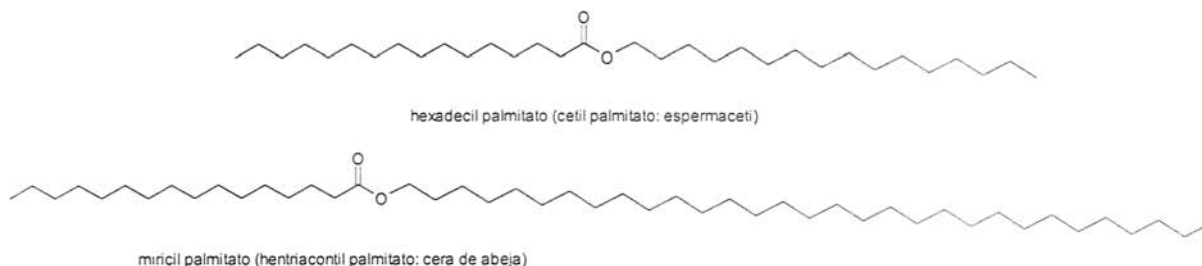


Figura 1. Ceras.

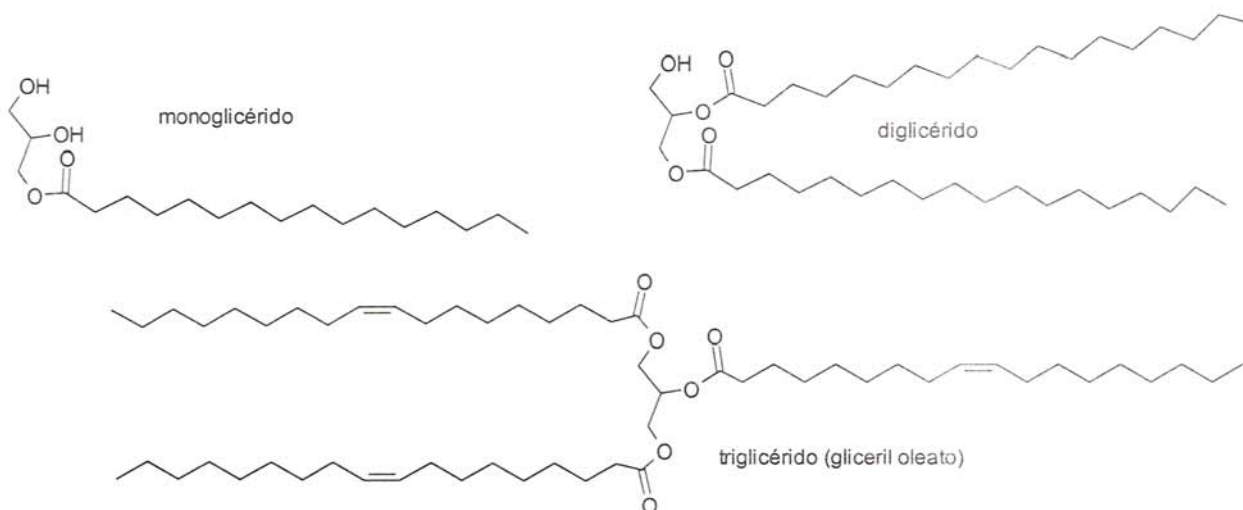


Figura 2. Mono, di y triglicéridos.

Mono-, Di- y Triacilglicéridos

También llamados monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos contienen respectivamente uno, dos y tres moles de ácido graso unidas por un enlace éster a un mol de glicerol. Los mono y diacilglicéridos rara vez están presentes en cantidades mayores a las trazas en tejidos frescos de plantas y animales. Algunos diacilglicéridos son importantes como intermediarios en la biosíntesis de triacilglicéridos y otros lípidos. Los triacilglicéridos también llamados grasas o grasas neutras, son moléculas hidrofóbicas no polares debido a que no contienen grupos funcionales altamente polares o eléctricamente cargados y representan la mayor parte de los lípidos de reserva en casi todos los organismos (Fig. 2).

Esteroles

Los organismos fotosintéticos suelen tener diferentes esteroides como el estigmasterol, sitosterol, ergosterol, brasicasterol, etc. (Fig. 3). Dependiendo de la especie, las cantidades y proporciones relativas de diferentes esteroides pueden variar, aspecto que permite emplearlos como biomarcadores. Por ejemplo, el **dinosterol** y el **dehidrodinosterol** se han reportado en **dinoflagelados**, mientras que el fucosterol y el fucoestanol se han observado en macroalgas, el **brassicasterol** y el **desmosterol** en **diatomeas**. El colesterol es usualmente un componente menor en células vegetales, sin embargo, se sabe que en las **algas rojas** es el principal esteroide. Los ésteres de esteroides (esteroides unidos a un ácido graso) también están presentes en células vegetales, pero en general son componentes relativamente menores.

Lípidos complejos

Glicerofosfolípidos

También llamados fosfolípidos, contienen un grupo fosfato polar y un esqueleto de glicerina al cual se encuentran unidos los ácidos grasos. A esta estructura se le conoce como ácido fosfatídico y solo se encuentra en cantidades traza en los tejidos. Sin embargo, es importante metabólicamente como precursor de la mayoría de los glicerofosfolípidos. Por ejemplo, la unión del glicerina con el ácido fosfatídico da como resultado el fosfatidilglicerol (Fig. 4), que se encuentra en los cloroplastos.

Los principales fosfolípidos eluidos en la fracción polar son la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, cardiolipinas y lisofosfolípidos. Mientras que las moléculas del difosfatidilglicerol

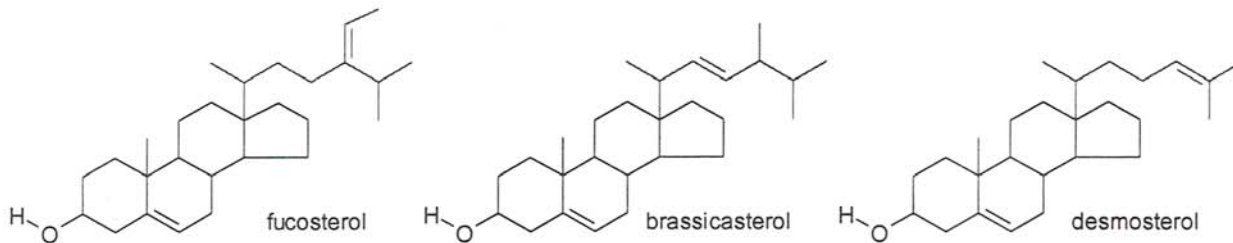


Figura 3. Esteroides

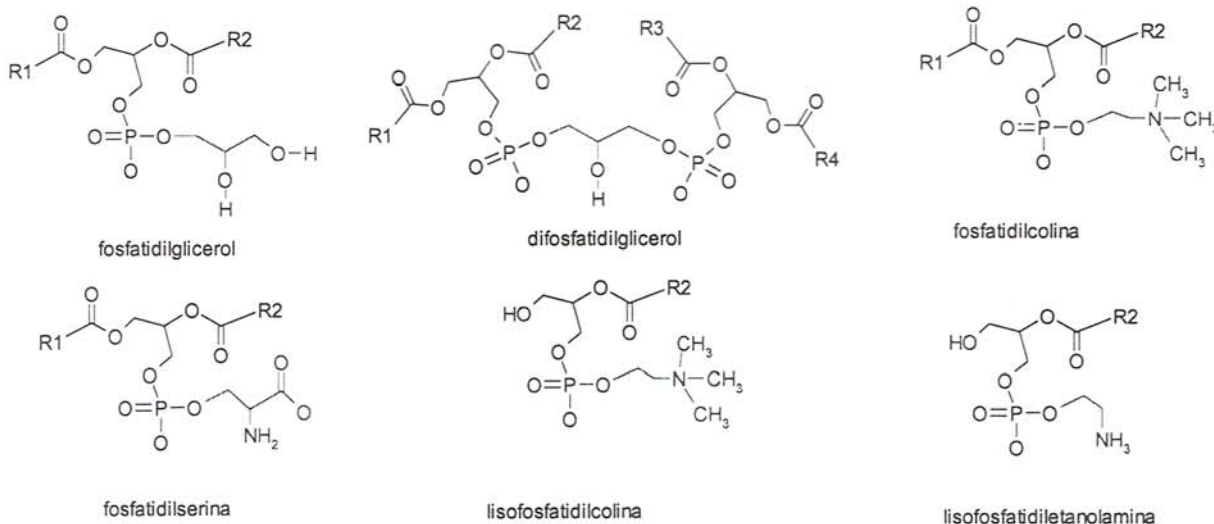


Figura 4. Glicerofosfolípidos.

están compuestas de cuatro ácidos grasos. Las moléculas de fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina están compuestas de dos ácidos grasos, y las moléculas de lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina liberan un solo ácido graso durante la derivatización (Fig. 4). En todos estos compuestos, los ácidos grasos forman la porción no polar y el resto de la estructura la porción polar.

Las microalgas suelen contener grandes cantidades de gliceroglicolípidos, en los cuales los 1,2-diacil-*sn*-gliceroles (glicerina unido a dos ácidos grasos en las posiciones 1 y 2), están unidos por enlace glicosídico en la posición *sn*-3 a un carbohidrato (Fig. 5). Aunque los principales componentes de este tipo de lípidos son los mono- y digalactosildiácilgliceroles, también se han encontrado lípidos conteniendo hasta cuatro unidades de galactosa, o en los cuales una o más de éstas es reemplazada por glucosa.

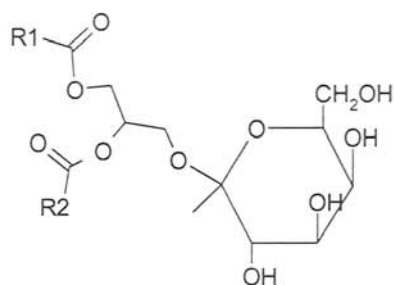
Los monogalactosildiácilgliceroles y los digalactosildiácilgliceroles son los principales gliceroglicolípidos de las membranas tilacoidales y de organelos relacionados, y de hecho son los lípidos

más abundantes en todas las estructuras fotosintéticas, incluyendo tejidos de plantas superiores, microalgas y cianobacterias.

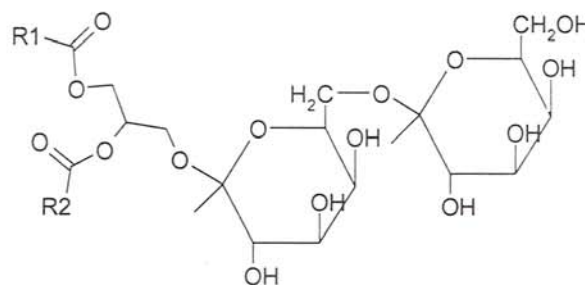
En los cloroplastos se encuentra un glicerolípido único llamado sulfoquinovosildiácilglicerol, que contiene un residuo de ácido sulfónico unido al carbohidrato mediante un enlace carbono-sulfuro.

Esfingolípidos

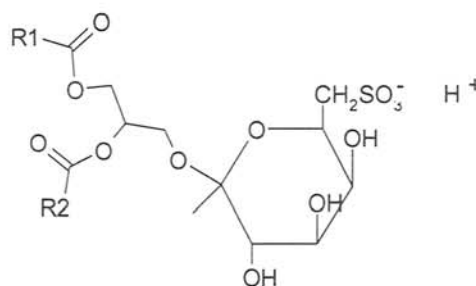
Se encuentran constituidos por bases de cadena larga entre las que destacan la esfingosina y la fitoesfingosina, que es la base de cadena larga más común en organismos fotosintéticos. Cuando el grupo amino de una de estas bases se une a un ácido graso mediante un enlace amida, se forman las ceramidas. La esfingomielina se forma cuando una ceramida compuesta por un ácido graso unido al grupo amino de la esfingosina se une a la fosforilcolina. La esfingomielina no está presente en plantas o en microorganismos. Los esfingolípidos también incluyen a las glicosilceramidas neutras y a los gangliosidos.



monogalactosildiácilglicerol



digalactosildiácilglicerol

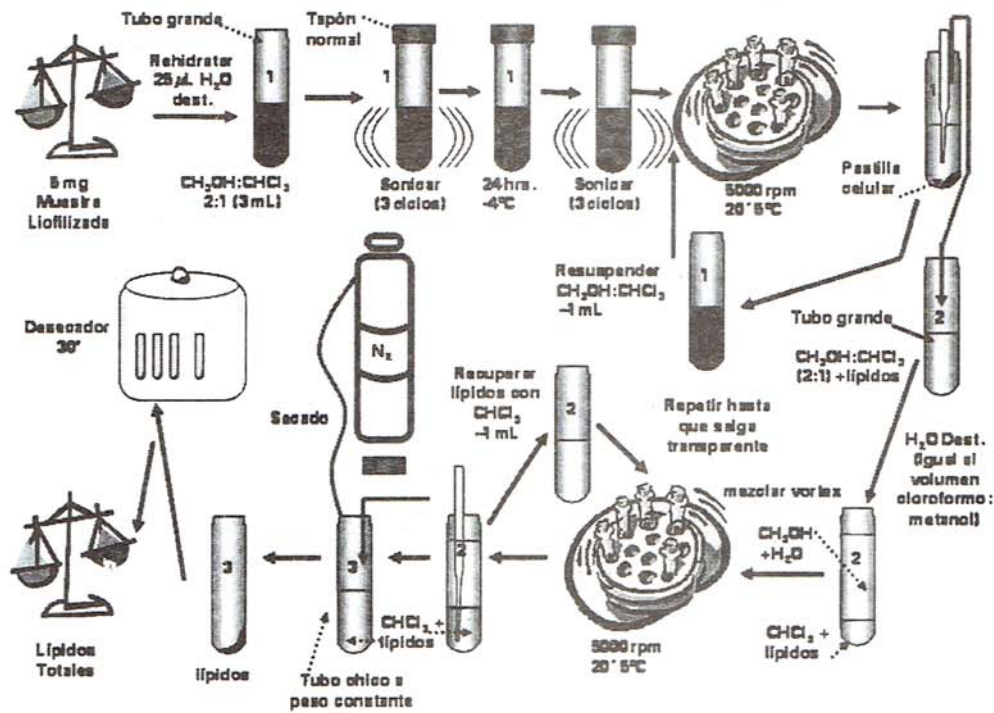


sulfoquinovosildiácilglicerol

Figura 5. Gliceroglicolípidos.

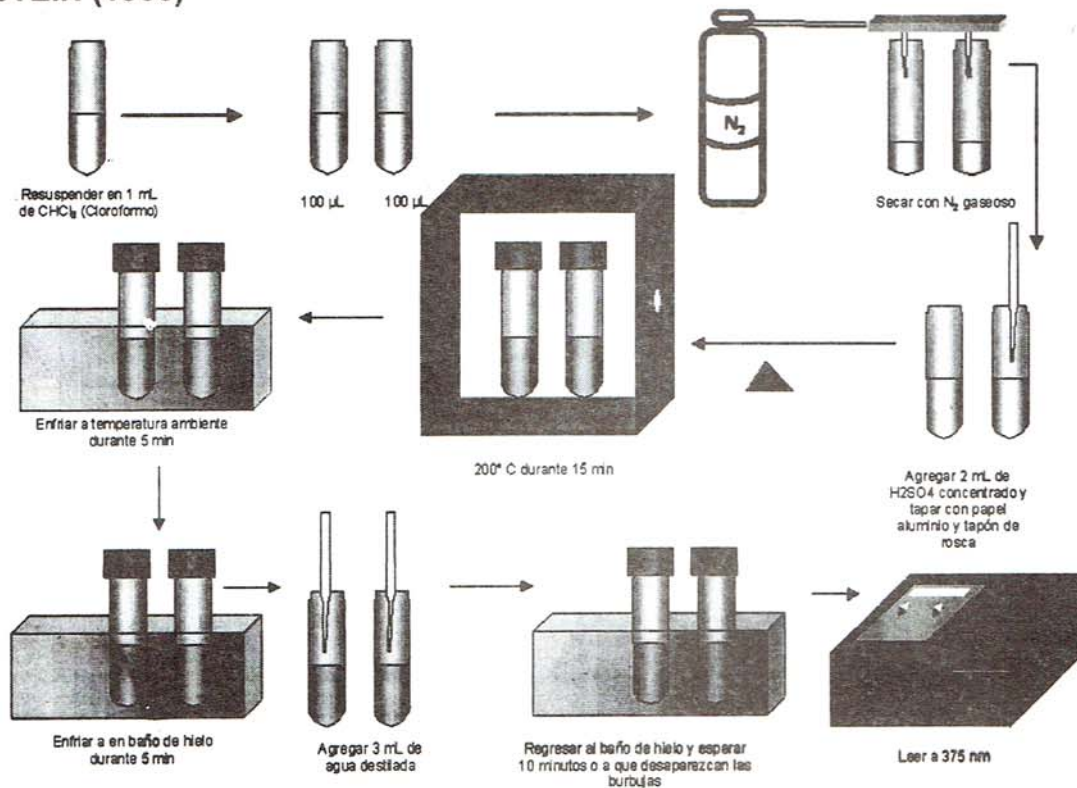
ANEXO 2

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN MICROALGAS MODIFICADO DEL MÉTODO DE Blich y DYER (1959)



ANEXO 3

PROCEDIMIENTO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POR EL MÉTODO DE MARSH Y WEINSTEIN (1966)



5. REFERENCIAS

- BARNES, H. y Blackstock, J. (1973). Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 12:103-118.
- BLIGH, G.E., y Dyer, J.W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(3): 911-917.
- CASEY, A C., (1969). Separation of neutral lipids of shark liver by "dry-column" chromatography. *Journal of Lipid Research* 10: 456 - 459.
- CHRISTIE, W. W., (2003). Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. Bridgater, England. 416 pp.
- FOLCH, J., Less, M. y Stanley, G. H. (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry*. 226: 497 - 509.
- GRAHL-NIELSEN, O. Hammill, M. O., Lydersen, C. y Wahlstrom, S., (2000). Transfer of fatty acids from female seal blubber via milk to pup blubber. *Journal of Comparative Physiology and Biology* 170: 277-283.
- KATES, M. y Work, E. (1986). Lipids Extraction Procedures. *En: Technics of Lipidology, Isolation, Analysis and Identification of Lipids*. North Holland Publishing Company. 607 pp.
- MARSH, B. J. y Weinstein, B. D. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*. 7: 574-576.
- NELSON, G. J., (1991). Isolation and purification of lipids from biological matrices. *En: Analysis of Fats Oil and Derivates*. Champaign, E.G. (ed.). Illinois AOCS Press. 20-59 pp.
- NYBERG, H., 1986. GC-MS methods of lower plant glycolipids fatty acids. *In: Modern methods of plant analysis*. New Series Vol. 3. Gas Chromatography/Mass Spectrometry. H. F. Linskens H.F. and Jackson, J.F. (eds.) vol. 3, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 67-99 pp.
- PALACIOS E., Racotta, I.D., Heras, H., Marty, Y., Moal, J. y Samain, J. F. , (2001). The relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture International* 9: 531-543
- PANDE, S. V., Parvin, R.K. y Venkatasubramanian, T.A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry* 6: 415 - 423.
- SOUDANT, P., Marty, Y., Moal, J. y Samain, J.F., (1995). Separation of major polar lipids in *Pecten maximus* by high-performance liquid chromatography and subsequent determination of their fatty acids using gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 673: 15-26.
- VANDER VEEN, J., Medwadowski, B. y Olcott, H. S., (1971). The lipids of krill (*Euphausia species*) and red crab (*Pleuroncodes planipes*). *Lipids* 6(7): 481-485.

