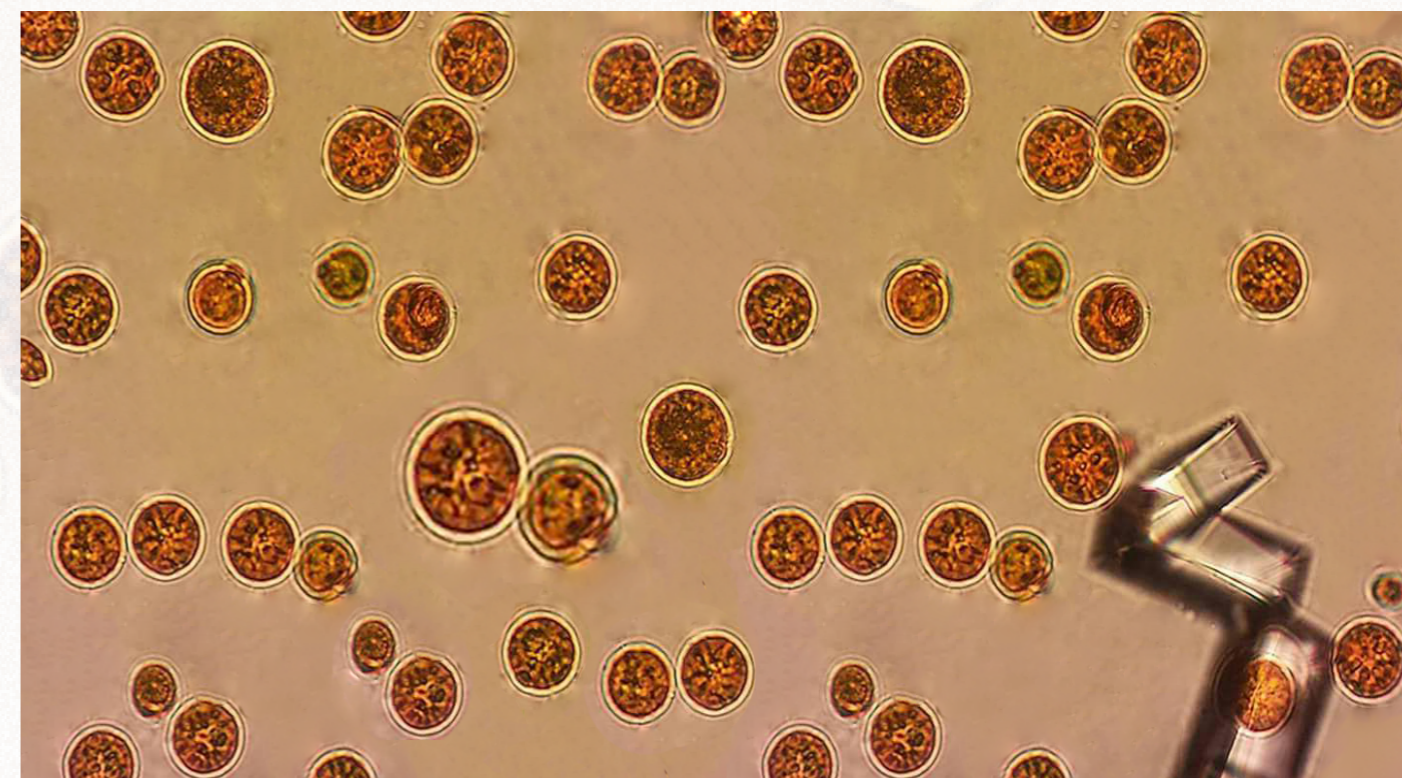




MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL

# MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL

2ª Edición



Editado por:

**Bertha Olivia Arredondo Vega, Domenico Voltolina,  
Tania Zenteno Savín, Mario Arce Montoya, Gracia A. Gómez Anduro**



## **CONTENIDO GENERAL**

<b>PRESENTACIÓN</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iv</b>
1. BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO <i>Laura Carreón-Palau</i>	<b>1</b>
2. MANEJO SEGURO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS <i>Víctor Manuel Moyrón Ibarra</i>	<b>5</b>
3. MÉTODOS DE COLECTA DE MICROALGAS <i>Lourdes Morquecho, Amada Reyes Salinas</i>	<b>16</b>
4. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS DE MICROALGAS <i>Marte Virgen Félix, María Concepción Lora Vilchis</i>	<b>33</b>
5. CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO <i>Bertha Olivia Arredondo Vega, Domenico Voltolina, Beatriz Cordero Esquivel</i>	<b>44</b>
6. DETERMINACIÓN DE PESO SECO Y CONTENIDO ORGÁNICO E INORGÁNICO <i>Bertha Olivia Arredondo Vega, Beatriz Cordero Esquivel, Domenico Voltolina,</i>	<b>51</b>
7. DETERMINACIÓN DE NITRATOS, NITRITOS, FOSFATOS, SILICATOS Y HIERRO POR MICROMÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS <i>María Concepción Lora Vilchis, Gabriela Mendoza Carrión, Roberto Hernández Herrera</i>	<b>55</b>
8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS <i>Bertha Olivia Arredondo Vega, Beatriz Cordero Esquivel, Domenico Voltolina</i>	<b>64</b>
9. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS <i>Bertha Olivia Arredondo Vega, Beatriz Cordero Esquivel, Domenico Voltolina</i>	<b>71</b>
10. DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS TOTALES POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS <i>Bertha Olivia Arredondo Vega, Domenico Voltolina</i>	<b>75</b>
11. TINCIÓN DE GOTAS DE LÍPIDOS CON EL COLORANTE BODIPY Y DETECCIÓN POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA <i>Marte Virgen Félix, María Concepción Lora Vilchis</i>	<b>86</b>

12. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS, LÍPIDOS TOTALES Y ÁCIDOS GRASOS DE MICROALGAS	<b>90</b>
<i>Laura Carreón-Palau, Araceli Cazares Salazar, Víctor Alonso Galván Álvarez, Bertha Olivia Arredondo Vega</i>	
13. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y ESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS	<b>96</b>
<i>Jorge A. Del-Angel Rodríguez, Laura Carreón-Palau, M. Olivia Arjona López</i>	
14. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	<b>112</b>
<i>Orlando Lugo Lugo, Tania Zenteno Savín, Fredy Hernández Uribe, Bertha Olivia Arredondo Vega</i>	
15. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	<b>117</b>
<i>Orlando Lugo Lugo, Tania Zenteno Savín, Fredy Hernández Uribe, Bertha Olivia Arredondo Vega</i>	
16. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SUPER ÓXIDO DISMUTASA (SOD), CATALASA (CAT) Y PEROXIDASAS TOTALES (POX) POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	<b>122</b>
<i>Orlando Lugo Lugo, Tania Zenteno Savín, Fredy Hernández Uribe, Bertha Olivia Arredondo Vega</i>	
17. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MICROALGAS	<b>131</b>
<i>Mario Arce Montoya, Julio A. Hernández González, Mario Rojas Arzaluz, Oskar A. Palacios López, Héctor D. Garza Avelar, Gracia A. Gómez Anduro</i>	

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los participantes y autores de esta obra por su espíritu de colaboración.

Al CIBNOR por las facilidades y apoyo brindado durante los años que hemos trabajado en colaboración con investigadores, técnicos y estudiantes.

Al CONACYT por los proyectos aprobados que nos han permitido dotar de infraestructura nuestros respectivos laboratorios.

A la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez (ICMyL-UNAM de la Unidad Académica de Mazatlán) por facilitar algunos de los equipos, y al técnico Arturo Pedro Sierra Beltrán (CIBNOR, La Paz) por las fotografías (Figura 5B) para ilustrar el capítulo 3.

Al Dr. Rolf Joachim Mehlhorn del Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley, University of California, por su valioso apoyo para el montaje de la técnica de análisis de hierro del capítulo 7.

Al Dr. M. Hermes-Lima de la Universidade de Brasilia, y a sus alumnos por compartir su conocimiento teórico y práctico de las metodologías para cuantificar los indicadores de estrés oxidativo. Así mismo, a Norma Olimpia Olguín-Monroy, a los alumnos y exalumnos del Laboratorio de Estrés Oxidativo por su contribución a la implementación y estandarización de los protocolos descritos en los capítulos 14, 15 y 16.

Al M. en C. Fredy Hernández Uribe por su apoyo en la edición del formato, figuras y tablas de los capítulos, así como por su contribución en los capítulos 14, 15 y 16.

A Eliseo Sánchez Gallegos por la edición al diseño de la portada.

Un agradecimiento especial a **PERKIN-ELMER de México, S. A.** y a la **Dirección General del CIBNOR**, por el apoyo brindado en la impresión y empastado de los ejemplares. Es muy grato saber que contamos con ustedes, ¡gracias mil!

A los miembros del Comité Editorial del CIBNOR por la revisión del documento.

Y a ti joven ficólogo, colega, amigo y lector que eres nuestra principal fuente de inspiración. Este documento que hemos desarrollado después de 10 años de su primera edición, lo hacemos con el mismo entusiasmo y pasión. Nuestro agradecimiento infinito por tener como modelo de estudio a las microalgas.

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), S. C.**  
**La Paz, Baja California Sur, México.**  
**Septiembre, 2017.**

**Bertha Olivia Arredondo Vega, Domenico Voltolina,**  
**Tania Zenteno Savín, Mario Arce Montoya, Gracia Alicia Gómez Anduro.**

## CAPÍTULO 1

# BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO

LAURA CARREÓN PALAU

Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. CIBNOR).  
La Paz, Baja California Sur, 23096, México.  
lcarreon@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. HÁBITOS EN EL LABORATORIO
3. HÁBITOS PERSONALES
4. HÁBITOS DE TRABAJO
5. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** seguridad, sustancias químicas

---

### 1. INTRODUCCIÓN

La principal función de la seguridad en un laboratorio es reducir la posibilidad de accidentes para proteger al personal y las instalaciones (Santos y Cruz-Galván, 2002). Los responsables técnicos de los laboratorios son los encargados del procesamiento y manejo de las sustancias químicas en forma segura, así como de verificar que cualquier persona que trabaje en el laboratorio conozca, entienda y atienda las recomendaciones de seguridad. Dichas recomendaciones se encuentran en el reglamento general de la institución y del laboratorio en particular. Además, es el conducto para informar a las autoridades de las deficiencias en las instalaciones, equipo de seguridad, o de las normas para lograr que la operación de las sustancias químicas sea segura.

El objetivo de este capítulo es que cualquier persona de cualquier institución que realice entrenamiento técnico, estancia de capacitación o tesis en un laboratorio, conozca los conceptos

básicos de seguridad como parte fundamental del quehacer científico y realice su trabajo diario con buenas prácticas de seguridad. Se sugiere la lectura de este capítulo antes de iniciar el trabajo en el laboratorio.

### 2. HÁBITOS EN EL LABORATORIO

La organización del laboratorio se debe adecuar para el mantenimiento de un buen nivel preventivo. Por lo que es importante:

1. Uso obligatorio de bata y equipo de protección (guantes, mascarilla, gafas).
2. No trabajar solo(a) en el laboratorio y especialmente fuera de horas hábiles cuando se realicen análisis, así como operaciones que sean de riesgo.
3. Antes de iniciar el trabajo de laboratorio revisar el procedimiento del análisis, solicitar la hoja de seguridad al responsable técnico del laboratorio y asegurarse de entender las indicaciones de uso y desecho de los reactivos.
4. Informar al responsable técnico y a las personas presentes en el laboratorio cuando se realicen procedimientos de riesgo.
5. Trabajar en las campanas de extracción siempre que se manipulen productos tóxicos o inflamables. Es importante

- comprobar periódicamente su funcionamiento correcto.
6. Almacenar los reactivos protegidos del sol, no guardarse en estanterías altas, asegurar su etiquetado y mantenerlos en las cantidades imprescindibles.
  7. No deben utilizarse refrigeradores convencionales de laboratorio para almacenar comida, agua potable, refresco u otro tipo de líquidos. No debe de contener productos inflamables, si no han sido modificados para reducir el riesgo de chispas.
  8. La disposición final de los residuos peligrosos es responsabilidad del Departamento de Residuos de cada institución, el cuál de manera periódica, deberá de recoger de los laboratorios, dichos residuos.
  9. Los residuos peligrosos nunca se deben eliminar por el desagüe, ni en pequeñas cantidades. Productos tales como: muy tóxicos, tóxicos, pestilentes, lacrimógenos, no biodegradables y cancerígenos, así como los que reaccionan violentamente con el agua.
  10. Colocar los residuos (líquidos y sólidos) en un sitio específico del laboratorio. Los nuevos miembros de un laboratorio, deberán preguntar al responsable técnico la ubicación de dicho sitio y el procedimiento para colocar los residuos en recipientes adecuados.

## INVENTARIO

Un inventario es un listado de las sustancias químicas de un laboratorio. El inventario sirve para el personal de respuesta a emergencias porque contiene los riesgos asociados a las sustancias químicas como reactivos con agua, de bajo punto de ignición, agentes oxidantes, gases comprimidos, entre otros.

El inventario del cualquier laboratorio de investigación deberá contar con una bitácora para el registro de las sustancias químicas, y deberá estar organizado en una base de datos, con la siguiente información: Número

consecutivo, nombre comercial, número CAS (Chemical Abstracts Service), grado de riesgo para la salud, inflamabilidad y reactividad, así como si tiene algún riesgo especial. Las sustancias químicas se almacenan de acuerdo a su compatibilidad, sinónimo de afinidad química basándose en la tabla de compatibilidad de Bethrick. En ésta se indican las sustancias del laboratorio que no deben almacenarse juntas (Tabla 1).

La bitácora del registro de las sustancias químicas, deberá contener la cantidad y frecuencia de uso.

El laboratorio deberá contar con equipo de protección como guantes, máscaras, gafas que estarán a disposición de los integrantes del laboratorio. La bata es un requisito obligatorio de protección y seguridad, y todo el personal que esté en un laboratorio deberá siempre traerla puesta.

Tabla 1. Tabla de compatibilidad de Bethrick

COMPUESTO QUIMICO	NO MEZCLAR CON:
Ácido acético	Acido crómico, ácido nítrico, etilenglicol, ácido perclórico, peróxidos, permanganatos ni compuestos que tengan hidroxilos.
Ácido nítrico	Ácido acético, ácido crómico, ácido sulfúrico, aminas aromáticas, fenoles, carbón, líquidos inflamables, gases, sustancias nitrogenadas, alcoholes ni carburos.
Ácido oxálico	Plata, mercurio ni agentes oxidantes
Ácido perclórico	Anhídrido acético, bismuto y sus derivados, alcoholes, papel, madera, cartón ni otros materiales orgánicos oxidables.
Ácido sulfúrico	Cloruros, cloratos, percloratos,

	permanganatos, carburos ni metales.
Amoniaco anhidro	Halógenos, mercurio, hipoclorito de calcio, ácido fluorhídrico, sales de plata ni zinc.
Anilinas	Halógenos, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, ni otros agentes oxidantes fuertes
Bromo	Amoniaco, acetileno, butadieno, butano, hidrógeno, carburo de sodio, turpentina, ni metales divididos finamente.
Cianuros	Ningún ácido.
Cloratos	Sales de amonio, ácidos, polvos metálicos, azufre, carbón, compuestos químicos finamente divididos ni otros combustibles o reductores
Cloro	Amoniaco, acetileno, butadieno, butano, benceno ni otros derivados del petróleo, hidrógeno, carburo de sodio, turpentina, ni polvos metálicos finos.
Hidrocarburos	Flúor, cloro, bromo, ácido crómico, peróxido de sodio.
Yodo	Acetileno, amoniaco (acuoso o anhidro).
Mercurio	Acetileno, ácido fúlmico, amoniaco, azidas ni cobre.
Metales alcalinos y alcalinotérreos (sodio, calcio y potasio)	Agua, dióxido de carbono, tetracloruro de carbono, ni compuestos clorados en general.
Nitrato de amonio	Ácidos, líquidos inflamables, cloratos, nitratos, azufre, polvo de metales, ni materiales orgánicos combustibles finamente divididos.
Oxígeno	Líquidos inflamables, gases y aceites.
Pentóxido de fósforo	Agua, alcoholes
Permanganato de potasio	Etilenglicol, glicerina, benzaldehído, ni ácido sulfúrico.
Peróxido de hidrógeno	Cobre, cromo, fierro, plata, zinc,

	manganeso, y la mayoría de los metales y sus sales, líquidos inflamables, anilinas, nitrometano.
Peróxido de sodio	Metanol, etanol, ácido acético glacial, anhídrido acético, benzaldehído, disulfuro de carbono, glicerina, etilenglicol o acetil acetato.

### 3. HÁBITOS PERSONALES

En el quehacer científico es muy importante la actitud personal para evitar accidentes, así como para obtener resultados de calidad. Parte de una buena actitud es la disciplina de hacer las cosas lo mejor posible siempre, pero también se necesita una actitud crítica para detectar condiciones inseguras y proponer como mejorarlas.

Las buenas prácticas personales incluyen:

1. Mantener en todo momento las batas abrochadas.
2. No abandonar objetos personales en mesas de trabajo
3. No escuchar música en los teléfonos celulares.
4. No comer ni beber en el laboratorio.
5. No guardar alimentos ni bebidas en los refrigeradores del laboratorio.
6. No fumar en el laboratorio, ni en el edificio.
7. Las batas no deben llevarse a lugares de uso común como bibliotecas, cafeterías, comedores, pasillos, sanitarios, auditorios.
8. Es recomendable usar gafas de seguridad cuando se manipulen productos químicos o líquidos en ebullición, o mejor trabajar en la campana de extracción con la ventana lo más abajo posible.
9. No utilizar lentes de contacto en el laboratorio.
10. No es aconsejable guardar la ropa de calle en el laboratorio.

11. Lavarse las manos antes de abandonar el laboratorio, al quitarse los guantes protectores y siempre que se haya estado en contacto con material irritante, cáustico, tóxico o infeccioso.

#### 4. HÁBITOS DE TRABAJO

El trabajo en el laboratorio debe iniciarse una vez que el diseño experimental esté plenamente discutido y sea acorde con la hipótesis planteada, de esta forma la persona que realice el trabajo tendrá claridad en la interpretación de los resultados que espera y se evitará la repetición de análisis, así como el desperdicio de reactivos y la generación de residuos químicos peligrosos y no peligrosos.

Los buenos hábitos de trabajo incluyen:

1. Recibir entrenamiento técnico antes de trabajar en un laboratorio.
2. No manipular un producto químico sin conocer sus características físico-químicas y toxicológicas.
3. Si la sustancia es muy tóxica buscar una menos tóxica que la sustituya o un método alternativo, siempre que sea posible.
4. Deberán conocerse la clasificación de riesgos incluidos en la etiqueta del envase con el código de colores de acuerdo a la **Norma Oficial Mexicana (NOM-018-STPS-2000)** y que deberá estar a la vista de todo el personal del laboratorio, por ejemplo, puede estar a un costado de la campana de extracción.
5. No usar material de vidrio roto ni llenar los tubos de ensayo a más de dos o tres centímetros de la boca del tubo.
6. No llevar tubos de ensayo ni productos en los bolsillos de las batas.
7. Utilizar en todo momento gradillas y soportes.
8. Transportar los productos en bandejas o recipientes adecuados y/o especiales para evitar derrames en caso de roturas.
9. No tocar con las manos ni ingerir los productos químicos.
10. No trabajar separado de la mesa, dejar máximo 10 centímetros de separación.

11. No efectuar pipeteos con la boca, utilizar una pro-pipeta para la succión.
12. Asegurarse del enfriamiento de los materiales antes de usar directamente las manos para moverlos o usar guantes de protección térmica.
13. Utilizar el equipo de protección siempre que se trabaje con sustancias peligrosas de acuerdo al código de colores. Preguntar al responsable técnico del laboratorio la ubicación del código y asegurarse de entenderlo. Dicho código se ubica en un lugar fácil de detectar, por ejemplo, a un costado de la campana de extracción.
14. Al terminar el trabajo, asegurarse de cerrar la llave del agua y los gases para evitar fugas. Preguntar al responsable técnico donde colocar los residuos de las reacciones. Los contenedores de residuos se encuentran en el almacén de residuos peligrosos del laboratorio. Desechar el agua usada en la tarja si no estuvo en contacto con sustancia tóxicas y si lo estuvo colocarla en el frasco de residuos que corresponda.
15. Al finalizar una tarea u operación, recoger el material usado, colocar los reactivos en su sitio, apagar los equipos y desconectarlos.
16. Usar y almacenar productos inflamables en las cantidades imprescindibles. No usar mecheros ni ninguna fuente de ignición para evitar un incendio.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

**SANTOS, E.,** Cruz-Galván, I. 2002. Manual de procedimientos de seguridad en los laboratorios de la UNAM. 2ª. Edición. Dirección General de Incorporación y Revalidación de Estudios. Universidad Nacional Autónoma de México. (UNAM), México, 109 págs.



## CAPÍTULO 2

# MANEJO SEGURO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

VÍCTOR MANUEL MOYRON IBARRA

Subcoordinación Técnica de Enlace. Coordinación de Servicios.  
Especializados y Proyectos Institucionales (COSEPI).  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR).  
La Paz, Baja California Sur, 23096, México.  
vmoyron@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. OBJETIVO
3. ALCANCE
4. DEFINICIONES
5. TRABAJO SEGURO EN EL LABORATORIO
6. MANIPULACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS EN EL LABORATORIO
7. PRIMEROS AUXILIOS
8. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** seguridad, sustancias químicas

---

### 1. INTRODUCCIÓN

La Prevención de los Riesgos Laborales es una prioridad en cualquier centro de trabajo. Además de ser una obligación legal, moral y social del empleador, requiere del compromiso y la participación activa de todos los integrantes de la organización. El presente capítulo, tiene la finalidad de implementar y optimizar la prevención de riesgos laborales en este campo específico, el cual reúne los conceptos más modernos sobre el tema, agrupados y desarrollados en forma ordenada y didáctica, para una sencilla lectura y comprensión de sus contenidos. Aquí se indican los aspectos esenciales vinculados a la prevención de riesgos

laborales tanto en la clasificación como en el manejo de sustancias químicas y materiales peligrosos, desde su transporte, almacenamiento, manipulación y utilización, incluyendo las acciones en caso de emergencia.

### 2. OBJETIVO

El objetivo de este capítulo es conocer los conceptos básicos de seguridad como parte fundamental del quehacer científico durante el trabajo diario con buenas prácticas de seguridad. La información presentada en este capítulo está basada en el manual para el manejo seguro de sustancias químicas (2017. Manual para el manejo seguro de sustancias químicas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.) Y se sugiere la lectura antes de iniciar el trabajo en el laboratorio.

### 3. ALCANCE

Este documento es aplicable al personal científico, técnicos y estudiantes expuestos, ya que en sus funciones sustantivas de docencia e investigación involucran la manipulación de productos y sustancias químicas, así como también en sus procesos de mantenimiento de la infraestructura física y tecnológica.

### 4. DEFINICIONES

- **Accidente laboral:** Es todo suceso repentino que sobrevenga por causa o con ocasión del trabajo, y que produzca en el trabajador una lesión orgánica, una perturbación funcional, una invalidez o la muerte. Es también

accidente de trabajo aquel que se produce durante la ejecución de órdenes del empleador, o durante la ejecución de una labor bajo su autoridad, aun fuera de lugar y horas de trabajo.

- **Acto inseguro:** comportamiento que podría dar paso a la ocurrencia de un accidente.

- **Almacenamiento:** Es el depósito temporal de residuos o desechos peligrosos en un espacio físico definido y por un tiempo determinado con carácter previo a su aprovechamiento y/o valorización, tratamiento y/o disposición final.

- **Contenedor primario:** Recipiente que entrega el proveedor con la sustancia química.

- **Contenedor secundario:** Recipiente donde se deposita y/o trasvasa una sustancia química.

- **Derrame:** Fuga, descarga o emisión, producida por práctica o manipulación inadecuada de las sustancias peligrosas.

- **Disposición final:** Es el proceso de aislar y confinar los residuos o desechos peligrosos, en especial los no aprovechables, en lugares especialmente seleccionados, diseñados y debidamente autorizados, para evitar la contaminación y los daños o riesgos a la salud humana y al ambiente.

- **Enfermedad:** Condición física o mental adversa identificable, que surge, empeora o ambas, a causa de una actividad laboral, una situación relacionada con el trabajo o ambas.

- **Enfermedad profesional:** Todo estado patológico que sobrevenga como consecuencia obligada de la clase de trabajo que desempeña el trabajador o del medio en que se ha visto obligado a trabajar, bien sea determinado por agentes físicos, químicos.

- **Elemento de protección personal:** Todo elemento fabricado para preservar el cuerpo humano, en todo o en

parte, de riesgos específicos de accidentes del trabajo o enfermedades profesionales.

- **Evacuación:** Es la acción de desalojar una unidad, servicio o lugar, en que se ha declarado una emergencia.

- **Extintor:** Equipo con propiedades físicas y químicas diseñado para la extinción inmediata del fuego.

- **Factor de riesgo:** Existencia de elementos, fenómenos, condiciones, circunstancias y acciones humanas, que pueden producir lesiones o daños.

- **Fuente de riesgo:** Condición/acción que genera el riesgo.

- **Higiene industrial:** Conjunto de actividades destinadas a la identificación, evaluación y control de los factores de riesgo del ambiente de trabajo que puedan alterar la salud de los trabajadores, generando enfermedades profesionales.

- **Hoja de seguridad:** Documento que describe los riesgos de un material peligroso y suministra información sobre cómo se puede manipular, usar y almacenar el material con seguridad.

- **Incompatibilidad:** Es el proceso que sufren las mercancías peligrosas cuando puestas en contacto entre sí puedan sufrir alteraciones de las características físicas o químicas originales de cualquiera de ellos con riesgo de provocar explosión, desprendimiento de llamas o calor, formación de compuestos, mezclas, vapores o gases peligrosos, entre otros.

- **Impacto ambiental:** Cualquier cambio en el ambiente, ya sea adverso o beneficioso, como resultado total o parcial de los aspectos ambientales de una organización.

- **Incendio:** Fuego de grandes proporciones que provoca daños a las personas a las instalaciones y al medio ambiente.

- **Neutralizar:** Hacer que una sustancia química sea neutra, que pierda su carácter ácido o básico.

- **Peligro:** Fuente, situación, o acto con un potencial de daño en términos de lesión o enfermedad, o una combinación de éstas.

- **Prevención:** Es el conjunto de acciones dirigidas a identificar, controlar y reducir los factores de riesgo biológicos, del ambiente y de la salud, que puedan producirse como consecuencia del manejo de los residuos de que trata el presente decreto, ya sea en la prestación de servicios de salud o cualquier otra actividad que implique la generación, manejo o disposición de esta clase de residuos, con el fin de evitar que aparezca el riesgo o la enfermedad y se propaguen u ocasionen daños mayores o generen secuelas evitables.

- **Producto químico:** Designa los elementos y compuestos químicos, y sus mezclas, ya sean naturales o sintéticos.

- **Reactivos:** Son aquellos que por sí solos y en condiciones normales, al mezclarse o al entrar en contacto con otros elementos, compuestos, sustancias o residuos, generan gases, vapores, humos tóxicos, explosión o reaccionan térmicamente, colocando en riesgo la salud humana o el medio ambiente.

## 5. TRABAJO SEGURO EN EL LABORATORIO

En los laboratorios de trabajo son lugares donde se desarrollan actividades experimentales además de docencia. Debido a los procesos que allí se realizan y a los materiales, equipos y sustancias que en ellos permanecen, son espacios potencialmente riesgosos. Sin embargo, si trabajamos bajo las normas de seguridad, manejamos adecuadamente las sustancias, equipos y materiales, y seguimos las indicaciones de los docentes y auxiliares se tendrán menos riesgos en los laboratorios.

Todas estas lesiones y otras enfermedades, además de algunos riesgos, pueden prevenirse haciendo uso adecuado del equipo de protección personal indicado en cada laboratorio y tomando las siguientes medidas:

### a. Medidas que el responsable del laboratorio debe indicar a todo personal que ingrese al laboratorio:

- Establecer las normas de seguridad internas, de acuerdo a las actividades, uso y manejo de sustancias químicas y su frecuencia.
- Hacer cumplir las normas de seguridad internas a todo personal que trabaje en el laboratorio.
- No permitir la manipulación de sustancias químicas sin supervisión.
- Verificar que se utilicen correctamente los equipos de protección personal y equipos de protección colectiva.
- Verificar el estado y funcionamiento adecuado de los equipos de protección colectiva.
- Reportar al responsable del área, la necesidad de reemplazo de los equipos de protección personal y colectiva, cuando estos lleguen al final de su vida útil, o bien estén en malas condiciones para su uso.
- Informar inmediatamente al personal de nuevo ingreso y estudiantes, sobre las normas de trabajo y protocolos existentes.
- Mantener los suministros en el botiquín de primeros auxilios y solicitar los implementos faltantes al área de salud laboral.
- En los laboratorios se debe establecer un manejo correcto de las sustancias químicas que se utilizan, así como formar e informar a los estudiantes sobre el riesgo en el manejo de sustancias químicas y monitorear continuamente dicho manejo.

### b. Medidas que debe adoptar toda persona que ingrese al laboratorio

#### 1) Aspectos generales de conducta

##### a) Está prohibido:

- Fumar, comer o ingerir bebidas con excepción de agua natural.
- Almacenar alimentos de consumo personal en las áreas de trabajo.
- Portar pulseras, anillos, bufandas, y otro tipo de accesorios personales

durante la manipulación de sustancias químicas.

- La aplicación de cosméticos durante la manipulación de sustancias químicas.
- Usar el cabello suelto durante la manipulación de sustancias químicas.
- Usar pantalón corto, faldas cortas, zapatos de tacón, zapatos abiertos, sandalias o zapatos hechos de tela durante la manipulación de las sustancias químicas.
- Utilizar equipos electrónicos personales durante la manipulación de sustancias químicas.
- Si se cuenta con una herida, evitar manipular sustancias químicas o bien usar un vendaje que la cubra.
- No se manipule lentes de contacto en el laboratorio, a no ser que sea para removerlos y poder usar la fuente lavaojos en caso de una emergencia.
- Mantenga en orden y limpieza los lugares de trabajo, antes, durante y después de la manipulación de sustancias químicas.
- Lávese las manos al entrar y salir del laboratorio.
- No corra dentro del laboratorio, en casos de emergencia mantenga la calma, transite rápidamente y conserve su derecha, **recuerde No corro, No empujo, No grito.**

## 2) Aspectos de seguridad laboral

- a) Antes de manipular cualquier sustancia química, debe consultar las fichas de seguridad correspondientes, léelas detenidamente y comprenda el numeral **“Controles de exposición/protección personal”**.
- b) Lea detenidamente las etiquetas de las sustancias químicas o mezclas que

se emplearán antes de su uso para evitar un accidente.

- c) Identifique la ubicación y uso de los equipos de seguridad con que cuenta el laboratorio (regaderas de emergencia, sistemas lavaojos, kit de derrames, etc.).
- d) Conozca donde se ubican las hojas de seguridad de las sustancias químicas que se usan en el laboratorio.
- e) No realice experimentos sin la autorización del responsable del laboratorio.
- f) Conozca la metodología y procedimientos para el trabajo a realizar en el laboratorio.
- g) Use el equipo de protección personal dentro del laboratorio exclusivamente.
- h) Utilice los equipos de protección personal, de acuerdo al riesgo al cual está expuesto y determinados para el tipo de trabajo que realice (gafas, guantes, máscara); revíselos continuamente para que sepa reconocer cuál es el momento de renovarlos, límpielos y desinféctelos frecuentemente, para que así cumplan con la función de protegerlo.
- i) La vestimenta deberá ser apropiada y cómoda, que facilite la movilidad para la actividad que se desarrolla en los laboratorios. Debe cubrir áreas considerables de la piel como los pantalones, blusas con mangas.
- j) Use calzado cerrado que cubra completamente el pie.
- k) Nunca se deberá emplear recipientes alimenticios para contener productos químicos.
- l) No utilice vidrio agrietado, el material de vidrio en mal estado aumenta el riesgo de accidente.
- m) Durante el trabajo en el laboratorio cuando se tenga que hacer una reacción química, se debe escoger el recipiente adecuado para la cantidad que se va a usar, recordar siempre hacerlo dentro de una campana de extracción.
- n) No realice trabajos en zonas con ventilación deficiente.

- o) Si cuenta con sistemas de extracción y renovación mecánica de aire activados, manténgalos siempre en funcionamiento.
- p) Debe utilizar las campanas extractoras siempre que sea posible.
- q) No devolver nunca a los frascos de origen los sobrantes de las sustancias utilizadas.
- r) Al momento de trabajar con ácido o bases, para diluirlos **vierta el ácido sobre el agua, nunca, al contrario.**
- s) Nunca se deben arrojar químicos sólidos a la tarja de lavado. Se vierte el líquido que los acompaña, se lavan por decantación con agua y se disponen en el sitio que se indique. Recordar que no se deben de verter sustancias químicas al drenaje.
- t) En caso de producirse un accidente, quemadura o lesión, comuníquelo inmediatamente al responsable del laboratorio y acuda al dispensario médico.
- u) Debe asegurarse de la desconexión de equipos, agua y gas al terminar el trabajo.
- v) Antes de salir del laboratorio quítese los Equipos de Protección Personal y ubíquelos en el espacio destinado para tal fin.

## 6. MANIPULACION DE SUSTANCIAS QUIMICAS EN EL LABORATORIO

Tener conocimiento sobre la peligrosidad, es la base fundamental del manejo de sustancias químicas, ya que la recepción, clasificación, almacenamiento y trasvase de sustancias químicas, son labores que implican riesgo para quienes tienen contacto con este tipo de sustancias, a su vez son generadores de impactos negativos para el ambiente. Por lo tanto, la manipulación segura de los productos químicos, implica describir las responsabilidades, los procedimientos y prácticas principales que se deben llevar a cabo durante cada actividad, minimizando

el riesgo de exposición del personal del laboratorio, así como del entorno en general.

### a. Recepción de sustancias químicas

Al momento de recibir sustancias químicas verifique lo siguiente:

- Solicite la ficha de seguridad, previendo todas las medidas necesarias para la manipulación posterior.
- Verifique que las sustancias químicas estén debidamente etiquetadas y que los contenedores estén en buenas condiciones.
- Revise que las etiquetas de cada sustancia química tenga como mínimo:
- Identificación del producto (nombre químico de la sustancia o nombre comercial del preparado).
- Identificación de peligros (pictogramas).
- Se debe mantener el inventario de sustancias químicas actualizado.

### b. Clasificación de las sustancias químicas

Al momento de clasificar sustancias químicas.

- Identifique el tipo de peligro de la sustancia en la etiqueta o en la ficha de seguridad.
- Clasifique las sustancias de acuerdo al tipo pictograma de peligro.
- Agrupe las sustancias químicas con la misma clase de peligro.
- Evite la mezcla de los solventes.
- Aísle aquellas sustancias que por sus características fisicoquímicas (cancerígenas, tóxicas, inflamables, entre otros), deben permanecer bajo estrictas condiciones de seguridad.

### c. Almacenamiento de las sustancias químicas

El personal que tenga dentro de sus funciones el almacenamiento de las sustancias químicas debe:

- Asegurarse que las sustancias químicas estén debidamente etiquetadas.
- Para el caso de no existir información del numeral inmediatamente anterior, elabore la etiqueta para poder identificar la muestra.

- Asegurarse que el sitio de almacenamiento se mantenga en buenas condiciones de orden y aseo.
  - Cerciorarse que el sitio de almacenamiento sea exclusivo para las sustancias químicas.
  - Cerciorarse que el sitio de almacenamiento de las sustancias químicas cumple con los siguientes requisitos: ventilación, iluminación, sistemas de drenaje, señalización, estructura y sistemas de seguridad (contra incendios y para la salud).
  - Conocer la ubicación de las hojas de seguridad, equipos, dispositivos y salidas de emergencia.
  - El almacenamiento de las sustancias químicas debe hacerse en niveles seguros, en armarios o en estanterías estables (ancladas a la pared) a una altura superior sobre el nivel de los ojos, **NO almacene sustancias químicas a nivel del piso.**
  - Los reactivos que requieran refrigeración deben estar muy bien cerrados y en refrigeradores seguros, libres de alimentos.
  - Cuando se disponga de grandes cantidades de líquidos inflamables, estos deben ser almacenados en el exterior del laboratorio.
- transvasado algún producto químico o donde se hayan envasado mezclas, identificando su contenido, a quién pertenece y la información sobre su peligrosidad (reproducir el etiquetado original).
- Tenga a la mano un kit anti derrames, previendo posibles derrames. No utilice trapos ni papel.
  - Solo transportar sustancias dentro del laboratorio a trasvasar menores de 4 L.
  - Al momento de realizar el trasvase, el lugar debe tener ventilación, preferentemente bajo sistemas de extracción localizada, que capte las emisiones contaminantes para evitar intoxicaciones.
  - Cuando trasvase sustancias químicas altamente peligrosas (sustancias cancerígenas, mutágenas, teratógenas), realícelo dentro de una cabina extractora de gases y vapores.
  - Si la sustancia es un ácido, hidróxidos alcalinos o metales alcalinos, se recomienda trabajar con pequeñas cantidades y adicionar estas sustancias poco a poco sobre el agua, para evitar dar lugar a reacciones fuertemente exotérmicas.
  - Si la sustancia es inflamable, debe efectuar el trasvase lejos de fuentes de calor.
  - Evite el trasvase de sustancias por vertido libre cuando el contenido supera los 4L.
  - Después de abrir el contenedor principal de la sustancia a trasvasar, deje un espacio de tiempo de 30 s a 1 min, antes de iniciar el trasvase.
  - Verifique continuamente el nivel de llenado del contenedor secundario. Tenga presente que solo se puede llenar las  $\frac{3}{4}$  partes del volumen del mismo.
  - Disponga de sistemas de visualización o indicadores de nivel, para evitar derrames o salpicaduras.
  - Permita un tiempo de relajación entre 30 s a 1 min, antes de proceder a tapar los contenedores.
  - Tape los contenedores.

#### d. Trasvase de las sustancias químicas

Planificación de la actividad de trasvase:

- Consulte la información sobre las características fisicoquímicas de los productos químicos, antes de iniciar cualquier operación con ellos.
- Disponga de todos los elementos de protección personal necesarios para realizar la actividad.
- Disponga de etiquetas para rotular el envase que contendrá la sustancia. No sobreponga etiquetas ni reutilice envases sin quitar la etiqueta original.
- Se debe etiquetar adecuadamente los frascos y recipientes a los que se haya

- En caso de ocurrir algún derrame, emplee inmediatamente las sustancias neutralizadoras para cada caso y el kit anti derrames.
- Etiquete el contenedor secundario, transmitiendo en la etiqueta la información necesaria para su manipulación, nombre de las sustancias, peligros asociados, fecha de vencimiento.

#### e. Manejo de sustancias químicas

Durante la manipulación de sustancias químicas peligrosas se debe de atender los siguientes puntos:

- Utilice los equipos de protección personal indicados en la hoja de seguridad de cada sustancia.
- NO debe PIPETEAR sustancias químicas con la boca.
- NO debe OLFATEAR directamente el contenido de un frasco.
- NO debe PROBAR ninguna sustancia química.
- Los frascos de los reactivos deben cerrarse inmediatamente después de su uso, durante su utilización los tapones deben depositarse siempre boca arriba sobre la mesa.
- Se deben reconocer los productos peligrosos que existen en el laboratorio.
- Los envases deben llenarse hasta un 80 % de su capacidad, para evitar salpicaduras y derrames.
- Identifique de manera correcta las sustancias de trabajo, teniendo en cuenta la información contenida en las **Fichas de Seguridad**, y las precauciones individuales de los reactivos de partida para la preparación de mezclas.
- Los volúmenes de ácidos, bases concentradas y disolventes orgánicos se miden con probetas, en el caso tal, que deba medir volúmenes exactos, utilice manualmente peras de succión o pipeteadores.

- Nunca se debe calentar directamente a la llama los líquidos inflamables (alcohol, gasolina, acetona, otros), ni acercarlo a un mechero o fuentes de calor. Solo se pueden calentar hirviendo a reflujo con un refrigerante que impida la salida de vapores, y en caso de requerir calentar tubos con dichos productos, se hará al baño María.
- Nunca utilizar envases que estén deteriorados o rotos, pueden causar posibles: accidentes, o derrames de sustancias químicas en el lugar de almacenamiento.
- Antes de utilizar alguna sustancia química observe si existen cambios en la forma del envase por el aumento de presión, formación de sales en el exterior de este, si los hay manejar la sustancia como un residuo.

#### f. Derrame de sustancias químicas

Durante el desarrollo de las diferentes actividades de los laboratorios se pueden presentar derrames de sustancias químicas, los cuales no solo afectan el desarrollo de las actividades sino también, pueden suponer un riesgo para la integridad del personal, de los equipos y del medio ambiente al ser tratados inadecuadamente. Es importante que el laboratorio o área de trabajo disponga de un kit de derrames.

#### En el instante de derrame se deben seguir los siguientes pasos:

- Pida ayuda.
- Alerta a todas las personas que podrían estar en riesgo para evitar que ellos se expongan al peligro y así minimizar su propagación.
- Utilice los elementos de protección personal.
- Evite el contacto directo con la sustancia derramada.
- Localice el origen del derrame.
- Identifique la sustancia derramada (de la etiqueta del envase), estableciendo los riesgos.

- Detenga el derrame lo más pronto posible regresando el recipiente a su posición segura o eliminando las fugas.
- Si el material derramado es inflamable, elimine (si es posible) al máximo los focos de ignición apagando adicionalmente equipos e instrumentos que se encuentren en el área afectada, extinga todas las llamas, corte el suministro del gas del laboratorio y de los laboratorios adyacentes.
- Proceda a evacuar el área si el material derramado entró en contacto con otra sustancia química y se observa reacción (emisión de gas, incendio, otro.)
- Evite la respiración de vapores del material derramado.
- Ventile el área (abra las ventanas si es posible).
- Coloque una señal de advertencia que diga "Piso mojado y resbaloso", salpique algún absorbente sobre el punto del derrame. Se debe tener cuidado porque la vermiculita, así como los demás absorbentes pueden crear el peligro de resbalar si éste está disperso sobre una superficie húmeda.
- Todo incidente debe ser informado al jefe inmediato, con el fin de tomar medidas correctivas.
- Comunique el incidente al responsable del área.

**Al detener y controlar el derrame se deben de seguir los siguientes pasos:**

- Disponga del equipo de protección personal al momento de realizar la limpieza del derrame.
- Si el vertido es un sólido, recogerlo con una escoba y recogedor, y depositarlo en una bolsa resistente, debidamente etiquetada como residuo peligroso.
- Si el vertido es líquido, contenerlo con un absorbente, y proteger los

sumideros del suelo, para evitar que el derrame llegue al alcantarillado.

- Elija el material absorbente apropiado, dependiendo de las características de la sustancia derramada. Colocar el material absorbente sobre toda el área del derrame, trabajando en círculos desde afuera hacia dentro. Adicionar, la cantidad de absorbente necesario para la sustancia derramada. Prestar atención a los desniveles y zonas situadas detrás de aparatos e instalaciones.
- Se denominan pequeños derrames de líquidos sobre el piso o sobre las mesas de laboratorio: si la cantidad es menor de 200 mL.
- Si ha ocurrido un derrame grande de líquido, haga una barrera en el suelo con un material absorbente y un retenedor.
- Trate el derrame tal como lo indica la ficha de seguridad de la sustancia química involucrada.
- Recoja los residuos resultantes del proceso con ayuda de una escoba y un recogedor.
- Recoja el vidrio roto (si lo hay) con pinzas o guantes adecuados y guardarlo en un recipiente adecuado.
- Disponga de los residuos en bolsas rojas.
- Descontamine la superficie de las áreas contaminadas, con un detergente suave y agua, cuando sea prudente.

**g. Residuos peligrosos**

**Durante la generación de residuos químicos peligrosos.**

- Identifique las sustancias químicas que conforman el residuo generado. En caso de ser mezcla tomar en cuenta la reacción entre los componentes.
- Determinar la peligrosidad del residuo.
- Seleccione el contenedor primario apropiado, teniendo en cuenta:
- La compatibilidad del envase con la sustancia a almacenar, con base en las propiedades fisicoquímicas de los residuos como inflamabilidad, corrosión, contenido de halógeno, reactividad, toxicidad y combustión.



- Vierta de forma lenta y controlada el residuo dentro del contenedor. Esta operación se debe interrumpir, si observa cualquier fenómeno anormal como la producción de gases o el incremento excesivo de temperatura.
- Llene las  $\frac{3}{4}$  partes del volumen del mismo, con la finalidad de evitar salpicaduras, derrames o sobrepresiones.
- Evite mezclar residuos sólidos con líquidos.
- Almacene el residuo de acuerdo con su peligrosidad, es decir: inflamable, corrosivo, y posteriormente, seguir con el procedimiento habitual de gestión de residuos implementado.
- De acuerdo con la clasificación inicial del residuo, se dividirán las zonas de almacenamiento de residuos químicos dentro del laboratorio, ejemplo: zona para residuos inflamables, zona para residuos corrosivos, etc.
- Marque las zonas de almacenamiento, tenga presente incompatibilidades entre sustancias cuando se elijan las áreas de almacenamiento.
- Debe disponer de extintor contra incendios, según el tipo de fuego que se pueda generar.
- Debe ser zonas de poco tránsito y lejos de toda fuente de calor o de la incidencia de la luz directa del sol.
- Mantenga el área de almacenamiento dentro del laboratorio en condiciones apropiadas de orden y limpieza.
- Está prohibido eliminar líquidos inflamables, corrosivos, tóxicos, peligrosos para el ambiente por los desagües, deben emplearse los recipientes para residuos que se encuentran en el laboratorio.
- Está prohibido el abandono, vertido o eliminación incontrolada de residuos en todo el territorio nacional y toda mezcla o dilución de residuos que dificulte su gestión.

## 7. PRIMEROS AUXILIOS

En el desarrollo de las actividades diarias en el laboratorio se presentan situaciones imprevistas causadas por condiciones inseguras y actos inseguros que ponen en peligro la vida de las personas. La gravedad de estas situaciones depende de las medidas que se tomen al respecto tanto para prevenir como para actuar frente a ellas.

Las instrucciones siguientes deben seguirse solamente en concepto de primeros auxilios, tras los cuales será necesaria la asistencia médica.

### a) En ojos:

- Inmediatamente después del accidente, irrigar ambos ojos con grandes cantidades de agua, de ser posible a chorro o con ayuda de una pera de goma grande o un lavaojos.
- Si no se dispone de una fuente lava ojos, las personas lesionadas deben ser colocadas sobre sus espaldas y hacerles fluir agua suavemente a través de las esquinas de sus ojos por al menos 15 min. El agua no se debe aplicar directamente sobre el globo ocular, sino a la base de la nariz, esto hace que sea más efectivo el lavado de los ojos, extrayendo las sustancias químicas (los chorros potentes de agua pueden volver a introducir partículas en los ojos).
- Mantenga los ojos abiertos.
- Estire los párpados hacia el exterior mueva sus ojos continuamente hacia arriba, hacia abajo y hacia los lados, de modo que el agua penetre por debajo de los mismos.
- Continúe la irrigación por lo menos 15 min.
- Seguidamente dependiendo del tipo de sustancia química que causó la afectación, siga las instrucciones de primeros auxilios que aparecen en la etiqueta o en la Ficha de Seguridad, continúe el lavado dos o tres veces más con una solución específica, manteniéndola en contacto con los ojos por 5 min.
- Vierta en cada ojo una gota de aceite de oliva puro.

- Después de que se ha dado los primeros auxilios a sus ojos, rápidamente visite un miembro del equipo médico.

**b) En piel:**

- Asegúrese de identificar el agente contaminante.
- Aleje a la persona de la fuente de contacto.
- Retire inmediatamente la ropa de la zona afectada.
- Inmediatamente, irrigue la zona con grandes cantidades de agua preferiblemente con la ducha de seguridad.
- Seguidamente dependiendo del tipo de sustancia química que causó la afectación, siga las instrucciones de primeros auxilios que aparecen en la etiqueta o en la Ficha de Seguridad.
- Acuda a recibir asistencia médica.

**c) Por inhalación:**

- Trate de identificar el material.
- Utilice el tipo adecuado de máscara para gases durante la aproximación a la persona afectada.
- Si la máscara disponible no es la adecuada o no hay, será necesario aguantar la respiración el máximo posible mientras se esté en contacto con los vapores tóxicos.
- Retire al afectado por inhalación de humo o de vapores de sustancias químicas a un área donde haya aire fresco.
- Si la sustancia química ha sido inhalada, siga las instrucciones de primeros auxilios que aparecen en la etiqueta o en la Ficha de Seguridad.
- Si el afectado está inconsciente, póngalo en posición lateral de seguridad, con la cabeza de lado, y extienda la lengua hacia fuera con ayuda de un baja lenguas. Si está consciente, manténgalo apoyado.

- Solicite asistencia médica inmediatamente.

**d) Por ingesta:**

- Identifique la sustancia química ingerida.
- No se debe suministrar nada vía oral precipitadamente sin conocer la identidad del producto ingerido.
- Si la sustancia química ha sido ingerida, siga las instrucciones de primeros auxilios que aparecen en la etiqueta o en la Ficha de Seguridad.
- Si el afectado está inconsciente, póngalo en posición lateral de seguridad, con la cabeza de lado, y extienda la lengua hacia fuera, con ayuda de un baja lenguas. Si está consciente, manténgalo apoyado mientras llega personal médico

## 9. BIBLIOGRAFÍA

**LEY FEDERAL DEL TRABAJO**, última

Reforma DOF 12-06-2015,

[www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/156203/1044\\_Ley\\_Federal\\_del\\_Trabajo.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/156203/1044_Ley_Federal_del_Trabajo.pdf)

**REGLAMENTO FEDERAL DE SEGURIDAD Y SALUD EN EL TRABAJO**, última Reforma

el 13 de noviembre de 2014 entrada en vigor el 1w2 de septiembre de 2016,

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/134257/Reglamento\\_Federal\\_de\\_Seguridad\\_y\\_Salud\\_en\\_el\\_Trabajo.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/134257/Reglamento_Federal_de_Seguridad_y_Salud_en_el_Trabajo.pdf)

**NORMA Oficial Mexicana NOM-005-STPS-**

**1998**. “Condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas” Diario Oficial de la Federación,

[http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4943543&fecha=02/02/1999](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4943543&fecha=02/02/1999).

**NORMA Oficial Mexicana NOM-010-STPS-**

**2014**. “Agentes químicos contaminantes, del ambiente laboral.Reconocimiento, evaluación y control”. Diario Oficial de la Federación, [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5342372&fecha=28/04/2014](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5342372&fecha=28/04/2014)

**NORMA Oficial Mexicana NOM-018-STPS-**

**2000**. “Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas

en los centros de trabajo”. Diario Oficial de la Federación.

[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5411121&fecha=09/10/2015](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5411121&fecha=09/10/2015).

**GAVILÁN, A.** Cano, G., Gavilán, I. 2012. Guía técnica de acción para residuos químicos, Universidad Nacional Autónoma de México.