CAPÍTULO 7

DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. La Paz, Baja California Sur. México. kitty04@cibnor.mx

DOMENICO VOLTOLINA

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Laboratorio de Estudios Ambientales UAS-CIBNOR. Mazatlán, Sinaloa, México. voltolina@mzt.megared.net.mx

CONTENIDO

1. INTRODUCCION
2. CLOROFILAS Y CAROTENOIDES
 - 2.1 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS LIPOSOLUBLES
 - 2.2 ECUACIONES PARA CUANTIFICAR CLOROFILAS EN DIFERENTES MICROALGAS
 - 2.3 ECUACIONES PARA CUANTIFICAR CAROTENOIDES TOTALES
 - 2.4 ECUACIONES PARA CUANTIFICAR CLOROFILAS ($\mu\text{g}/\text{cel}$ o $\mu\text{mol}/\text{cel}$)
3. FICOBILIPROTEINAS Y FICOBILISOMAS
 - 3.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA Y FICOERITRINA
 - 3.2 PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FICOCIANINA Y FICOERITRINA EN *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Porphyridium cruentum*
4. RESULTADOS
5. REFERENCIAS

Palabras clave: pigmentos fotosintéticos, clorofilas, carotenoides, ficobiliproteínas

1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas contienen tres grupos principales de pigmentos: clorofilas, carotenoides y ficobilinas. Estas últimas se encuentran solamente en las cianobacterias, en las rodófitas (algas rojas) y en las criptomonadinas, mientras

que las clorofilas y los carotenoides se encuentran en todos los vegetales y constituyen normalmente entre el 0.5 y el 5% del peso seco de la biomasa orgánica de las microalgas (Ben-Amotz *et al.*, 1985).

Todos estos pigmentos participan en la conversión de la energía luminosa en energía química, pero solamente la clorofila *a* se localiza en el centro de reacción del aparato fotosintético y es la responsable de la captación de los electrones derivados de la disociación de las moléculas de agua para iniciar la reacción luminosa de la fotosíntesis. Los demás pigmentos se denominan pigmentos antena o accesorios y tienen la función de captar y transferir al centro de reacción la energía luminosa de longitud de onda diferente de la que es captada por la clorofila *a*.

2. CLOROFILAS Y CAROTENOIDES

Las clorofilas se localizan en las membranas tilacoides del cloroplasto y son compuestos liposolubles, por lo cual es necesario usar disolventes orgánicos, como acetona, para lograr su extracción. Son porfirinas como los citocromos, pero a diferencia de éstos contienen un átomo de Mg^{++} en el centro del anillo porfirínico y se asocian con lípidos y proteínas hidrofóbicas de las membranas fotosintéticas mediante una cadena hidrofóbica de alcohol de cadena larga. Cada pigmento se caracteriza por su espectro de absorción, que indica la capacidad de ese

pigmento de absorber luz de diferentes longitudes de onda. Las células que contienen clorofila *a* se caracterizan por su color verde, porque su espectro de absorción tiene máximos en la luz roja (absorción máxima a una longitud de onda de 680 nm) y azul (máximo a 430 nm), mientras que el mínimo está en el verde que por lo tanto es reflejado por la superficie celular (Madigan, 2004).

El espectrofotómetro mide la cantidad de luz que los pigmentos absorben en las diferentes longitudes de onda de la luz visible. Cada pigmento tiene una longitud de onda a la cual tiene un pico de absorción, por lo tanto identificando este pico se puede identificar a cada pigmento. Del ancho del pico y de la absorbancia es posible calcular la (concentración) de cada tipo de pigmento extraído de las células. Este tipo de mediciones es importante para estimar la cantidad de biomasa y para determinar la condición fisiológica de las células y de la población, así como su adaptación a diferentes niveles de luz (Sterman, 1988).

Los carotenoides son moléculas poliisoprenoides que poseen dobles enlaces conjugados y un anillo de ciclohexano en cada extremo de la molécula y funcionan como fotoprotectores y como pigmentos captadores de luz (Cohen, 1986). El **licopeno** es el precursor de todos estos compuestos y si bien cada especie de alga puede contener entre 5 y 10 carotenoides distintos, el β -caroteno es el carotenoide típico que se encuentra en todas las algas y plantas superiores, aunque es más abundante en las algas verdes. Generalmente equivale a <1% del peso seco celular, aunque en condiciones de estrés salino y elevada luminosidad se puede acumular, como sucede en las microalgas halotolerantes como *Dunaliella salina* (Borowitzka, 1988) y *D. bardawil*, en las cuales llega a representar hasta el 10% del peso celular (Ben-Amotz y Avron, 1989).

La variedad de carotenoides es mayor en las algas que en las plantas superiores y en efecto el nombre común de algunos grupos de algas refleja su contenido en carotenoides. Aunque la mayoría de los carotenoides son amarillos o anaranjados, su color puede estar enmascarado por la clorofila (Abalde *et al.*, 1995). Existen muchos tipos de xantofilas en las microalgas; la similitud entre las

Chlorophyceae y las plantas superiores se debe al elevado contenido de **luteína**, que es abundante también en las Rhodophyceae y Cryptophyceae. Otras xantofilas importantes son la **peridina**, que es la xantofila primaria de los dinoflagelados, y la **fucoxantina** de las Phaeophyceae y Bacillariophyceae.

Con frecuencia es difícil determinar la banda de absorción de los carotenoides debido a que, además de que normalmente existe más de un carotenoide en las microalgas, sus bandas de absorción se superponen con las clorofilas. En general las bandas de los carotenoides *in vivo* están entre 400 y 540 nm (Abalde *et al.*, 1995).

2.1 Protocolo para la extracción de pigmentos liposolubles (Jeffrey y Humphrey, 1975; Humphrey, 1979; Strickland y Parsons, 1972)

- a) Para el caso de cultivos poco concentrados, se colocan 40 mL en tubos cónicos de plástico. Para cultivos concentrados son suficientes 15 mL.
- b) Se centrifugan a 3000 rpm por 2 a 10 min (dependiendo de la microalga, por ejemplo, si se trata de diatomeas y rodofíceas de 6 a 10 min; y si son dinoflagelados, 2 min) a 15 °C.
- c) Se desecha el sobrenadante con una pipeta Pasteur y/o en el caso de que la pastilla celular esté muy compacta, se decanta.
- d) La pastilla celular se coloca en un tubo de vidrio limpio con tapón de rosca, el cual se cubre con papel aluminio para evitar la fotooxidación.
- e) Se añaden 3 mL de acetona al 90 y/o 100% (según la microalga) y se agita en el vortex permitiendo así la resuspensión de la pastilla celular y la extracción de los pigmentos.
- f) Se sonica en baño de hielo por dos ciclos durante 5 min y las muestras se dejan reposar a 4°C durante la noche (16 h).
- g) Después de las 16 h se sonica nuevamente en las condiciones del apartado anterior.
- h) Se centrifuga a 3000 rpm por 10 min a 15 °C, se separa el extracto de pigmentos con una pipeta Pasteur limpia y se coloca en otro tubo también limpio y protegido de la luz.

i) Los pigmentos se colocan en una celda de cuarzo y se leen en un espectrofotómetro (previamente calibrado con acetona al 90 o 100%, según sea la microalga), a las longitudes de onda de 630, 647, 664 nm para las clorofilas, y a 480 nm para los carotenoides totales.

2.2 Ecuaciones para cuantificar clorofilas en diferentes microalgas

Para calcular la concentración de las clorofilas se utilizan las ecuaciones indicadas por Jeffrey y Humphrey (1975) y Humphrey (1979), y para los carotenos totales se usan las de Strickland y Parsons (1972).

NOTA: los resultados se expresan en µg/mL de extracto, que se multiplican por el volumen del extracto y se dividen por el número de mL de muestra para obtener la concentración de clorofilas en µg/mL de cultivo.

Algas verdes (*Tetraselmis suecica*, *Dunaliella salina*, otras) que contienen clorofila a y b (acetona al 90% como disolvente)

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= 11.93 A_{664} - 1.93 A_{647} \\ \text{Clorofila } b &= 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664} \end{aligned}$$

Diatomeas y algas pardas (*Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*) que contienen clorofilas a y c₁+c₂ (acetona al 90% como disolvente)

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= 11.47 A_{664} - 0.4 A_{630} \\ \text{Clorofilas } c_1+c_2 &= 24.36 A_{630} - 3.73 A_{664} \end{aligned}$$

Dinoflagelados y cryptomonadales que contienen clorofila a y c₂ (acetona al 100% como disolvente)

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= 11.43 A_{664} - 0.64 A_{630} \\ \text{Clorofila } c_2 &= 27.09 A_{630} - 3.63 A_{664} \end{aligned}$$

Dinoflagelados y cryptomonadales que contienen clorofila a y c₂ (acetona al 90% como disolvente)

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= 11.43 A_{664} - 0.40 A_{630} \\ \text{Clorofila } c_2 &= 24.88 A_{630} - 3.80 A_{664} \end{aligned}$$

Mezcla de microalgas que contienen todos los pigmentos (acetona al 90% como disolvente)

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= 11.85 A_{664} - 1.54 A_{647} - 0.08 A_{630} \\ \text{Clorofila } b &= -5.43 A_{664} + 21.03 A_{647} - 2.66 A_{630} \\ \text{Clorofilas } c(c_1+c_2) &= -1.67 A_{664} - 7.6 A_{647} + 24.52 A_{630} \end{aligned}$$

Mezcla de microalgas que contienen todos los pigmentos (acetona al 100% como disolvente) (Becker, 1994)

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= 12.7 A_{663} - 2.69 A_{645} \\ \text{Clorofila } b &= 22.9 A_{645} - 4.64 A_{663} \\ \text{Clorofilas } a + b &= 8.02 A_{663} + 20.2 A_{645} \end{aligned}$$

Mezcla de microalgas que contienen todos los pigmentos (metanol al 90% como disolvente) (Becker, 1994)

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= 16.5 A_{665} - 8.3 A_{650} \\ \text{Clorofila } a &= 16.5 A_{665} - 8.3 A_{650} \\ \text{Clorofila } b &= 33.8 A_{650} - 12.5 A_{665} \\ \text{Clorofilas } a + b &= 4.0 A_{665} + 25.5 A_{650} \end{aligned}$$

Mezcla de microalgas que contienen todos los pigmentos (dietil eter al 100% como disolvente) (Becker, 1994)

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a &= 9.92 A_{660} - 0.77 A_{642.5} \\ \text{Clorofila } b &= 17.6 A_{642.5} - 2.18 A_{660} \\ \text{Clorofilas } a + b &= 7.12 A_{660} + 16.8 A_{642.5} \end{aligned}$$

2.3 Ecuaciones para cuantificar carotenoides totales (µg/mL)

Para los carotenoides se utiliza acetona al 90% como disolvente y se calculan de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{Clorofíceas y cianobacterias: Carotenoides} &= 7.6(A_{480} - 1.49 A_{510}) \\ \text{Crisofíceas y Pirofíceas: Carotenoides} &= 10 A_{480} \end{aligned}$$

2.4 Ecuaciones para cuantificar clorofilas (µg/cel o µmol/cel)

Para obtener los valores en µg chl/cel o en µmol chl/cel se usan las siguientes ecuaciones (Sternman, 1988).

$$\begin{aligned} \mu\text{g chl / cel} &= \mu\text{g chl en 1 mL de cultivo} / N \\ \mu\text{mol chl / cel} &= [(\mu\text{g chl en el extracto} / \text{PM})] / N \end{aligned}$$

En donde:

N es la concentración celular del cultivo y

PM es el peso molecular de las clorofilas: **Chl a** = 894; **Chl b** = 908; **Chl c** = 610

La Figura 1 muestra el contenido de pigmentos del dinoflagelado *Prorocentrum lima* cultivado en los medios f/2 (Guillard y Ryther, 1962), K (Keller *et al.*, 1987) y ES (Harrison *et al.*, 1980).

3. FICOBILIPROTEINAS Y FICOBILISOMAS

Las clorofilas y los carotenoides están unidos a las proteínas que son parte integral del fotosistema I y el fotosistema II, mientras que en las cianobacterias y en las algas rojas existe un complejo macromolecular pigmento-proteína

especializado llamado ficobilisoma (Glazer, 1984), en el cual están localizadas las ficobiliproteínas. Estos pigmentos antena son solubles en agua y con base en sus características espectrales se dividen en tres clases principales: ficoeritrina (PE; roja), ficocianina (PC; azul) y aloficocianina (APC; verde-azulada).

Los ficobilisomas son capaces de absorber la energía luminosa desde los 550 nm a 650 nm y de transferir la energía absorbida al centro de reacción (RC por sus iniciales en inglés), que es la parte del complejo encargado de convertir la energía radiante en energía química. En las cianobacterias y algas rojas, el pigmento presente en el RC siempre es una molécula de clorofila a (chl a). Los ficobilisomas son muy eficientes debido a su estructura muy ordenada. Las biliproteínas que absorben la radiación con el

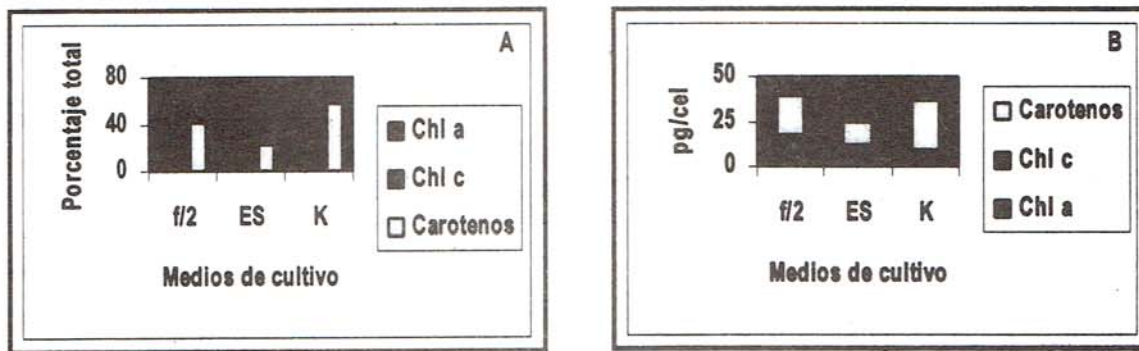


Figura 1. Contenido de pigmentos del dinoflagelado *Prorocentrum lima* (Fig. 2) cosechado después de 25 días de cultivo en los medios f/2, ES y K. **A)** datos expresados como porcentaje del total de pigmentos; **B)** datos expresados como pg/cel (Heredia-Tapia, 2005).

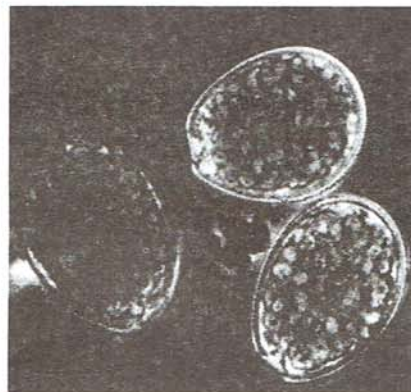


Figura 2. *Prorocentrum lima* cultivada en medio f/2 y cosechada a los 25 días. Foto tomada por Alejandra Heredia-Tapia y Erick Núñez (objetivo 40X) (Heredia-Tapia, 2005).

mayor contenido energético (menor longitud de onda) están espacialmente más alejadas del RC, mientras que las que absorben la de contenido energético menor, están más próximas.

Las biliproteínas están organizadas en arreglos tales que los espectros de emisión de un tipo se traslapa con los espectros de absorción de las otras biliproteínas, facilitando la transferencia de energía hacia el RC.

En las cianobacterias y algas rojas, las ficobiliproteínas se ensamblan en los ficobilisomas y en éstos la ruta de transferencia de energía es:



Las ficobiliproteínas son una familia de proteínas unidas lineal y covalentemente a un grupo prostético tetrapirrol. Estos grupos se conocen como "bilinas" debido a que su estructura es similar a los pigmentos biliares de los seres humanos, como la biliverdina y la bilirrubina (Lemberg y Legge, 1949). Los cromóforos o grupos prostéticos de las ficobiliproteínas se unen covalentemente por uno o dos enlaces tioéter a residuos de cisteína de las apoproteínas (Boussiba y Richmond, 1980).

Existen cuatro tipos de ficobilinas: ficocianobilina, ficoeritrobilina, ficourobilina y criptoviolina (Guerrero *et al.*, 1998). Debido a la presencia de estas bilinas como cromóforos, estos sistemas antena son capaces de captar la energía de la luz en regiones del espectro donde la chl a no absorbe o lo hace muy debilmente.

Las ficobilinas son pigmentos solubles en

agua que se encuentran en abundancia en las cianobacterias y en las algas rojas (Rhodophyceae), en donde desempeñan un papel importante en el proceso de captación de luz. Las cianobacterias contienen principalmente ficocianina y las algas rojas ficoeritrina. Ambos grupos contienen pequeñas cantidades de aloficocianina. Como ejemplo de especies de estos dos grupos de organismos, se incluirán los resultados de *Spirulina (Arthrospira) maxima* (Fig. 3) (Serrano-Véliz, 2004) y de *Porphyridium cruentum* (Fig. 4) (Arredondo-Vega, 1995).

Como se mencionó, las ficobilinas capturan mucha de la energía que no puede ser captada por las clorofilas y los carotenoides, por lo que se puede decir que las cianobacterias y algas rojas utilizan más eficientemente la radiación solar, ya que la **ficocianina** absorbe *in vitro* a la longitud de onda de **620 nm**, la **ficoeritrina** a **545 nm** y la **aloficocianina** a **650 nm**. La principal característica que identifica a una molécula de pigmento es su espectro de absorción; sin embargo, éstos pueden cambiar con la extracción y se obtienen diferentes espectros de la misma molécula en diferentes disolventes y a diferentes temperaturas, por lo que los espectros de absorción sólo pueden compararse cuando se obtienen en condiciones similares.

3.1 Métodos de extracción de ficocianina y ficoeritrina

Son varios los métodos que se han reportado para la extracción de ficocianina y ficoeritrina,

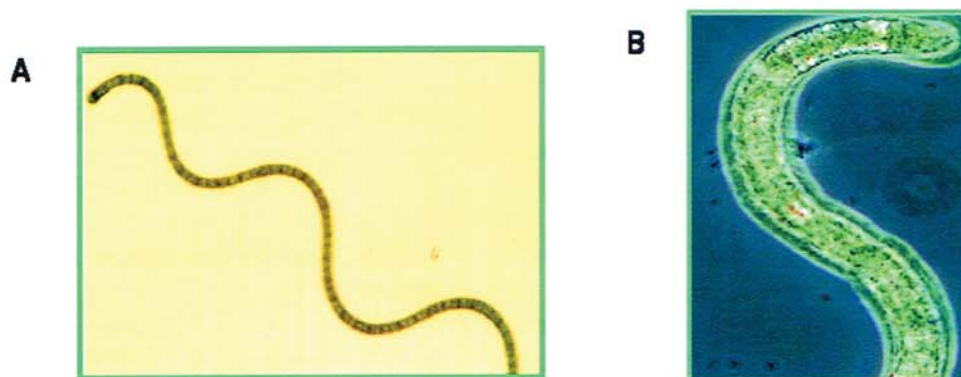


Figura 3. Espiral de una hebra de *Spirulina (Arthrospira) maxima*. **A)** objetivo 20X, **B)** objetivo 80X. (Serrano-Véliz, 2004).