**MOYRON, IBARRA, V.** 2017. Manual para el manejo seguro de sustancias químicas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

**SANTOS, E.,** Cruz-Gavilán, I. 2002. Manual de Procedimientos de Seguridad en los Laboratorios de la UNAM. Editorial DGIRE, 2ª. Edición, México, D.F.

**ZARCO RUBIO, E.** 2007. Seguridad en los laboratorios: prevención de accidentes y primeros auxilios en laboratorios químicos. Editorial Trillas, 3ª. Edición México, D. F.

## CAPÍTULO 3

# MÉTODOS DE COLECTA DE MICROALGAS

LOURDES MORQUECHO, AMADA REYES-SALINAS

Laboratorio de Taxonomía y Ecofisiología de Microalgas Marinas.  
Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR).  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR).  
La Paz, Baja California, Sur, 23096, México  
lamorquecho@cibnor.mx, areyes@cibnor.mx

---

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. SELECCIÓN DE LOS SITIOS DE COLECTA Y DEFINICIÓN DE LAS ESTRATEGIAS DE MUESTREO
3. MÉTODOS DE MUESTREO DE MICROALGAS PLANCTÓNICAS
  - 3.1. REDES DE PLANCTON
  - 3.2. BOTELLAS OCEANOGRÁFICAS
  - 3.3. BOMBEO Y MANGUERAS MUESTREADORAS
  - 3.4. FILTRACIÓN INVERSA
  - 3.5. USO DE TRAMPAS
4. TÉCNICAS DE MUESTREO DE MICROALGAS BENTÓNICAS O EPÍFITAS
  - 4.1. SELECCIÓN DEL TIPO DE SUSTRATO
  - 4.2. MÉTODOS DE COLECTA Y PROCESAMIENTO DEL SUSTRATO
    - 4.2.1. ROCAS, ESTRUCTURAS HIDRÁULICAS Y SEDIMENTO
    - 4.2.2. MACROALGAS
    - 4.2.3. USO DE SUSTRATOS ARTIFICIALES
5. SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE MUESTREO Y ANÁLISIS EN TIEMPO REAL
6. CONSIDERACIONES PARA EL CUIDADO Y MANEJO ADECUADO DE LAS MUESTRAS DE MICROALGAS
7. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** microalgas, métodos de colecta

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La colecta de muestras es una parte fundamental y que debe planearse adecuadamente para garantizar el éxito en la búsqueda de la(s) microalga(s) de interés, con el consecuente éxito en su aislamiento, caracterización bioquímica y definición de su potencial biotecnológico. Este capítulo se enfocará en proporcionar los elementos básicos para el planteamiento de las estrategias de muestreo y se describirán los diferentes métodos que comúnmente se emplean para la colecta de microalgas.

## 2. DEFINICIÓN DE LAS ESTRATEGIAS DE MUESTREO Y SELECCIÓN DE LOS SITIOS DE COLECTA

El número y la ubicación de los sitios de colecta debe establecerse de acuerdo con los alcances y objetivos de la investigación (Taylor *et al.*, 2007). Los sitios deben ser seleccionados para proporcionar muestras representativas, por ejemplo, de zonas prístinas, donde existan cambios marcados, o donde se lleven a cabo actividades humanas. Aunado a esto, una revisión bibliográfica sobre la hidrografía del área a estudiar y sobre las características biológicas y ecológicas de la(s) especie(s) de interés (Reguera *et al.*, 2011) es un paso imprescindible para la correcta ubicación de los sitios de colecta y sobre todo delimitar el período de muestreo. Si se carece de este tipo de información, entonces será necesario obtener una aproximación de las

características y composición de la población objeto de estudio, con base en una adecuada delimitación de objetivos y el planteamiento de un diseño de las estrategias de muestreo e implementación de un monitoreo extensivo que cubra la mayor parte del área objeto de estudio (Tabla I).

Tabla I. Estrategias de muestreo (Venrick 1978a, 1995).

Tipo de muestreo	Característica
Sistemático	Toma de muestras a intervalos regulares o subjetivos, se aplica en estudios puramente descriptivos y para determinar fluctuaciones periódicas.
Azar simple	Mediante la enumeración de elementos, el uso de tablas al azar y de cuadrantes, se determinan las unidades de muestreo de la población.
Estratificado al azar	La población se divide en estratos considerando gradientes ambientales o estacionales y una o más muestras son colectadas al azar. Se debe intensificar el muestreo en zonas de transición y las poblaciones densas deben muestrearse intensamente.
Grupos	La población se subdivide en unidades y uno o más grupos se seleccionan al azar y son muestreados totalmente o submuestreados.
Proporcionalidad y regresivo	Eficaces para la colecta de la biomasa total. Dependen del empleo de datos auxiliares locales (parámetros ambientales y biológicos). La proporcionalidad presupone una relación constante entre dos variables, mientras que el regresivo sólo una relación cuantificable.
Estudios de simulación	Se crea y simula por computadora una población artificial con un modelo de distribución. Su validez depende de la exactitud con que se haya reproducido la población modelo.
Muestras integradas	Las muestras se mezclan en proporción al volumen que representan, reduciendo así la variabilidad de una población y sin incrementar el esfuerzo para su análisis.

La selección de los sitios de colecta también involucra considerar el hábitat y los hábitos de crecimiento. En sistemas acuáticos a las

microalgas se les clasifica en 4 categorías (Stevenson *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2007):

- *Epipelon*: sobre limos o arcillas.
- *Epipsammon*: entre las partículas de arena.
- *Epilithon*: en grava, piedra y rocas.
- *Epiphyton*: adheridas a macrófitas que flotan, emergen o están sumergidas en el agua.

Objetos hechos por el hombre, como ladrillos, trozos de hormigón, canales, muelles, cascos y tanques de agua de lastre de embarcaciones, estanques acuícolas y plantas de tratamiento de aguas residuales, también pueden convertirse en hábitats para las microalgas.

En ambientes marinos los términos más comunes para referirse a las microalgas por su tipo de hábitat son:

- *Fitoplancton*: formas oceánicas o neríticas, suspendidas en la columna de agua y que por su poca movilidad están a merced de las corrientes oceánicas o mareas.
- *Fitobentos*: microalgas asociadas con el piso o fondo marino.
- *Epifita(o)*: microalgas asociadas a macroalgas o pastos marinos.
- *Ticoplancton*: microalgas bentónicas ocasionalmente encontradas en la columna de agua.

Si se pretende establecer cepas para estudios ecofisiológicos o de caracterización bioquímica, también se debe de considerar la medición y registro *in situ* de variables hidrológicas como la temperatura, salinidad, pH, y la composición y concentración de nutrientes. La temperatura y salinidad son importantes parámetros ambientales que afectan la fisiología de las microalgas. Cada especie tiene un rango óptimo de estas variables, dentro del cual su desarrollo es óptimo (Reguera *et al.*, 2011).

Cuando se realicen muestreos de microalgas planctónicas, es importante tener en cuenta

la distribución vertical de la temperatura y salinidad típica de la localidad y del grado de transparencia de la columna de agua. Las capas con fuertes gradientes de densidad (ej. termoclinas, haloclinas, pycnoclinas y nutriclinas) son importantes zonas de agregación de microalgas (por acumulación física o por ser una capa de condiciones óptimas de crecimiento), y de formación de máximos de clorofila (Reguera *et al.*, 2011).

Es por tanto fundamental contar con una sonda multiparamétrica (que al menos registre la salinidad y temperatura) y con un disco de Secchi (Figura 1). El disco permite identificar la capa apta para el crecimiento de las microalgas (Reguera *et al.*, 2011). Aunado a esto, también es importante contar durante el muestreo con un sistema de posicionamiento global (GPS) para registrar la ubicación geográfica exacta (latitud y longitud) de los sitios de colecta.

También es fundamental contar con el equipamiento y materiales básicos para realizar las colectas. En la tabla II, se enlistan los equipos y materiales básicos dependiendo del tipo de colecta a realizar y en las subsiguientes figuras 2–5 se ilustran algunos de ellos. Aunado a esto, el diseño de la bitácora para el registro de variables ambientales y para el control de las muestras, así como el etiquetado de las mismas, debe garantizar precisión y un total control de todos los elementos a considerar durante las campañas de muestreo.

### 3. MÉTODOS DE MUESTREO DE MICROALGAS PLANCTÓNICAS

#### 3.1 REDES DE PLANCTON

Las redes han sido ampliamente utilizadas para la recolecta de microalgas. La ventaja de su uso consiste en que filtran grandes volúmenes de agua para concentrar microorganismos; sin embargo, el proceso de filtración es selectivo por tamaño y forma.

El modelo de red y la apertura de malla a utilizar dependerán principalmente del rango



Figura 1. Equipos hidrológicos básicos: (A) Sonda multiparamétrica, (B) Disco de Secchi.

de tamaño (5–200  $\mu\text{m}$ ) de la(s) microalga(s) que se pretenden estudiar, el tipo de muestreo diseñado (horizontal y/o vertical) y del modo de arrastre (manual o con guinche oceanográfico) (Tangen *et al.*, 1978; González, 1988; Dawes, 1991; Ferrario *et al.*, 1995). Por lo general, se realizan arrastres horizontales o verticales si la zona de estudio es somera o profunda (>15 m), respectivamente.

*Red estándar:* La red consiste en una abertura circular rígida con un diámetro de aproximadamente 25 cm y una longitud de 1 m, a la cual se fija una red fina (10 o 20  $\mu\text{m}$ ) de forma cónica, que lleva sujeto un recipiente colector en su extremo más delgado y que comúnmente se conoce como copo (Figura 2A). Sin embargo, como la superficie de filtración de la red es pequeña con respecto a los orificios de la misma, se corre el riesgo de que la resistencia a la filtración sea bastante alta, ocasionando una intensa obturación progresiva (Tangen, 1978; Ramírez, 2000).

Tabla II. Equipo y materiales básicos para la colecta de microalgas. Consulte las subsiguientes figuras 1–5 para complementar esta información.

Equipo o material	Microalgas planctónicas	Microalgas bentónicas o epífitas
Equipos para medición de parámetros hidrológicos y geográficos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sonda multiparámetrica (al menos con sensores de temperatura y salinidad), o sonda CTD (Conductivity, Temperature, Depth)</li> <li>• Termómetro de cubeta</li> <li>• Sistema de posicionamiento global (GPS)</li> </ul>	
Equipos para la colecta de muestras	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Redes de plancton (10–20 µm)</li> <li>• Botella oceanográfica</li> <li>• Trampa</li> <li>• Disco de Secchi (transparencia de la columna de agua)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nucleador manual o gravitacional</li> <li>• Draga para zonas someras o profundas</li> <li>• Equipo para buceo libre (aletas, visor, snorkel, cinturón con lastre)</li> <li>• Equipo para buceo SCUBA (tanque, chaleco hidrostático, regulador, cinturón de lastre, reloj, profundímetro, manómetro y tablas de buceo)</li> <li>• Brújula</li> </ul>
Materiales para la colecta de muestras	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recipientes de plástico 50 y 250 mL (muestras de red y botella, respectivamente)</li> <li>• Pipetas de transferencia (10–20 mL)</li> <li>• Tamiz de 60 o 100 µm</li> <li>• Abrazaderas de acero inoxidable</li> <li>• Desarmador</li> <li>• Ligas, papel aluminio y parafilm</li> <li>• Cabos de nylon y/o plástico resistentes</li> <li>• Lastre y boyas</li> <li>• Hielera de plástico y si es necesario hielo para traslado muestras sin fijar (ej. 4°C) o para simular temperatura <i>in situ</i></li> <li>• Jabas de plástico para trabajo rudo</li> <li>• Si es el caso, fijadores (ver Tabla IV)</li> <li>• Bitácora</li> <li>• Tabla, lápiz, bolígrafo y marcadores indelebles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recipientes de plástico con tapón hermético de 50 o 100 mL (microalgas bentónicas)</li> <li>• Tubos de plástico con tapón hermético (sedimento superficial)</li> <li>• Tubos de acrílico con tapones (sedimento colectado con nucleador)</li> <li>• Pipetas de transferencia (10–20 mL)</li> <li>• Cabos de nylon y/o plástico resistentes</li> <li>• Bolsas de plástico reforzadas con cierre hermético (macroalgas)</li> <li>• Bolsas para buceo</li> <li>• Ligas, papel aluminio y parafilm</li> <li>• Cepillo de dientes con cerdas duras (microalgas epiliticas) y/o navajas</li> <li>• Espátula y/o cuchillo (microalgas epiliticas)</li> <li>• Rastrillo con mango telescópico y red adaptada de 10 o 20 µm (microalgas en estructuras hidráulicas)</li> <li>• Sistema de filtración</li> <li>• Bomba de vacío manual</li> <li>• Filtros de fibra de vidrio (tipo GF/F)</li> <li>• Recipiente de plástico (5–10 L) para almacenar agua circundante filtrada</li> <li>• Tamices de diferente luz de malla (250 µm, 150 µm y 20 µm)</li> <li>• Si es el caso, fijadores (ver Tabla IV)</li> <li>• Hielera de plástico y si es necesario hielo para traslado muestras sin fijar (ej. 4°C) o para simular temperatura <i>in situ</i></li> <li>• Jabas de plástico para trabajo rudo</li> <li>• Aquascope o cubeta con fondo de vidrio (búsqueda del sustrato sumergido)</li> <li>• Bitácora</li> <li>• Tabla, lápiz, bolígrafo y marcadores indelebles</li> </ul>
Materiales y vestuario para protección personal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Salvavidas y anteojos de protección</li> <li>• Botas impermeables de seguridad</li> <li>• Guantes impermeables para trabajo rudo</li> <li>• Ropa impermeable y/o con protección UV</li> <li>• Guantes para trabajo rudo</li> <li>• Guantes de nitrilo (manejo de químicos y/o aguas contaminadas)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Traje de neopreno</li> <li>• Escarpines o botines</li> <li>• Cuchillo de buceo</li> <li>• Botas impermeables o vadeadores de pesca</li> <li>• Salvavidas y anteojos de protección</li> <li>• Ropa impermeable y/o con protección UV</li> <li>• Guantes impermeables para trabajo rudo</li> <li>• Guantes de nitrilo (manejo de químicos y/o aguas contaminadas)</li> </ul>

**Red de Zeppelin:** Esta es una red de orificios pequeños (5  $\mu\text{m}$ ) pero de una mayor superficie de filtración que la anterior, por lo cual es muy larga y estrecha. Dicha red está conformada en la parte inferior por un cono que se alarga hacia arriba en forma de cilindro, con un diámetro superior a 15 cm y una longitud de 1 m (Ramírez, 2000).

Durante la toma de muestras con red, es conveniente considerar las siguientes recomendaciones y/o precauciones:

- Mantener tenso el cable que soporta la red con un peso o plomo.
- Asegurar que la red no haya acumulado bolsas de aire que impidan su descenso y la hagan flotar.
- Al realizar el izado mantener la continuidad y velocidad del movimiento, ya que cualquier detención, provoca la devolución del material ya colectado. La colmatación de la red, es mayor cuanto mayor es el diámetro de la boca, menor la superficie de filtración, o menor la abertura del poro de la malla filtrante.
- Una vez recuperada la red, desenroscar el colector (copo) y verter el contenido en el recipiente donde será almacenada la muestra.
- La muestra se puede dividir en réplicas *in vivo* y fijadas (ver sección 6). Para realizar aislamientos y establecer cepas, es recomendable remover de inmediato el zooplancton, pasando la muestra por un tamiz de 60 o 100  $\mu\text{m}$ .
- Una vez obtenida la muestra, la red debe ser lavada considerando los siguientes pasos: 1) hacer un pre-lavado o enjuague con agua dulce para eliminar las sales; 2) dependiendo del grado de suciedad, lavar con un agente de limpieza disuelto en agua dulce tibia (jabón o detergente, hidróxido de sodio al 15 %, acetona), incluyendo el copo; si éste tuviera ventanas cubiertas con malla metálica o de tela, habría que lavarlas suavemente con un cepillo de cerda; 3) enjuagar con abundante agua dulce para eliminar el agente de limpieza; 4) secar al aire y almacenar en un lugar oscuro y fresco. Las redes de nylon al

secarse no deben exponerse a la luz solar (Tangen 1978).

### 3.2 BOTELLAS OCEANOGRÁFICAS

Las botellas son empleadas para obtener muestras de un volumen determinado a una profundidad establecida. La ventaja de utilizarlas es que las muestras son cuali y cuantitativamente representativas.

Existe un gran número de modelos de botellas, las más utilizadas son: Nansen, Niskin y VanDorn. Las características básicas de las botellas son las siguientes:

- Constan de un cilindro de plástico grueso con extremos abiertos. En uno de los extremos suele ubicarse un grifo para el vaciado de la muestra. También tienen un mango metálico adherido que sirve para sujetar el cabo y tiene instalados los sistemas de cierre (Figura 2C).
- A lo largo del interior del cilindro corre una manguera de plástico reforzada y muy elástica, que en sus extremos tiene sujetas unas válvulas o tapaderas de cierre, las cuales son accionadas con un mensajero que está sujeto al cabo con el cual se sumerge la botella. Algunos sistemas de cierre son electrónicos y otros son más simples y sólo requieren de jalones repetitivos y ligeros para accionar el cierre de la botella (Figuras 2B y 2C). La capacidad de las botellas es variable (1–10 L) (Venrick, 1978b; González, 1988; Ferrario *et al.*, 1995; Reguera *et al.*, 2011).

Durante la toma de muestra con botella se recomienda:

- Sujetar la botella al cable, con las dos tapas abiertas y ajustadas al sistema de cierre por mensajero.
- Sumergir la botella a la profundidad deseada.
- Lanzar el mensajero para que accione el dispositivo de cierre de las tapas.
- Recuperar la botella izando el cable lentamente y a una velocidad constante.



- Recuperar las réplicas en botellas de plástico (500 mL), etiquetar, fijar (consultar sección 6) y almacenar preferentemente protegidas de la luz y en un lugar fresco; o bien recibir la preparación o tratamiento ulterior, dependiendo de los alcances de la investigación.

### 3.3 BOMBEO Y MANGUERAS MUESTREADORAS

Para obtener una muestra integrada de la columna de agua se utilizan bombas o mangueras muestreadoras que succionan o colectan agua desde una determinada profundidad.

Las *bombas de agua*, consisten de un tubo de hule u otro material flexible que se sumerge a la profundidad deseada, por acción de la bomba es succionada el agua, filtrándose una cantidad determinada a través de una tela, quedando retenidos la totalidad o la mayor parte de los organismos del plancton (Franks y Keafer, 2004).

El muestreo con manguera segmentada es sencillo y económico. Se recomienda su uso para áreas someras y cercanas a la costa (Sar *et al.*, 2002; Franks y Keafer, 2004). Este sistema de muestreo consta de tramos de manguera de jardinería reforzada (1 m de largo y 3–5 cm de diámetro). Cada segmento de la manguera se une con válvulas de acoplamiento y llaves o grifos (Figura 2D). Se recomienda que el largo total de la manguera no supere los 15–20 m (Sar *et al.* 2002; Franks y Keafer, 2004; Reguera *et al.*, 2011).

Para la toma de muestra con *manguera* hay que considerar lo siguiente:

- Establecer el área libre de muestreo, es decir la separación entre la superficie del mar y la altura de la embarcación o punto de ejecución del muestreo.
- Cerciorarse del buen funcionamiento de las llaves del muestreador y el fácil enrosque y desenrosque de las secciones.
- Asegurarse que las llaves estén abiertas y bajar la manguera a una velocidad tal que

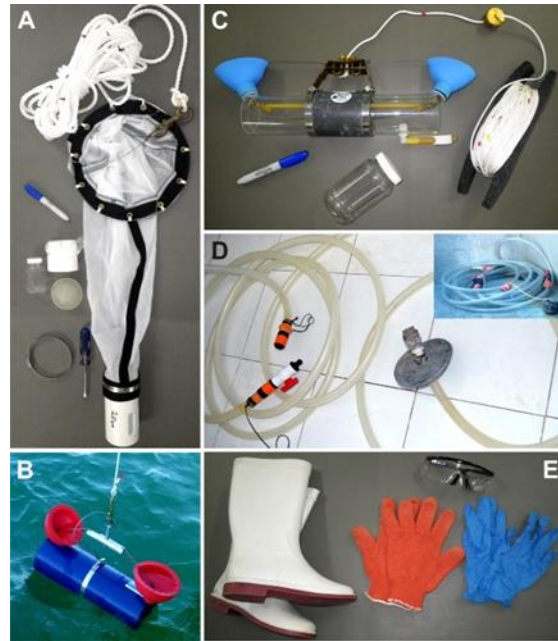


Figura 2. Equipo y material básico para el muestreo de microalgas planctónicas: (A) Red de fitoplancton. (B) Botella oceanográfica básica 1L. (C) Botella oceanográfica con sistema de cierre accionado con mensajero. (D) Manguera segmentada. (E) Equipo básico de protección personal.

el llenado sea uniforme y sin turbulencia.

- Es preciso colocar un lastre, cerca de la boca inferior del sistema (Figura 2D), cuidando que no obstruya la libre circulación de agua por la manguera, esto para asegurar que el muestreador se mantenga vertical.
- Al llegar a la profundidad requerida, cerrar la llave de la superficie (llave superior) y proceder a izarla.
- Sucesivamente y conforme se va izando el muestreador, también se van cerrando las llaves de las subsiguientes secciones.
- Con el muestreador en cubierta, se procede a recuperar el contenido de cada sección en botellas de plástico, o bien se colecta en una cubeta todo el contenido, para obtener una muestra integrada y se toman las réplicas que se requieran.
- Fijar las muestras (consultar sección 6) y almacenar en un lugar fresco preferentemente protegidas de la luz; o bien recibir la preparación o tratamiento

ulterior, dependiendo de los alcances de la investigación.

### 3.4 FILTRACIÓN INVERSA

Con la filtración inversa es posible concentrar suficientes microalgas en una pequeña cantidad de agua, con un mínimo de manipulación de la muestra y una alta reducción de daño a las células frágiles y/o para mantenerlas vivas. La concentración de células con este método es eficaz y puede ser adaptado satisfactoriamente para otros usos, tales como el fraccionamiento por tamaños (Dodson y Thomas, 1978). Este método se aplica primordialmente para microalgas planctónicas pequeñas (<5 µm) sin embargo, puede adaptarse para otros rangos de talla mayores, probando diferentes tipos de mallas, siendo la clave principal el realizar un sifonado lento usando mangueras delgadas (Figura 3).

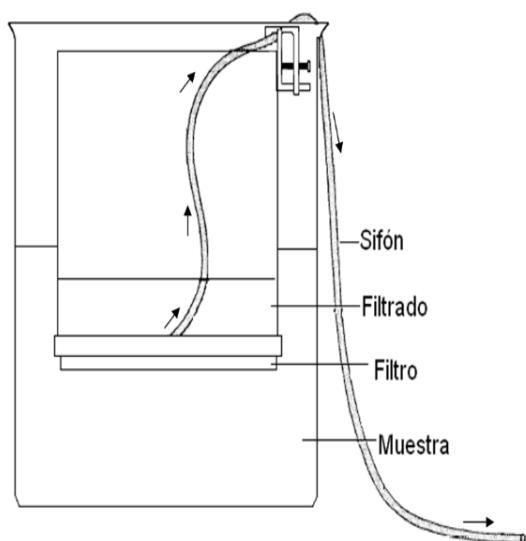


Figura 3. Representación esquemática del sistema de filtración inversa (adaptado de Dodson y Thomas, 1978).

La filtración inversa consiste en:

- Contener una muestra (colectada con botella oceanográfica o manguera) en un recipiente (ej. vaso de vidrio o contenedor plástico 2.5 L, 15.5 cm de diámetro y 17 cm de alto).

- Introducir en la cubeta un cilindro (delgado y liviano, 12.5 cm de diámetro y 15 cm de alto) con un filtro de papel (Whatman No. 42), membrana (0.8 µm) o malla (10–20 µm) adherida en un extremo. El lado cubierto del cilindro es el que debe de sumergirse en la muestra.
- Introducir una manguera delgada en el interior del cilindro y sifonar lentamente el agua para favorecer la concentración de las microalgas contenidas en la muestra. Usando el filtro del papel, 2 litros de muestra son fácilmente reducidos a 20 mL en aproximadamente 1 hora.

### 3.5 USO DE TRAMPAS

El uso de trampas facilita un muestreo continuo por varios meses, pudiéndose realizar estudios de variabilidad estacional. En sistemas acuáticos es una herramienta cualitativa y cuantitativa para el estudio de los flujos biogeoquímicos, así como en investigaciones sobre microalgas productoras de quistes de resistencia (Lange y Boltovskoy, 1995; Gardner *et al.*, 1997).

Las trampas simples (Figura 4A) consisten en un tubo de PVC equipado con una llave de drenaje, que está sujeta a un cabo de poliestireno dotado con un sistema de flotación y lastre (Morquecho, 2004). El extremo inferior de la trampa tiene un recipiente colector, el cual se puede llenar con algún fijador.

Las trampas automatizadas llevan hasta 21 viales en una bandeja motorizada (Figura 4B). El equipo se pre-programa para intercambiar los viales a intervalos establecidos, o cuando los sensores de la unidad registran un cambio en las condiciones hidrológicas de la columna de agua.

Consideraciones para el uso e instalación de trampas:

- Montar la trampa a un cable de amarre de subsuelo o una boya de superficie.

- Verificar que la trampa esté atornillada en la línea a la profundidad específica.
- Cerciorarse que la trampa permanezca vertical en el agua para su correcto funcionamiento.
- Si son desplegadas en áreas con fuertes corrientes, es importante el registro continuo de su ángulo de inclinación.
- El tiempo de permanencia de la trampa está en función de los objetivos de la investigación; en aguas profundas se recomienda un máximo de un año para retirarla.