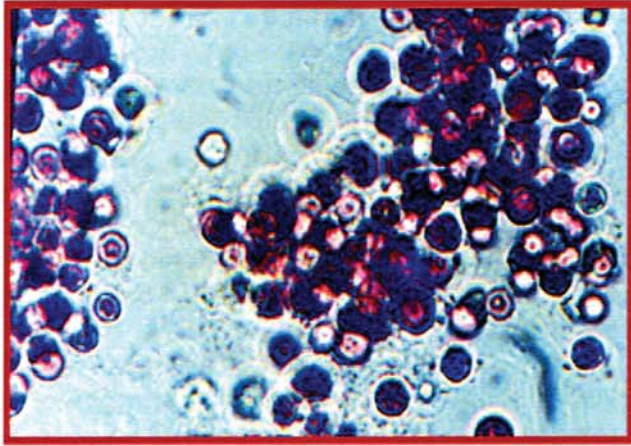


Figura 4. Células de *Porphyridium cruentum* cultivada en medio marino (objetivo 20X) (Arredondo-Vega, 1995).

siendo los más utilizados: el calentamiento a 40°C de la suspensión celular en solución amortiguadora de fosfatos (Mahadev, 2005); en solución amortiguadora de fosfatos en frío (Boussiba y Richmond, 1979); en solución amortiguadora de fosfatos adicionada de 0.15 M de NaCl (Bennett y Bogorad, 1973); en solución de acetatos en frío (Tetzuya, 1988); congelamiento y descongelamiento repetidos (Siegelman *et al.*, 1978), por sonicación (Jahn *et al.*, 1984; Roth *et al.*, 1989), con 0.15 M NaCl y sonicación (Becker, 1994), la combinación de alguno de ellos.

En todos los casos el extracto crudo contiene el **complejo de ficobiliproteínas** así como otros componentes solubles en agua como el polisacárido sulfatado. En los protocolos que a continuación se mencionan, la concentración de los pigmentos se da en **mg/mL** de extracto crudo.

3.2 Protocolos para la extracción y cuantificación de ficocianina y ficoeritrina en *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Porphyridium cruentum*

I: Bennett y Bogorad, (1973)

- a) En un tubo cónico de plástico, centrifugar 10 mL del cultivo de *Spirulina* y/o *Porphyridium* (en la fase de crecimiento seleccionada) a 3000 rpm/10°C/15 min. En el caso de *Spirulina*, ya que

no se forma totalmente la pastilla celular debido a la flotación de las células, se recomienda filtrar.

- b) Descartar el sobrenadante.
 c) Lavar las células con 10 mL de formato de amonio 3% (en el caso de las microalgas marinas), con agua destilada acidulada (pH 4) en el caso de las cianobacterias (Vonshak, 1997), o con agua destilada normal en el caso de las microalgas de agua dulce (Arredondo-Vega *et al.*, 1997).
 d) Resuspender la pastilla celular en 5 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio ($K_2HPO_4:KH_2PO_4$) 100 mM pH 7.0.
 e) Sonicar las células durante 45 - 60 seg en baño de hielo y congelar a -40°C durante 2 h.
 f) Descongelar a temperatura ambiente. El paso de congelar y descongelar, se realiza al menos en dos etapas para asegurar la total extracción de los pigmentos.
 g) Centrifugar a 3000 rpm/10 °C/ 15 min. Separar con una pipeta Pasteur limpia el extracto que contiene el complejo de las ficobiliproteínas, es decir, la ficocianina, la ficoeritrina y aloficocianina y colocarlo en tubos limpios.
 h) La cantidad de PE, PC y APC se cuantifica en el espectrofotómetro a 565, 620 y 650 nm, respectivamente.

Las ecuaciones para determinar el contenido de ficocianina y ficoeritrina son:

Ecuación para la ficocianina (PC):

$$PC = [(A_{620} - 0.72 \cdot A_{650}) / 7.38]$$

Ecuación para la aloficocianina (APC):

$$APC = [(A_{650} - (0.19 \cdot A_{620})) / 5.65]$$

Ecuación para la ficoeritrina (PE):

$$PE = [(A_{565} - 2.8 PC - 1.34 \cdot APC) / 12.70]$$

II. Bryant *et al.* (1979)

NOTA: Repetir los pasos a, b y c del método anterior.

- d) Resuspender la pastilla celular en 10 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio ($K_2HPO_4:KH_2PO_4$) 50 mM pH 6.8.

- e) Sonicar las células durante 45 - 60 seg en un baño de hielo y colocar en refrigeración toda la noche.
- f) Mezclar bien y centrifugar a 3500 rpm/10°C durante 10 min.
- g) Recuperar el extracto.
- h) La cantidad de PE, PC y APC se cuantifica en el espectrofotómetro en la región visible a 565, 620 y 650 nm, respectivamente.

Las ecuaciones para determinar el contenido de ficocianina y ficoeritrina son:

Ecuación para la ficocianina (PC):

$$PC = [(A_{620} - 0.72 \cdot A_{650}) / 6.29]$$

Ecuación para la aloficocianina (APC):

$$APC = [(A_{650} - 0.19 \cdot A_{620}) / 5.79]$$

Ecuación para la ficoeritrina (PE):

$$PE = [A_{565} - 2.41 PC - 1.4 \cdot APC] / 12.70]$$

III. Boussiba y Richmond (1979):

NOTA: Repetir los pasos a, b y c del método anterior.

- d) Resuspender la pastilla celular en 10 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio

(K_2HPO_4 ; KH_2PO_4) 100 mM pH 7 y agitar en el vortex.

- e) Colocar en refrigeración toda la noche.
- f) Mezclar bien y centrifugar a 3500 rpm/10°C durante 5 min.
- g) Recuperar el extracto.
- h) La cantidad de PC se cuantifica en el espectrofotómetro en la región visible a 620 nm.

La ecuación para determinar el contenido de ficocianina es:

Ecuación para la ficocianina (PC):

$$PC = A_{620} / 3.39$$

En la Figura 5 se muestra los extractos de ficocianina y ficoeritrina extraídos de *Spirulina (Arthrospira) maxima* (Serrano-Véliz, 2004) y *Porphyridium cruentum* (Arredondo-Vega, 1995).

4. RESULTADOS

En la Tabla 1 y en la Figura 6 se dan algunos de los resultados de trabajos realizados con *Porphyridium cruentum* (Arredondo-Vega, 1995) y con *Spirulina (Arthrospira) maxima* (Serrano-Véliz, 2004).

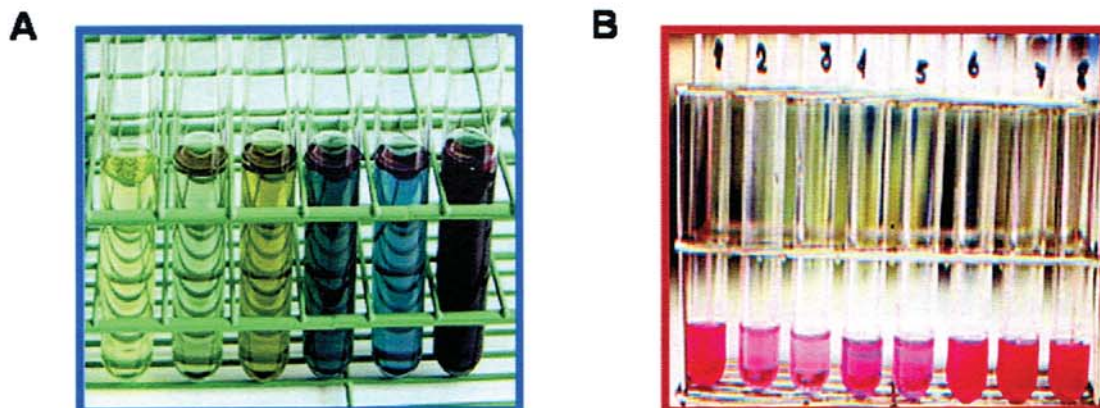


Figura 5. Pigmentos hidrosolubles. **A)** Ficocianina extraída durante la curva de crecimiento de *Spirulina (Arthrospira) maxima*. (Serrano-Véliz, 2004). **B)** Ficoeritrina extraída de un cultivo de *Porphyridium cruentum* (Arredondo-Vega, 1995).

Tabla 1. Contenido (pg/cel) y productividad (mg/L/día) de ficoeritrina de *Porphyridium cruentum* cultivado en un sistema semicontinuo con tasas de renovación diaria del medio de 10, 30 y 50% (Arredondo-Vega, 1995).

TASA DE RENOVACION %	FICOERITRINA pg/cel	PRODUCTIVIDAD FICOERITRINA mg/L/día
10	8.97 ± 0.13	2.89
30	3.04 ± 0.63	3.13
50	3.26 ± 0.32	5.42

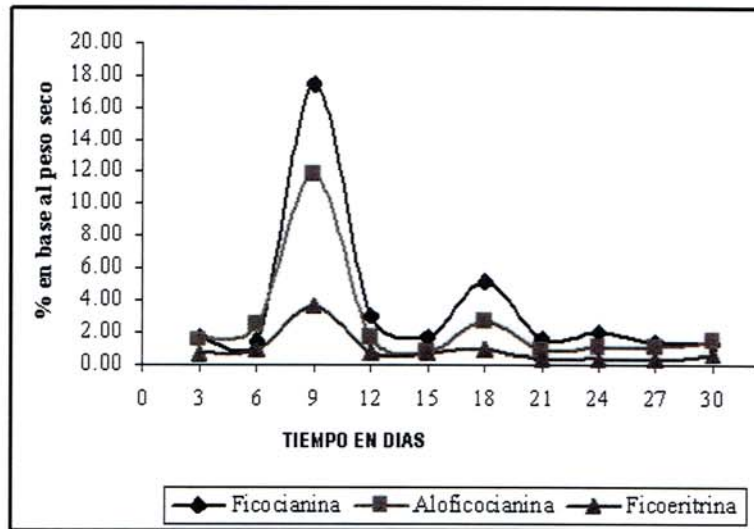


Figura 6. Contenido de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina durante la curva de crecimiento de *Spirulina (Arthrospira) maxima* (Serrano-Véliz, 2004).

5. REFERENCIAS

- ABALDE, J., Cid A., Fidalgo P. y Herrero C. (1995). Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Universidade da Coruña, España, 210 págs.
- ARREDONDO-VEGA, B. O. (1995). Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Porphyridium cruentum*. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España. 80 págs
- BECKER, E.W. (1994). Measurement of Algal Growth. *En: Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge Press. 56-62 pp.
- BEN-AMOTZ, A., Tornabene, T.G. y Thomas, W.H. (1985). Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology* 21: 72-81.
- BEN-AMOTZ, A. y Avron, M. (1989). The Biotechnology of Mass Culturing *Dunaliella* for Products of Commercial Interest. *En: Algal Biotechnology*. Cresswell, R.C., Rees, T.A.V. y Shah, N. (eds.). Longman Scientific and Technical Press. London.
- BENNETT, A. y Bogorad, L., (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal Cell Biology* 58: 419-435.
- BOUSSIBA, S. y Richmond, a. (1980). C-phycocyanin as a storage protein in the blue-

- green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* 143 (1-2): 143-147.
- BOUSSIBA, S. y Richmond, A. (1979). Isolation and purification of phycocyanin from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* 120: 155-159.
- BOROWITZKA, M. y Borowitzka, L.J. (1988). *Dunaliella*. En: Micro-algal Biotechnology. Borowitzka M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.). Cambridge University Press. Cambridge. 27-58 pp.
- BRYANT, D. A., Guglielmi, G., Tandeau de Marsac, N., Castets, A. M. y Cohen-Bazire, G. (1979). The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology* 123: 113-127.
- COHEN, Z. (1986). Products From Microalgae. En: Handbook for Microalgal Mass Culture. Richmond A. (ed.). CRC Press. Boca Raton, FL. 421-454 pp.
- COHEN, Z. (1997). The Chemicals of *Spirulina*. En: *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. A. Vonshak (ed.) 175-204 pp.
- GUERRERO, M. G., Rodríguez, H., Vargas, M. A. (1998). Las microalgas como productoras de pigmentos de interés comercial. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Universidad de Sevilla-CSIC. 222-225 págs.
- GUILLARD, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies on the marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-39.
- HARRISON, P.J., Waters, R.E. y Taylor, F.J.R. (1980). A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology* 16: 28-35.
- HEREDIA-TAPIA, A. (2005). Aislamiento, cultivo y caracterización bioquímica del dinoflagelado marino tóxico *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, de la isla El Pardito, Baja California Sur, México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México, 78 págs.
- HUMPHREY, G.F. (1979). Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light dark regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 40: 63-70.
- JEFFREY, S.W. y Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equation for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural populations. *Biochimie and Physiology Pflanze* 167: 191-194.
- KELLER, D.K., Selvin, R.C., Claus W. y Guillard, R.R.L (1987). Medium for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *Journal of Phycology* 23: 633-38.
- MAHADEV DOKE, J. (2005). An improvement and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Spirulina* sp. *International Journal Food Engineering* 1:(5), Article 2. (<http://www.bepress.com/ijfe/vol1/iss5/art2>).
- MADIGAN, M. T., Martinko J. M., Parker J. (2004). Biología de Microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. 1096 págs.
- SIEGELMAN, H. W. y Kycia, J. H. (1978). Algal Biliprotein. En: Handbook of Phycological Methods. Hellebust, J.A. y Craisie, J.S. (eds.), Cambridge University Press. Cap. 7: 71-79 pp.
- SERRANO-VELIZ, J. (2004). Cultivo de *Spirulina maxima*: cuantificación de los pigmentos durante la curva de crecimiento. Reporte de Residencias Profesionales. Instituto Tecnológico de La Paz. La Paz, Baja California Sur, México, 56 págs.
- STERMAN, N.T. (1988). Spectrophotometric and fluorometric chlorophyll analysis. En: Experimental Phycology. A Laboratory Manual. Lobban, C.S., Chapman, D.J. y Kremer B.P. (eds). Cambridge University Press. 35-46 pp.
- STRICKLAND J. D. y Parsons, T. R. (1972). A Practical Handbook of Seawater Analysis. Pigments analysis. Spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. *Fish Resource Building Canada Bulletin* 167: 185-199
- TETZUYA, K. (1988). Phycobilisome Stability. En: Methods and Enzymology 167 (33): 313-328.

CAPÍTULO 8

DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA (HPLC)

FRANCISCO E. HERNÁNDEZ SANDOVAL Y LILIA I. IBARRA MARTÍNEZ

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)

La Paz, Baja California Sur, 23000, México

fherman04@cibnor.mx, libarra04@cibnor.mx

CONTENIDO

1. INTRODUCCION
2. CUANTIFICACION DE PIGMENTOS EN MICROALGAS
3. FUNCIONAMIENTO DEL HPLC
 - 3.1 PRINCIPIOS BÁSICOS
 - 3.2 INSTRUMENTACIÓN
4. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR HPLC
 - 4.1 IDENTIFICACIÓN
 - 4.2 CUANTIFICACIÓN
 - 4.3 ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN
5. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS
 - 5.1 TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO
 - 5.2 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA
 - 5.3 ANÁLISIS POR HPLC
6. ANEXO
7. REFERENCIAS

Palabras clave: pigmentos, clorofila a, carotenoides, HPLC, microalgas

1. INTRODUCCIÓN

La unidad fotosintética básica de las células vegetales está constituida por la clorofila y por otros pigmentos accesorios que actúan como antena. Existen diferentes tipos de clorofila, pero todos tienen un anillo tetrapirrólico cíclico (porfirina), generado por la unión de los anillos pirrólicos mediante grupos metilo. En el centro de las porfirinas se halla un átomo metálico, que para las clorofilas es el magnesio. Se estima que

cada año se producen y destruyen en la tierra y en el océano más de 1000 millones de toneladas de clorofila la cual, debido al corto tiempo de generación del fitoplancton, se regenerará unas 40 veces en un año.

Además de las clorofilas, existen los pigmentos accesorios (carotenoides) que absorben la luz de longitudes de onda diferentes a las que utiliza la clorofila. Están conformados de un sistema de dobles enlaces conjugados y una cadena larga de hidrocarburos, por lo cual son compuestos insolubles en agua. Se dividen en carotenos, que son hidrocarburos insaturados, y en xantofilas que son derivados oxigenados de los carotenoides. Los carotenos que participan en la fotosíntesis se definen como carotenoides primarios. Estos compuestos son la clase de pigmentos más ampliamente distribuida en la naturaleza, con funciones biológicas tanto en vegetales como en animales. Son productos intracelulares y su concentración máxima depende de su localización celular; por ejemplo, son abundantes si funcionan como protectores y están confinados en organelos como cromoplastos o mitocondrias que pueden generar radicales, o en la superficie de membranas de organismos expuestos a altas intensidades de luz.

Los carotenoides son sintetizados *de novo* por todos los organismos fotosintéticos incluyendo las cianobacterias y ocasionalmente por las bacterias no fotosintéticas y los líquenes (que son una simbiosis alga-hongo) (Salazar, 2000). Se ha evaluado la posibilidad de usar los carotenoides como marcadores quimiosistemáticos y se ha

encontrado que las propiedades a su favor son diversidad estructural, amplia distribución, funciones importantes para los organismos y fácil análisis por lo cual los carotenoides, junto con las clorofilas, representan el principal criterio para la clasificación de algas microscópicas (Liansen-Jensen y Andrewes, 1985).

Los carotenoides pueden encontrarse libres o pueden formar complejos con proteínas en los cloroplastos y cromoplastos de los organismos eucariotas fotosintéticos. En este caso, estos compuestos no están probablemente ligados a la fotosíntesis, pero pueden estar involucrados en la fotomorfogénesis, fototropismo o fotoprotección.

En la mayoría de los organismos fotosintéticos, la principal fracción de los carotenoides está unida de manera no-covalente a complejos proteínicos altamente ordenados del sistema fotosintético. En las primeras etapas de la evolución, la función primordial de los carotenoides fue tal vez la "cosecha de energía" y posteriormente adoptaron sus funciones protectoras, durante la formación de la atmósfera aeróbica (Jeffrey *et al.*, 1997). Aparte de su importancia para fines taxonómicos, los carotenoides han sido usados para seguir el movimiento de flujo, la transformación y el destino del carbono durante el proceso fotosintético (Jeffrey *et al.*, 1997).

Existen también otros pigmentos, típicos de las rodofíceas y de las cianobacteria (ficobiliproteínas) de naturaleza diferente, aunque tienen funciones similares (Capítulo VII). En la Figura 1 se muestran los espectros de absorción luminosa de la clorofila *a* y *b*, del β -caroteno y de la ficoeritrina y ficocianina, cada uno de los cuales tiene su pico de absorción característico.

2. CUANTIFICACION DE PIGMENTOS EN MICROALGAS

Existen 3 métodos para determinar la clorofila *a* en el fitoplancton: el espectrofotométrico (Capítulo 7), el fluorométrico y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

La fluorometría es más sensible que la espectrofotometría, requiere menor cantidad de muestra y se puede utilizar para determinaciones *in vivo*. Estos métodos pueden infra o sobreestimar las concentraciones de clorofila *a* de forma significativa, debido en parte a la superposición de las bandas de absorción, a la fluorescencia de los pigmentos accesorios y a la presencia de productos de degradación de la clorofila.

La cromatografía es una parte muy importante de la química analítica, que en la actualidad

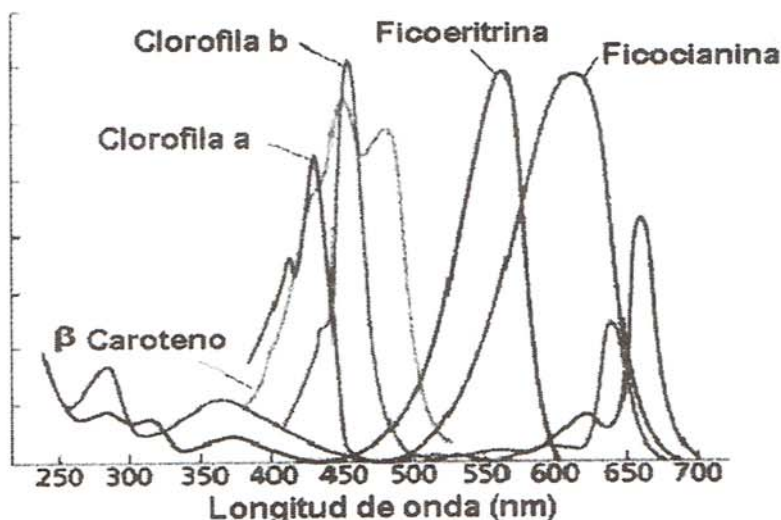


Figura 1. Espectros de absorción de las clorofilas *a* y *b* del β -caroteno y de la ficoeritrina y ficocianina.

permite determinar todo tipo de compuestos orgánicos. Consiste en la separación de los componentes de una muestra, los cuales son distribuidos entre dos fases: la estacionaria y la móvil. En cromatografía de líquidos, estas fases están compuestas de la siguiente forma:

La **fase estacionaria** puede ser un sólido o un gel empacado en una columna y la **fase móvil** es un líquido. En los últimos años, se han publicado varios métodos de HPLC para cuantificar pigmentos marinos, sin embargo, hasta la fecha no existe un método ideal para todos los pigmentos (Wright *et al.*, 1991).

3. FUNCIONAMIENTO DEL HPLC

3.1 Principios básicos

La cromatografía fue empleada originalmente para separar sustancias coloridas. En 1850, Runge describió la formación de zonas con diferentes colores cuando se goteaban sustancias colorantes sobre papel secante, pero el desarrollo más importante vino en 1903 con los experimentos de Tswett, quien logró separar los pigmentos de las plantas en una columna de carbonato de calcio (Fig. 2). En este, como en cualquier sistema cromatográfico, las moléculas de la muestra son acarreadas por la fase móvil a través de las partículas del soporte o fase estacionaria.

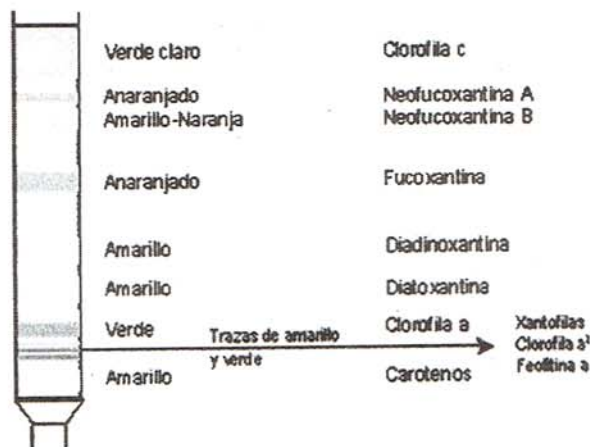


Figura 2. Pigmentos separados en columna de carbonato de calcio.

Durante su recorrido a través de la fase estacionaria, las moléculas individuales son retenidas dependiendo de sus interacciones con esa fase o con la fase móvil. Esta retención es selectiva, lo cual significa que en un determinado sistema formado por una fase móvil y una fase estacionaria, el tiempo de retención en el sistema de cada componente deberá ser diferente. Los componentes son registrados en un cromatograma (Fig. 3), en el cual aparecen separados en dependencia de sus interacciones en el sistema. El registro de cada componente aparece en el cromatograma en forma de pico, y el tiempo de retención proporciona el aspecto cualitativo mientras que el área de pico se usa para fines cuantitativos.

En cromatografía de líquidos pueden distinguirse 5 formas de separación de acuerdo al tipo de fase estacionaria (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1999):

Fase inversa (Fase reversa). La fase estacionaria es de naturaleza no polar (hidrofóbica), mientras que la fase móvil es un líquido polar, como son mezclas de agua y metanol o acetonitrilo. Aquí los componentes no polares se retendrán por más tiempo en la columna.

Par iónico. La fase estacionaria es la misma que en fase inversa, la diferencia es que se agregan reactivos de par iónico a la fase móvil para modificar la polaridad de los componentes de la muestra.

Fase normal. La fase estacionaria es de naturaleza altamente polar, y la fase móvil es no polar (hexano, tetrahydrofurano, otros). En este

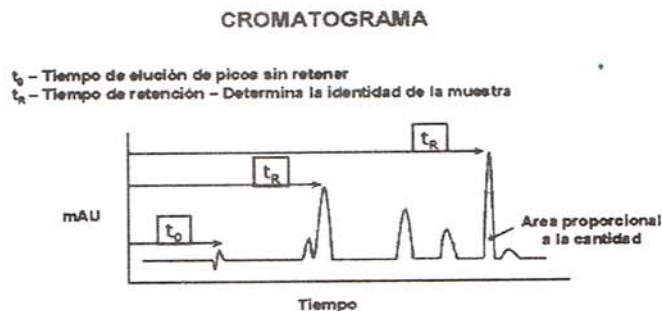


Figura 3. Cromatograma típico.

caso, los componentes polares de la muestra son retenidos en la columna por más tiempo.

Intercambio iónico. La superficie de la fase estacionaria está cargada, pero de manera opuesta a la de los componentes de la muestra. Cuanto más fuerte sea la carga de los componentes de la muestra, mayor será su retención en la columna. La fase móvil es una solución amortiguadora, el pH y la fuerza iónica se utilizan para controlar la elución.

Exclusión por tamaño. La fase estacionaria tiene tamaño de poro definido y la muestra simplemente es filtrada de acuerdo a su tamaño molecular. Las moléculas de mayor tamaño fluyen más rápidamente y las más pequeñas tardan más porque penetran en los poros.

3.2 Instrumentación

El corazón del sistema cromatográfico es la columna, donde se realiza la separación. Es necesaria una bomba de alta presión para pasar la fase móvil a través de la columna (por lo cual se habla también de cromatografía líquida de alta presión, que tiene la misma inicial en inglés), ya que la fase estacionaria está compuesta por partículas de tamaño micrométrico. El proceso cromatográfico inicia con la inyección del soluto al inicio de la columna, a través de la cual los componentes se separan y pasan a través de detectores, que pueden ser selectivos o universales. La respuesta de cada detector es capturada en un registro denominado cromatograma. Para coleccionar, almacenar y analizar los datos cromatográficos, se utilizan integradores o estaciones de trabajo (Fig. 4).

4. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS POR HPLC

4.1 Identificación

El análisis cualitativo puede dividirse en dos tipos. En el primero solamente es necesario identificar los picos, por lo cual el cromatograma se puede comparar con un estándar que es analizado bajo las mismas condiciones cromatográficas (Fig. 5).

El segundo utiliza sistemas de detección específicos, como son fluorescencia y arreglo de diodos. Estos tienen la capacidad de proporcionar espectros de absorción, que facilitan la identificación de los componentes. En el caso de muestras totalmente desconocidas, es necesario coleccionar cada pico y analizarlo por infrarrojo (IR),

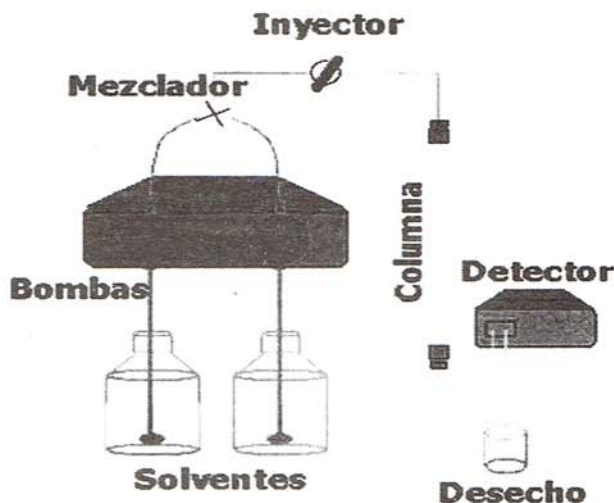


Figura 4. Componentes básicos de un cromatógrafo.

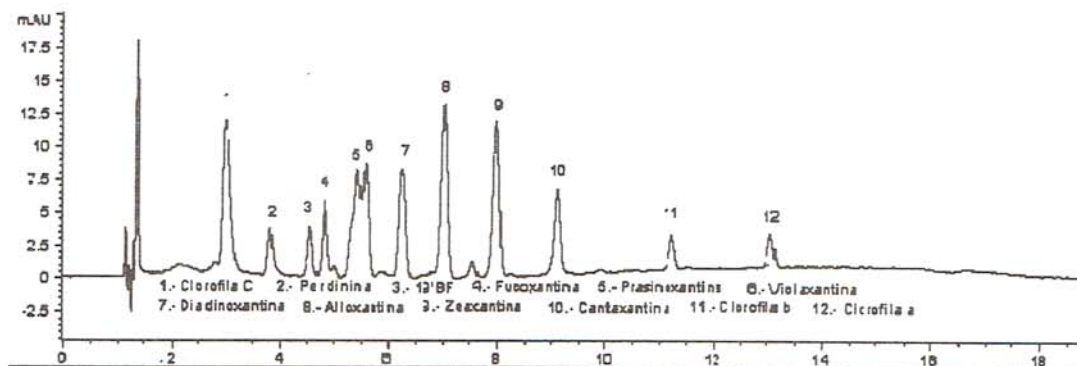


Figura 5. Cromatograma de estándares de pigmentos.

resonancia magnética nuclear (RMN) o espectrometría de masas (EM).

4.2 Cuantificación

Para determinar la concentración de los componentes de la muestra se utiliza la altura o el área de los picos. La determinación cuantitativa involucra el conocimiento de los compuestos que se están analizando, o el análisis de muestras con concentraciones conocidas de pigmentos comerciales, preparando un gradiente de concentración de cada pigmento que, al ser inyectadas en el HPLC, generarán una serie de datos que se usan como se detalla en el inciso siguiente para identificar y calcular la concentración de las muestras problema.

4.3 Elaboración de la curva de calibración

La curva de calibración de los pigmentos fotosintéticos se prepara con estándares comerciales, realizando un gradiente de concentración desde 10 hasta 90 ng/μL. Éstos se inyectan de manera independiente, generando una serie de datos con los cuales se calculan las respectivas ecuaciones de regresión lineal. En la Figura 6 se ilustran algunos ejemplos que se obtuvieron utilizando los estándares de la Figura 5 e integrando el área bajo cada pico, la cual es directamente proporcional a la concentración.

5. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS

5.1 Toma de muestra y almacenamiento

El volumen de muestra a filtrar depende de la concentración de fitoplancton esperada en la muestra. En lagunas costeras, de 0.5 a 1.5 L es generalmente suficiente, mientras que en aguas oceánicas se usa en general entre 3 y 5 L. Se recomienda utilizar filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F con capacidad de retención de partículas de 0.7 μm, ya que la fibra ayuda a romper las células durante la trituración y no se disuelve en el solvente. Para prevenir la acidificación de la muestra, se agregan de tres a cinco gotas de una suspensión saturada de MgCO₃.

Durante la filtración se debe eliminar la mayor cantidad de agua posible y, una vez terminado, el filtro se remueve del soporte, se dobla y se envuelve en papel aluminio o se coloca en tubos criogénicos para su almacenamiento a -20°C. Si la muestra procede de un cultivo de microalgas, se sugiere centrifugar de 10 a 20 mL de cultivo a 4000 rpm por 10 min a 15°C y eliminar el sobrenadante.

5.2 Extracción de la muestra

- Para muestras concentradas en filtros, se toma el filtro con pinzas y se coloca en un tubo con tapa de rosca de 15 mL.

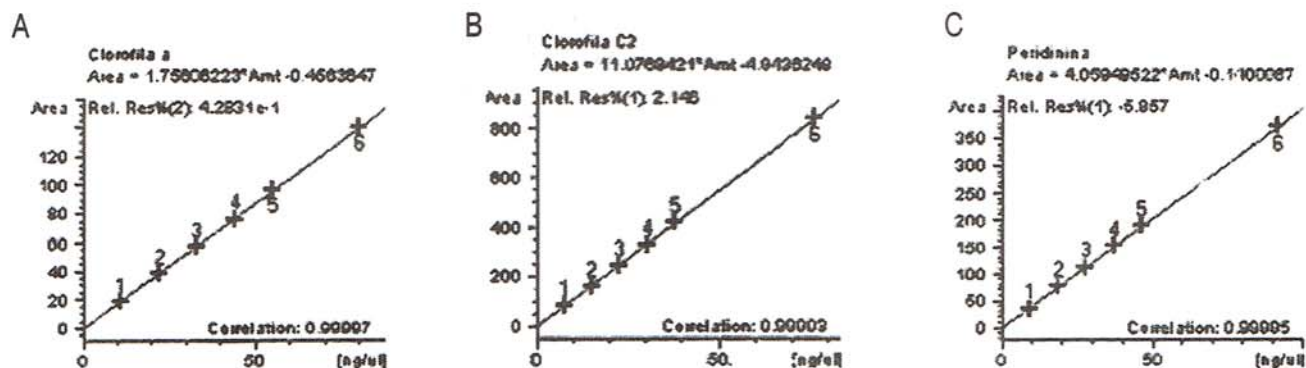


Figura 6. Curvas de calibración clorofila a, clorofila c₂ y peridinin.

- b) Se macera con una varilla de vidrio en baño con hielo para reducir el calentamiento de la muestra. (Para muestras de cultivo puros es necesario sonicar en un baño con hielo durante 30 a 45 seg, para favorecer la extracción de los pigmentos).
- c) Agregar de 3 a 4 mL de acetona grado HPLC, dejar reposar a -20°C durante 24 h para favorecer la total extracción de los pigmentos. El tubo debe estar protegido de la luz con papel aluminio para evitar que la muestra se degrade.
- d) Después de las 24 h, las muestras se transfieren a una temperatura de 10°C y se dejan reposar hasta alcanzar esta temperatura y posteriormente se centrifugan a 4000 rpm durante 20 min a 10°C .
- e) Con una pipeta Pasteur de vidrio limpia (de preferencia nueva y enjuagada previamente con acetona) se recupera el extracto de pigmentos y se coloca en un vial o tubo eppendorf de 2 mL para su análisis por HPLC (Figura 7: A-E).

5.3 Análisis por HPLC (Vidussi *et al.*, 1996)

En los últimos años, se han publicado varios métodos de HPLC para cuantificar pigmentos marinos, sin embargo, todavía no existe un método ideal para todos los pigmentos (Wright *et al.*, 1991). En nuestro laboratorio utilizamos el descrito por Vidussi *et al.* (1996).

a) Condiciones de operación del equipo

Tiempo de corrida	20 min.
Tiempo de parado	1 min.
Flujo	1 mL/min.
Longitud de onda	440 y 667 nm
Presión máxima de la bomba	400 bar
Volumen de inyección	100 μL

Gradiente	Solución A	Solución B
Minuto 0	75%	25%
Minuto 1	50%	50%
Minuto 15	0%	100%
Minuto 18	0%	100%
Minuto 18.5	75%	25%

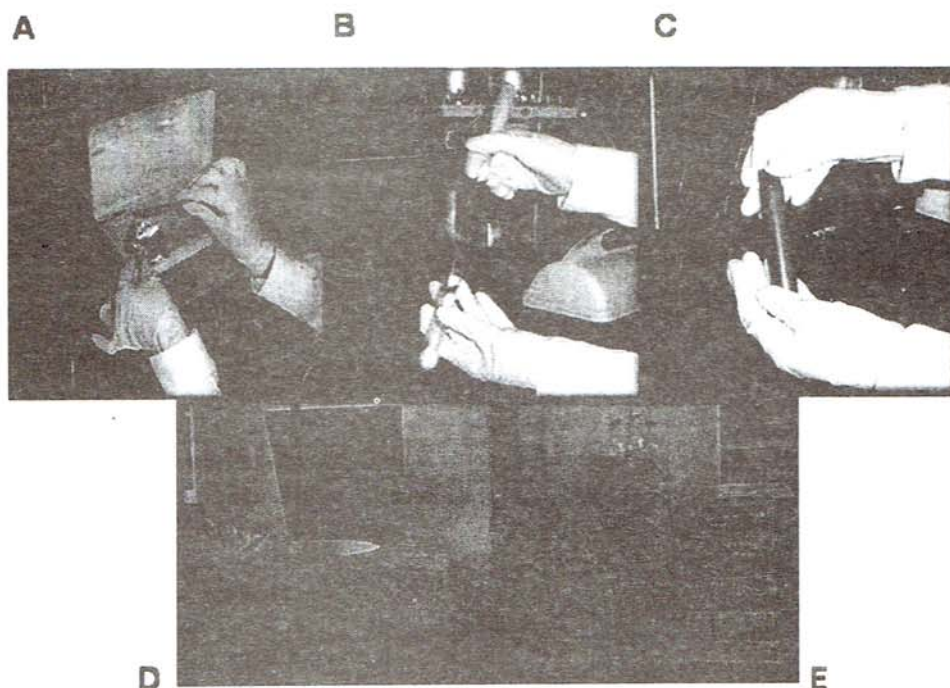


Figura 7. Procesamiento para la extracción de pigmentos de microalgas. **A)** Doblado del filtro con muestra de microalgas. **B)** Maceración del filtro con acetona. **C)** Preparación del filtro macerado con acetona para centrifugar. **D)** Centrífuga refrigerada Beckman GPR. **E)** HPLC modelo HP 1100.

***NOTA.- Todos los reactivos utilizados deben ser de calidad HPLC (Anexo I).**

Solvente A: Metanol-acetato de amonio 1 N, 70/30 v/v

Solvente B: Metanol.

Columna: C8 MOS Hypersil (5 μ m x 100 mm x 4.6 mm)

Equipo: HPLC Modelo 1100

a) Identificación

Los pigmentos presentes en las muestras de microalgas se identifican bajo dos criterios: comparando los tiempos de retención (Fig. 5) y los espectros de absorción (Figs. 8-12). A continuación se muestran algunos perfiles cromatográficos y espectros de absorción de especies de microalgas determinados en nuestro laboratorio (Figs. 8-12).