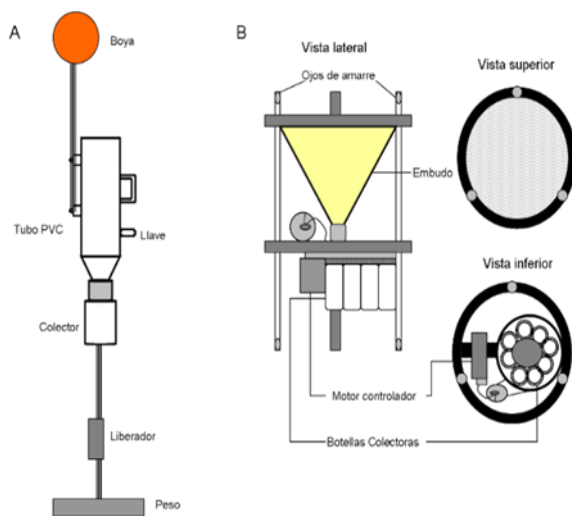


Figura 4. Representación esquemática de trampas de sedimento estándar (A) y automatizada (B).

#### 4. TÉCNICAS DE MUESTREO DE MICROALGAS BENTÓNICAS O EPÍFITAS

##### 4.1 SELECCIÓN DEL TIPO DE SUSTRATO

La composición de las comunidades de microalgas varía en función del sustrato, por lo que su selección es un elemento importante a considerar. Las microalgas pueden encontrarse en una gran diversidad de superficies sumergidas. La colecta se debe de enfocar en las superficies parduzcas o verduzcas resbaladizas que se desarrollen sobre sustratos duros (rocas, piedra y cantos rodados, de un tamaño mínimo de 10x10

cm) situados en zonas sumergidas o infraestructura hidráulica, con excepción de las construidas con madera. Si el sustrato dominante son las arenas, limos o arcillas y/o macroalgas, pastos marinos y manglares, se deben de colectar los sustratos más característicos y dominantes (Cambra *et al.*, 2005).

Una revisión bibliográfica previa al muestreo, sobre la afinidad del fitobentos al sustrato también sería muy útil. Por ejemplo, las macroalgas de los géneros *Jania*, *Amphiroa*, *Turbinaria* y *Halimeda*, tienden a hospedar un mayor número de dinoflagelados bentónicos, y son muy comunes en las zonas arrecifales y dejan menos residuos cuando se procesan para despendar a los epífitos (Reguera *et al.* 2011).

#### 4.2 MÉTODOS DE COLECTA Y PROCESAMIENTO DEL SUSTRATO

##### 4.2.1 ROCAS, ESTRUCTURAS HIDRÁULICAS Y SEDIMENTO

Para la colecta de rocas, se recomienda evitar sustratos ubicados en zonas sombreadas, emergidas, o muy cercanas a las orillas. De acuerdo a Cambra *et al.* (2005), los procedimientos de colecta de rocas o cantos rodados, e infraestructura hidráulica consta de los siguientes pasos principales:

##### ROCAS

- Situarse, si es posible, en el punto de máxima corriente, e ir haciendo el recorrido contra corriente para evitar la contaminación de muestras.
- Se seleccionan como mínimo 5 piedras, o 10 si sólo se encuentran piedras pequeñas o guijarros.
- Se elimina cualquier tipo de elemento (ej. detritus, restos de macroalgas, hojas, etc.) adherido al sustrato. Evitar elegir sustratos recubiertos de algas filamentosas.
- Se cepilla (o raspa con navaja) por cada piedra una superficie aproximada de al menos 10 cm<sup>2</sup> de la superficie superior del

sustrato, evitando las zonas de erosión y/o sedimentación. La superficie total de muestreo debe ser de unos 100 cm<sup>2</sup>.

- Se introduce el cepillo (o la navaja) en un recipiente de plástico de boca ancha (50 mL), llenado con agua circundante previamente filtrada. El cepillo se agita suavemente para desprender las microalgas y poco a poco el agua se tornará turbia y de color marrón.
- La réplica o réplicas procesadas se etiquetan y se pueden fijar (consultar sección 6) y almacenar preferentemente protegidas de la luz y en un lugar fresco; o bien recibir la preparación o tratamiento ulterior, dependiendo de los alcances de la investigación.
- Para evitar la contaminación de muestras es necesario que el cepillo o la navaja se laven rigurosamente entre colectas.

#### **SUPERFICIES VERTICALES DE INFRAESTRUCTURA HIDRÁULICA**

- La muestra se debe tomar al menos 30 cm por debajo del nivel del agua, para evitar la zona de fluctuación del nivel del agua.
- Una superficie de aproximadamente 10 cm<sup>2</sup>, se raspa con un rastrillo con mango telescópico para desprender las microalgas de la superficie artificial. El rastrillo puede disponer de una red (10–20 µm) que recoja el raspado, aunque existe el riesgo de contaminación con formas planctónicas.
- El material colectado en la red se transfiere a un recipiente de plástico y se sugiere colectar al menos tres réplicas.
- Las réplicas procesadas se pueden fijar (consultar sección 6) y se deben almacenar preferentemente protegidas de la luz y en un lugar fresco, o bien recibir la preparación o tratamiento ulterior, dependiendo de los alcances de la investigación.

#### **SEDIMENTOS**

Para la colecta de los sedimentos, se debe de considerar la profundidad de la zona de

estudio y sus características sedimentológicas. Si se trata de zonas someras, la colecta se puede realizar manualmente con el uso de una espátula o cuchara y transfiriendo el sedimento superficial a un tubo o recipiente de plástico, o usando un nucleador manual para zonas someras sumergidas. Si el sitio de colecta es profundo (> 10m), entonces se tendría que usar un nucleador de gravedad (Figura 5A), draga (Figura 5B) o colecta manual con buceo SCUBA (Figura 5D). Cabe mencionar que los nucleadores manuales y de gravedad colectan más eficientemente limos o arcillas, y permiten la caracterización cualitativa y cuantitativa en diferentes estratos.

En el sedimento encontraremos macrofauna, principalmente foraminíferos y tanto formas vegetativas, como de resistencia (quistes o esporas) de microalgas, por lo que el manejo de las muestras, el método para su limpieza y concentración, y preservación, dependerá de las microalgas de interés y de los alcances de la investigación. En la tabla III se enlistan y describen brevemente algunos métodos para procesar muestras de sedimento marino.

Las muestras de sedimento se almacenarán y resguardarán dependiendo del tipo de investigación a realizar. Para estudios palinológicos el sedimento suele procesarse casi de inmediato a su colecta, fraccionando el núcleo en estratos, para posteriormente deshidratarlos. Si se quieren mantener tanto formas de resistencia, como vegetativas, para estudios de germinación u obtención de cepas de diatomeas bentónicas o dinoflagelados, las muestras preferentemente se mantienen en recipientes herméticos y protegidos de la luz y en refrigeración (4°C), o en incubación a una temperatura comparable a la registrada *in situ*.

#### **4.2.2 MACROALGAS**

La colecta de macroalgas se debe realizar en las zonas del intermareal o en zonas arrecifales más profundas. Dependiendo de

la profundidad o extensión del área a muestrear, se requerirá de buceo libre o SCUBA (Figura 5D).

Las macroalgas (~250 g) se colectan envolviéndolas con una bolsa de plástico, antes de ser arrancadas para que no se pierda el material adherido (Reguera *et al.*, 2011). Las bolsas plásticas reforzadas y con cierre hermético, pueden ser una buena opción y preferentemente deben estar previa y apropiadamente etiquetadas con tinta indeleble. Al sellar la bolsa asegúrese de que también contenga agua circundante para su posterior procesamiento.

El procedimiento para separar las microalgas epífitas de macroalgas, consta de los siguientes pasos principales:

- Se agita vigorosamente la bolsa que contiene la macroalga durante 2 min, para favorecer el desprendimiento de las microalgas asociadas.
- Se remueve la macroalga y se filtra la suspensión de agua de mar contenida en la bolsa, a través de tres tamices superpuestos de 250  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ . Dependiendo de la talla del organismo de interés se pueden incluir o sustituir el tamiz de 20  $\mu\text{m}$  por uno de 10  $\mu\text{m}$ .
- Con una piseta y agua de mar filtrada, se lava y recupera la fracción contenida en el tamiz de 20 o 10  $\mu\text{m}$ , hasta alcanzar un volumen de alrededor de 50 mL.
- Se vierte la muestra procesada en una probeta y se registra el volumen final, este dato es esencial si se desea estimar la abundancia celular de los epífitos.
- La muestra se almacena en un frasco de plástico o vidrio (50–100 mL) apropiadamente etiquetado y sellado para su almacenamiento.

La réplica o réplicas procesadas se pueden fijar (consultar sección 6) y se deben almacenar preferentemente protegidas de la luz y en un lugar fresco, o bien recibir la preparación o tratamiento ulterior, dependiendo de los alcances de la investigación. Para análisis cuantitativos, el registro del volumen final de la fracción de

epífitos, el peso de la macroalga (después de haberle eliminado el exceso de agua con papel absorbente), junto con el material retenido en el tamiz de 250  $\mu\text{m}$ , son esenciales. Dicho análisis lo encontrará completamente detallado en el manual de Reguera *et al.* (2011).

#### 4.2.3 USO DE SUSTRATOS ARTIFICIALES

El uso de sustratos artificiales es necesario en muchos estudios ya que proporcionan una superficie uniforme para examinar el desarrollo de la comunidad, la densidad y su composición. Sin embargo, su efectividad requiere de un entendimiento de cómo el tipo de sustrato, el período de incubación y la localización puede afectar el grado en que la comunidad natural estará representada (Lane *et al.*, 2003).

Son preferibles el uso de superficies heterogéneas, como telas o cuerdas de propileno deshilachadas, aunque también se pueden usar superficies lisas sólidas como porta objetos y baldosas de barro (Lane *et al.*, 2003; Cambra *et al.*, 2005). También se pueden usar superficies lisas homogéneas y de porosidad uniforme, como la malla de mosquetero de fibra de vidrio, que además permite realizar estudios ecológicos y

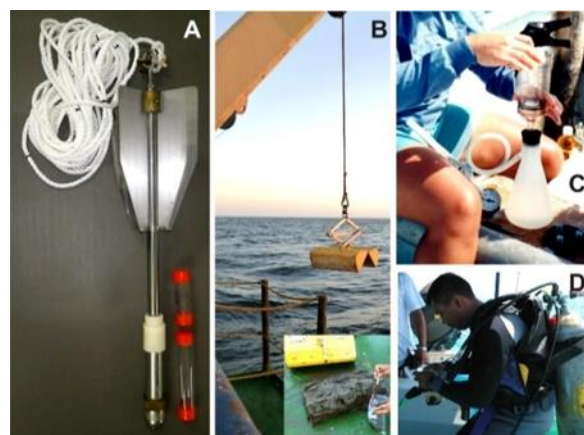


Figura 5. Equipo y material básico para el muestreo de microalgas bentónicas: (A) Nucleador gravitacional. (B) Draga. (C) Sistema básico de filtración y bomba manual. (D) Equipo de buceo SCUBA.

Tabla III. Métodos ficológicos o palinológicos para separar, limpiar y concentrar microalgas (estadios vegetativo y quístico) del sedimento.

Método	Descripción	Aplicación	Referencia
Técnica de tamizado	Un peso o volumen conocido de sedimento marino se re-suspende en agua de mar filtrada y se sónica (2–5 min.) y tamiza (250, 125 y 20 $\mu\text{m}$ ). La fracción de 20 $\mu\text{m}$ se lava sucesivamente. Conteniendo la fracción de 20 $\mu\text{m}$ en un cristizador, se retiran arenas y granos finos, creando con una piseta un vórtice para favorecer la resuspensión de los quistes y diatomeas. Finalmente, el líquido resuspendido se filtra (20 $\mu\text{m}$ ) y la muestra concentrada se recupera en un vial (10 mL).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ensayos de germinación de quistes de dinoflagelados, para el establecimiento de la relación quiste-teca y/o establecer cepas.</li> <li>• Estudios taxonómicos de diatomeas bentónicas.</li> <li>• Para análisis cualitativo y cuantitativo de los quistes o diatomeas en sedimento marino superficial.</li> </ul>	Matsuoka y Fukuyo (2000)
Técnica palinológica para quistes de dinoflagelados	Un peso conocido de sedimento seco se mezcla con un marcador (polen de <i>Lycopodium clavatum</i> ). El sedimento se tamiza (106 y 10 $\mu\text{m}$ ) y la fracción retenida en 10 $\mu\text{m}$ se lava con ácido clorhídrico al 10% y ácido fluorhídrico concentrado. Se preparan laminillas permanentes, la cuales se analizan cualitativa y/o cuantitativamente.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para análisis cualitativo y cuantitativo de los quistes en sedimento marino superficial o en estratos específicos de núcleos sedimentarios</li> </ul>	De Vernal <i>et al.</i> (2010)
Técnica palinológica para diatomeas	Un gramo de sedimento seco se trata secuencialmente con ácido clorhídrico, peróxido de hidrógeno y agua destilada para remover carbonatos y materia orgánica. Se preparan laminillas permanentes con resinas sintéticas, la cuales se analizan cualitativa y/o cuantitativamente.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para análisis cualitativo y cuantitativo de diatomeas en sedimento marino superficial o en estratos específicos de núcleos sedimentarios</li> </ul>	De Vernal <i>et al.</i> (2010)

análisis cuantitativos más precisos (Tester *et al.*, 2014). Si se opta por porta objetos, éstos deben ser nuevos y estándar (sin ningún tipo de recubrimiento), y se debe de evitar en lo posible tocarlos directamente con las manos para no dejar huellas de aceite que puedan afectar la colonización (Danielson, 2014). En el mercado existen aditamentos para coleccionar microalgas, conocidos como muestreadores de perifiton, los cuales consisten de un multiportaobjetos de 16 plazas y un arnés con flotadores.

Cuando se usan sustratos artificiales, un mes de período de incubación puede ser tiempo suficiente para proporcionar resultados reproducibles y representativos de la comunidad natural (Lane *et al.*, 2003). Sin embargo, para garantizar la colecta de una comunidad de microalgas madura, se requiere que, como mínimo el sustrato artificial esté expuesto entre 7–8 semanas. Por lo tanto, el tiempo de exposición dependerá de los alcances de la investigación y de las condiciones ambientales (Cambra *et al.*, 2005).

El diseño y la ubicación de los sustratos debe contemplar una exposición similar en todas las réplicas, y que el período de exposición e inicio de la colecta esté sincronizado (Cambra *et al.*, 2005). Para la ubicación y definición del número de réplicas, se debe de considerar el uso de un GPS y la posible pérdida de muestras por vandalismo o malas condiciones ambientales. El diseño debe ser simple y discreto, también debe de garantizar un impacto mínimo al ambiente y a las actividades que comúnmente se realicen en la zona.

## 5. SISTEMAS AUTOMATIZADOS DE MUESTREO Y ANÁLISIS EN TIEMPO REAL

Con el acelerado desarrollo científico y tecnológico, así como la implementación de directrices gubernamentales en materia de manejo y preservación de los ecosistemas costeros y oceánicos, se ha propiciado un resurgimiento en el uso de sistemas marinos

autónomos para el mapeo y monitoreo ambiental (Suberg *et al.*, 2014). Estos equipos están esencialmente integrados por sensores que miden diferentes parámetros hidrológicos y biológicos, así como por instrumentos electromecánicos y de sistemas de fluidos, diseñados para coleccionar muestras discretas de agua; e incluso algunos, al ir midiendo en tiempo real ciertas propiedades químicas y físicas del entorno, pueden decidir la estrategia de muestreo y con la recopilación de datos puede crear modelos probabilísticos para diseñar estrategias de muestreo subsiguientes (Das *et al.*, 2015).

Algunos equipos autónomos pueden concentrar microorganismos o partículas, e incluso tener aplicaciones automáticas de pruebas moleculares para una rápida identificación de microorganismos nocivos, como microalgas tóxicas y bacterias indicadoras de contaminación fecal (Doucette *et al.*, 2009; Eberhart *et al.*, 2012; Yamahara *et al.*, 2015). Las muestras se procesan *in situ* y en pocas horas los resultados se recaban de forma remota el mismo día de la colecta, mientras que los datos hidrológicos como la temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto y clorofila *a*, se obtienen en tiempo real.

También existen sistemas autónomos programables de muestreo *in situ* para microalgas planctónicas, que están diseñados para bombear agua, filtrar múltiples muestras y coleccionarlas en bolsas especiales y en algunos casos con la posibilidad de adicionar fijadores. Otros sistemas como los citómetros de flujo sumergibles, son capaces de generar *in situ* y en tiempo real imágenes de partículas (<10–150 µm). Usando una combinación de citometría de flujo, tecnología de video para capturar imágenes de alta resolución y programas que procesan y clasifican las imágenes, en algunos casos se logra identificar microalgas a nivel género o especie.

## **6. CONSIDERACIONES PARA EL CUIDADO Y MANEJO ADECUADO DE LAS MUESTRAS DE MICROALGAS**

### **MUESTRAS EN VIVO**

Para evitar daño celular y mantener la viabilidad de las muestras es recomendable llenar la totalidad del recipiente colector para minimizar, durante el traslado, la agitación excesiva. Las muestras se deben mantener en una hielera para evitar irradiación excesiva o estrés térmico; en general, deben mantenerse a temperaturas más frías (5-10°C) con respecto al hábitat donde fueron colectadas (Kawai *et al.*, 2005). Se pueden usar trozos de hielo y/o bolsas de gel, evitando en lo posible que queden en contacto directo con el recipiente que contiene la muestra; para lograr esto se pueden poner barreras de hule espuma. Como se mencionó anteriormente, el zooplancton debe removerse de inmediato.

### **MUESTRAS FIJADAS**

La fijación de las muestras es un aspecto muy importante a considerar si éstas se pretenden conservar a largo plazo, así como para minimizar las alteraciones que el fijador pueda ocasionar a las características celulares de las microalgas (forma y tamaño). Los preservantes más utilizados son el Lugol y el formaldehído. Por lo general todas las muestras fijadas se deben conservar protegidas de la luz y en un lugar fresco. También puede ser conveniente fijar alícuotas de la muestra con distintos fijadores. En la tabla IV se describen las ventajas y desventajas de los fijadores/preservantes más comunes, así como los reactivos que lo componen y su forma de preparación.



Tabla IV. Fijadores/conservadores comúnmente empleados para microalgas.

Fijador	Descripción	Preparación	Referencia
Lugol	<p>Preserva fitoflagelados, cianobacterias y dinoflagelados desnudos. Por cada 100 mL de muestra se adiciona de 0.2 a 0.5 mL.</p> <p><b>Ventajas:</b> El yodo conserva, colorea y hace más pesadas las células. El ácido acético conserva cilios y flagelos. No coagulante con efecto en el estado coloidal. Si las muestras se almacenan en la oscuridad, pueden conservarse por más de 10 años.</p> <p><b>Desventajas:</b> Cambia la coloración de las células, dificulta observación de organelos y tecas de dinoflagelados. Se degrada por foto-oxidación, siendo conveniente añadirlo periódicamente. Levemente tóxico, dañino por contacto en piel o ingestión.</p>	<p><b>Solución ácida:</b> 20 g Yoduro de potasio (KI) 10 g Iodo (I<sub>2</sub>) 20 ml ácido acético glacial 200 ml agua destilada</p> <p><b>Solución alcalina:</b> 20 g Yoduro de potasio (KI) 10 g Iodo (I<sub>2</sub>) 50 g acetato de sodio 200 ml agua destilada</p> <p><b>Solución neutra:</b> 20 g Yoduro de potasio (KI) 10 g Iodo (I<sub>2</sub>) 200 ml agua destilada</p>	Throndsen (1978) Lars y Malte (2010) Reguera <i>et al.</i> (2011)
Formaldehído neutralizado	<p>Preserva diatomeas y dinoflagelados tecados facilitando su identificación. Se añade 1 volumen de formol por cada 9 de muestra.</p> <p><b>Ventajas:</b> Con un adecuado almacenamiento, conserva las muestras por años. No coagulante con efecto reticulante. Económico.</p> <p><b>Desventajas:</b> Produce cierta deformación celular y pérdida de flagelos. Tóxico por inhalación, irritante moderado en la piel, irritante severo para los ojos y cancerígeno por exposición crónica.</p>	500 ml formaldehído 40% 500 ml agua destilada 100 g hexametilentetramida pH 7.3–7.9	Throndsen (1978) Lars y Malte (2010) Reguera <i>et al.</i> (2011)
Glutaraldehído (V/V) 2%	<p>Se prepara en soluciones diluidas a pH fisiológico. No coagulante y tiene efecto por reticulación en las células, asegurando su máxima preservación química y espacial.</p> <p><b>Ventajas:</b> Potencial de oxidación parecido al formol. Es un compuesto miscible en agua y con fuerte poder de penetración. Fija proteínas y estructuras celulares como ADN y membranas.</p>	10 ml glutaraldehído 8% 30 ml agua de mar filtrada	Lars y Malte (2010) Haifeng <i>et al.</i> (2013)
Etanol (V/V) 70%	<p>Penetra lentamente en las células produciendo contracción y endurecimiento.</p> <p><b>Ventajas:</b> coagulante, no aditivo y de bajo potencial de ionización (0.45 volt.). Es miscible en agua en todas sus proporciones y compatible con todos aquellos fijadores que no tienen actividad oxidante fuerte. No produce efectos de sobre-coloración. Provoca la precipitación de las proteínas sin desnaturalizarlas.</p>	Etanol Agua destilada	Lars y Malte (2010) Megías <i>et al.</i> (2015).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- CAMBRA, J.**, Ector, L., Sabater, S. 2005. Protocolos de muestreo para Fitobentos (microalgas bentónicas). *En: Metodología para el establecimiento del Estado Ecológico según la Directiva del Marco Agua*. Ministerio del Medio Ambiente. Confederación Hidrográfica del Ebro. Zaragoza. España. 17–20 págs.
- DAS, J.**, Py, F., Harvey, J. B. J., Ryan, J. P., Gellene, A., Graham, R., Caron, D. A., Rajan, K., Sukhatme, G. S. 2015. Data-driven robotic sampling for marine ecosystem monitoring. *The International Journal of Robotics Research* 1–18, DOI: 10.1177/0278364915587723.
- DANIELSON, T. J.** 2014. Protocols for sampling benthic algae in rivers, streams, and freshwater wetlands. Standard operating procedure. Biomonitoring Program Division of Environmental Assessment. Bureau of Land and Water Quality. Doc num: DEPLW-0634B-2014. Augusta, M. E. 19 pp.
- DAWES, J. C.** 1991. Botánica marina. Editorial Limusa. México. 579–605 págs.
- DE VERNAL, A.**, Henry, M., Bilodeau, G. 2010. Micropaleontological preparation techniques and analyses (3a. edition). Notes prepared for students of course SCT 8245. Département des Sciences de la Terre. L'Université du Québec à Montréal (UQAM). 35 pp.
- DOUCETTE, G. J.**, Mikulski, C. M., Jones, K. L., King, K. L., Greenfield, D. I., Marin, R. III, Jensen, S., Roman, B., Elliott, C. T., Scholin, C. A. 2009. Remote, subsurface detection of the algal toxin domoic acid onboard the Environmental Sample Processor: Assay development and field trials. *Harmful Algae* 8: 880–888.
- DODSON, A. N.**, Thomas, W. H. 1978. Reverse filtration. *En: Phytoplankton Manual*. Sournia, A. (Ed). Monographs on oceanographic methodology 6. UNESCO, Paris. 104–107 pp.
- EBERHART, B.L.**, Bill, B. D., Trainer, V. L. 2012. Remote sampling of harmful algal blooms: A case study on the Washington State coast. *Harmful Algae* 19: 39–45.
- FRANKS, P. J. S.**, Keafer, B. A. 2004. Sampling techniques and strategies for coastal phytoplankton blooms. *En: Manual on Harmful Marine Microalgae*. Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. (Eds.). UNESCO, Paris, 51–76 pp.
- FERRARIO M. E.**, Sar, E. A., Sala, S. E. 1995. Metodología básica para el estudio del fitoplancton con especial referencia a las diatomeas. *En: Manual de Métodos Ficológicos*. Alveal, K., Ferrario, M. E., Oliveira, E. C. y Sar, E. (eds.) Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 1–23 págs.
- GARDNER, W. D.**, Biscaye, P. E., Richardson, M. J. 1997. A sediment trap experiment in the Vema channel to evaluate the effect of horizontal particle fluxes on measured vertical fluxes. *Journal of Marine Research* 55: 995–1028.
- GONZÁLEZ de Infante, A.** 1988. El plancton de las aguas continentales. Washington D. C. Secretaría General de la OEA. 130 págs.
- HAIFENG, G.**, Zhaohu, L., Ting, T. L., Dongzhao, L. 2013. Morphology and phylogeny of *Scrippsiella enormes* sp. nov. and *S. cf spinifera* (Peridinales, Dinophyceae) from the China Sea. *Phycologia* 52: 182–190.
- KAWAI, H.**, Motomura, T., Okuda, K. 2005. Isolation and purification techniques for microalgae. *En: Algal Culturing Techniques*. Andersen, R. A. (Ed.). Elsevier y Phycological Society of America. San Diego, CA. 133–143 pp.
- LANE, C. M.**, Taffs, K. H., y Corfiel, J. L. 2003. A comparison of diatom community structure on natural and artificial substrata. *Hydrobiologia* 493: 65–79.
- LANGE, C. B.**, Boltovskoy, D. 1995. Trampas de sedimento. *En: Manual de Métodos Ficológicos*. Alveal, K.,

- Ferrario, M. E., Oliveira, E. C. y Sar, E. (Eds.) Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 93–118 págs.
- LARS, E.**, Malte, E. 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. *En: Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis.* Karlson, B., Cusack, C. y Bresnan, E. (Eds.). Intergovernmental Oceanographic Commission of ©UNESCO. IOC Manuals and Guides, no. 55 (IOC/2010/MG/55). Paris. 13–20 pp.
- MATSUOKA, K.**, Fukuyo, Y. 2000. Guía técnica para el estudio de quistes de dinoflagelados actuales. WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC. Tokio, 30 pp.
- MEGÍAS, M.**, Molist, P., Pombal, M. A. 2015. Atlas de histología animal y vegetal. Técnicas histológicas. Fijación. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. España 4–10 págs.
- MORQUECHO-ESCAMILLA, L.** 2004. Estudio de la dinámica poblacional de dinoflagelados en Bahía Concepción, Golfo de California: relación entre las fases quística y vegetativa. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 107 págs.
- RAMÍREZ, J. J.** 2000. Fitoplancton de agua dulce: Bases ecológicas, taxonómicas y sanitarias. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. Colombia, 224 págs.
- REGUERA, B.**, Alonso, R., Moreira, A., Méndez, S. 2011. Guía para el diseño y puesta en marcha de un plan de seguimiento de microalgas productoras de toxinas. COI de UNESCO y OIEA, Paris y Viena. Manuales y Guías de la COI, 59 (español solamente). 46 págs.
- SAR, E.**, Ferrario, M., Reguera, B. 2002. *Floraciones algales nocivas en el cono sur americano.* Instituto Español de Oceanografía. España. 40–46 págs. Disponible en: <http://www.bclme.org/factfig/HAB%20workshop/Books/SarEtAl2002.pdf>.
- STEVENSON, R. J.**, Bothwell, M. L., Lowe, R. L. 1996. Algal Ecology: Freshwater Benthic Systems. Academic Press; Boston. 753 págs.
- SUBERG, L.**, Wynn, R. B., Kooij, J., Fernand, L., Fielding, S., Guihen, D., Gillespie, D., Johnson, M., Gkikopoulou, K. C., Allan, I. J., Vrana, B., Miller, P. I., Smeed, D., Jones, A. R. 2014. Assessing the potential autonomous submarine gliders for ecosystem monitoring across multiple trophic levels (plankton to cetaceans) and pollutants in shallow shelf seas. *Methods in Oceanography* 10: 70–89.
- TANGEN, K.** (1978). Nets. *En: Phytoplankton Manual.* Sournia, A. (Ed.). Monographs on oceanographic methodology 6. UNESCO, Paris. 50–58 pp.
- TAYLOR, J. C.**, Harding, W. R., Archibald C. G. M. 2007. A methods manual for the collection, preparation and analysis of diatom samples (version 1.0). WRC Report TT 281/07. Water Research Commission, Printed in the Republic of South Africa. 49 pp.
- TESTER, P. A.**, Kibler, S. R., Holland, W. C., Usup, G., Vandersea, M. W., Leaw, C. P., Teen, L. P., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M. A., Litaker, R. W. 2014. Sampling harmful benthic dinoflagellates: comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae* 39: 8–25.
- THRONDSSEN, J.** 1978. Preservation and storage. *En: Phytoplankton Manual.* Sournia, A. (Ed.). Monographs on oceanographic methodology 6. UNESCO, Paris. 69–74pp.
- VENRICK, E. L.** 1978a. Sampling design. *En: Phytoplankton Manual.* Sournia, A. (Ed.). Monographs on oceanographic methodology 6. UNESCO, Paris. 7–16 pp.
- VENRICK, E. L.** 1978b. Waters-bottles. *En: Phytoplankton Manual.* Sournia, A. (Ed.). Monographs on oceanographic methodology 6. UNESCO, Paris. 33–40 pp.