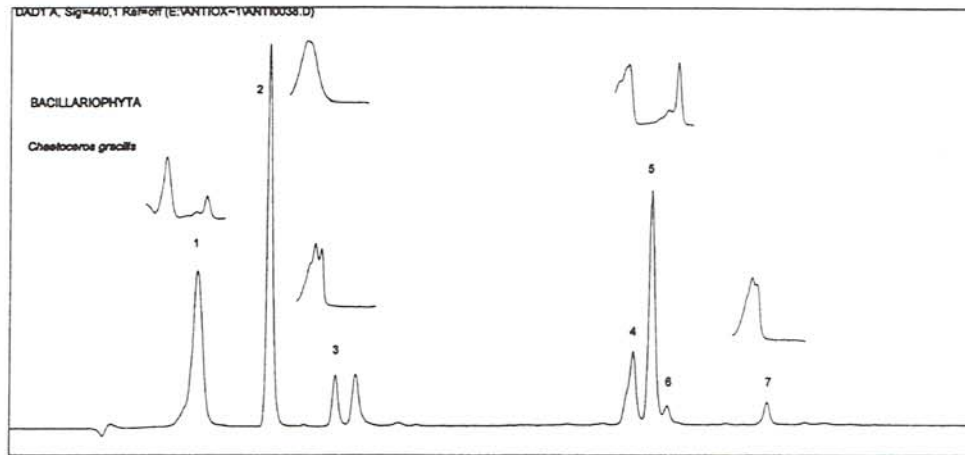


Figura 8. Cromatograma a 440 nm de *Chaetoceros gracilis* y espectros de absorción de pigmentos característicos: 1) clorofila c₁, 2) fucoxantina, 3) diadinoxantina, 4) clorofila a, 5) clorofila a, 6) clorofila a', 7) β -caroteno. Disolvente utilizado para la extracción: acetona.

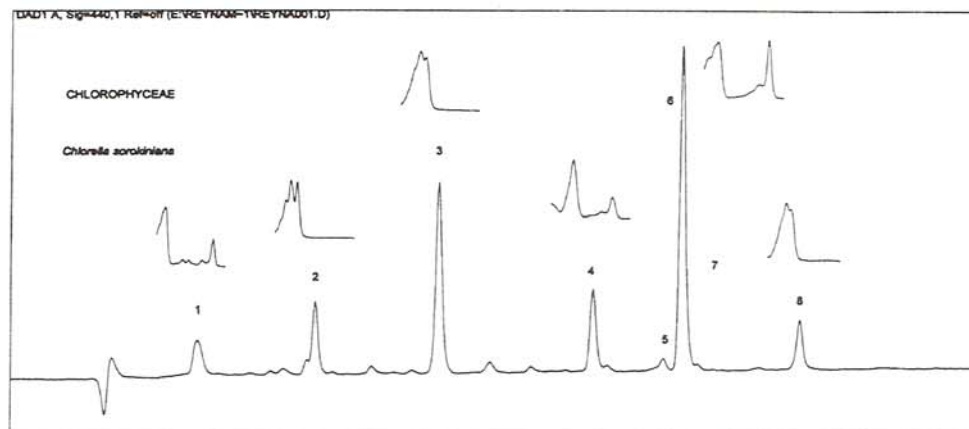


Figura 9. Cromatograma a 440 nm de *Chlorella sorokiniana* y espectros de absorción de pigmentos característicos: 1) feofoorbide a, 2) violaxantina, 3) zeaxantina, 4) clorofila b, 5) clorofila a, 6) clorofila a, 7) clorofila a', 8) β -caroteno. Disolvente utilizado para la extracción: acetona (Con permiso del Dr. Morales Avendaño).

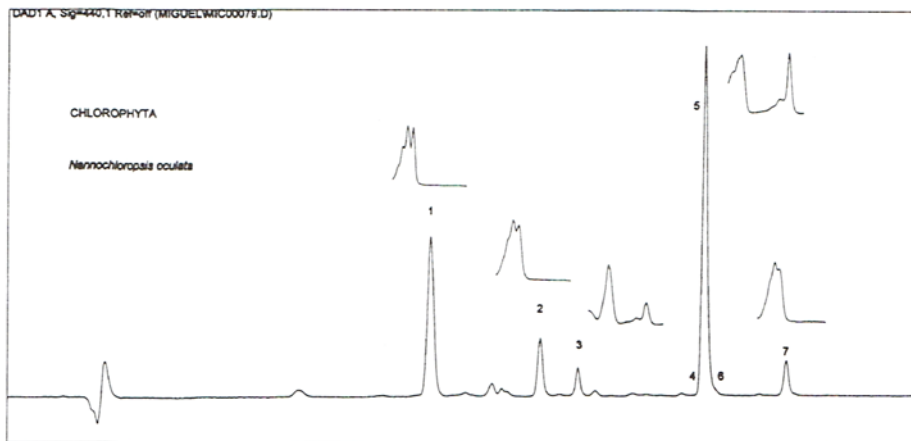


Figura 10. Cromatograma a 440 nm de *Nannochloropsis oculata* y espectros de absorción de pigmentos característicos: 1) violaxantina, 2) luteína, 3) clorofila b, 4) clorofila a, 5) clorofila a, 6) clorofila a', 7) β-caroteno. Disolvente utilizado para la extracción: acetona.

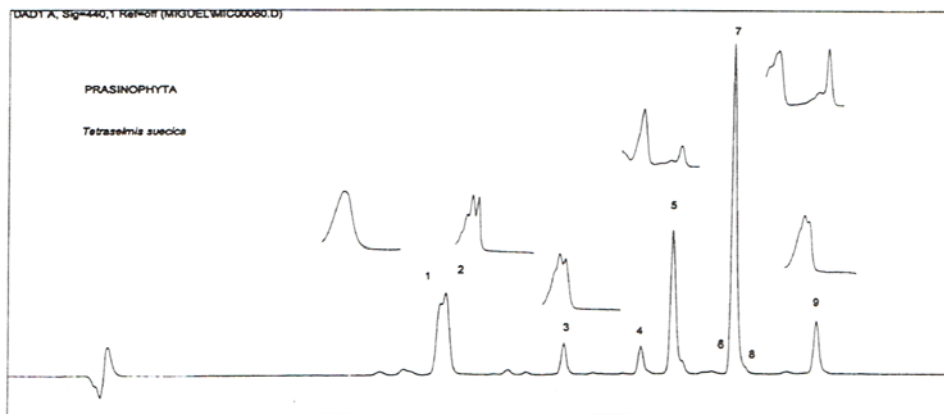


Figura 11. Cromatograma a 440 nm de *Tetraselmis suecica* y espectros de absorción de pigmentos característicos: 1) prasinoxantina, 2) violaxantina, 3) luteína, 4) desconocido, 5) clorofila b, 6) clorofila a, 7) clorofila a, 8) clorofila a', 9) β-caroteno. Disolvente utilizado para la extracción: acetona.

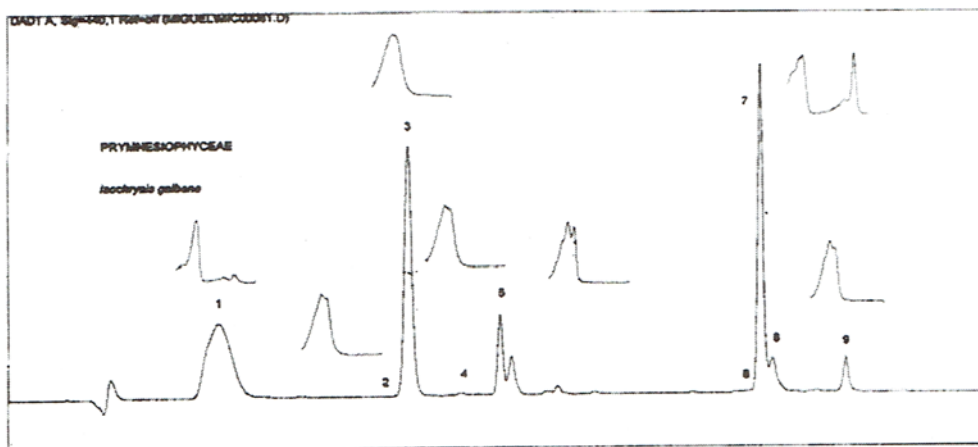


Figura 12. Cromatograma a 440 nm de *Isochrysis galbana* y espectros de absorción de pigmentos característicos: 1) clorofilas c1, c2, c3, 2) 19'-Butanoyloxyfucoxantina, 3) fucoxantina, 4) 19'-hexanoyloxyfucoxantina, 5) diadinoxantina, 6) clorofila a, 7) clorofila a, 8) clorofila a', 9) β-caroteno. Solvente utilizado para la extracción: acetona.

b) Cuantificación de pigmentos

La concentración de los pigmentos presente en las muestras se calcula integrando el área bajo la curva, la cual es directamente proporcional a la concentración de los estándares. Para calcular la concentración de pigmentos se utilizan las siguientes ecuaciones (dependiendo si se parte de una muestra liofilizada o de un volumen de muestra filtrada):

$$\begin{aligned} \text{Pigmento} &= (A_m \cdot FR) \cdot (V_E/V_i) / P \\ \text{Pigmento} &= (A_m \cdot FR) \cdot (V_E/V_i) / V \\ \text{Pigmento} &= \text{ng/g} \\ \text{Pigmento} &= \text{ng/mL} \end{aligned}$$

En donde:

Pigmento = clorofilas y/o carotenos

A_m = área del pico de la muestra (mAU · s)

A_{std} = área del pico del estándar (mAU · s) para ser utilizado durante la cuantificación

FR = factor de respuesta = concentración del estándar (ng) / área del estándar (mAU · s)

V_E = volumen de acetona utilizado para la extracción (μL)

V_i = volumen de muestra inyectado (μL)

P = peso de la muestra en (g)

V = volumen de muestra filtrada (mL)

A manera de ejemplificar los cálculos para la cuantificación de pigmentos, presentamos datos de un cultivo discontinuo de *Tetraselmis suecica* en medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962), cosechado a los 7 días. Datos importantes para la cuantificación de la clorofila a:

a) Volumen de cultivo filtrado (V _f) =	10 mL
b) Volumen de extracción (acetona) (V _E) =	3 mL (3000 μL)
c) Volumen de inyección (V _i) =	13.33 μL
d) Concentración del estándar =	80.375 ng
e) Área del estándar de chl a (A _{std}) =	293.81781 mAU · s
f) Área de pico de chl a de la muestra (A _m) =	796.18726 mAU · s

De acuerdo a la ecuación definida en el apartado anterior:

$$\text{Clorofila a} = (A \cdot FR) \cdot (V_E/V_i) / V_f$$

FR= Factor de respuesta: concentración del estándar (ng) / área del estándar (mAU · s);

$$\begin{aligned} \text{FR} &= 80.375 \text{ ng} / 293.81781 \text{ mAU} \cdot \text{s} \\ \text{FR} &= 0.2722775 \text{ ng} \end{aligned}$$

Sustituyendo en la ecuación de **Clorofila a** tenemos:

$$\text{Clorofila a} = (A_m \cdot FR) \cdot (V_E/V_i) / V_f$$

$$\text{Clorofila a} = [(796.18726 \text{ mAU} \cdot \text{s}) \cdot (0.2722775 \text{ ng})] \cdot (3000 \mu\text{L} / 13.33 \mu\text{L}) / 10 \text{ mL}$$

$$\text{Clorofila a} = 4878.856 \text{ ng/mL}$$

6. ANEXO

Preparación de soluciones para la determinación de pigmentos por HPLC:

Acetato de amonio 1 N:

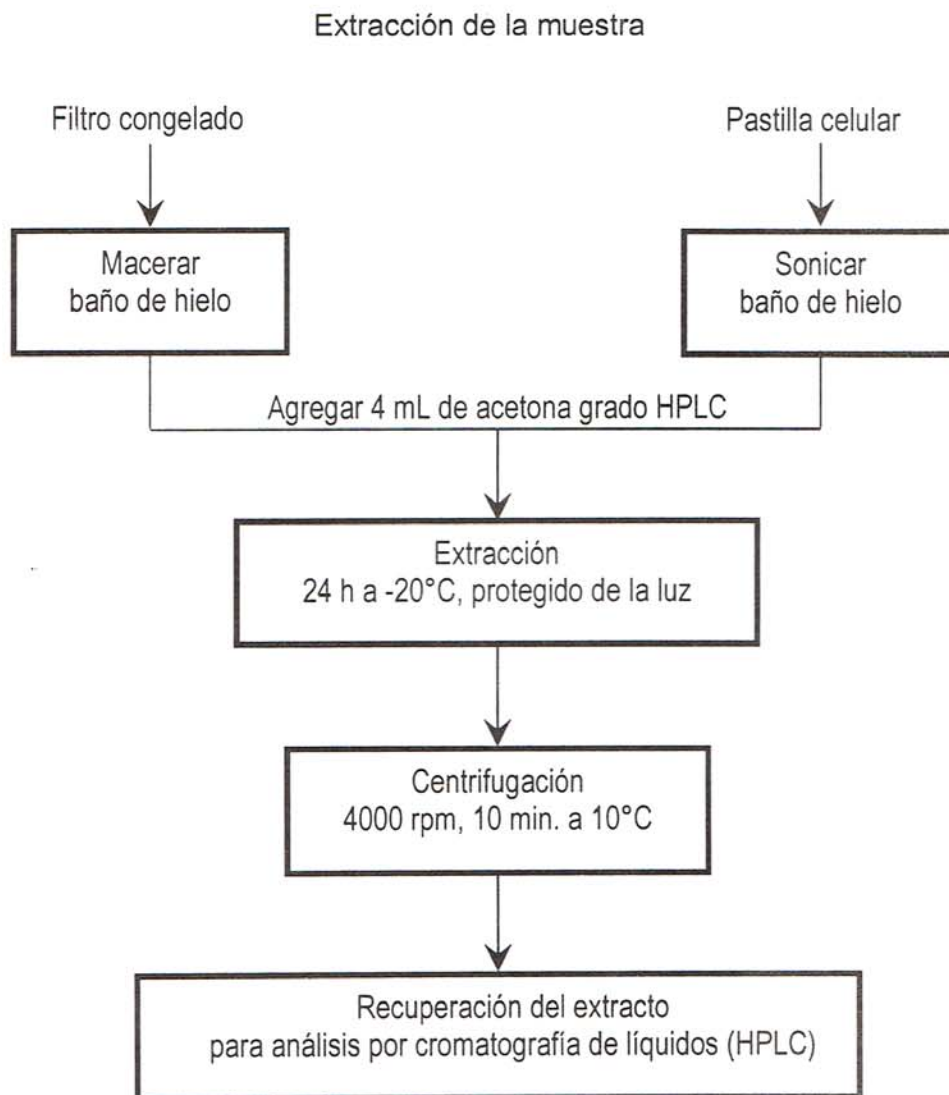
pesar 77.8 gr de acetato de amonio grado HPLC y disolverlo en 500 mL de agua HPLC, aforar a 1 L.

Fase móvil A.- 70:30 metanol:acetato de amonio 1 N v:v (mezclar 700 mL de metanol HPLC con 300 mL de la solución de acetato de amonio 1 N).

Fase móvil B.- metanol grado HPLC al 100 %.

Ambas soluciones se deben de filtrar con filtros de fibra de vidrio de 0.45 μm de tamaño de poro.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA EXTRACCION DE PIGMENTOS



7. REFERENCIAS

- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (1999). Reversed Phase Chromatography. *En: Principles and Methods*. Edition AA. 6-9 pp.
- CARRILLO, L. (2004). Energía de Biomasa. Edición del autor, S.S. Jujuy (http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap02/02_01.htm)
- GUILLARD, R.R.L. y Ryther, J.H. (1962). Studies on the marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-39.
- JEFFREY S.W., Mantoura, R.F.C. y Wright, S.W. (1997). Phytoplankton Pigments in Oceanography. Monographs on Oceanographic Methodology. UNESCO Publishing. Cap. 3, 85 pp.
- LIANSEN-JENSEN, S. y Andrewes A.G. (1985). Analysis of carotenoids and related polyenes pigments. *En: Methods in Microbiology*. Academic Press. Vol. 18, 225-255 pp.
- SALAZAR-GONZALEZ, M. (2000). La astaxantina y su biosíntesis. *ContactoS* 36: 61-64.
- SALAZAR-GONZALEZ, M. (2000). Carotenoides: Distribución en el mundo vegetal y animal. *ContactoS* 37: 60-68.
- VIDUSSI, F., Claustré, H., Bustillos Gúzman, J., Cailliau, C. y Marty, J.C. (1996). Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton. Separation of chlorophyll a from divinyl chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research* 18 (2): 237-282.
- WRIGHT, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjornland, T., Repeta, D. y Welschmeyer, N. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology Program Series* 77: 183-196.

CAPÍTULO 9

DETERMINACIÓN DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES- ESPECTROMETRÍA DE MASAS

LAURA CARREÓN PALAU, JORGE DEL ANGEL RODRÍGUEZ
Y MA. OLIVIA ARJONA LÓPEZ

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur, 23000, México
lcarreon@cibnor.mx, delangelj@gmail.com, oarjona04@cibnor.mx

CONTENIDO

1. INTRODUCCION
2. MÉTODOS DE ESTUDIO
3. EXTRACCION DE ÁCIDOS GRASOS
 - 3.1 TAMAÑO MÍNIMO Y MANEJO DE LAS MUESTRAS
 - 3.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS
 - 3.2.1 ESTERIFICACIÓN CATALIZADA POR ÁCIDOS
 - 3.2.2 TRANSESTERIFICACIÓN CATALIZADA POR BASES
 - 3.2.3 TRANSMETILACIÓN DIRECTA SIN EXTRACCIÓN PREVIA
 - 3.2.4 PROCEDIMIENTO PARA LA ESTERIFICACIÓN (DERIVATIZACIÓN) CATALIZADA POR ÁCIDOS
4. IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE ACIDOS GRASOS
 - 4.1 MÉTODO CROMATOGRÁFICO SUGERIDO PARA COLUMNA OMEGAWAX (SUPELCO, BELLEFONTE, PA)
 - 4.2 REACCIÓN DE IONIZACIÓN DE METIL ÉSTERES
 - 4.3 ESPECTROS DE MASAS CARACTERÍSTICOS DE ÁCIDOS GRASOS METIL ESTERIFICADOS
 - 4.4 IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS
 - 4.5 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS
5. ANEXOS
 1. ESTRUCTURA Y NOMENCLATURA DE ÁCIDOS GRASOS
 2. PROCEDIMIENTO PARA LA ESTERIFICACIÓN (DERIVATIZACIÓN) CATALIZADA POR ÁCIDOS
 3. FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS
 4. HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS DE ANÁLISIS DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL
6. REFERENCIAS

Palabras clave: ácidos grasos, cromatografía de gases espectrometría de masas

1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos tienen tres funciones principales en los organismos, 1) como reserva energética en depósitos grasos constituyendo ceras y triglicéridos, con un valor energético de hasta 9 kcal/g, 2) como elementos estructurales de las membranas celulares y tilacoidales, organizados en una doble capa lipídica con propiedades anfipáticas constituyendo fosfolípidos y los esfingolípidos que incluyen a los galactolípidos y 3) como precursores de eicosanoides, sustancias parecidas a las hormonas que regulan procesos de inflamación, vasodilatación, vaso constricción y coagulación.

Los ácidos grasos en los organismos pueden provenir de la dieta o ser sintetizados de *novo*. La síntesis de *novo* de los ácidos saturados ocurre a partir del acetato, que a su vez se genera de los carbohidratos o del catabolismo de las grasas. Las células vegetales son capaces de sintetizar el ácido linoléico (cis-9, cis-12 octadienoico o 18:2 ω -6) a partir del ácido oleico (18:1 ω -9) por desaturación de la Δ 12-desaturasa, y el ácido α -linolénico (cis-9, cis-12, cis-15-octadecatrienoico o 18:3 ω -3), a partir del ácido linoleico por reacción de desaturación de la Δ 15-desaturasa (para entender la estructura y nomenclatura de ácidos grasos ver Anexo 1). Sin embargo, la Δ 12 y la

$\Delta 15$ -desaturasas solo están presentes en células vegetales, por lo que los ácidos linoléico y α -linolénico se consideran esenciales para los animales.

A partir del ácido linoléico y del ácido α -linolénico se generan las dos principales familias de ácidos grasos poliinsaturados $\omega 6$ y $\omega 3$.

Los ácidos grasos de la serie $\omega 6$ tienen al menos cuatro funciones en la fisiología de los animales:

- 1) Modulación de la estructura de la membrana.
- 2) Formación de moléculas biológicamente activas de vida corta (eicosanoides) responsables de la inflamación, formación de plaquetas y vaso constricción de venas y arterias.
- 3) Control de la impermeabilidad al agua por parte de la piel.
- 4) Regulación de la síntesis y el transporte de colesterol.

Los ácidos grasos de la serie $\omega 3$ tienen al menos dos funciones en la fisiología:

- 1) Formación de la mielina que favorece la comunicación neuronal y por lo tanto el funcionamiento del sistema nervioso de los animales.
- 2) Formación de moléculas bioactivas como los tromboxanos A₃, que evitan la agregación de plaquetas, promueven la dilatación de vasos sanguíneos y una reacción de coagulación más lenta.

En la dieta occidental humana se consume gran cantidad del ácido linoléico de la serie $\omega 6$, que es muy abundante en las semillas de vegetales que se utilizan para la producción de aceite de cocina, así como del ácido araquidónico (20:4 o ARA) presente en carne y huevo. Los ácidos de la serie $\omega 3$ como el ácido linolénico (18:3), el eicosapentaenoico (20:5 ω -3 o EPA) y el docosahexanoico (22:6 ω -3 o DHA) son principalmente generados en las microalgas marinas y en los peces dulceacuícolas, por lo que resultan abundantes en sus consumidores (peces, crustáceos y moluscos). En las sociedades occidentales el consumo de pescado y mariscos es muy bajo generando una descompensación en la proporción de $\omega 6/\omega 3$. Dado que los

eicosanoides derivados de ARA y el EPA son antagonistas entre sí y compiten por la misma enzima ciclooxigenasa (Cohen, *et al.* 1995) esto trae como consecuencia problemas como la arteriosclerosis, trombosis, presión sanguínea alta, cáncer de colon y próstata así como enfermedades relacionadas a reacciones de inflamación como asma, artritis, soriasis, lupus eritematoso y nefritis. Estas enfermedades se pueden evitar con una dieta rica en ácidos grasos $\omega 3$ debido a que se recupera el balance de las moléculas biológicamente activas derivadas de los $\omega 6$ y $\omega 3$.

La fuente comercial de EPA y DHA más común es el aceite de pescado, sin embargo, su capacidad de sintetizar EPA y DHA es reducida, por lo que la calidad de dicho aceite varía de acuerdo a la temporada, la zona geográfica y la calidad de su alimento. Actualmente se explora la obtención de EPA y DHA a partir de microalgas marinas que al ser la base de la cadena trófica sintetizan *de novo* los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de manera más eficiente. Por ejemplo, los monogalactosildiacylgliceroles y los digalactosildiacylgliceroles de las diatomeas contienen altas cantidades de EPA. Los aceites provenientes de microalgas son una fuente más limpia y concentrada de EPA y DHA, y su calidad puede ser controlada una vez que se encuentre el mejor método de cultivo, cosecha y purificación para una especie previamente seleccionada del medio natural.

2. MÉTODOS DE ESTUDIO

Los investigadores anteriores a 1935, aislaron los lípidos usando solo sus propiedades de solubilidad y la formación de sales de ácidos grasos, los cuales fueron posteriormente caracterizados por su fórmula general, puntos de ebullición y de fusión. El período que siguió a 1935 se caracterizó por procedimientos nuevos y eficientes en la separación y estudio de mezclas de ácidos grasos, incluyendo destilación de éter, cristalización de complejos de urea de varias sales metálicas y varias formas de cromatografía (www.cyberlipids.com).

El descubrimiento de la cromatografía gas-líquida (GLC por sus iniciales en inglés, o simplemente GC) a mediados de los 50's revolucionó el análisis de los ácidos grasos. Actualmente esta técnica es la más empleada cuando se trata de la cuantificación de ácidos grasos individuales en cualquier lípido acetilado. Sin embargo, en algunos estudios se deben considerar técnicas complementarias para separar previamente a los lípidos (Fig. 1), mientras que los estudios metabólicos involucran el marcado de especies moleculares con átomos radiactivos, y los estudios de identificación requieren la separación y cuantificación de ácidos grasos conjugados, *trans*, de cadena ramificada, hidroxilados y la determinación de la posición de los dobles enlaces (www.cyberlipids.com, Mukherjee y Weber, 1993; Agilent Technologies, 2001).

3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

3.1 Tamaño mínimo y manejo de las muestras

La cantidad final de ácidos grasos que se va a inyectar en un cromatógrafo de gases espectrómetro de masas está dada por la sensibilidad del detector. Para el espectrómetro de masas la cantidad mínima detectable es

cercana a 1 µg/mL y la cantidad máxima la determina la columna y es cercana a los 100 µg/mL. Sin embargo, aunque el detector es muy sensible, el método cromatográfico también define la cantidad mínima identificable (1 µg/mL) y la cantidad mínima cuantificable (5 µg/mL). Cabe aclarar que cada equipo requiere métodos ligeramente distintos y se tiene que calcular la cantidad mínima detectable y mínima cuantificable para cada uno en particular. Dado que se inyecta 1 µL de muestra en el inyector, la concentración de cada ácido graso en la muestra final debe localizarse en el intervalo lineal de concentraciones de la curva de calibración, que en el caso del equipo GCD 1800B, oscila entre 5 y 100 µg/mL. Para ello se investiga el porcentaje de lípidos totales, así como la cantidad y el porcentaje de ácidos grasos totales en muestras parecidas, lo que permite calcular la cantidad de microgramos que se requiere pesar de la muestra.

Para determinar el número de réplicas o repeticiones de una misma condición, se pueden utilizar fórmulas estadísticas que se basan en datos previos de las muestras (Sokal y Rohlf, 1995).

$$n \geq 2(CV/\delta)^2 [t_{\alpha}(v) + t_{1-p}(v)]^2$$

En donde:

- n** = tamaño mínimo de muestra
- CV** = coeficiente de variación
- δ** = mínima diferencia que se necesita detectar (porcentaje del coeficiente de variación expresado en valores entre 0 y 1)
- α** = nivel de significación
- v** = grados de libertad de la desviación estándar muestral $v = a(n_0 - 1)$ donde a = número de grupos que se comparan
- n₀** = tamaño inicial de la muestra
- t** = valor de tablas para los grados de libertad correspondientes
- p** = probabilidad deseada para que se encuentre una diferencia significativa

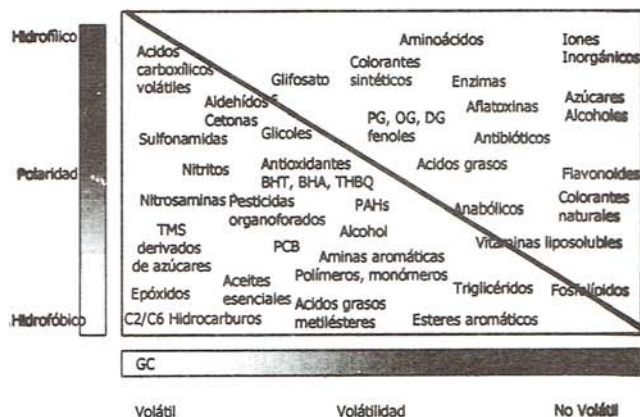


Figura 1. Comparación entre CG y HPLC (con permiso de Agilent Technologies, 2001).

Las muestras deben ser de preferencia frescas para prevenir cualquier oxidación o hidrólisis. La presencia de lisofosfolípidos, ácido fosfatídico, monoacilglicerol, diacilglicerol o ácidos grasos libres, son

indicadores de una posible degradación previa a la extracción. Para evitar la oxidación se recomienda el uso del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) a una concentración de menos del 1% de la cantidad de lípidos de la muestra. En el caso de muestras que no se extraerán inmediatamente se recomienda congelarlas en nitrógeno líquido, mantenerlas a -70°C y/o liofilizarlas y mantenerlas a -20°C (Christie, 2003). Dado que en cada experimento se pueden generar un gran número de muestras, se recomienda congelarlas y liofilizarlas ya que los lípidos se mantienen viables por más tiempo y se facilita el cálculo de lípidos con respecto al peso seco.

En la selección del sistema de solventes es necesario considerar además de su efectividad, la toxicidad y la dificultad para deshacerse de los residuos. Es sabido que el CHCl_3 es mutagénico y carcinogénico y el CH_3OH es altamente tóxico. Como alternativa existen métodos automatizados basados en extracción con disolventes no clorados más "amigables" con el ambiente. En la extracción asistida con horno de microondas (Microwave Extraction System / Microwave Accelerated Solvent Extraction System) se emplea etil acetato como solvente polar y el ciclohexano como solvente no polar (Batista *et al.*, 2001).

3.2 Extracción de ácidos grasos

Antes del análisis por CGL es necesario preparar derivados no reactivos de los ácidos grasos (normalmente metil ésteres), que además son más volátiles que los ácidos grasos libres. Los lípidos se extraen con mezclas de solventes (ver Capítulo 6) y son transformados por una reacción de transesterificación, en la cual un mol de glicerina es desplazado por tres moles de otro alcohol (metanol) en condiciones ácidas (HCl o BF_3) o básicas.

Para determinar los ácidos grasos presentes en una muestra celular, se realiza un paso previo que consiste en la derivatización analítica de los lípidos (Knapp, 1979), este proceso se hace principalmente por dos razones:

- 1) Para permitir el análisis de los compuestos que son volátiles e inestables y que por su

naturaleza no se encuentran directamente disponibles.

- 2) Para mejorar la detección de los compuestos durante el análisis cromatográfico.

Los derivados de ácidos grasos más comunes son los metil-ésteres, los derivados butil- y otros álcali ésteres también se emplean, sin embargo, éstos tienen la particularidad de que son algo inestables. Los derivados t-butil-dimetilsilil (TBDMS) son más estables a la hidrólisis y se fragmentan más rápido en el espectrómetro de masas, sin embargo no son los más utilizados (Knapp, 1979). La generación de metil ésteres puede realizarse en condiciones ácidas o alcalinas, en lípidos aislados o en ácidos grasos, aunque también existe un procedimiento de un solo paso que combina la extracción de los lípidos con la transesterificación en pequeñas cantidades de tejido.

3.2.1 Esterificación catalizada por ácidos

Los derivados más comunes de los ácidos grasos son los metil ésteres, estos se obtienen al calentar ácidos grasos libres con un exceso de metanol anhidro en presencia de un catalizador, como el trifloruro de boro (BFT) (Morrison y Smith, 1964), aunque también se han descrito condiciones ácidas generadas por HCl 2M en metanol anhidro o ácido sulfúrico metanólico.

3.2.2 Transesterificación catalizada por bases

Las derivatizaciones en presencia de catalizadores básicos tienen la ventaja de una alta velocidad y calentamiento moderado. Este tipo de derivatización se recomienda en muestras que poseen ácidos grasos de cadena corta o muy lábiles (poliinsaturados, anillos de ciclopropano, insaturaciones conjugadas); asimismo, el método evita la formación de productos de oxidación (Piretti *et al.*, 1988).

3.2.3 Transmetilación directa sin extracción previa

El método de transesterificación directa en un solo paso ha sido utilizado en diferentes matrices

biológicas sin cambio significativo con respecto a la extracción previa con disolvente apolares y no polares. El método tiene tres ventajas:

- 1) Disminuye el trabajo de preparación,
- 2) El tamaño de la muestra que se necesita es menor y
- 3) Se observa menor daño sobre el material analizado (Mjaavatten, 1997).

Sin embargo, se sugiere que antes de realizar los análisis de una muestra particular, se hagan pruebas para encontrar la mejor técnica de extracción de ácidos grasos.

El método de transesterificación directa ha sido utilizado para muestras de tejido (1-10 mg). La muestra que contenga unos 10 mg de lípidos se coloca en el fondo de un tubo con tapón de rosca empacada con teflón. Se agrega 0.5 mL de ácido clorhídrico metanólico (HCl:CH₃OH) 2N anhidro. Se cierra fuertemente el tubo y se calienta a 90°C por 2 h, se deja enfriando a temperatura ambiente y se seca el exceso de HCl con nitrógeno gaseoso por 3 min. Después de enfriado se agregan 2 mL de hexano y 0.5 mL de agua. Se agita suavemente el tubo, para mezclar y se colecta la capa de hexano después de una centrifugación corta. Se agregan otros 2 mL antes del análisis por cromatografía, el extracto puede ser concentrado por evaporación con nitrógeno gaseoso (Barnung y Grahl-Nielsen, 1987).

Una revisión crítica de la transesterificación *in situ* evitando el uso de la extracción de lípidos, se discute en (Carrapiso y García, 2000).

3.2.4 Procedimiento para la esterificación (derivatización) catalizada por ácidos

El procedimiento para este método está basado en la esterificación ácida utilizando HCl-

Metanol 5:95 v/v propuesto por Sato y Murata (1988). (Ver Anexo 2).

- a) Pesar 5 mg de microalgas liofilizadas en un tubo de tapón de rosca previamente lavado con un líquido limpiador que no deje residuos (vgr. Micro-90).
- b) Aplicar el protocolo de extracción de lípidos totales (y de fraccionamiento de lípidos en caso de ser necesario. Capítulo 6).
- c) Secar el extracto lipídico con nitrógeno gaseoso y someter a metanólisis (derivatización) adicionando 2.5 mL la mezcla de HCl:CH₃OH (5%, v/v), a 85°C por 2.5 h.
- d) Los metil-ésteres obtenidos de la reacción de metanólisis se extraen con 1.5 mL de hexano, repitiendo este paso dos veces.
- e) Una vez obtenido el hexano se lava con 2 mL de agua destilada 3 veces, atravesando el hexano con una pipeta Pasteur (burbujeando). Después del tercer lavado se recupera el hexano en un nuevo tubo previamente lavado como los anteriores.
- f) Secar el extracto de hexano que contiene los ácidos grasos metil esterificados, con nitrógeno gaseoso.
- g) Resuspender en la cantidad de hexano calculada para que la concentración de cada ácido graso se encuentre dentro de los parámetros de la curva de calibración (aproximadamente 1 mL) y agregar una pizca de sulfato de sodio anhidro para evitar inyectar agua en el cromatógrafo.
- h) Tomar 250 µL y colocarlos en un vial con tapa de teflón.
- i) Sellar el vial e inyectar 1 µL en el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas.
- j) Las condiciones del análisis también llamado método cromatográfico se deben probar con estándares cada vez que se cambia de columna.

4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

4.1 Método cromatográfico sugerido para columna Omegawax (Supelco, Bellefonte, PA)

Para tener una mejor comprensión de los fundamentos de la cromatografía de gases-espectrometría de masas se recomienda revisar el Anexo 6.3

Condiciones del método:

Volumen de inyección:	1 μ L
Gas portador:	He alta pureza
Flujo del gas portador en la columna:	0.9 mL/min
Inyección de la muestra:	sin división (splitless)
Temperatura del inyector:	250 °C
Temperatura del detector:	260 °C

Programa del cromatógrafo:

Temperatura inicial del horno:	110°C 3 min;
Incremento:	de 30°C/min hasta 165°C
Mantener esa temperatura por 2 min y posteriormente incrementar en 2.2°C/min hasta 209°C.	
Mantener en esa temperatura por 35 min.	

Método de adquisición de espectros de masas:

Retardo del solvente:	3.3 min
Rango masas:	45-450 uma
Tiempo entre barridos:	0.5 min.

4.2 Reacción de ionización de metil ésteres

Cuando los ésteres de los ácidos grasos son sometidos a una fuente de ionización constante, se producen una serie de iones característicos: en casi todos los ésteres alifáticos, incluyendo algunos de alto peso molecular, se produce el ión molecular (M^+), aunque su abundancia decrece conforme aumenta la ramificación de las cadenas. El sitio más susceptible de reacciones de ionización es el grupo funcional éster, tanto el oxígeno del carbonilo, como el átomo de oxígeno saturado de los ésteres pueden actuar como sitios de iniciación de la reacción (Fig. 2), dando lugar

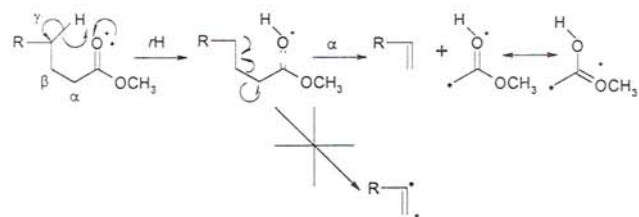


Figura 2. Reacciones de McLafferty para ácidos grasos metil esterificados.

a patrones específicos dentro del espectro de masas (McLafferty y Turecek, 1993).

4.3 Espectros de masas característicos de ácidos grasos metil esterificados

Entre los iones que destacan encontramos al $(M-31)^+$ producto de la pérdida del grupo metil cuya abundancia decrece conforme aumenta el peso molecular; el $(M-43)^+$ producto de reacciones de pérdida de carbonos (Figs. 3 y 4); y el ión de rearrreglo de McLafferty y Turecek (1993) $(74)^+$ producto del intercambio de electrones del oxígeno del carbonilo con el hidrógeno del carbono (McLafferty y Turecek, 1993).

4.4 Identificación de ácidos grasos

Los ácidos grasos presentes en las muestras se identifican mediante la comparación de los espectros de masas con los espectros contenidos en la biblioteca (base de datos) de espectros de masas NIST/NBS. Esta identificación se confirma por:

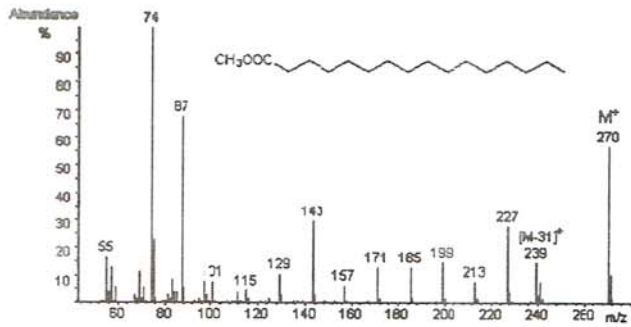


Figura 3. Espectro de masas del ácido hexadecanoico (C16:0).