- VENRICK, E. L.** 1995. Muestreo y submuestreo del fitoplancton marino y dulceacuícola. *En*: Manual de Métodos Ficológicos. Alveal, K, Ferrario, M. E., Oliveira, E. C. y Zar, E. (Eds.). Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 199–218 págs.
- YAMAHARA, K. M.,** Demir-Hilton, E., Preston, C. M., Marin, R. III, Pargett, D., Roman, B., Jensen, S., Birch, J. M., Scholin, C. A. 2015. Simultaneous monitoring of faecal indicators and harmful algae blooms using an *in-situ* autonomous sensor. *Applied Microbiology* 61: 130–13.

## CAPÍTULO 4

# AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS DE MICROALGAS

<sup>1</sup>MARTE VIRGEN FÉLIX, <sup>1,2</sup>MARÍA CONCEPCIÓN LORA VILCHIS

<sup>1</sup>Cepario de Microalgas. <sup>2</sup>Laboratorio de Alimento Vivo.  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR).  
La Paz, Baja California Sur, 23096, México.  
marte04@cibnor.mx, cony04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. EQUIPOS, MATERIALES, SOLUCIONES Y REACTIVOS
3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO
  - 3.1 CON MICROPIPETA
  - 3.2 POR DILUCIÓN SERIADA
  - 3.3 POR ESTRIA EN AGAR
4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN
  - 4.1 CENTRIFUGACIÓN
  - 4.2 ULTRASONIDO
  - 4.3 TELURITO DE POTASIO
  - 4.4 ANTIBIÓTICOS
  - 4.5 DIÓXIDO DE GERMANIO
5. MANTENIMIENTO DE CEPAS
  - 5.1 RECOMENDACIONES
  - 5.2 LAVADO DE MATERIAL
  - 5.3 CONDICIONES DE CULTIVO
    - 5.3.1. ILUMINACIÓN
    - 5.3.2. TEMPERATURA
    - 5.3.3. AGUA DE CULTIVO
    - 5.3.4. MEDIO DE CULTIVO
6. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** cepa, aislamiento, purificación, mantenimiento de cepas

---

### 1. INTRODUCCIÓN

El término microalga, incluye células tanto procariontas como eucariotas microscópicas, coloniales o filamentosas, pueden encontrarse en aguas marinas y dulces, suelos y otros ambientes; la mayoría realiza fotosíntesis oxigénica. Los usos y

aplicaciones de las microalgas son diversos, y en la mayoría de los casos se requiere contar con la cepa de interés, esto es tenerla aislada y limpia, además de ofrecerle las condiciones más adecuadas para su crecimiento en forma similar a su medio ambiente natural. Las cepas que requieren condiciones extremas (ej. alta salinidad, pH alcalino o ácido) son más difíciles de mantener que las que toleran amplias variaciones. Es importante por lo tanto tomar en cuenta las características del medio ambiente del cuál fue obtenida la muestra para el aislamiento de la cepa, o las condiciones en las que han permanecido en mantenimiento. Los métodos expuestos aquí son indicaciones promedio y en algunos casos puede ser necesario hacer ajustes específicos a la cepa de interés. No son métodos difíciles, pero requieren paciencia y perseverancia y tienen como finalidad la obtención de cultivos clonales unialgales con una carga bacteriana baja, así como asegurar un mantenimiento adecuado a los mismos.

### 2. EQUIPOS, MATERIALES, SOLUCIONES Y REACTIVOS

- A. Microscopios
  - Microscopio estereoscópico con amplificación hasta 100 X
  - Microscopio compuesto con amplificación hasta 1000 X
- B. Equipos y aparatos
  - Mechero
  - Campana de flujo laminar

- Refrigerador
  - Centrífuga (2000-3000 rpm)
  - Baño ultrasónico
  - Lámpara ultravioleta
  - Autoclave
  - Esterilizador de asas
- C. Material de vidrio y plástico
- Cajas multipozo de 24 orificios
  - Tubos de vidrio de 20 x 125 mm con tapón de rosca (polipropileno)
  - Pipetas Pasteur
  - Aguja hipodérmica 25G x 16 (naranja)
  - Asa bacteriológica
  - Capilares
  - Cajas de Petri grandes
  - Bulbos de plástico para pipeta Pasteur
  - Tubos cónicos de 15 mL de plástico para centrifuga
  - Portaobjetos escavados
  - Matraces Erlenmeyer de 50 y 125 mL
  - Cámara de Neubauer
  - Micropipeta 100-1000  $\mu$ L
  - Puntas para micropipeta 100-1000  $\mu$ L
  - Filtros estériles de fibra de vidrio de 0.47  $\mu$ m de porosidad
  - Filtros estériles de 0.2  $\mu$ m
  - Papel parafilm
  - Encendedor de gas
- D. Soluciones y reactivos
- Medio de cultivo estéril
  - Medio de cultivo estéril al 50%
  - Agua de mar y destilada estéril
  - Alcohol al 70%
  - Agar
  - Telurito de potasio ( $K_2TeO_3$ )
  - Solución stock No. 1 de mezcla de antibióticos (750 mg de penicilina G, 100 mg de kanamicina y 200 mg de neomicina en 100 mL de agua destilada)
  - Medio de enriquecimiento para bacterias

### 3. MÉTODOS DE AISLAMIENTO

Con estos métodos se busca la obtención de una sola célula microalgal capaz de crecer en un determinado medio para establecer un cultivo clonal unialgal, que será la base para la obtención de una cepa (población de células descendientes de una única célula). Este cultivo unialgal, puede servir como base para la obtención de cultivos axénicos. En algunos casos es recomendable la combinación de dos o más técnicas, lo que permitirá realizar el aislamiento de una forma más sencilla. Es importante tomar la muestra en forma adecuada, por lo que será conveniente revisar previamente el capítulo de muestreo en este mismo manual. Cuando la concentración celular en la muestra sea muy baja, podría emplearse algún método para concentrar, ej. sedimentación por gravedad o inducida por centrifugación, fototactismo u otros.

#### 3.1 CON MICROPIPETA

Este método se recomienda para células de tamaño mayor a 10  $\mu$ m, como son quistes, esporas, colonias o filamentos. La idea es separar una sola célula con ayuda de un microscopio y una pipeta Pasteur preparada como microcapilar. Se lleva a cabo como sigue (Figuras 1 y 2):

- 1) Con la ayuda de un mechero, fabricar un microcapilar, calentando en la zona azul de la llama el área cercana a la punta de la pipeta Pasteur y cuando inicie la fusión del vidrio, estirar la punta con una pinza. En este momento retirarla del fuego y al solidificar el vidrio doblar la punta con la misma pinza para producir un corte homogéneo en la zona estirada para obtener un microcapilar. No debe haber bordes irregulares que pudiesen dañar las células que se pretende aislar lo cual debe corroborarse observando la punta al estereomicroscopio. Esta pipeta será utilizada para el aislamiento celular.



Figura 1. Material empleado en el aislamiento con micropipeta.

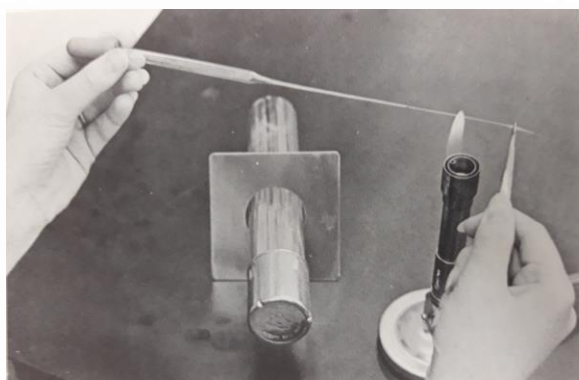


Figura 2. Microcapilar fabricado a partir de pipeta Pasteur (Schwartz *et al.*, 1975).

- 2) Limpiar con alcohol al 70% el material de vidrio requerido como son portaobjetos excavados y pipetas Pasteur y cuando estén secos,
- 3) Depositar en uno de los pocillos del portaobjetos excavado la muestra de fitoplancton.
- 4) Depositar en los otros pocillos (5-6) una gota de agua marina o agua dulce estéril dependiendo del tipo de célula a aislar.
- 5) Colocar el portaobjetos bajo el microscopio estereoscópico y localizar la célula a aislar.
- 6) Con la pipeta Pasteur previamente preparada con punta microcapilar, succionar la célula de interés y transferirla a un pocillo con agua de mar o agua destilada estéril. Observar al microscopio para localizar de nuevo la célula de interés. La succión de la célula ocurrirá por capilaridad al poner en contacto con el

agua; esto también puede favorecerse por una succión en la punta contraria de la pipeta a la que se conectará una manguera con una boquilla (Figura 1). La boquilla puede ser una punta de pipeta automática que se conectará a la boca de la persona que está aislando las células.

- 7) Repetir este procedimiento hasta aislar la microalga de otras células, cuidando de asepticar la punta de la pipeta Pasteur entre cada transferencia, sumergiéndola en alcohol al 70%, esperar a que se evapore y proceder con la siguiente transferencia.
- 8) Una vez aislada la microalga, transferirla a un pocillo de una placa multipozo conteniendo 2 mL medio de cultivo diluido al 50%.
- 9) Incubar la placa multipozo a la temperatura deseada y con una intensidad luminosa baja ( $8-12 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).
- 10) Diariamente revisar el crecimiento en los pozos y cuando la concentración celular sea observable por el color (5–10 días), tomar una submuestra de ese pozo y observarla al microscopio para corroborar que es unialgal, es decir que todas las células se parecen en su morfología.
- 11) Transferir el contenido del pozo a un volumen mayor (25 o 50 mL) e incubar a la temperatura deseada e intensidad luminosa alta ( $30-40 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).
- 12) En los muestreos o transferencias, emplear pipetas o puntas estériles y evitar corrientes de aire al realizar la operación.

### 3.2 POR DILUCIÓN SERIADA

Este método se emplea principalmente en muestras de fitoplancton con alta concentración en una especie de microalga en particular y cuando la célula de interés tiene un tamaño inferior a  $10 \mu\text{m}$  (Andersen *et al.*, 2005) (Figura 3). El método se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 1) Estimar la concentración celular de la especie de interés mediante recuento en la cámara de Neubauer, de esta forma se calcula el número de diluciones necesarias para el aislamiento.

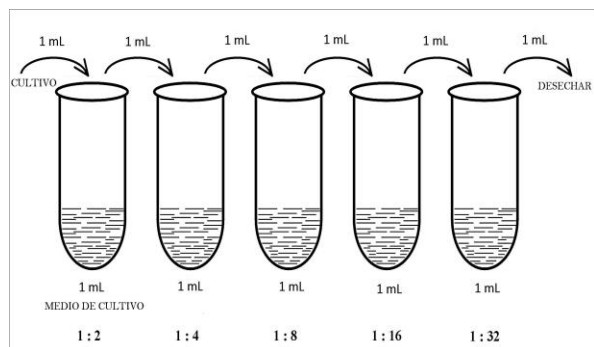


Figura 3. Aislamiento por dilución seriada.

- 2) Preparar de 6 a 10 tubos de ensayo con 9 mL de medio de cultivo estéril al 50%.
- 3) Depositar 1 mL de la muestra de fitoplancton en un tubo de ensayo.
- 4) Homogenizar perfectamente y transferir nuevamente 1 mL a otro tubo, cuidando de cambiar la punta de la micropipeta entre cada transferencia, así sucesivamente hasta la dilución calculada.
- 5) Incubar los tubos a la temperatura deseada y a intensidad lumínica baja ( $8-12 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).
- 6) Observar visualmente el desarrollo todos los días. Usualmente el desarrollo se lleva a cabo en los tubos con dilución de  $10^{-3}$  a  $10^{-6}$ , pero también dependerá de la concentración celular de la microalga.
- 7) Evaluar por observación al microscopio si el cultivo es monoalgal, en caso contrario, repetir el procedimiento de dilución hasta obtener el aislamiento deseado.
- 8) Transferir el contenido del tubo donde se observe desarrollo unialgal a un matraz Erlenmeyer conteniendo 25 o 50 mL de medio de cultivo estéril.
- 9) Si en el recuento inicial, la concentración de la microalga fuese muy baja, se recomienda adaptar el método usando placas multipozo (2 mL) en lugar de tubos de ensayo.

### 3.3 POR ESTRÍA EN AGAR

Varios tipos de microalgas pueden ser aisladas por esta técnica, incluyendo clorofitas, diatomeas bentónicas, flageladas y algunas filamentosas (Schwartz *et al.*, 1975). El método se recomienda para microalgas

que midan  $10 \mu\text{m}$  o menos.

Se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 1) Preparar cajas Petri de 9-10 cm de diámetro con agar preparado ( $10-15 \text{ g L}^{-1}$ ) con el medio de cultivo apropiado.
- 2) Depositar  $100 \mu\text{L}$  de la muestra de fitoplancton sobre un extremo del agar.
- 3) Con asa microbiológica, previamente esterilizada por calor, estriar de forma cruzada la muestra en la superficie del agar (Figura 4).

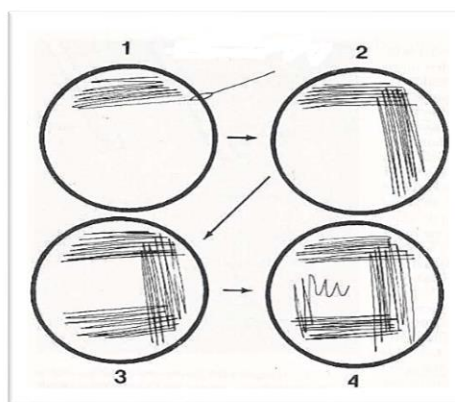


Figura 4. Aislamiento por estría en agar.

- 4) Tapar la caja y esperar unos minutos hasta que toda la muestra haya sido absorbida por el agar.
- 5) Cubrir los bordes entre las dos tapas de la caja de Petri con una tira de papel parafilm.
- 6) Invertir la caja de Petri inoculada y rotularla adecuadamente.
- 7) Incubar de 4 a 8 días a la temperatura deseada y a baja intensidad luminosa ( $8-12 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).
- 8) Con la ayuda del microscopio estereoscópico, observar el desarrollo de colonias completamente aisladas.
- 9) Una vez localizadas, con la ayuda de una aguja de jeringa hipodérmica (25Gx16 color naranja), esterilizada a la flama de un encendedor de gas inmediatamente antes, proceder a levantar parte de la colonia o la colonia en su totalidad cortando cuidadosamente el agar donde se encuentra depositada.
- 10) Transferir la colonia a un pocillo de la placa multi pozos conteniendo 1 mL del medio de cultivo al 50%.



- 11) Incubar a la temperatura deseada y a una intensidad luminosa baja ( $8-12 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),
  - 12) Diariamente revisar visualmente el desarrollo y en cuanto el color sea evidente, verificar que el cultivo sea unialgal, observando una muestra al microscopio.
  - 13) Transferir todo el volumen del pocillo a un matraz Erlenmeyer con un volumen de medio de cultivo de 25 mL e incubar a la temperatura deseada e intensidad luminosa alta ( $30-40 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).
  - 14) Una vez que el cultivo se desarrolle, comprobar mediante observación microscópica la obtención de una cepa monoalgal. En caso contrario, deberá reiniciarse el trabajo de aislamiento.
- 3) Eliminar por decantación el sobrenadante y adicionar otro volumen similar del medio de cultivo estéril.
  - 4) Resuspender el paquete celular y homogenizarlo bien.
  - 5) Repetir el procedimiento de 2-3 veces (a partir del punto 2).
  - 6) Incubar las células lavadas en medio fresco a la temperatura deseada y a una intensidad luminosa baja ( $8-12 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).
  - 7) Otra alternativa es estriar en agar  $100 \mu\text{L}$  de la suspensión de células lavadas y una vez que se observen las colonias, aislar las que se observen libres de contaminantes y sembrarlas en medio estéril en placa de pozos.

#### **4. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN**

Muchos estudios bioquímicos y fisiológicos relacionados con microalgas requieren el uso de cultivos axénicos (sin bacterias); sin embargo, deberá considerarse que estos cultivos son difíciles de obtener y de mantener en un cepario.

Los métodos de purificación permiten obtener cultivos con una carga bacteriana baja, lo que favorecerá un desarrollo saludable y facilitará el mantenimiento. En algunos casos, puede ser recomendable la combinación de dos o más técnicas.

##### **4.1 CENTRIFUGACIÓN**

La purificación por lavados es acompañada siempre por centrifugación y adición de medio estéril, procedimiento que se repite varias veces. El uso de esta técnica se recomienda para microalgas que no sean susceptibles a la manipulación, ya que pueden dañarse. En general el tiempo y la velocidad de centrifugación pueden variar dependiendo de la especie de microalga que se trate (Schwartz, 1975).

La metodología es la siguiente:

- 1) Depositar un volumen determinado del cultivo en un tubo de ensayo cónico estéril.
- 2) Centrifugar a  $1,200 \text{ xg}$  por 5 min.

##### **4.2 ULTRASONIDO**

Este método es muy efectivo para separar físicamente los contaminantes que se encuentran adheridos a la pared celular de la microalga. Fue descrito inicialmente por Brown y Bischoff (1962). Se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 1) Depositar el cultivo en un tubo de ensayo de vidrio estéril (llenar con medio de cultivo o agua hasta la mitad del tubo).
- 2) Colocar el tubo con el cultivo en el baño ultrasónico por 5 a 20 min y 90 ciclos  $\text{s}^{-1}$ .
- 3) El tiempo se determina observando las células al microscopio para determinar si hay daño celular. Aplicar pruebas de viabilidad ya que la muerte puede ocurrir incluso sin una observación al microscopio de daño estructural.
- 4) Centrifugar (punto 2) el tubo y decantar el sobrenadante.
- 5) Adicionar un volumen similar de medio de cultivo estéril y repetir el procedimiento de 3-5 veces.
- 6) Incubar a la temperatura deseada y a una intensidad luminosa baja ( $8-12 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).
- 7) Otra alternativa es estriar el paquete celular en agar y separar las colonias completamente aisladas.

### 4.3 TELURITO DE POTASIO

Un efecto bacteriostático es aquel en el que aunque no produce la muerte inmediata a una bacteria, impide su reproducción. La bacteria envejece y muere sin dejar descendencia. El compuesto químico que da tal efecto es el telurito de potasio ( $K_2TeO_3$ ). La utilización de esta sustancia fue descrita por primera vez por Ducker y Willoughby (1964) y por Rosowski y Hoshaw (1970). Se puede utilizar para obtener colonias de microalgas libres de contaminante bacterianos.

El método es el siguiente:

- 1) Preparar cajas Petri de 9-10 cm de diámetro con agar estéril (10-15 g L<sup>-1</sup> de agua destilada o marina) previamente adicionado con el medio de cultivo apropiado y telurito de potasio ( $K_2TeO_3$ ) a una concentración de 10 mg L<sup>-1</sup>.
- 2) Inocular por estría cruzada el agar con 100 µL del cultivo.
- 3) Incubar las cajas por 8-10 días a la temperatura deseada y a una intensidad luminosa baja (8-12 µmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).
- 4) Buscar al microscopio estereoscópico las colonias microalgales sobre la superficie del agar que se encuentren completamente aisladas.
- 5) Una vez localizadas, con la ayuda de una aguja hipodérmica, tomar parte de la colonia o la colonia completa y depositarla en un pocillo de una microplaca conteniendo el medio de cultivo adecuado.
- 6) Incubar a la temperatura deseada y a una intensidad luminosa baja (8-12 µmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) hasta observar un desarrollo visual que puede ser de varios días o incluso semanas, lo que dependerá de la concentración celular y de la tasa de crecimiento de la cepa inoculada.
- 7) Transferir el cultivo a un volumen mayor (50 mL).

### 4.4 ANTIBIÓTICOS

Este método puede aplicarse cuando no se tiene éxito con los métodos físicos, como centrifugación o sonicación, o como un complemento de ellos. Puede usarse un solo

antibiótico o la combinación de varios ya sea mezclados con agar o en medio líquido (Droop, 1967; Guillard, 2005).

El método que a continuación se describe, se emplea para eliminar la contaminación bacteriana de cultivos microalgales marinos o dulceacuícolas. Sin embargo, este método no siempre es 100% efectivo pues la combinación de antibióticos puede inducir varias respuestas, ejemplo: no ser letal para las bacterias presentes; la cepa microalgal puede verse afectada por los antibióticos y morir, o que no se desarrolle sin la presencia de las bacterias eliminadas.

La técnica es la siguiente:

- 1) Preparar la solución stock de antibióticos No. 1 y esterilizarla por filtración usando filtros de 0.2 µm.
- 2) Preparar una serie de 6 diluciones en tubo de vidrio con tapón de rosca estéril como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Diluciones de la mezcla de antibióticos.

TUBO	1	2	3	4	5	6
Medio de cultivo	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Mezcla de antibióticos (Penicilina, neomicina y kanamicina)	0 (0%)	25 µL (0.5%)	25 µL (1%)	25 µL (5%)	25 µL (7.5%)	25 µL (10%)
Medio para bacterias (enriquecimiento)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Cultivo algal (de 5 a 7 días de incubación)	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

- 3) El proceso inicia cuando se adiciona la microalga y se mezcla perfectamente con los antibióticos.
- 4) Incubar a la temperatura e intensidad luminosa deseada.
- 5) Tomar una muestra de 50 µL de cada tubo a las 24, 48, 72 y 96 h e inocular a un volumen similar de medio de cultivo para microalgas estéril.
- 6) Tomar una muestra y comprobar que el cultivo esté purificado y la microalga se esté replicando.
- 7) De los tubos donde el método fue exitoso, tomar una alícuota e inocularla en medio nuevo para iniciar un cultivo purificado.

## 5. MANTENIMIENTO DE CEPAS

En esta sección, se describen las condiciones generales para el mantenimiento rutinario de cepas. Estas son de suma importancia, ya que su correcta implementación evitará el colapso de una cepa o incluso de una colección completa.

Es recomendable, si se tiene el presupuesto y las instalaciones adecuadas, mantener las cepas en medio sólido y líquido, así como mantener una copia de cada cepa en un edificio diferente a donde se mantiene la cepa original bajo las mismas condiciones.