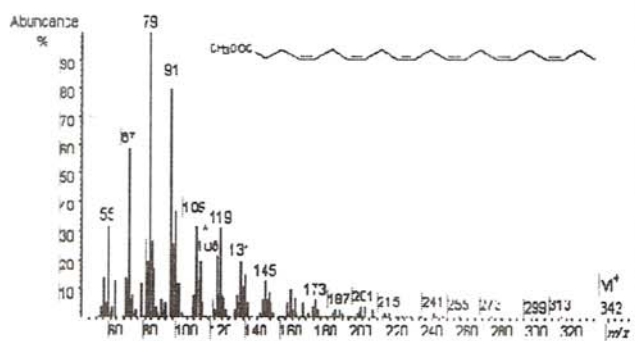


Figura 4. Espectro de masas del ácido docosahexanoico (C22:6).

1. Interpretación de los espectros de metil-ésteres de ácidos grasos según McLafferty y Turecek (1993).
2. Comparación de los tiempos de retención de los picos en la muestra, con los tiempos de retención de un patrón comercial de 29 metil-ésteres de ácidos grasos.

Gracias a que los iones producidos son siempre los mismos y a que sus abundancias relativas en el espectro son constantes, es posible construir bases de datos de espectros de masas de ácidos grasos conocidos como referencia para la identificación y cuantificación de mezclas de composición desconocida. En la actualidad los procesos de comparación automática de los espectros son suficientemente rápidos, sin embargo, deben ser considerados como una ayuda y no como un sustituto en la interpretación. Asimismo, muchas bases de datos comerciales son incompletas o no se adaptan específicamente

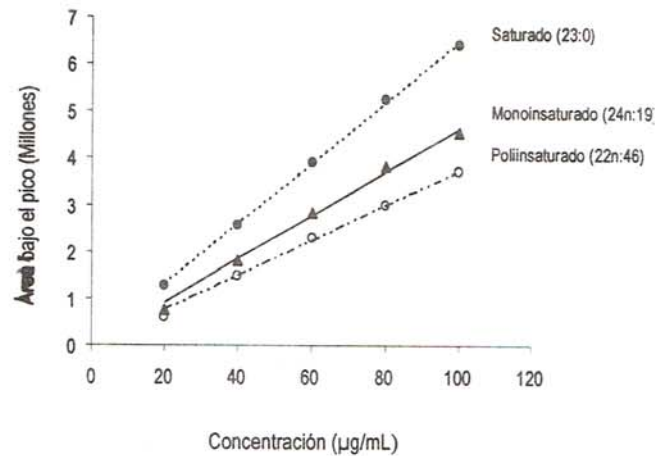


Figura 5. Curva de calibración de ácidos grasos.

a nuestros intereses, por lo que es importante contar con estándares puros de compuestos conocidos semejantes a los que deseamos analizar y que nos permitan actualizar, crear o modificar nuestras propias bases de espectros.

4.5 Cuantificación de ácidos grasos

Además de la identificación, los estándares permiten elaborar curvas de calibración a partir de mezclas de concentración conocida, basadas tanto en la intensidad de la señal, como en el área integrada de cada uno de los picos del cromatograma.

Para calcular la concentración de los ácidos grasos presentes en las muestras, se integra el área bajo los picos, y se interpola con una curva de calibración que relaciona 5 concentraciones conocidas (20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL) de cada uno de los 29 estándares de ácidos grasos metil esterificados, con sus respectivas áreas bajo el pico, siendo el área directamente proporcional a la masa en el sistema GC-MS (Fig. 5).

Para fines prácticos, se puede preparar un volumen suficiente de una mezcla de estándares conocidos a una concentración mayor a los 100 µg/mL de cada metil éster de ácido graso. Posteriormente, esta mezcla es diluida de manera sucesiva hasta obtener 5 mezclas de 200 µL cada una, cuyas concentraciones cubran un intervalo entre 5 y 100 µg/mL, la concentración más alta se define por la eficiencia del pico.

Para cada ácido graso se calcula la pendiente de la recta y se utiliza como factor de conversión para obtener su concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir del área. Dichos factores son individuales para cada ácido graso ya que la intensidad de la señal puede variar conforme aumenta el número de carbonos de los compuestos, con la presencia e incremento de dobles enlaces y de ramificaciones. Para calcular la concentración de cada ácido graso por miligramos de muestra se usa la siguiente ecuación:

$$C = [(A/FC) \cdot Vr] / P$$

En donde:

- C** = Concentración en $\mu\text{g}/\text{mg}$
- A** = Área bajo el pico de cada ácido graso
- FC** = Factor de conversión o pendiente de la curva de cada ácido graso
- Vr** = Volumen en el que se resuspendieron los ácidos grasos (en mL)
- P** = Peso de la muestra (en mg)

Para el cálculo del porcentaje se considera la suma de los $\mu\text{g}/\text{mg}$ como el 100% con una regla de 3 se calcula el porcentaje de cada ácido graso. La Tabla 1 muestra la organización de los datos para una muestra de *Chaetoceros muelleri* cosechada en fase exponencial, floculada con

quitosano y liofilizada. Los lípidos fueron extraídos de 17.7 mg con cloroformo: metanol 1:2 y la derivatización se realizó con ácido clorhídrico:metanol 5:95. Los ácidos grasos metil esterificados se resuspendieron en 1.5 mL de hexano.

Dado que durante el proceso de extracción ocurren ciertas pérdidas, se ha sugerido que estas pueden ser cuantificadas mediante el cálculo de la razón entre la concentración observada y la concentración esperada de un estándar interno (C17:0, C23:0 o algún otro ácido graso que no esté presente en la muestra), que se haya agregado a la muestra y cuya concentración sea conocida previamente.

La interpretación final de los resultados requerirá cierto manejo estadístico de los datos, el cual dependerá del diseño experimental. Para tal fin, los datos corregidos pueden ser presentados como concentraciones en $\mu\text{g}/\text{mg}$, $\mu\text{g}/\text{individuo}$ o bien como porcentajes relativos, aunque en este último caso es necesaria la transformación arcoseno de la raíz del porcentaje sobre 100 a fin de que la variancia sea independiente de la media y puedan emplearse procedimientos como pruebas de **T**, **ANOVA**, **MANOVA**, análisis de componentes principales, análisis de factores o análisis de agrupamiento (ver Anexo).

Tabla 1. Ejemplo de organización de los datos obtenidos de una muestra de *Chaetoceros muelleri*

Ácido graso	Tiempo de retención (min)	Factor de Conversión	Área	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Porcentaje (%)	Arco seno (raíz(%/100))
14:0	11.69	99902	3059319	2.6	9.2	0.3083
15:0	13.92	101139	157947	0.1	0.5	0.0686
16:0	16.50	101935	2695769	2.2	8.0	0.2859
16:1 ω -7	17.22	94914	4707419	4.2	14.9	0.3965
16:1 ω -5	17.92	94914	425818	0.4	1.3	0.1164
16:2 ω -6	18.12	76415	1170323	1.3	4.6	0.2163
16:2 ω -4	18.86	76415	1640365	1.8	6.5	0.2569
16:3 ω -3	19.76	68589	3875994	4.8	17.0	0.4249
16:4	21.32	66930	148087	0.2	0.7	0.0817
18:0	22.85	102698	173766	0.1	0.5	0.0714
18:1 ω -9	22.96	88759	109510	0.1	0.4	0.0610
18:1 ω -7	23.36	88759	298942	0.3	1.0	0.1008
18:2 ω -6	24.40	76415	126299	0.1	0.5	0.0706
18:3 ω -3	25.97	68589	134738	0.2	0.6	0.0769
18:4 ω -3	27.38	66930	264247	0.3	1.2	0.1092
20:4 ω -6	34.06	74187	379899	0.4	1.5	0.1244
20:5 ω -3	37.14	55294	5446096	8.3	29.6	0.5755
22:0	38.82	81563	35654	0.0	0.1	0.0363
24:0	55.86	54887	42002	0.1	0.2	0.0480
22:6 ω -3	56.14	36243	203080	0.5	1.7	0.1302
Suma				28.2	100.0	
Σ Saturados				5.2	18.5	0.4447
Σ Monoinsaturados				5.0	17.6	0.4336
Σ Poliinsaturados				17.8	63.2	0.9188
Σ ω -3				14.1	50.1	0.7862
Σ ω -6				1.9	6.6	0.2607

5. ANEXOS

ANEXO 1

ESTRUCTURA Y NOMENCLATURA DE ACIDOS GRASOS

Estructura

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de cadenas largas de carbonos unidas a un grupo carboxilo. En los lípidos la forma más importante es como ácidos monocarboxílicos; los ácidos dicarboxílicos constituyen productos metabólicos o de la oxidación de los primeros (Fig. 1).



Figura 1. Ácidos grasos monocarboxílicos y dicarboxílicos

En los lípidos de plantas y animales, se observan cerca de 20 formas distintas de los varios cientos de ácidos grasos que han sido identificados en la naturaleza. La mayoría de los ácidos grasos son compuestos que forman una cadena lineal, y frecuentemente se encuentran constituidos por un número par de átomos de carbono. La longitud de la cadena llega a variar desde 2 hasta 80 pero normalmente se encuentran entre 12 y 24 (Gunstone, 1996; Christie, 2003).

Los ácidos grasos de cadena corta suelen ser muy volátiles y algunos se encuentran asociados a aromas característicos, ejemplos son: los ácidos pentanoico, hexanoico y octanoico que están asociados al sudor; el nonanoico al aroma de algunos quesos; los ácidos butanoico y decanoico están asociados al olor rancio; el benzoico al olor de la orina y el dodecanoico a la cera. Los ácidos grasos clasifican en saturados y poliinsaturados. Los saturados no tienen enlaces insaturados (dobles enlaces) y no pueden ser alterados por hidrogenación o halogenación. Los insaturados tienen dobles enlaces presentes; monoinsaturados si solo se presenta un doble enlace y poliinsaturados (PUFA por sus iniciales en inglés) si poseen dos o más enlaces dobles. En sistemas biológicos, los dobles enlaces suelen estar

separados por un solo grupo metileno (CH_2), razón por la que se les llama "insaturaciones metileno-interrumpidas". En los trabajos fisiológicos recientes, la última categoría (PUFA) es empleada solo para ácidos grasos con tres a seis dobles enlaces, como los que se encuentran en aceite de pescado y tejidos cerebrales (Gunstone, 1996; Christie, 2003).

Algunos ácidos grasos poco comunes, tienen dos dobles enlaces adyacentes separados por más de un grupo metileno, estos son nombrados ácidos grasos "polimetileno-interrumpidos". Asimismo, en algunas plantas y bacterias, los ácidos grasos pueden ser más complejos, bien porque posean un número impar de átomos de carbono, bien porque se encuentren ramificados o porque contengan una variedad de otros grupos funcionales, incluyendo enlaces acetileno, grupos epoxi-, hidroxi- o ceto-, e incluso estructuras anilladas (ciclopropano, ciclopropeno, ciclopenteno y furano).

Nomenclatura

Cuando tienen una longitud de cadena entre 2 y 4 carbonos, son llamados de cadena corta, de 6 a 10 son considerados de cadena media y de 12 a 24 se consideran ácidos grasos de cadena larga. Sus propiedades físicas y biológicas están relacionadas con esta división en tres clases.

Para describir precisamente la estructura de una molécula de un ácido graso se debe señalar la longitud de la cadena de carbonos (número de átomos unidos en forma lineal), el número de dobles enlaces y además la posición exacta de estos dobles enlaces. Esto define la actividad biológica de la molécula y del lípido que lo contiene.

Para describir a los ácidos grasos insaturados, han prosperado dos propuestas:

La terminología química propone que los átomos de carbono sean contados a partir del grupo carboxilo lo que pone el énfasis en el doble enlace más cercano a este grupo, por ejemplo: el

ácido linoleico se nombrará: 18:2 Δ 9,12 o ácido *cis*-9, *cis*-12-octadecadienoico. Los dobles enlaces (Figs. 2 y 3) usualmente tienen una configuración **Z** (*cis*), y en muchos casos se omite, pero se suele emplear cuando se quiere mencionar por separado a aquellos dobles enlaces que tienen configuración **E** (*trans*).

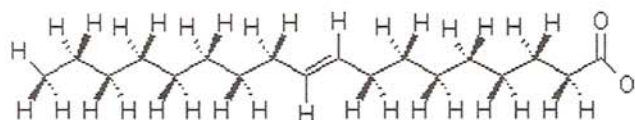


Figura 2. Ácido graso *trans*.

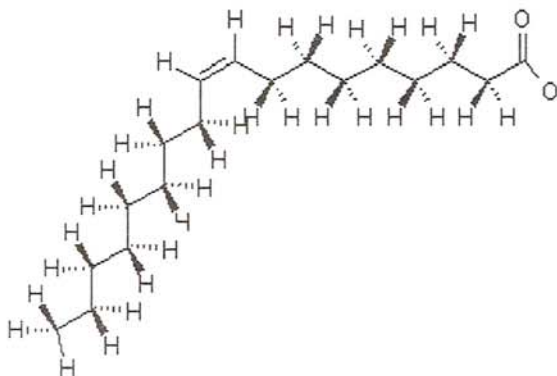


Figura 3. Ácido graso *cis*.

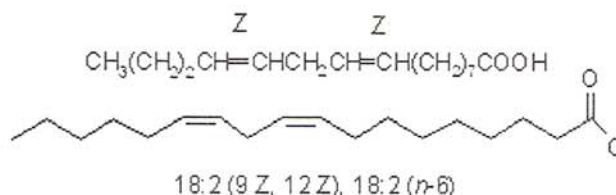
La terminología bioquímica y fisiológica ha adoptado una forma distinta de contar la posición de los dobles enlaces, éstos son contados a partir del grupo metilo terminal de modo que se denota la familia metabólica. En este caso la notación es *n-x* (siendo *n* el número total de carbonos, *x* la posición del último doble enlace). En la extensa mayoría de los casos la posición de los otros dobles enlaces no es explícita ya que se deduce a partir del primero agregando 3 unidades cuando se trata de ácidos grasos no-conjugados (interrumpidos por un grupo metileno), sin embargo existen casos en los que los ácidos grasos presentarán dobles enlaces conjugados (no hay grupo metileno intermedio), en este caso la posición de los siguientes dobles enlaces se obtiene agregando dos unidades (Gunstone, 1996; Christie, 2003).

El ácido linoleico (Fig. 4) o ácido *cis*-9, *cis*-12-octadecadienoico es también llamado en nomenclatura reducida 18:2 (*n*-6) o 18:2 ω 6. Este compuesto tiene 18 átomos de carbono, 2 dobles

enlaces y 6 átomos de carbono desde el último doble enlace hasta el metilo terminal indicando que pertenece a la familia ω 6.

Como $18-6=12$, y $12-3=9$, entonces Δ 9,12.

Esta forma de nomenclatura ha permanecido e incluso es aceptada por la **Comisión Internacional de Nomenclatura Bioquímica** debido a que resulta de interés para describir el metabolismo de los ácidos grasos.



ácido *cis*-9, *cis*-12-octadecadienoico

Figura 4. Ácido linoleico (18:2 ω 6).

Origen de la familia *n*-6 (ω 6)

El ácido linoleico es desaturado y elongado en el retículo endoplásmico para formar ácido δ -linolénico (18:3 n -6) y de ahí se sucede la siguiente secuencia de reacciones: ácido dihomo- δ -linolénico (20:3 n -6), ácido araquidónico (20:4 n -6) y ácido adrenico (22:4 n -6). El ácido docosapentaenoico (22:5 n -6) es sintetizado a partir del adrenico en cantidades significativas solo bajo condiciones de prolongada deficiencia de ácidos grasos *n*-3.

El ácido araquidónico (ARA) se encuentra normalmente esterificando las posiciones *sn*-2 de los fosfolípidos de la membrana. Este ácido graso es liberado por la acción de la fosfolipasa A_2 . El araquidonato libre es usado como precursor de los eicosanoides, como las prostaglandinas de la serie PG_2 , los leucotrienos y los tromboxanos. (Gunstone, 1996; Christie, 2003).

Origen de la familia *n*-3 (ω -3)

El otro ácido graso esencial, el ácido α -linolénico, puede ser posteriormente elongado y desaturado para formar los ácidos grasos de cadena larga de la serie ω 3, como el ácido eicosapentaenoico

(EPA) y el docosahexaenoico (DHA), que son particularmente abundantes en membranas neuronales de la retina y el cerebro de mamíferos.

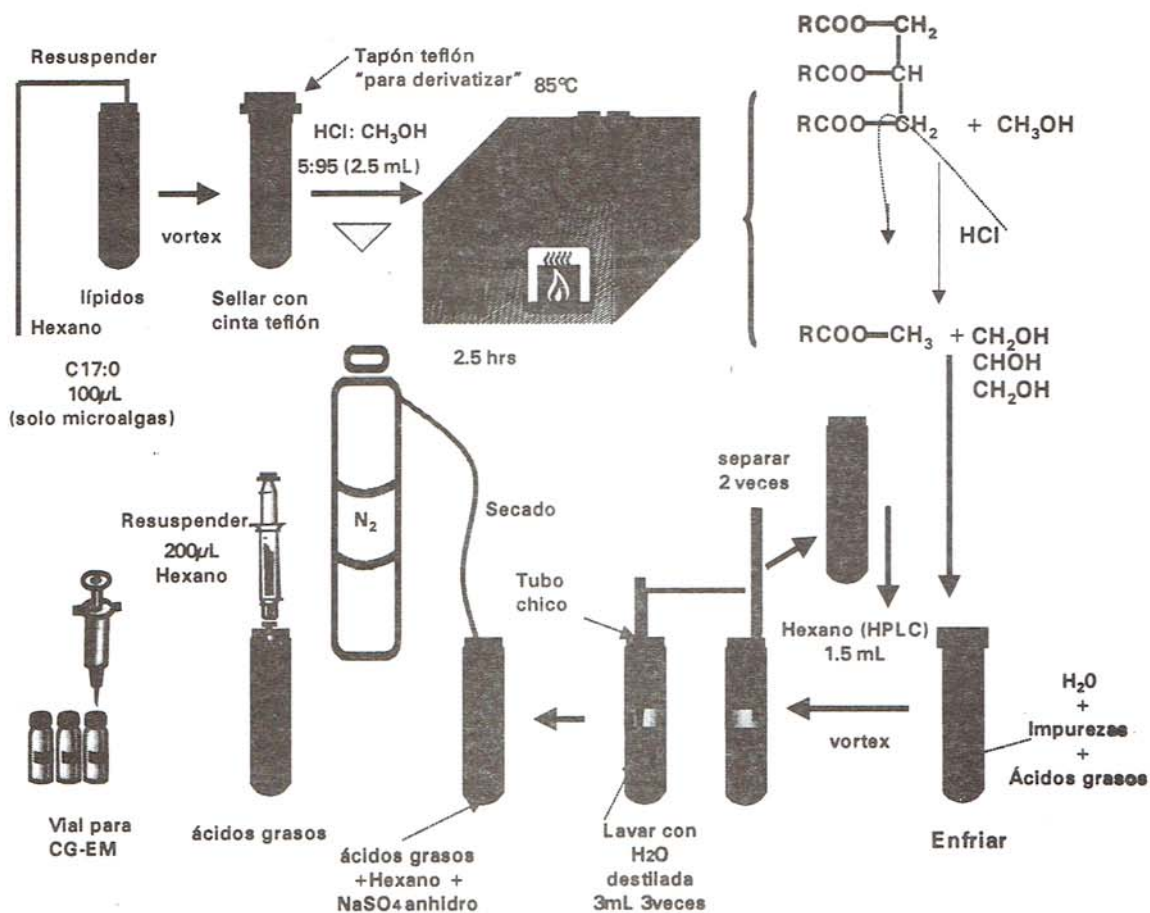
El DHA y el EPA como productos metabólicos del ácido α -linolénico (cis 9,12,15-18:3) pertenecen a la serie de los ácidos grasos ω 3. Su síntesis ocurre a través de la siguiente secuencia de reacciones: 9,12,15-18:3 \rightarrow 6,9,12,15-18:4 \rightarrow 8,11,14,17-20:4 (ARA) \rightarrow 5,8,11,14,17-20:5 (EPA) \rightarrow 7,10,13,16,19-22:5 (DPA) \rightarrow 9,12,15,18,21-24:5 \rightarrow 6,9,12,15,18,21-24:6 \rightarrow 4,7,10,13,16,19-22:6 (DHA). De acuerdo con

estas vías, se piensa que los ácidos de 24-carbonos que se elaboran en el retículo endoplásmico se movilizan a los peroxisomas, para una β -oxidación parcial.