Los volúmenes de mantenimiento van de 15 a 100 mL, depositados en tubos de ensayo con tapón de rosca y en matraces Erlenmeyer tapados con torundas de algodón o tapones de fomi (Figuras 5 y 6). Ejemplo, los matraces de 125 mL deberán tener como máximo 50 mL ya que esto permitirá una superficie de intercambio gaseoso adecuada.

Los periodos de resiembra o de transferencia varían de acuerdo a la microalga, pero en general van de 3 semanas a 6 meses (Lorenz *et al.*, 2005). Se recomienda resembrar la cepa por duplicado y/o triplicado para asegurar su viabilidad.

Las transferencias, requieren de un área estéril como una campana de flujo laminar o si esto no es posible, utilizar mecheros Bunsen o Fischer que proporcionen un área de esterilidad siempre y cuando no haya corrientes de aire que la alteren.



Figura 5. Mantenimiento en matraces Erlenmeyer de 125 mL con tapones de fomi recubiertos con papel aluminio. Cepario del CIBNOR.

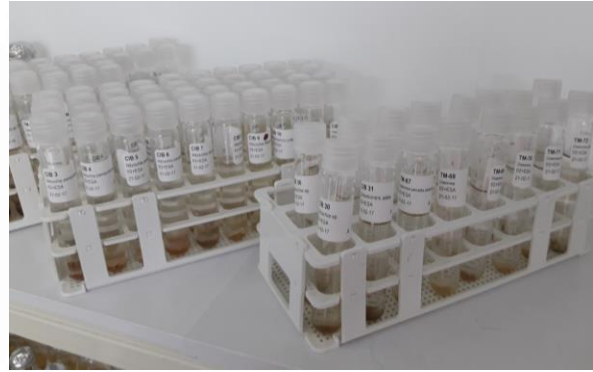


Figura 6. Mantenimiento en tubos de ensayo con tapón de rosca de polipropileno transparente. Cepario del CIBNOR.

El volumen de cultivo a transferir puede ir del 5–10% del total, lo que permitirá una mejor adaptación de la cepa a las nuevas condiciones de resiembra. Es muy importante rotular adecuadamente los recipientes del cultivo en mantenimiento, ya sea mediante plumines indelebles o con etiquetas claramente rotuladas que indiquen la clave de la cepa, el medio empleado y la fecha de resiembra. Respecto a la clave de la cepa, se recomienda emplear números consecutivos, de acuerdo al momento de ingresar al cepario. Realizada la resiembra, se recomienda mantener como respaldo el cultivo viejo, hasta que la cepa se desarrolle, entonces podrá descartarse.

### 5.1 RECOMENDACIONES

El material de vidrio debe ser de marca Pyrex o Kimax, lo que nos asegura un uso y manejo confiable. El material usado para la preparación de los medios de cultivo, debe mantenerse separado del material de uso general del laboratorio. El material nuevo de vidrio o plástico debe ser desgrasado con NaOH diluido, después sumergirlo en HCl diluido (10%) al menos por 24 h, y finalmente lavado con suficiente agua destilada. No debe usarse mezcla crómica ya que el cromo es tóxico para el fitoplancton. Las mangueras de látex desprenden compuestos tóxicos para el fitoplancton, particularmente del tipo pentaclorofenoles y tetraclorofenoles usados para preservar el látex.

Los tubos o mangueras de silicón son completamente seguros. Los tapones de hule coloreados o negros pueden ser tóxicos por lo que se recomienda el uso de tapones de silicón. Los tapones de baquelita que posean un sello en el fondo del tapón, deben ser esterilizados en autoclave mínimo 3 veces en cambios de agua de mar, debido a que desprenden compuestos fenólicos tóxicos cuando se calientan. Las autoclaves viejas con tubos de cobre no deben usarse, debido a que desprenden cobre que en exceso es tóxico para el fitoplancton.

Todo el material de vidrio, plástico, fomi, teflón, agua de mar, agua destilada, soluciones de nutrientes y medios de cultivo utilizados para el mantenimiento y cultivo de microalgas, se esterilizan en autoclave, de acuerdo a las siguientes condiciones: 121°C y 15 lbs de presión por 15 – 20 min (Kawashi y Helene, 2005).

## 5. 2 LAVADO DE MATERIAL

Este paso inicial es muy importante ya que no deben quedar restos de materia orgánica o inorgánica que podrían propiciar o ser contaminación así como causar posibles daños a los cultivos. Es importante evitar el uso de detergentes ya que muchos de ellos dejan residuos que a veces son difíciles de eliminar.

El lavado de material deberá iniciar usando agua corriente y escobillón, en seguida se deberá remojar en ácido clorhídrico o muriático 10% al menos por 24 h; posteriormente enjuagar con agua corriente y al final enjuagar 2 veces con agua destilada. Es posible reciclar el ácido algunas veces pero deberá desecharse cuando baje su potencia, lo que se observará cuando no elimina las sales o materia orgánica adherida a los materiales.

## 5.3 CONDICIONES DE CULTIVO

Las siguientes, son las condiciones generales que deben cumplirse para un buen mantenimiento.

### 5.3.1 ILUMINACIÓN

Es recomendable que la iluminación se lleve a cabo por medio de lámparas fluorescentes o de tipo led. Las lámparas fluorescentes son las del tipo “day-light” o “cool-white” de una potencia de 40 W (Abalde *et al.*, 1995). En cuanto a la iluminación led, la temperatura de color usada es entre 5000-6000°K y una potencia de 30-40 W (Figura 7). En la etapa de desarrollo inicial de la microalga se prefiere usar intensidad luminosa entre 30-40  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Una vez que el cultivo se desarrolle y ya en la etapa de mantenimiento prolongado, se deben emplear intensidades más bajas, entre 8-12  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Schulze *et al.*, 2014).

Los fotoperiodos más recomendados son 12:12 o 10:14 h luz:oscuridad, la mayoría de las microalgas se desarrollan bien en ambos.



Figura 7. Tubos fluorescentes y de tipo Led.

### 5.3.2 TEMPERATURA

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importante en el desarrollo de la microalga (Raven y Geider, 1988). En el mantenimiento de cepas lo más conveniente en la etapa de desarrollo inicial, es usar temperaturas entre 20-26°C, aunque algunas cepas pueden desarrollar bien a temperaturas más bajas. En la etapa de mantenimiento prolongado donde la iluminación es baja (8-12  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), lo más recomendable es usar temperaturas entre 15-21°C, de esta forma se puede alargar el periodo entre las resiembras.

Para cepas de nuevo ingreso, será necesario establecer el intervalo de temperaturas tolerables por éstas. Es recomendable el monitoreo de la temperatura de cultivo por medio de termómetros digitales que permiten registrar las temperaturas máximas y mínimas durante las 24 h (Figura 8).



Figura 8. Registro de la temperatura con termómetro digital. Ceparario del CIBNOR.

### 5.3.3 AGUA DE CULTIVO

Para microalgas dulceacuícolas se usa agua destilada o desionizada. Por seguridad, antes de su utilizarla se recomienda filtrar el agua por un sistema de filtros de carbón activado y de membrana, ya que de esta forma se eliminan contaminantes metálicos y partículas no deseados (Watanabe, 2005).

En las microalgas marinas, el agua de mar oceánica es el agua ideal ya que es baja en concentración de nutrientes y metales traza. Estos pueden adicionarse en las cantidades requeridas, además de que contiene menos fitoplancton, lo que hace más fácil su filtración. El agua de mar cercana a los litorales puede variar ampliamente en su composición de acuerdo a la época del año, ya que con las lluvias acumula una gran cantidad de materia orgánica, sedimentos y tiene baja salinidad (Harrison y Berges, 2005), y en la época de secas aumentan las concentración y la salinidad.

Normalmente el agua de mar debe filtrarse por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (PALL Metrigard), o de 0.2  $\mu\text{m}$  en casos

especiales. El agua de mar filtrada puede almacenarse en contenedores de plástico (previamente lavados y sumergidos en HCl al 10% por varios días). Esta agua almacenada debe mantenerse fresca, si es posible refrigerada y en la oscuridad, lo que “envejece” el agua y hace que se remineralice, lo cual es beneficioso para las microalgas. Se debe checar la salinidad con un refractómetro y si es necesario deberá ajustarse a 33-35 UPS (Unidades Prácticas de Salinidad) con agua destilada. Salinidades menores hasta de 28-30 UPS pueden dejarse sin modificar ya que son benéficas para el fitoplancton marino. Una vez definida la salinidad de trabajo, es importante mantenerla en los cultivos de la misma cepa.

El agua de cultivo se deberá esterilizar en autoclave, aunque también se puede esterilizar por filtración (0.2  $\mu\text{m}$ ), volúmenes pequeños. El empleo del autoclave para el agua marina puede originar problemas de precipitación de algunos de los componentes, y cuando estos precipitan ya no están disponibles y pueden ser dañinos para las células en cultivo. Hay varias maneras de evitar la precipitación, tales como el uso de soluciones amortiguadoras o buffers de pH o enfriar rápidamente de inmediato a la salida del autoclave. Otra manera es la esterilización por pasteurización o tindalización (Kawachi y Helene, 2005).

### 5.3.4 MEDIO DE CULTIVO

Los reactivos (sales) para la preparación del medio de cultivo deben ser de grado reactivo y de marca reconocida, esto es con el fin de evitar la adición de contaminantes que podrían alterar el crecimiento en forma imprevista.

Los nutrientes en un medio de cultivo se dividen en: **macronutrientes** (carbono, nitrógeno, fósforo y silicio), **micronutrientes metálicos** (hierro, manganeso, zinc, cobalto, cobre, molibdeno y selenio) y **iones** ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ ).

Los macronutrientes y los iones son por lo general muy solubles en agua de mar y no son

tóxicos en altas concentraciones por lo que pueden adicionarse sin problema para soportar un desarrollo microalgal vigoroso. En contraste, muchos de los metales traza como cobre, zinc y cobalto son tóxicos en altas concentraciones y se preparan como stocks primarios a mayor concentración para el pesado de cantidades razonables (Harrison y Berges, 2005). El hierro es insoluble en agua de mar y forma óxidos férricos lo que lo hace no disponible para las microalgas; además este precipitado férrico adsorbe otros metales esenciales bajando su disponibilidad. Por lo anterior el uso de agentes quelantes, soluciones amortiguadoras o buffers, es indispensable ya que regulen la disponibilidad de los iones metálicos, principalmente de los divalentes en el medio, en forma similar a lo que hace un buffer de pH con la disponibilidad de los iones hidrógeno (Harrison y Berges, 2005).

Las proporciones más comúnmente usadas de quelante:metal son 1.5:1 y 3:1. El EDTA (ácido etilendiamintetraacético) es el quelante más empleado en forma de sal disódica soluble en agua. También se utiliza en medios de agua marina y dulce.

Otros compuestos requeridos por las microalgas en cantidades traza, son las vitaminas. Las tres más importantes son: B<sub>12</sub> (cianocobalamina), tiamina y biotina. Sin embargo, muy pocas microalgas necesitan las tres a la vez. La mayoría requieren una o dos. El orden general de requerimiento de vitaminas es B<sub>12</sub> > tiamina > biotina (Provasoli y Carlucci, 1974).

El extracto de suelo es usado para mantener con éxito algunas especies planctónicas y bentónicas, en general es útil para el mantenimiento de especies difíciles, las células mantienen su morfología original en cultivos de mantenimiento prolongado (McLachlan, 1973).

El uso de soluciones amortiguadoras de pH o buffers no es común en medios marinos, pero sí en medios de agua dulce. No son muy recomendables ya que al ser compuestos orgánicos, pueden servir como fuente de

carbono a las bacterias.

Algunos de los medios de cultivo más utilizados son:

Medios Marinos, f/2, Erdscheiber's, Agua de Mar Enriquecida, Agua de Mar Suplementada y L1 (UTEX). Medios Dulceacuícolas, Medio 3N-BBM+V, Medio Bold, Medio Mes-Volvox y para cianobacterias Medio Spirulina y Medio Allen. Para conocer la composición de estos medios y de otros más, se recomienda consultar el anexo de recetas de medios para agua dulce y marina en Andersen *et al.*, (2005).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ABALDE, J.**, Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., Herrero, C. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Universidade Da Coruña, España. 210 págs.
- ANDERSEN, R. A.**, Kawachi, M. 2005. Traditional Microalgae Isolation Techniques. *En*: Andersen, R. A. (Ed.). Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. London, UK, 83-100 pp.
- ANDERSEN, R. A.**, Berges, J. A., Harrison, P. J., Watanabe, M. M. 2005. Appendix A—Recipes for Freshwater and Seawater Media. *En*: Andersen, R. A. (Ed.). Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. London, UK. 429-538 pp.
- BROWN, R. M.**, Bischoff, H.W. 1962. A new and useful method for obtaining axenic cultures of algae. Phycological Society of America New Bulletin 15: 43-44.
- DROOP, M. R.** 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. British Phycological Bulletin 3(2): 295-297.
- DUCKER, S. C.**, Willoughby, L. G. 1964. Potassium telurite as bacteriostatic agent in isolating algae. Nature 202: 210.
- GULLARD, R. R. L.** 2005. Purification Methods for Microalgae. *En*: Andersen, R. A. (Ed.), Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. London, UK. 117-132 pp.
- HARRISON, P. J.**, Berges, J. A. 2005. Marine

- Culture Media. *En*: Andersen, R. A. (Ed.). Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. London, UK. 21-34 pp.
- KAWACHI, M.**, Helene, M. 2005. Sterilization and Sterile Technique. *En*: Andersen, R. A. (Ed.). Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. London, UK. 65 – 82 pp.
- LORENZ, M.**, Friedl, T., Day, J. G. 2005. Perpetual Maintenance of Actively Metabolizing Microalgal Cultures. *En*: Andersen, R.A. (Ed.), Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. London, UK. 145-156 pp.
- MCLACHLAN, J.** 1973. Growth media—marine. *En*: Stein, J., (Ed.) Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 25–51 pp.
- PROVASOLI, L.**, Carlucci, A. F. 1974. Vitamins and growth regulators. *En*: Stewart, W. D. P. (Ed). Algal Physiology and Biochemistry. Blackwell Scientific, UK, 741–87 pp.
- RAVEN, J. A.**, Geider, R. J. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytologist* 110: 441–461.
- ROSOWSKI, J. R.**, Hoshaw, R. W. 1970. Cultivation of filamentous alga in quantity on agar plates. *Journal of Phycology* 6: 220-222.
- SCHULZE, P. S. C.**, Barreira, L. A., Pereira, H. G. C. Y., Varela, J. C. S. 2014. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology* 32(8): 422 – 430.
- SCHWARTZ, W.** 1975. Methods for Microscopic Algae; Isolation and Purification. Stein, J. R. (Ed.). *En*: Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge, University Press.
- WATANABE, M. M.** 2005. Freshwater Culture Media. *En*: Andersen, R. A. (Ed.), Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. Phycological Society of America. London, UK. 13-20 pp.

## CAPÍTULO 5

# CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO

<sup>1</sup>BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA, <sup>2</sup>DOMENICO VOLTOLINA,  
<sup>3</sup>BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur. <sup>2</sup>Laboratorio de Estudios Ambientales-UAS-CIBNOR, Mazatlán, Sinaloa. <sup>3</sup>Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California.  
kitty04@cibnor.mx, voltolin04@cibnor.mx, bcordero@cicese.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 LA CÁMARA DE 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
5. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** recuento celular, curva de crecimiento, fases de crecimiento.

---

### 1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento de un cultivo de microalgas se expresa como el incremento de biomasa ya sea en número de células (cél mL<sup>-1</sup>), en peso seco (total y/o 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 específico.

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, 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) 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 están sometidos los cultivo (Alfonso, 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. RECUESTO CELULAR

### 2.1 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 (Figura 1).

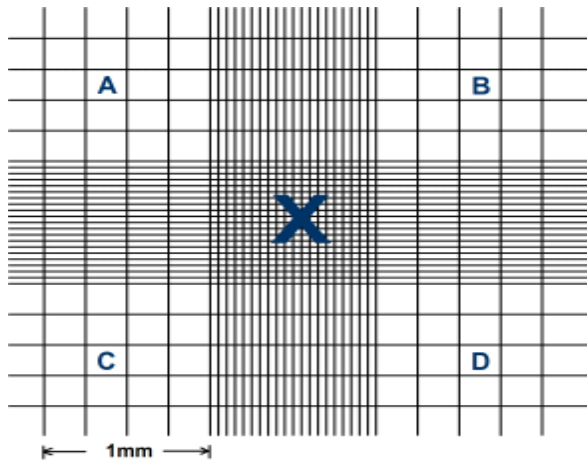


Figura 1. Reglilla de Neubauer de 9 mm<sup>2</sup>.

El hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad consta de 9 cuadrados con lados de 1 mm (área total de recuento = 0.9 mm<sup>2</sup>), cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0.1 μL. Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, cada uno con un área de 0.04 mm<sup>2</sup> (0.2 mm x 0.2 mm), a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños (Figura 1).

Para células más grandes de 6 μm 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, seleccionando cada vez al 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**.

Para microalgas de mayores dimensiones, como muchos dinoflagelados, los tipos de cámara que se utilizan comúnmente son: de Sedgwick-Rafter o el de Fuchs-Rosenthal. En la tabla 1 se dan las principales características de las cámaras más usadas.

### 2.2 Cálculos de recuento celular cámara de Neubauer

Si se contaron todas las células presentes en los 4 cuadros de 1 mm<sup>2</sup> marcados como **A**, **B**, **C** y **D**, la concentración celular se calcula de acuerdo a la fórmula:

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

En donde:

**C** = cél mL<sup>-1</sup>

**N** = promedio de células en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 μL)

**10<sup>4</sup>** = factor de conversión de 0.1 μL a 1 mL

**dil** = factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra).

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

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

**NOTA:** 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. 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.

Para determinar la concentración celular con las otras cámaras de cultivo, se recomienda consultar el **capítulo 2 del Manual y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal del año 2007** que se encuentra en el repositorio de la biblioteca del CIBNOR.

### 2.3 Protocolo para el recuento celular con la cámara de Neubauer

- Agitar el cultivo para permitir que las células tengan una distribución homogénea.
- 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<sub>2</sub> cristalino y disolver en 10 mL de CH<sub>3</sub>COOH. Mezclar ambas soluciones (A+B), agitar bien y mantener en frasco ámbar).
- Cuando el cultivo está muy concentrado (>10<sup>6</sup> cél mL<sup>-1</sup>) se diluye la muestra con agua de mar o destilada (según sea el caso).

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<sup>2</sup>, de acuerdo con la fórmula:

$$\mu = x \pm 2\sqrt{x}$$

en la cual  $\mu$  es la media poblacional, calculada a partir del estimador  $x$  el cual es el promedio de células contadas en 1 mm<sup>2</sup> (Lund *et al.*, 1958). Por lo anterior, si se cuentan en promedio 25 células en 1 mm<sup>2</sup>, la precisión de ese recuento es  $25 \pm 2\sqrt{25} = 25 \pm 10$ .

- El tubo se agita y se succiona una muestra con una pipeta Pasteur.
- 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 cubreobjetos, 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** (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 ( $\text{cél mL}^{-1}$ ) se utiliza la fórmula indicada anteriormente.
  - i) Con los datos de concentración celular 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 y en el eje de las "X" el tiempo (en días). También es importante determinar la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), el tiempo de generación ( $T_g$ ) y el número de duplicaciones ( $n$ ) (Schoen, 1998).

### 3. DENSIDAD OPTICA

La concentración celular puede ser estimada de manera indirecta usando la densidad óptica de un cultivo. Es una técnica menos precisa del recuento directo, pero permite una valuación 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, ya que todavía se usa en algunos laboratorios para reconocer rápidamente las fases de crecimiento de los cultivos. Esto 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 que permite obtener una lectura, aun cuando la concentración celular sea 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 que diferentes autores sugieren **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 la absorbancia (densidad óptica) en el 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 en el eje de las “Y” con el tiempo en el eje de las “X”.

#### 4. CURVA DE CRECIMIENTO

De la misma manera que las 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 cambia 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 ( $\mu$ ) 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 ( $\mu$ ) está definida por la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{dx}{dt}$$

En donde:

$x$  = concentración de la biomasa (cél mL<sup>-1</sup>)

$t$  = 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; Barsanti y Gualtieri, 2006), las cuales se definen a continuación.

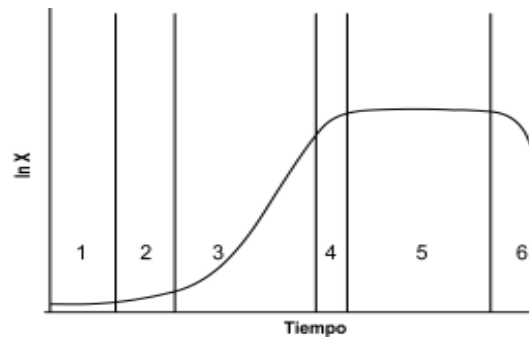


Figura 2. Curva de crecimiento típica en la cual se muestran las diferentes fases, marcadas como: 1. Fase lag; 2. Fase de aceleramiento; 3. Fase exponencial; 4. Fase de desaceleración del crecimiento; 5. Fase estacionaria; 6. Fase de muerte.

#### 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 y el crecimiento puede no ser exitoso, de ahí que se recomienda que las células del cultivo estén en fase logarítmica de crecimiento. La fase lag es atribuida principalmente a la adaptación fisiológica de las células al metabolismo del crecimiento, como un incremento en los niveles de las enzimas y de los metabolitos involucrados en la división celular y en la fijación de carbono. 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. Durante esta fase, la tasa de crecimiento es cero.

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

esta fase, la tasa de crecimiento se incrementa.

**3. Fase exponencial:** durante este periodo la velocidad de crecimiento adquiere su valor 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. Normalmente esta fase es de corta duración debido al efecto de autosombreado causado el incremento en la población celular. En esta fase, la tasa de crecimiento es constante.

**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. 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. En esta fase, la tasa de crecimiento disminuye.

**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 también 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. En esta fase, la tasa de crecimiento es cero.

**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. En esa fase, la tasa de crecimiento es negativa.

#### 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 (Guillard, 1973):

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{T_2 - T_1}$$

En donde:

$\mu$  = tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ )

$X$  = concentración celular ( $cél\ mL^{-1}$ ) en dos tiempos de la fase exponencial y/o logarítmica de crecimiento.

$\ln$  = logaritmo natural de  $X_2$  y  $X_1$

$T$  = tiempo en días

El tiempo 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:

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

En donde:

$T_g$  = tiempo de generación (d)

$\ln 2 = 0.6931$

$\mu$  = tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ )

En la figura 3 se representa la curva de crecimiento de una microalga en función de

su tasa de crecimiento.

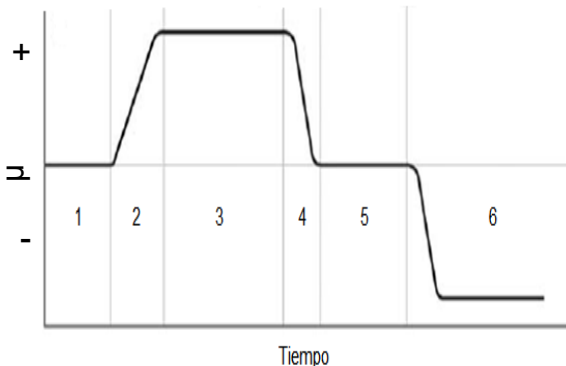


Figura 3. Curva de crecimiento en función de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), en la cual se muestran las diferentes fases, marcadas como: 1. Fase lag; 2. Fase de aceleramiento; 3. Fase exponencial; 4. Fase de desaceleración del crecimiento; 5. Fase estacionaria; 6. Fase de muerte.

#### 4.4 Número total de divisiones celulares

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 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 ( $\mu$ ), ya que cualquier cambio de la pendiente de esta nueva curva de dispersión indica una variación de la velocidad de duplicación.

Para visualizar esta parte, sugerimos revisar el capítulo 2 del Manual y Herramientas Analíticas en el Evaluación de la Biomasa Microalgal publicada en el 2007, y que está accesible en el repositorio de la biblioteca del CIBNOR.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- ALFONSO, E.**, Leal, S. 1998. Creación y Mantenimiento de un Cepario de Microalgas. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana. Habana, Cuba. 21 págs.
- BARSANTI, L.**, Gualtieri, P. 2006. Algal Culturing. *En: Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Barsanti L., Gualter, P. (Eds). CRC Taylor and Francis Group, LLC. Boca Raton, Fl. 209-249 pp.
- 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.**, 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.
- LUND, J. W. G.**, Kipling, C., 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.**, Maske, H. 1982. Algae: Growth Techniques and Biomass Production. *En: Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*. Coombs, J., Hall, D. O. (Eds). Pergamon Press. Section 3. 62-77 pp.

## CAPÍTULO 6

# DETERMINACIÓN DE PESO SECO Y CONTENIDO ORGÁNICO E INORGÁNICO

<sup>1</sup>BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA, <sup>2</sup>BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL,  
<sup>3</sup>DOMENICO VOLTOLINA

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur. <sup>2</sup>Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California. <sup>3</sup>Laboratorio de Estudios Ambientales, UAS-CIBNOR, Mazatlán, Sinaloa.  
kitty04@cibnor.mx, bcordero@cicese.mx, voltolin04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. DETERMINACIÓN DE BIOMASA SECA, TOTAL Y ORGÁNICA
  - 2.1 PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PESO SECO CONTENIDO ORGÁNICO E INORGÁNICO
  - 2.2 ECUACIONES PARA EL CÁLCULO DE PESO SECO TOTAL, ORGÁNICO Y CENIZAS
3. PESOS UNITARIOS
4. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** peso seco, peso orgánico, cenizas

---

### 1. INTRODUCCIÓN

La evaluación de la calidad de las microalgas en los diferentes sistemas de cultivo requiere del conocimiento de la cantidad de biomasa seca y orgánica, que se produce. Ésta se determina con las técnicas tradicionales que se describen en los apartados siguientes.