El DHA es particularmente abundante en membranas neuronales de retina y cerebro en mamíferos. La deficiencia en ácidos grasos de la serie n-3 causa la reducción de los niveles de DHA en estos tejidos y produce retraso en la habilidad de aprendizaje, daños en la visión además de ser importante para el desarrollo completo del sistema nervioso del feto y del recién nacido.

ANEXO 2

PROCEDIMIENTO PARA LA ESTERIFICACIÓN (DERIVATIZACIÓN) CATALIZADA POR ÁCIDOS.



ANEXO 3

FUNDAMENTOS DE CROMATOGRAFIA DE GASES ESPECTROMETRIA DE MASAS.

La cromatografía se ha definido como un método físico de separación en la cual los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área superficial y, la otra es un gas (fase móvil) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria (McNair, 1981; Christian, 1981; Lederer y Lederer, 1957). Un cromatógrafo de gases está constituido por 5 partes importantes: Gases, puerto de inyección, horno (columna), detector y dispositivo de salida (computadora).

Gas portador o de arrastre

Los gases portadores, de arrastre o acarreadores, deben ser químicamente inertes, se utiliza generalmente helio, argón, nitrógeno e hidrógeno. La elección del gas está determinada por el tipo de detector a usar. Con el suministro del gas se encuentran asociados los reguladores de presión, manómetros y medidores de flujo, además, el sistema de gases que pasan a través de una serie de filtros como: tamiz molecular para eliminar el agua, un metal catalítico para eliminar oxígeno y carbón activado para eliminar hidrocarburos (Agilent Technologies, 2001).

Sistemas de inyección

El método más común de inyección es a través de una micro-jeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un septo de goma o silicona, en una cámara de vaporización situada en la cabeza de la columna, donde la temperatura juega un papel importante (McNair, 1981; Christian, 1981; Lederer y Lederer, 1957). Existen diversos tipos de sistemas de inyección como el split, splitless, split-splitless, on-column, entre otros. (Agilent Technologies, 2001).

Columnas

En cromatografía de gases se emplean dos tipos de columnas: Las **empacadas** o de relleno

y las tubulares abiertas o **capilares**. La temperatura de una columna es un factor importante, para una buena resolución y eficiencia en un análisis. Es importante regular la temperatura en décimas de grado, por lo que la columna se introduce en un horno termostático. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación que se necesita. Las columnas de relleno, se fabrican con tubos de vidrio, metal, acero inoxidable, cobre o teflón. Estos tubos se empacan con un material de relleno sólido, finamente dividido y homogéneo que se recubre con una capa delgada de la fase estacionaria líquida. Las columnas capilares, son de dos tipos, denominadas capilares de pared recubierta (WCOT) y capilares con soporte recubierto (SCOT) (Agilent Technologies, 2001).

Detectores

Un detector es un dispositivo para identificar la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna cromatográfica. Es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible, en una señal. En cromatografía un detector funciona comparando una propiedad física entre el gas portador puro y el mismo gas portador llevando cada uno de los componentes que previamente se han separado en la columna, esta acción se traduce en una señal eléctrica, que posteriormente se amplificará mediante un registrador gráfico o integrador permitiendo indicar el momento que salen de la columna los componentes (McNair y Miller 1997, McNair, 1981; Christian, 1981; Lederer y Lederer, 1957). Existen una gran variedad de detectores como: Detector de Conductividad Térmica (TCD), Detector de Ionización de Flama (FID), Detector de Captura de Electrones (ECD), Detector Selectivo de Masas (MS). Sin embargo los detectores que se utilizan para el análisis de ácidos grasos metil esterificados (FAME) son: el detector de ionización de flama (FID) y el detector selectivo de masas (MS).

Detector de ionización de flama (FID)

En un FID los componentes que se queman en la flama producen iones, los cuales son colectados y a su vez generan la señal del detector. Los analitos que tienen mayor número de carbonos son los que producen una señal mayor. Es un detector destructivo y es especialmente útil para analizar compuestos: como alcoholes, fragancias, ácidos grasos, esteroides e hidrocarburos (McNair y Miller 1997, McNair, 1981; Christian, 1981; Agilent Technologies, 2001).

Detector Selectivo de Masas (MSD)

El propósito fundamental de un espectrómetro de masas es convertir una muestra en productos mensurables que sean indicadores de la naturaleza de la molécula original. Dichos productos son iones en estado gaseoso, generalmente positivos que se pueden separar de acuerdo a su masa molecular. La representación gráfica de la relación que existe entre el cociente masa/carga de cada uno de los iones y su abundancia relativa es a lo que se le llama un espectro de masas. En la abscisa se in-

dica la relación masa – carga (m/z) de cada uno de los iones que forman la molécula y en la ordenada la abundancia relativa de cada ión (McLafferty, 1993). Un espectrómetro de masas está constituido por una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector de masas.

Descripción y funcionamiento del espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas es un tipo de detector que ioniza las moléculas. La corriente de muestras vaporizadas entra con una presión aproximada de 10^{-5} Torr y choca con una corriente de electrones que proviene de un filamento incandescente formando varios productos entre los que se incluyen iones positivos. Los iones viajan a través de una cámara hacia un ánodo en el lado opuesto y son expulsados hacia el analizador, en donde un filtro cuadrupolo los separa de acuerdo a su masa / carga, una bomba de vacío los acelera hasta el detector donde la corriente iónica se amplifica generando una señal que es interpretada por un software y representada por un espectro de masas (McLafferty y Turecek, 1993; Siuzdak, 1996; Gunstone, 1996).

ANEXO 4

HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS DE ANÁLISIS DE ACUERDO AL DISEÑO EXPERIMENTAL.

Un experimento diseñado es una prueba o serie de pruebas en las cuales se inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que sea posible identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida. Algunas variables del proceso: las variables independientes, son controladas, mientras que otras no son controladas: las variables dependientes.

Para que los resultados de cualquier análisis bioquímico puedan ser interpretados con mayor facilidad es necesario establecer y definir varios aspectos del diseño experimental. El principal de ellos es la claridad en los objetivos del estudio.

Entre los objetivos del experimento pueden incluirse:

1. Determinar cuales variables x tienen mayor influencia en la respuesta y (Ejemplo: ¿Qué variables afectan el contenido de uno o varios ácidos grasos en mis muestras?, (temperatura, salinidad, profundidad, iluminación, nutrientes).
2. Determinar el mejor valor de las variables x que influyen en y , de modo que y tenga casi siempre un valor cercano al valor nominal deseado. (Ejemplo: en que temporada, o con qué dieta el contenido de un ácido graso es mayor).
3. Determinar el mejor valor de las x que influyen en y , de modo que la variabilidad de y sea pequeña. (Ejemplo: qué temperatura causa menos estrés térmico o qué salinidad causa

menos estrés salino permitiendo una menor variabilidad en el contenido de uno o varios ácidos grasos).

4. Determinar el mejor valor de las x que influyen en y , de modo que se minimicen los efectos de las variables no controladas. (Ejemplo: No controlo la temperatura en colectas de campo, pero sé que ésta afecta más a los juveniles que a los adultos, de modo que colecto y determino preferentemente la composición de adultos).

Para fines de muestreo es importante considerar si las variables que nosotros registramos son las únicas responsables de los cambios observados, ya que la correspondencia entre una variable dependiente y una independiente no forzosamente implica relaciones causa: efecto. El conocimiento de la literatura especializada en el tema de estudio resulta de vital importancia en el diseño experimental, a fin de hacer pruebas sencillas y claras.

Una vez establecido el objetivo del estudio, es importante definir cuales son las variables independientes, los niveles de esas variables k , las variables dependientes y el tamaño de la muestra, tanto en volumen, biomasa o con relación al número de réplicas n .

Los tratamientos serán las variables que controlamos o que conocemos *a priori*, es decir las independientes, como pueden ser la temperatura, salinidad, profundidad, iluminación, nutrientes. Los diseños experimentales pueden incluir un solo tratamiento como variar la concentración de nitrógeno, de carbono, la frecuencia de aplicación de un mutágeno, de la temperatura, o de la luz, o más de uno, como temporada del año y localidad.

Cada uno de estos tratamientos puede tener uno o varios niveles. Así, un experimento que incluya 5 concentraciones distintas de nitrógeno y tres condiciones de iluminación será un experimento con dos tratamientos con 5 y 3 niveles cada uno. En estudios de campo las variables independientes pueden ser condiciones ambientales como profundidad (con tres niveles como superficial (0m), somera (0.5m a 10 m) y profunda (>10m), o temperatura (cálido y templado). Las variables no controladas o variables independientes en el caso de los ácidos

grasos pueden ser uno o más ácidos grasos, por ejemplo los esenciales (18:2 n6 y 18:3 n3), los de importancia funcional (ARA, EPA y DHA) e incluso el perfil completo de los ácidos grasos.

En los estudios de ácidos grasos, se busca analizar el comportamiento de una, dos o más variables independientes. Por ejemplo el comportamiento del EPA en función de distintos niveles de nitrógeno en un cultivo de microalgas, la comparación de los contenidos de EPA y el DHA en distintos estadios de desarrollo del camarón e incluso el análisis de múltiples variables, como el comportamiento del perfil de ácidos grasos de copépodos en distintas localidades de muestreo.

El análisis de una sola variable independiente puede ser meramente descriptivo (por ejemplo cuando no se sabe nada de la especie en cuestión), para lo cual se pueden aplicar medidas de tendencia central (media, mediana, moda) y medidas de desviación (varianza, desviación estándar) e incluso intervalos de confianza. Esta información permite hacer algunas comparaciones con otras especies en la literatura, con otros métodos de extracción o de separación de lípidos.

Un análisis del contenido de ácidos grasos puede dar valores absolutos de los ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$) o relativos (% de un ácido graso con relación a todos los ácidos grasos presentes en la muestra). El tratamiento de uno u otro tipo de datos es diferente debido a que los índices o medidas relativas no suelen mostrar independencia de la media con relación a la variancia, por lo que se recomienda transformar los datos a fin de subsanar este problema (transformación logarítmica, arco seno o raíz cuadrada, entre otras).

El caso más simple de comparación es el de un sólo tratamiento con dos niveles (verano vs. otoño, fase logarítmica vs. fase estacionaria). La prueba de t-Student es aplicable en estos casos siempre que queramos comparar el comportamiento de un solo ácido graso en estas condiciones. La prueba de ANOVA es útil cuando buscamos comparar dos o más tratamientos y cuando cada uno de estos tratamientos tiene dos o más niveles. Es importante recordar que para poder aplicar estas pruebas los datos deben

mostrar homogeneidad de varianzas, la distribución de los datos debe ser normal y la variable de respuesta debe ser continua.

Como recordatorio, los supuestos del análisis de varianza de una vía para muestras independientes son:

1. Que la escala en la cual la variable dependiente es medida, tenga las propiedades de una escala de intervalos iguales.
2. Que las muestras k sean tomadas de manera independiente y aleatoriamente de la población de origen.
3. Que se pueda suponer, razonablemente, que la población de origen tiene una distribución normal.
4. Que las muestras k tienen aproximadamente varianzas semejantes.

Cuando el tamaño de las muestras es igual en todos los casos, el primero, tercero y cuarto supuesto no deben ser muy preocupantes, el segundo siempre lo es. Para ese caso el análisis de varianza es suficientemente robusto, es decir, que los resultados no cambian mucho si se viola cualquiera de estos supuestos. Sin embargo, cuando el tamaño de las muestras no es igual, el efecto de violar cualquiera de estos tres supuestos, es mayor y por tanto puede conducirnos a interpretaciones erróneas de nuestros datos. Una alternativa no paramétrica equivalente al ANOVA de una vía para muestras independientes es la prueba de Kruskal-Wallis (Sokal y Rolf, 1995).

Análisis de más de una variable de respuesta

Cuando lo que se pretende es comparar la composición de más de un ácido graso, es posible hacer varias pruebas de ANOVA para cada ácido graso por separado (al igual que es posible hacer varias pruebas de t para cada variable independiente en lugar de una ANOVA), sin embargo existen mejores herramientas para solucionar esta situación.

Dependiendo de los objetivos del estudio, es posible que solo se desee comparar los perfiles entre dos o más tratamientos y saber si estos son diferentes, sin importar demasiado en donde residen esas diferencias. Si ese es el caso una

prueba de Chi-cuadrada es suficiente para comparar esas distribuciones, o si la naturaleza de los datos demanda un análisis no paramétrico, es posible aplicar una prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Sin embargo, la mayoría de las veces se requiere saber que ácidos grasos contribuyen a las diferencias en los perfiles que observamos. Un análisis MANOVA puede ser la solución, aunque es importante recordar que el MANOVA requiere tamaños de muestra mayores que ANOVA, en total y por grupo. Asimismo, el diseño debe corresponder al número de variables, por ejemplo: con dos o más variables independientes un diseño factorial es más apropiado, otra característica deseable es que las observaciones sean independientes, que las matrices de varianza covarianza sean iguales y que cada variable de respuesta tenga una distribución normal (Sokal y Rolf, 1995).

Cuando una o más de estas condiciones no se cumplen, una buena alternativa es el uso de métodos multivariados, como el análisis de componentes principales, el análisis de factores, el análisis de correlaciones canónicas y el análisis de funciones discriminantes. Nuevamente, su aplicación dependerá de los objetivos del estudio, existen bastantes ejemplos del uso de análisis multivariado utilizando perfiles de ácidos grasos en organismos acuáticos (Mjaavatten, 1997).

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales ha sido empleado recientemente en los estudios de perfiles de ácidos grasos. Este tipo de análisis sirve para detectar que tratamientos o variables dependientes tienen mayores efectos en la composición de cierto perfil de ácidos grasos. Tiene la ventaja de que se prueban todas las variables independientes y dependientes al mismo tiempo, de manera que permite conocer cuales variables de respuesta (cuáles ácidos grasos) son más afectadas por cuales tratamientos. La interpretación de los resultados, sin embargo, requiere de un conocimiento profundo no solo de la biología de las especies, sino de la teoría que fundamenta este tipo de análisis. Es un enfoque determinístico y no requiere de un tamaño de muestra muy grande.

6. REFERENCIAS

- AGILENT TECHNOLOGIES, (2001). Fundamentos de Cromatografía de Gases. Centro Educativo Analítico, 5-70 págs.
- BARNUNG, T.N. y Grahl – Nielsen, O. (1987). The fatty acids profile in Cod (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae. Developmental variations and responses to oil pollution. *Sarsia* 72:412-417.
- BATISTA A., Vetter W. y Luckas, B. (2001). Use of focused open vessel microwave-assisted extraction as prelude for the determination of the fatty acid profile of fish - a comparison with results obtained after liquid-liquid extraction according to Bligh and Dyer. *European Food Research and Technology* 212 (3): 377-384.
- CARRAPISO A. I. y García, C. (2000). Development in lipid analysis: some new extraction techniques and *in situ* transesterification. *Lipids* 35: 1167-77.
- CHRISTIAN, G. D. (1981). Química Analítica. 2a Edición. Limusa México. 684 pp.
- CHRISTIE, W.W. (2003). Lipid Analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. Bridgater, England. 416 pp.
- COHEN, Z., Norman, H. A. y Heimer Y. M., (1995). Microalgae as a source of w3 fatty acids. *En: Plants in human nutrition*. A. P. Simopoulos (ed). *World Review Nutrition Diet Basel, Karger*. 77:1-31.
- GUNSTONE, F.D. (1996). Fatty Acid and Lipid Chemistry. Chapman and Hall. London, U.K. 252 pp.
- KNAPP, D. R. (1979). Handbook of Analytical Derivatization Reactions. John Wiley and Sons, New York, 768 pp.
- LEDERER E. y Lederer, M. (1957). Chromatography, a review of principles and applications 2nd Ed. Elsevier, Amsterdam. 711pp.
- MCLAFFERTY, F. W. y Turecek, F. (1993). Interpretation of mass spectra. 4th Ed. University Sciences Books. Sausalito, CA. 371 pp.
- MCNAIR, H. M. (1981). Cromatografía de gases. Secretaría General de la OEA. Monografía No. 23 Serie Química. Washington D.C. 90 pp.
- MCNAIR, H. M., y Miller J. M. (1997). Basic gas chromatography. New York, E.U. A. 101-123
- MJAAVATTEN O. (1997). Fatty acid profile as a source of information in aquatic animals; a multivariate approach. Doctor Scientiarum Thesis in Chemistry. University of Bergen, Norway. 54 pp
- MORRISON, W. M. y Smith, L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride—methanol. *Journal Lipid Research* 5: 600-608.
- MUKHERJEE, K. D. y Weber, N. (1993). Analysis of Lipids. *En: Handbook of Chromatography*. J. Sherma J. (ed.) CRC Press, Florida. 519 pp.
- PIRETTI, M. V., Pagliuca G. y Vasina M. (1988). Transmethylation of neutral and polar lipids with NaBH₄ in the presence of NaOH. *Chemistry and Physics of Lipids* 47 (2): 149-153.
- SATO, N y Murata, N. (1988). Membrane Lipids. *En: Methods in Enzimology* 167: 251-259.
- SIUZDAK, G. (1996). Mass Spectrometry for Biotechnology. Academic Press, San Diego, CA. 161 pp.
- SOKAL, R. R. y Rohlf, F.J. (1995). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 3rd edition. W. H. Freeman and Co, New York, 887pp. www.cyberlipids.com

El libro
***Métodos y Herramientas Analíticas en la
Evaluación de la Biomasa Microalgal***
se terminó de imprimir en los
Talleres Gráficos del
Centro de Investigaciones Biológicas
del Noroeste, S.C.
en el mes de abril del 2007.
Su tiraje fue de 500 ejemplares.