### 2. DETERMINACIÓN DE 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, las cuales 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 (Sorokin, 1973; 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, se ha estandarizado el uso de filtros de fibra de vidrio (cuya porosidad nominal se selecciona con base en el tamaño de la microalga en cultivo), y de una solución de lavado de formato de amonio al 3% para el caso de microalgas marinas; mientras que para las de agua dulce se usa agua destilada y para 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. El procedimiento es:

- a) Lavar con agua destilada los filtros seleccionados de porosidad nominal determinada (durante todo el procedimiento deben manejarse con pinzas). Eliminar el exceso de agua y colocarlos en cajas o sobres de papel aluminio (sin apretar, para evitar que se adhieran en el aluminio), y pre-queumarlos en la mufla a 490°C por 6 h.

**NOTA:** No intentar abrir la mufla después de apagarla. Se recomienda dejar los filtros dentro de la mufla y sacarlos hasta el día siguiente.

- b) Colocar los filtros pre-queutados en la estufa (entre 65°C y 70°C), mínimo por 1 h y posteriormente en el desecador. Cerrar al vacío y mantenerlos hasta que se enfríen (1.5 h).
- c) Pesar los filtros pre-queutados, uno a uno en la balanza analítica de 5 dígitos, repetir el paso “b” (colocar en la estufa, desecador al vacío y pesar en balanza analítica) hasta verificar

que el peso permanece constante. Anotar el peso seco del filtro sin muestra (PSF), con su número respectivo en la bitácora de trabajo.

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

- d) Tomar un volumen conocido (entre 20 a 50 mL) del cultivo de microalgas (homogenizar bien la muestra antes de proceder) y filtrar en los filtros de peso conocido.
- e) Lavar la muestra filtrada con 10 a 20 mL de formato de amonio al 3%, filtrar nuevamente y guardar en la caja o sobre respectivo (Figura 1).
- f) Colocar las cajas con el filtro en una estufa a temperatura entre 65 y 70°C hasta que alcancen el peso seco constante (el tiempo de secado depende del tipo de estufa y de la humedad ambiental, además del volumen de la muestra).

**NOTA:** Es muy importante respetar los tiempos que permanecen los filtros con la muestra, tanto en la estufa como en el desecador.

- g) Pasar los filtros a un desecador, verificando previamente que el silicagel esté libre de humedad. En caso de que se observe cambio de coloración de azul a morado violeta, colocarlo en la estufa para eliminar la humedad y posteriormente en el desecador. Después enseguida los filtros. Aplicar vacío y dejar en el desecador 1.5 h.
- h) Pesar los filtros en una balanza analítica de 5 dígitos (sacando los filtros uno por uno, rápidamente del desecador y cerrándolo cada vez) hasta cuando la lectura en la balanza se estabilice. Anotar el peso seco del filtro con la muestra (PSFM), con su número respectivo, en la bitácora de trabajo.
- i) Regresar los filtros a la estufa y repetir la operación los dos días



siguientes o hasta asegurarse que se logró el peso constante.

- j) El filtro con la biomasa seca y a peso constante, se incinera en una mufla a 490°C durante 6 h.

**NOTA:** No intentar abrir la mufla después de apagarla. Se recomienda dejar los filtros con las cenizas dentro de la mufla y sacarlos hasta el día siguiente.

- k) Colocar el filtro con las cenizas en la estufa por 1 h, después en el desecador, cerrar al vacío durante 1.5 h y pesarlo, siguiendo la recomendación mencionada anteriormente para el peso seco (inciso f). Anotar el peso seco del filtro con la muestra incinerada (PSFC), con su número respectivo, en la bitácora de trabajo.
- l) Regresar los filtros a la estufa y repetir la operación los dos días siguientes o hasta asegurarse que se logró el peso constante.
- m) El peso seco total (PST) ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  o  $\text{mg L}^{-1}$ ), se obtiene por diferencia entre el peso de la muestra seca menos el peso del filtro vacío, dividido entre el volumen de cultivo filtrado.
- n) El peso inorgánico o peso de cenizas (PSI) ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  o  $\text{mg L}^{-1}$ ), se obtiene como diferencia entre el peso del filtro con las cenizas y el peso del filtro vacío, dividido entre el volumen de cultivo filtrado.
- ñ) El peso orgánico (PSO) ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  o  $\text{mg L}^{-1}$ ) se obtiene por diferencia entre peso seco de la muestra menos el peso de las cenizas.

## 2.2 Ecuaciones para el cálculo de peso seco total, orgánico y cenizas

$$\text{PST } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{(\text{PSFM} - \text{PSF})}{\text{VF}}$$

$$\text{PSI } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{(\text{PSC} - \text{PSF})}{\text{VF}}$$

$$\text{PSO } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{PST} - \text{PSI}$$

En donde:

**PST, PSI, PSO** = peso seco total, inorgánico (cenizas) y orgánico ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**PSF, PSFM y PSFC** = peso seco del filtro sin muestra; del filtro con muestra y del filtro con la muestra incinerada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**VF** = Volumen de muestra filtrado (mL).



Figura 1: Filtración y lavado de muestras de microalgas. Imágenes tomadas en el CICESE.

## 3. PESOS UNITARIOS

Es frecuente notar que en un cultivo de microalgas con un determinado tratamiento, la concentración celular ( $\text{cél mL}^{-1}$ ) que se obtiene, es significativamente mayor al resto de los tratamientos, sin embargo, estas diferencias no se reflejan en la producción de biomasa en peso ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Asimismo, se pueden registrar incrementos en el peso, aun cuando la concentración celular permanece constante. Ambas situaciones se deben a cambios en el peso celular unitario ( $\text{pg cél}^{-1}$ ) 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 microalgal, la concentración de algún componente celular, o para definir el momento más apropiado para la cosecha.

Esta información se consigue mediante las ecuaciones:

$$\text{PSTU } (\text{pg cél}^{-1}) = \frac{\text{PST}}{\text{N}}$$

$$\text{PSOU } (\text{pg cél}^{-1}) = \frac{\text{PSO}}{\text{N}}$$

En donde:

**PSTU y PSOU** = peso seco total y orgánico de una célula, PST y PSO son las cantidades de biomasa ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**N** = concentración celular ( $\text{cél mL}^{-1}$ ) en el mismo volumen de cultivo. El peso unitario se obtiene en  $\text{pg cél}^{-1}$  ( $\text{pg} = 10^{-12} \text{ g}$ ), multiplicando PSTU o PSOU x  $10^6$ .

**NOTA:** Esta cuantificación es recomendable para microalgas que no presentan altas variaciones en sus tamaños celulares durante el cultivo.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- BEN-AMOTZ, A.** Tornabene, T. G., Thomas W. H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *Journal of Phycology* 21: 71-81.
- BROWN, M. R.,** 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., 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., Gordon, M. 1992. Cuticles from *Chondrus crispus* (Rodophyta). *Journal of Phycology* 28: 777-786.
- FÁBREGAS, J.,** Abalde, J., Cabezas, B., 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., Sargent, J. R. 1988. Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Cryptothecodinium conorii*. *Phytochemistry* 27: 1679-1683.
- HU, Q.,** 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., 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., Ación-Fernández, F. G., López-Alonso, D. 1994. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALI4 in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 37: 159-166.
- REITAN, K. I.,** Rainuzzo, J. R., 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.,** 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., 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.
- SOROKIN, C.** 1973. Dry weight, packed cell volume 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.,** Milner, H. W. 1949. The chemical composition of *Chlorella*: effect of environmental conditions. *Plant Physiology* 24: 120
- TADROS, M. G.,** Johansen, J. R. 1988. Physiological characterization of six lipid-producing diatoms from the southern United States. *Journal of Phycology* 24: 445-452.
- VONSHAK, A.** 1997. Appendices. *En: Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology.* Vonshak, A. (Ed). Taylor and Francis. 213-215 pp.
- WIKFORS, G. H.,** Ferris, G. E., 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.
- ZHU, C. J.,** Lee, Y. K. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 9: 189-194.

## CAPÍTULO 7

# DETERMINACIÓN DE NITRATOS, NITRITOS, FOSFATOS, SILICATOS Y HIERRO POR MICROMÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

<sup>1</sup>MARÍA CONCEPCIÓN LORA VILCHIS, <sup>1</sup>GABRIELA MENDOZA CARRIÓN,  
<sup>2</sup>ROBERTO HERNÁNDEZ HERRERA

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

<sup>1</sup>Laboratorio de Alimento Vivo. <sup>2</sup>Laboratorio de Bioquímica Fisiológica.

La Paz, Baja California Sur, 23096, México.

[cony04@cibnor.mx](mailto:cony04@cibnor.mx), [gmendoza@cibnor.mx](mailto:gmendoza@cibnor.mx), [rherrera04@cibnor.mx](mailto:rherrera04@cibnor.mx)

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS
3. NITRÓGENO
  - 3.1 NITRATOS
    - 3.1.1 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR
    - 3.1.2 CURVA ESTÁNDAR
    - 3.1.3 DESCRIPCIÓN DEL MICROMÉTODO
  - 3.2 NITRITOS
    - 3.2.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS
    - 3.2.2 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR
    - 3.2.3 CURVA ESTÁNDAR
    - 3.2.4 DESCRIPCIÓN DEL MICROMÉTODO
4. FOSFATO
  - 4.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS
    - 4.1.1 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR
    - 4.1.2 CURVA ESTÁNDAR
    - 4.1.3 DESCRIPCIÓN DEL MICROMÉTODO
5. SILICATOS
  - 5.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS
    - 5.1.1 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR
    - 5.1.2 CURVA ESTÁNDAR
    - 5.1.3 DESCRIPCIÓN DEL MICROMÉTODO
6. HIERRO
  - 6.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

- 6.1.1 PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR.
- 6.1.2 CURVA ESTÁNDAR
- 6.1.3 DESCRIPCIÓN DEL MICROMÉTODO

### 7. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** nutrientes, nitratos, nitritos, fosfatos, silicatos y hierro.

---

### 1. INTRODUCCIÓN

Las determinaciones de compuestos como nitratos, nitritos, fosfatos, silicatos y hierro en los cultivos de microalgas pueden ser un buen indicador del crecimiento y del metabolismo celular.

Los métodos para medir nutrientes ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SiO}_4^{2-}$ ) en agua mar se basan en la formación de complejos coloridos que pueden ser medidos por espectrofotometría en celdas con un volumen de 1 a 10 mL (Strickland y Parsons, 1972). La reducción del volumen hasta 250  $\mu\text{L}$  permite la medición de la absorbancia en lectores de microplaca, lo cual es funcional y práctico. Los análisis en microplaca (ELISA) tienen varias ventajas, entre ellas un amplio rango de detección, requieren poca cantidad de muestra y por consiguiente una mínima cantidad de reactivos. Al medir varias muestras en forma simultánea (2 hasta 96) resulta un ahorro de tiempo de manera

significativa, además de consumibles, por lo que puede implementarse como análisis de rutina de bajo costo (Hernández-López y Vargas-Albores, 2003).

En este capítulo se describen: la medición directa de  $\text{NO}_3^-$  por espectrofotometría en UV (Collos, *et al.*, 1999); las modificaciones realizadas al método descrito por Strickland y Parsons, 1972 por Hernández-López y Vargas-Albores (2003); de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  en agua de mar; y de  $\text{SiO}_4^{2-}$  (Strickland y Parsons, 1972), adaptadas a microplaca de 96 pozos.

Es importante mencionar que Hernández-López y Vargas-Albores (2003) encontraron que las técnicas descritas por Strickland y Parsons (1972) mostraron una sensibilidad ligeramente más alta que las de microplaca, sin embargo, éstas últimas ofrecen varias ventajas sobre los métodos en microplaca, entre ellas el uso de menor volumen de muestra (~25 %) y de reactivos (~10 %), así como una sensibilidad adecuada y confiable para medir las concentraciones de los nutrientes que se encuentran en el cultivo de microalgas (Tabla 1). De acuerdo a lo mencionado, los micrométodos se consideran una herramienta excelente para monitorear estos compuestos en los cultivos de microalgas de manera rutinaria.

Tabla 1. Intervalos de detección de los micrométodos.

Compuesto	Intervalo de detección ( $\mu\text{M}$ )
Nitratos	10 a 320
Nitritos	0.31 a 40
Fosfatos	0.63 a 20
Silicatos	1.56 a 200
Hierro	0.37 a 11.7

## 2. Preparación de las muestras

Para todas las determinaciones de nutrientes, las muestras del medio de cultivo deben estar libres de células y de cualquier otra partícula. Al momento de la cosecha de un cultivo de microalgas, ya sea por centrifugación o filtración, se toma un

volumen mínimo de 2 mL, el cual se mantiene a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

## 3. NITRÓGENO

El nitrógeno es requerido para la formación de proteínas, ácidos nucleicos y pigmentos fotosintéticos principalmente, por lo que la falta de nitrógeno es un factor limitante del crecimiento. En el medio ambiente natural de las microalgas, el nitrógeno puede encontrarse en solución como nitratos, nitritos, amonio, urea o aminoácidos. El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) es en general, la forma mejor absorbida de nitrógeno, aunque se encuentra muy oxidado (+5), por lo que debe ser reducido hasta el estado de oxidación del grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) (-3), que es como se encuentra en las proteínas. Esta transformación consume una gran cantidad de poder reductor (NADPH) y eleva el pH al consumir  $\text{H}^+$ .

El  $\text{NO}_3^-$  normalmente es suministrado como nitrato de sodio o nitrato de potasio ( $\text{NaNO}_3$  o  $\text{KNO}_3$ ), el cual dependerá del tipo de microalga (marina o dulceacuícola, o de acuerdo con los requerimientos específicos). Por ejemplo, en el medio f/2 (Guillard y Ryther, 1975) diseñado para microalgas marinas, la concentración de  $\text{NaNO}_3$  es de  $882 \mu\text{M}$ , mientras que, para algunas microalgas dulceacuícolas, ésta es de 2.94 mM en el medio Bold (Andersen *et al.*, 2005).

### 3.1 Nitratos

Varias metodologías para determinar nitratos se basan en su reducción a nitritos y la subsecuente cuantificación colorimétrica de nitritos totales. Entre las más conocidas están la que emplea cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) como agente reductor, empleando cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) como activador (Wood *et al.*, 1967), y la que emplea vanadio activado por calentamiento a  $60^\circ\text{C}$  (García-Robledo *et al.*, 2014). Sin embargo, estos métodos requieren del manejo de metales pesados que son muy tóxicos, además de que se debe mantener constante el potencial reductor del metal, lo que los hace muy complejos.

La concentración de nitratos puede monitorearse de forma directa por espectrofotometría a una absorbancia de 220 nm en celdas de cuarzo. Para ello, las muestras deben diluirse a una concentración menor de 12 mg L<sup>-1</sup> de nitratos. La relación entre absorbancia y la concentración de nitratos es lineal hasta 500 µM. Tiene el inconveniente de que también mide nitritos, lo que es poco importante pues por lo general son valores muy bajos, a menos que se trate de especies que excretan grandes cantidades de nitritos, lo cual es muy poco común (Collos, 1998). El método tiene una precisión de 1.5%, pero no presenta interferencia con aminoácidos ni urea a una concentración de 10 µM de nitrógeno (generalmente encontradas en ambientes marinos) (Collos *et al.*, 1999). Griffiths *et al.* (2014) encontraron diferencias entre este método y el de cromatografía líquida de alta resolución de hasta el 12 %. A pesar de lo anterior, el método tiene la ventaja de ser simple, rápido y no incluir sustancias tóxicas, lo que lo hace muy adecuado a estudios rutinarios (Collos *et al.*, 1999; Griffiths *et al.*, 2014).

### 3.1.1 Preparación del estándar

Es recomendable que el KNO<sub>3</sub> a emplear en la preparación de la solución estándar, se seque previamente a 60 °C y se mantenga a temperatura ambiente en un desecador antes de pesar.

Disolver 0.102 g de KNO<sub>3</sub> en 100 mL de agua desionizada, lo que equivale a una solución de 10 mM. Esta solución es estable en ausencia de evaporación, pero se recomienda preparar inmediatamente antes de su uso y guardar en frasco ámbar de inmediato. De esta solución tomar 1.6 mL y llevar a 50 mL con agua desionizada; la concentración de esta solución es 320 µM.

### 3.1.2 Curva estándar

Realizar diluciones seriadas con agua desionizada a partir del estándar de 320 µM, hasta tener concentraciones de 160, 80, 40,

20, 10 y 5 µM de nitratos (Figura 1).

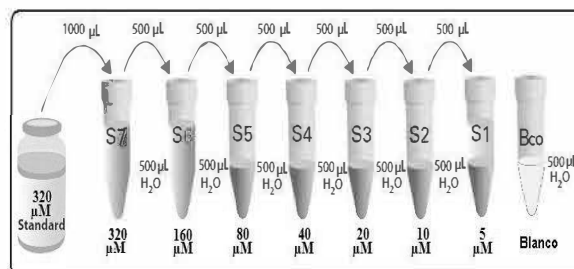


Figura 1. Preparación de la curva estándar de nitratos, por dilución consecutiva, a partir de una solución estándar de KNO<sub>3</sub> 320 µM.

### 3.1.3 Descripción del micrométodo

Una vez diluidas, la densidad óptica de las soluciones estándar se lee en un espectrofotómetro a 220 nm, empleando una celda de cuarzo. Se debe usar como blanco agua desionizada. Posteriormente se determina mediante regresión lineal la curva estándar. Las muestras se leen a la misma longitud de onda (220 nm) y a partir de la ecuación de regresión lineal (Figura 2), se calcula la concentración de nitratos mediante el uso de la ecuación:

$$x = \frac{y}{m} d$$

Donde:

$x$  = concentración de nitratos (µM)

$y$  =  $A_{220\text{ nm}}$

$m$  = pendiente

$d$  = dilución

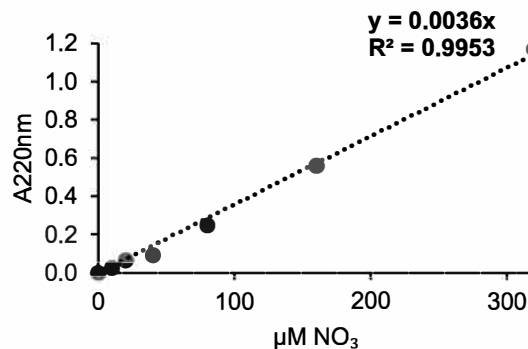


Figura 2. Curva estándar de nitratos.

### 3.2 Nitritos

La detección de nitritos en agua de mar se realiza mediante una reacción colorimétrica clásica derivada de la reacción de Griess (Tsikas, 2005). En solución ácida, los nitritos son convertidos en ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), el cual diazotiza con sulfanilamida. La sal de sulfanilamida-diazonio posteriormente reacciona con N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato para producir un cromóforo (muy colorido) que se mide a 540 nm. El método tradicional emplea 50 mL de muestra, a la cual se le adiciona 1 mL de cada reactivo y se lee en celdas de 1 o 10 cm.

#### 3.2.1 Preparación de reactivos

**Reactivo A.** disolver 0.5 g de sulfanilamida en una mezcla de 5 mL de HCl concentrado y 30 mL de agua desionizada, aforar a 50 mL con agua desionizada. Esta solución es estable durante varios meses en frasco ámbar, entre 8 y 20 °C.

**Reactivo B.** disolver 0.05 g de N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato en 50 mL de agua desionizada. Almacenar en recipiente oscuro; en caso de que se observe un color café oscuro se deberá preparar una nueva solución.

#### 3.2.2 Preparación del estándar

Disolver 0.0345 g de  $\text{NaNO}_2$ , previamente secado a 110 °C durante 1 h, en 100 mL de agua desionizada. Adicionar 0.1 mL de cloroformo y almacenar en recipiente oscuro. Esta solución es estable aproximadamente dos meses. La concentración de esta solución es de 5 mM. Hacer una dilución 1:125 de la solución estándar con agua desionizada, para obtener una solución de trabajo de concentración de 40  $\mu\text{M}$ .

#### 3.2.3 Curva estándar

Realizar diluciones seriadas con agua desionizada a partir del estándar de 40  $\mu\text{M}$  hasta tener concentraciones de 20, 10, 5,

2.5, 1.25 y 0.625  $\mu\text{M}$  de nitritos (Figura 3).

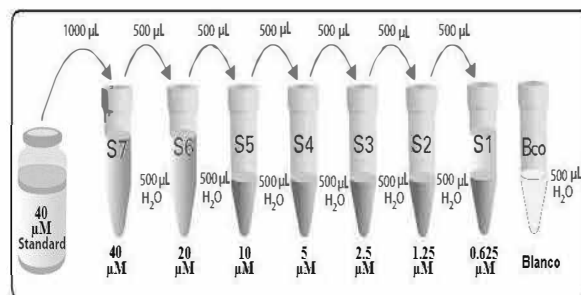


Figura 3. Preparación de la curva estándar de nitritos, por dilución consecutiva, a partir de una solución estándar de nitritos 40 $\mu\text{M}$ .

#### 3.2.4 Descripción del micrométodo

1. Colocar 10  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida (Reactivo A) en cada celda de la microplaca de 96 pozos.
2. Adicionar 250  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar (Figura 4).
3. Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato (Reactivo B).
4. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 10 min. El color es estable hasta por 2 h, cuidando de que no haya evaporación.
5. Leer entre 530 y 550 nm en un lector de microplacas.
6. Restar a todos los datos (muestras y estándares) el valor de la absorbancia del blanco.
7. Calcular la ecuación de regresión lineal a partir de los datos de absorbancias y las concentraciones de los estándares (Figura 5). La concentración de nitritos se calcula empleando la ecuación:

$$x = \frac{y}{m} d$$

Donde:

x = concentración de nitritos ( $\mu\text{M}$ )

y =  $A_{530\text{nm}}$

m = pendiente

d = dilución

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(Bco)	(1)	(9)	(17)	(25)	(33)	(41)	(49)	(57)	(65)	(73)	(81)
B	(S1)	(2)	(10)	(18)	(26)	(34)	(42)	(50)	(58)	(66)	(74)	(82)
C	(S2)	(3)	(11)	(19)	(27)	(35)	(43)	(51)	(59)	(67)	(75)	(83)
D	(S3)	(4)	(12)	(20)	(28)	(36)	(44)	(52)	(60)	(68)	(76)	(84)
E	(S4)	(5)	(13)	(21)	(29)	(37)	(45)	(53)	(61)	(69)	(77)	(85)
F	(S5)	(6)	(14)	(22)	(30)	(38)	(46)	(54)	(62)	(70)	(78)	(86)
G	(S6)	(7)	(15)	(23)	(31)	(39)	(47)	(55)	(63)	(71)	(79)	(87)
H	(S7)	(8)	(16)	(24)	(32)	(40)	(48)	(56)	(64)	(72)	(80)	(88)

Figura 4. Arreglo de muestras en una microplaca (ELISA) de 96 pozos. Primero se pone el blanco (Bco), seguido de los estándares (S1 a S7) y después las muestras en orden de la bitácora (1 a 88). Pueden leerse hasta 88 muestras en una placa.

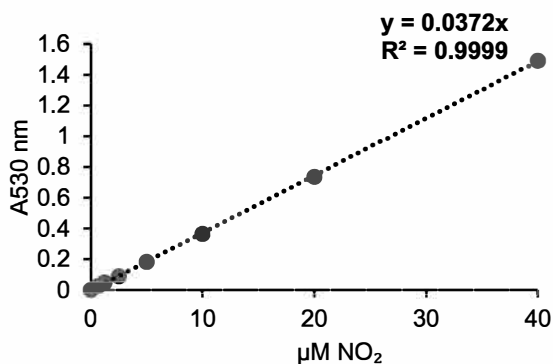


Figura 5. Curva estándar de nitritos.

#### 4. FOSFATOS

El fósforo juega un papel significativo en muchos procesos celulares, especialmente aquellos involucrados en la generación y transformación de la energía metabólica pues forma parte del ATP, la moneda energética celular (Butusov y Jernelöv, 2013). Muchas sustancias intermedias en la fotosíntesis y en la respiración celular están combinadas con el fósforo y son un componente básico en el proceso fotosintético. El fósforo, también tiene un papel fundamental en la formación de las membranas celulares constituidas por

fosfolípidos, además se encuentra en los ácidos nucleicos, por lo que su presencia es necesaria en la reproducción y división celular (Butusov y Jernelöv, 2013). La mayoría del fósforo en el agua de mar está presente como iones de ortofosfato, principalmente  $\text{HPO}_4^{-2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$ .

Un método excelente para cuantificar fósforo inorgánico es el descrito por Murphy y Riley (1962), basado en la formación de un complejo fosfomolibdato por la interacción entre el molibdato de amonio y el ortofosfato en presencia de antimonio. Este complejo es reducido con ácido ascórbico, formando un compuesto azul el cual se lee a una longitud de onda de 885 nm.

#### 4.1 Preparación de reactivos

**Solución de heptamolibdato de amonio (3% p/v).** Pesar 3 g de heptamolibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7 \text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), disolver en 50 mL de agua desionizada y aforar a 100 mL con esta misma agua.

**Solución de ácido sulfúrico (14% v/v).** Adicionar 14 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a un volumen de 86 ml de agua destilada.

**Solución de ácido ascórbico (1.08% p/v).** Pesar 1.08 g de ácido ascórbico, disolver con agua desionizada y aforar a 100 mL. Esta solución se deberá preparar el día de uso, ya que el ácido ascórbico se oxida fácilmente.

**Solución de tartrato de antimonio y potasio (0.0136% p/v).** Pesar 0.0136 g de tartrato de antimonio y potasio, disolver con agua desionizada y aforar a 100 mL.

**Mezcla reactiva:** adicionar 1 parte de solución de heptamolibdato de amonio 3%, 2.5 partes de solución de ácido sulfúrico 14%, 1 parte de solución de ácido ascórbico 1.08%, y 0.5 partes de solución de tartrato de antimonio y potasio 0.0136%. Esta mezcla se prepara inmediatamente antes de usarse y no se debe guardar por más de 6 h (Strickland y Parsons, 1962).

#### 4.1.1 Preparación del estándar

Pesar 0.328 g de fosfato de sodio ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ), diluir en un volumen aproximado de 50 mL y aforar a 100 mL. Esta solución se diluye 1000 veces para obtener una solución 20  $\mu\text{M}$ .

#### 4.1.2 Curva estándar

Realizar diluciones seriadas con agua desionizada a partir del estándar de 20  $\mu\text{M}$ , hasta tener concentraciones de 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625  $\mu\text{M}$  de fosfatos.

#### 4.1.3 Descripción del micrométodo

1. Las muestras y reactivos deben estar a temperatura ambiente. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  de mezcla reactiva en cada pozo de una microplaca de 96 pozos.
2. Agregar 250  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar.
3. Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
4. Leer a 882 nm en un lector de placas.
5. Restar el valor del blanco a todas las muestras y estándares.
6. Calcular la ecuación de regresión lineal a partir de los datos de las absorbancias a 882 nm y las concentraciones de los estándares. La concentración de fosfatos se calcula mediante la ecuación:

$$x = \frac{y}{m} d$$

Donde:

x = concentración de fosfatos ( $\mu\text{M}$ )

y =  $A_{882 \text{ nm}}$

m = pendiente

d = dilución

## 5. SILICATOS

El silicio es un nutriente esencial para diferentes especies de microalgas, como las diatomeas, en las cuales llega a representar del 25 al 60 % del peso seco (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000). Por lo general, las diatomeas obtienen el silicio en forma de silicatos y lo utilizan para formar las frústulas que conforman su pared celular. Algunos estudios indican que las diatomeas no pueden reproducirse si la concentración de

silicio es menor de 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Massol-Deyá y Fuentes, 2002).

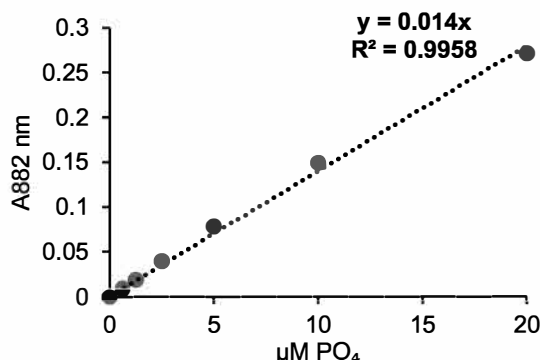


Figura 6. Curva estándar de fosfatos.

Todos los métodos para la determinación de silicatos en agua de mar dependen de la formación del complejo silicomolibdato, de color amarillo. Sin embargo, los métodos que miden directamente la absorción de esta sustancia amarilla son menos sensibles y satisfactorios que la reducción del complejo amarillo a un compuesto azul más intenso. Debe recordarse que no todas las formas de silicio en solución reaccionan para dar el complejo silicomolibdato. El ácido silícico polimeriza fácilmente al pH del agua de mar y sólo los polímeros de cadena recta de longitud relativamente corta pueden reaccionar con el molibdato a una velocidad apreciable. Los polímeros con tan pocas unidades de ácido silícico (ej. 3 o 4) probablemente no son reactivos con este método; por lo que es mejor referirse a "silicato reactivo", puesto que esta cantidad no será tan alta para diluir el ácido silícico y probablemente represente una medida significativa de la cantidad disponible para el crecimiento de las microalgas. El método reportado por Strickland y Parsons (1972) emplea 50 mL de muestra.

#### 5.1 Preparación de reactivos

**Solución A.** Paramolibdato de amonio. Disolver 0.4 g paramolibdato de amonio en 30 mL m de agua destilada. Agregar 1.2 mL de HCl concentrado. Mezclar y aforar a 50 mL con agua destilada. Guardar en una



botella de plástico ámbar donde puede durar varios meses si se cuida de no exponerlo a la luz. Descartar si se forma mucho precipitado blanco.

**Solución B.** Metol-sulfito. Disolver 0.6 g de sulfito de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) en 50 mL de agua destilada y agregar 1 g de metol (sulfato de "p"metilaminofenol). Cuando se disuelva el metol, filtrar a través de un papel Whatman #1 y guardar en una botella limpia de cristal con un tapón hermético. Esta solución puede deteriorarse rápidamente y debe prepararse al menos cada mes, dependiendo del uso.

**Solución C.** Ácido oxálico. Mezclar 5 g de ácido oxálico ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 50 mL de agua destilada. Decantar la solución de los cristales para su uso. Esta solución se almacena en botella de vidrio y es estable indefinidamente.

**Solución D.** Adicionar 25 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 25 mL de agua destilada. Enfriar a temperatura ambiente y ajustar el volumen a 50 mL.

**Mezcla reductora.** Mezclar 1 mL de solución B con 0.6 mL de solución C, lentamente agregar 0.6 mL de solución D con agitación. Llevar la mezcla a un volumen de 3 mL con agua destilada. Esta solución alcanza para 38 muestras y debe prepararse inmediatamente antes de usarse.

### 5.1.1 Preparación del estándar

**Metasilicato de sodio** ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), previamente secado a  $60^\circ\text{C}$  y mantenido en desecador se emplea para preparar la curva estándar. Pesar 0.4243 g y llevar a 100 mL con agua destilada para hacer una solución 20 mM. Tomar 1 mL de esta solución y aforarlo a 100 mL con agua destilada para obtener una concentración 200  $\mu\text{M}$ .

### 5.1.2 Curva estándar

Realizar diluciones seriadas con agua desionizada a partir del estándar de 200  $\mu\text{M}$ , hasta tener concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.562  $\mu\text{M}$ .

### 5.1.3 Descripción del micrométodo

1. Adicionar a cada pozo de una microplaca 50  $\mu\text{L}$  de solución A.
2. Adicionar 125  $\mu\text{L}$  de muestra y dejar reposar por 10 min.
3. Adicionar 75  $\mu\text{L}$  de mezcla reductora y dejar reposar de 2 a 3 h (esto es proporcional a la concentración). Tapar la microplaca para evitar evaporación. El color es estable por hasta 6 h.
4. Leer a 810 nm en un lector de microplacas.
5. Restar el valor del blanco a muestras y estándares.
6. Calcular la ecuación de regresión a partir de las lecturas a 810 nm y las concentraciones de los estándares. La concentración de silicatos se calcula de la siguiente forma:

$$x = \frac{y}{m} d$$

Donde:

x = concentración de silicatos ( $\mu\text{M}$ )

y =  $A_{810 \text{ nm}}$

m = pendiente

d = dilución

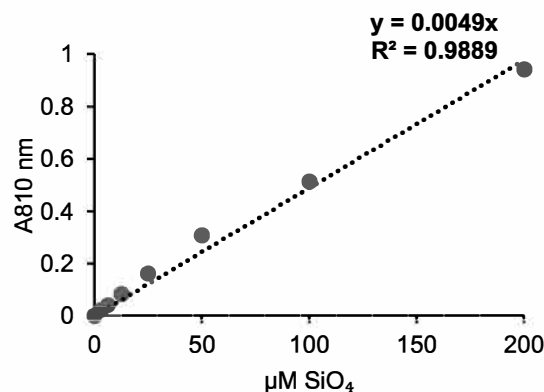


Figura 7. Curva estándar de silicatos.

## 6. HIERRO

El hierro es un componente básico para los procesos biológicos de oxidación-reducción. Algunas funciones del hierro resultan de su participación en la producción de clorofila, de la ferredoxina, ésta última es una proteína del fotosistema I que participa en la formación del potencial reductor en la fotosíntesis (NADPH), por lo que su ausencia

alterará el crecimiento de los organismos autótrofos oxigénicos (Stewart, 1974). La técnica que se describe a continuación, se emplea en la determinación de hierro en muestras de medio de cultivo de microalgas que contienen el ion férrico quelado usualmente en concentraciones aproximadas de 25  $\mu\text{M}$ . La liberación de hierro del Fe (III)-EDTA ocurre en la mezcla de reacción para la formación del complejo colorido Fe(II)-ferene; es una modificación de la técnica descrita por Artiss *et al.* (1981), que ha sido adaptada a microplaca de 96 pozos para ser leída en el espectrofotómetro con microplacas. El intervalo de detección es de 0.37 a 11.7  $\mu\text{M}$ .

## 6.1 Preparación de reactivos

*Solución de acetato de sodio 2.5 M.* Pesar 3.40 g de acetato de sodio trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), disolverlo en agua destilada y aforar a 10 mL.

*Solución de ácido acético 5 M.* Medir 14.3 mL de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) y aforar a 50 mL con agua destilada.

*Solución de ácido ascórbico 0.2 M.* Pesar 1.76 g de ácido ascórbico, disolverlos en agua destilada y aforar a 50 mL; esta solución se debe preparar inmediatamente antes de usar, ya que se oxida fácilmente.

*Solución de Ferene 20 mM.* Pesar 0.9887g de ferene (3-(2-piridil)-5,6-di(2-furil)-1,2,4-triazina-5',5''-ácido disulfónico sal disódica ( $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}_2$ ), disolver en agua destilada y aforar a 100 mL.

*Mezcla reactiva:* Combinar 0.26 partes (volumen) de ácido acético 5 M con 0.68 partes de solución de acetato de sodio 2.5 M y 0.06 partes de agua destilada.

La mezcla reactiva para un volumen de 2 mL (suficiente para alrededor de 80 muestras) se prepara mezclando 0.52 mL de solución de ácido acético 5 M, 1.36 mL de solución de acetato de sodio 2.5 M y 0.120 mL de agua destilada.

### 6.1.1 Preparación del estándar

Pesar 34.4 mg de  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 43.5 mg de EDTA, disolver y aforar a 10 mL con agua desionizada; esta es la solución madre de concentración  $1.17 \times 10^{-2}$  M. De esta solución, diluir 1 mL en 100 mL para tener una solución 117  $\mu\text{M}$ ; de aquí diluir 1 mL en 10 mL con agua destilada para tener una concentración de 11.7  $\mu\text{M}$ .

### 6.1.2 Curva estándar

A partir de la solución de 11.7  $\mu\text{M}$  preparar una dilución seriada con agua desionizada, para obtener concentraciones de 5.85, 2.925, 1.463, 0.731 y 0.366  $\mu\text{M}$  de hierro.

### 6.1.3 Descripción del micrométodo

1. En cada pozo de microplaca de 96 pozos, adicionar 200  $\mu\text{L}$  de muestra o estándar.
2. Agregar 25  $\mu\text{L}$  de mezcla reactiva.
3. Agregar 25  $\mu\text{L}$  de solución de ácido ascórbico 0.2 M.
4. Agregar 12.5  $\mu\text{L}$  de solución de Ferene 20 mM.
5. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Leer a una longitud de onda de 593 nm, en un lector de placas.
7. Restar el valor del blanco a todas las muestras y estándares.
8. Calcular la ecuación de regresión lineal a partir de los datos de las absorbancias y las concentraciones de los estándares. La concentración de hierro se calcula empleando la ecuación:

$$x = \frac{y}{m} d$$

Donde:

x = concentración de hierro ( $\mu\text{M}$ )

y =  $A_{593\text{nm}}$

m = pendiente

d = dilución

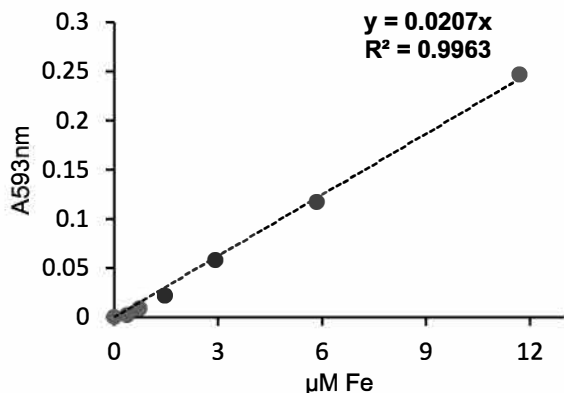


Figura 8. Curva estándar de hierro.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSEN, R. A.,** Berges, J. A., Harrison, P. J., Watanabe, M. M. 2005. Appendix A-Recipes for freshwater and seawater media. *En:* Andersen, R. A. (Ed.) *Algal Culturing Techniques*. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press. Burlington, USA. 578 pp.
- ARTISS, J. D.,** Vinogradov, S., Zak, B. 1981. Spectrophotometric study of several sensitive reagents for serum iron. *Clinical Biochemistry* 14: 311–315.
- BUTUSOV, M.,** Jernelöv, A. 2013. Phosphorus: An Element that could have been called Lucifer. *Springer Briefs in Environmental Science* 9, DOI 10.1007/978-1-4614-6803-5\_2.
- COLLOS, Y.** 1998. Nitrate uptake, nitrite release and uptake, and new production estimates. *Marine Ecology Progress Series* 71: 293-301.
- COLLOS, Y.,** Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A., Harrison, P. J. 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology* 11: 179–184.
- HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.,** Vargas-Albores F. 2003. A microplate technique to quantify nutrients ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) in

seawater. *Aquaculture Research* 34: 12001–12004

**GARCÍA-ROBLEDO, E.,** Corzo, A., Papaspyrou, S. 2014. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Marine Chemistry* 162: 30–36.

**GRIFFITHS, M. J.,** Van Hille, R. P., Harrison, S. T. L. 2014. The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 2345–2356.

**MASSOL-DEYÁ, A.,** Fuentes, F. 2002. *Ecología de microorganismos. Manual de Laboratorios.* Disponible en: <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual>.

**MARTIN-JÉZÉQUEL, V.,** Hildebrand, M., Brzezinski, M. A. 2000. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *Journal of Phycology* 36(5):821 – 840.

**MURPHY, J.,** Riley, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemical Acta* 27: 31–36.

**STEWART, W. D. P.** (Ed.) 1974. *Algal Physiology and Biochemistry.* Botanical Monographs Vol. 10. Blackwell Scientific Publications. 989 pp.

**STRICKLAND, J. D. H.,** Parsons, T. R. 1972. *A practical handbook of seawater analysis.* Fisheries Research Board of Canada, Ottawa. 310 pp.

**TSIKAS, D.** 2005. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids, *Free Radical Research* 39(8): 797–815.

**WOOD E. D.,** Armstrong, F. A. J., Richards, F. A. 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 47: 23–31.

## CAPÍTULO 8

# DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

<sup>1</sup>BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA, <sup>2</sup>BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL,  
<sup>3</sup>DOMENICO VOLTOLINA

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur.

<sup>2</sup>Departamento de Acuicultura.

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California.

<sup>3</sup>Laboratorio de Estudios Ambientales-UAS-CIBNOR, Mazatlán, Sinaloa.

kitty04@cibnor.mx, bcordero@cicese.mx, voltolin04@cibnor.mx

---

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS
  - 2.1 MÉTODOS UTILIZADOS PARA CUANTIFICAR PROTEÍNAS
  - 2.2 CURVA ESTÁNDAR UTILIZANDO BSA
  - 2.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
  - 2.4 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS
  - 2.5 CÁLCULOS PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE PROTEÍNAS EN UNA MUESTRA
3. BIBLIOGRAFÍA

**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 se pueden representar hasta más del 50% del peso seco total y que sumadas a los lípidos y 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 las especies y de su forma de vida (planctónica o bentónica), su contenido de compuestos inorgánicos puede representar entre el 30 y 45% del peso seco total (Abalde *et al.*, 1995).

## 2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

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

### 1.1 Métodos utilizados para cuantificar proteínas

Muchos de los datos relativos al contenido de proteínas de diferentes organismos están basados en la cuantificación de nitrógeno 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 del 16% (Coombs *et al.*, 1988; Tacon, 1990). Sin embargo, en las microalgas aproximadamente el 10% del nitrógeno es no proteínico, contenido principalmente en los ácidos nucleicos, en las glucosamidas, en las membranas celulares, o presentes 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) sugirieron que cuando se utiliza el método de Kjeldahl para cuantificar proteínas en muestras de origen marino, ya sea de microalgas, bacterias, protozoos o invertebrados, el factor más apropiado es 5.8; Laws (1991) sugirió que 6.0 es el valor más cercano al real en el caso de las diatomeas. Lourenco *et al.*, (2004) calculó dicho factor en 12 microalgas cultivadas en diferentes condiciones y fases de crecimiento, proponiendo los siguientes factores: Cryptophyceae (*Hillea* sp.: 4.72), Cyanophyceae (*Synechococcus subsalsus*: 5.22), Bacillariophyceae (*Phaeodactylum tricorutum*: 4.87; *Skeletonema costatum*: 4.63; *Thalassiosira oceanica*: 5.40), Dynophyceae (*Amphidinium carterae*: 5.13, *Prorocentrum minimum*: 4.43), Eustigmatophyceae (*Nannochloropsis oculata*: 4.95), Chlorophyceae (*Chlorella minutissima*: 4.25; *Dunaliella tertiolecta*: 4.34; *Tetraselmis gracilis*: 4.80), Prymnesiophyceae (*Isochrysis galbana*: 4.59). Para el caso de especies de microalgas que no se han estudiado, recomendó utilizar el factor de 4.78

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-tungstico: 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 **305,148 citas hasta octubre del 2014**, que lo ubican en primer lugar entre los 50 artículos con el mayor número de citas sobre temas bioquímicos (Dvorsky, 2014).

El método de Bradford es también ampliamente utilizado y citado. En este caso, las proteínas se tiñen con el colorante Azul Brillante de Coomassie 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 proteínas, 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 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  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . 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 1998, 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  $\mu\text{g mL}^{-1}$  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. Considerando las ventajas y las desventajas de los dos métodos mencionados, se decidió 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  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de BSA, a partir de la cual se prepara un gradiente de concentración de 0 a 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Tabla 1). 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 más adelante. Los datos anteriores se grafican y se ajustan por mínimos cuadrados a una ecuación de segundo grado, obteniendo la  $r^2$ , el valor de la pendiente (**m**), utilizando el intercepto (**b**) igual a cero. El valor de  $r^2$  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 (Figura 1).

Tabla 1. Elaboración de la curva de calibración de proteínas utilizando BSA como estándar.

Vol. BSA ( $\mu\text{L}$ )	NaOH 0.1N ( $\mu\text{L}$ )	Vol. total ( $\mu\text{L}$ )	BSA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$A_{750\text{ nm}}$ promedio
0	1000	1000	0	0
50	950	1000	15	0.040
100	900	1000	30	0.077
150	850	1000	45	0.107
200	800	1000	60	0.141
250	750	1000	75	0.182
300	700	1000	90	0.213
350	650	1000	105	0.245
400	600	1000	120	0.280
450	550	1000	135	0.307

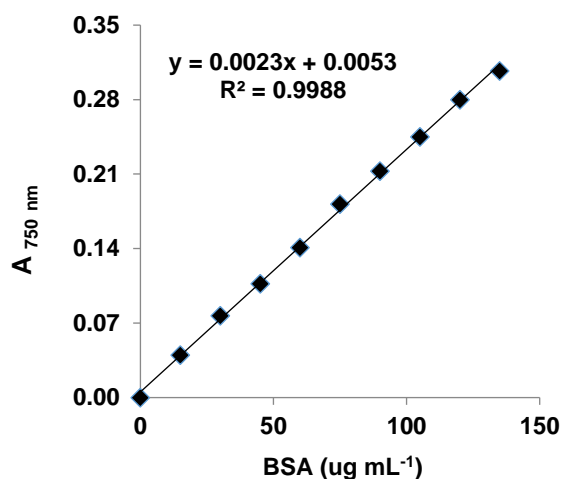


Figura 1. Curva de calibración de proteínas.

### 2.3 Obtención del extracto alcalino para la cuantificación de proteínas

Previo a la determinación de proteínas, es necesario realizar su extracción, para lo cual diversos autores (Bausch, 1981; Barbarino y Lourenco, 2005; Field *et al.*, 2017) 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 dicho proceso. En general, sugieren diferentes concentraciones de NaOH, con diferentes temperaturas y tiempos de extracción (Rausch, 1981). Otros autores precipitan las proteínas con ácido tricloroacético al 25% (Barbarino y Lourenco, 2005). Field *et al.*, (2017) evaluaron y compararon seis protocolos de extracción de proteínas, a los que les hicieron ligeras modificaciones, que consistieron en incubar la biomasa en agua ultrapura ddH<sub>2</sub>O por 24 h (en lugar de 12h), y el uso de un homogenizador mecánico para macerar, en lugar del Potter manual. El resultado fue un rendimiento alto de proteínas, así como un método más eficiente en la ruptura mecánica de la pared celular. González-López *et al.*, (2010) probaron el método de Kjeldahl (usando el factor de 5.95) y el de análisis elemental (factor de 4.44) para determinar el contenido de proteínas, en 4 especies:

*Porphyridium cruentum*, *Scenedesmus almeriensis*, *Muriellopsios* sp., y las cianobacterias *Synechocystis aquatilis* y *Arthrospira platensis*, concluyendo que los factores antes mencionados fueron útiles para estimar el contenido de proteínas en la biomasa microalgal producida en la fase estacionaria de crecimiento.

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 (ejemplo: aplanosporas de *Haematococcus*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Nannochloropsis*) se puede utilizar NaOH 1N. En este caso o cuando se usan normalidades de 0.25 o superiores, el pH del extracto resulta demasiado alcalino por lo que es necesario diluir con H<sub>2</sub>O destilada, para evitar interferencias con el desarrollo del color en la muestra.

**NOTA:** en el caso de haber diluido con agua el extracto, éste volumen deberá ser considerado al momento de los cálculos finales.

La extracción se realiza en calor, en un termobañero y el tiempo puede variar desde 10 hasta 60 min y temperaturas de 60 a 100°C.

En la tabla 2 se indican las condiciones de extracción para algunas especies de microalgas.

Una vez seleccionadas 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 este caso, la cantidad total de NaOH utilizado 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 en los casos de *Haematococcus*, *Chlorella*, *Scenedesmus*,

*Nannochloropsis* y de algunas diatomeas bentónicas.

Tabla 2. Ejemplo de condiciones de extracción de proteínas para ocho especies de microalgas (modificado de López Elías *et al.*, 1992).

Especie	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>Phaedodactylum 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	100	60

## 2.4 Protocolo para la extracción y 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  $-70^{\circ}\text{C}$ , 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 (Micro 90), 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 1,200 xg por 15 min a  $10^{\circ}\text{C}$ . 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 hacer 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 ( $\text{cél mL}^{-1}$ ) de la muestra.



Para cultivos muy concentrados, se puede utilizar hasta un total de 10 mL de NaOH.

- g) Colocar el extracto alcalino obtenido de la segunda extracción en el mismo tubo donde está el de la primera extracción. Mezclar en un vortex.
- h) Para determinar el volumen del extracto alcalino a usar en la determinación de proteínas, se recomienda hacer una búsqueda sobre el contenido de proteínas de la microalga en estudio, y hacer el cálculo de la alícuota a utilizar, tomando en consideración el punto medio de la concentración de la curva de calibración hecha con BSA. El volumen de la alícuota calculado, se coloca en un tubo de vidrio de tapón de rosca, y se completa a 1 mL con NaOH 0.1 N. Estas muestras se agitan con el vortex para su total homogenización.
- i) Preparar la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% (p/v) en NaOH 0.1 N (**solución A**).
- j) Preparar la mezcla 1:1 de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O al 0.5% y tartrato de K al 1% y agitar (**solución B: B1+B2**). 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<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0.1N + CuSO<sub>4</sub> al 5% y tartrato de K al 1% en una proporción de 50:1 (**solución C**), mezclar en el vortex y reposar 15 min. Esta solución se prepara al momento de usarse.
- l) Agregar 500 µL de la solución 1:1 de Folin: H<sub>2</sub>O 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 (Figura 1).

## 2.5 Cálculos para determinar el porcentaje de proteínas en una muestra

Considerando los datos de peso de la muestra de microalga liofilizada (Ps), el volumen total del extracto alcalino (Ve), el volumen de la alícuota calculada utilizado (Vm) 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, con respecto al peso seco.

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{[(A_{750}/m) \times Ve] / Vm}{Ps} \times 100$$

En donde:

A<sub>750</sub>: absorbancia a 750 nm

V<sub>e</sub>: volumen del extracto alcalino (mL)

V<sub>m</sub>: volumen de la alícuota calculada (mL)

P<sub>s</sub>: peso de la muestra liofilizada (mg)

## 3. BIBLIOGRAFÍA

- BARBARINO, E.**, Lourenco, S. O. 2005. An evaluation of methods for extraction and quantification for protein of marine macro and microalgae. *Journal of Applied Phycology* 17: 447-460. DOI: 10.1007/s10811-005-1641-4.
- BECKER, E. W.** 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge Press. 293 pp.
- BERGMEYER, J.**, Grabl, M. 1983. *Methods in Enzymatic Analysis*, 3<sup>rd</sup> Ed. Volume I. Fundamentals. Verlag Chemie, Weinheim, 84-99 pp.
- BIORAD**, 1979. *Bio-Rad protein assay*. Bio-Rad Bulletin 1069 EG, *Bio-Rad Laboratory*, Richmond, California, 10 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.
- BROWN, M. R.**, Jeffrey, S. W., Garland, C. D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture. A literature review. *CSIRO, Marine Reports*, No. 205. 44 pp.

- COOMBS, J.**, Hind, G., Leegood, R. C., Tieszen, L. L., Vonshak, A. 1988. Analytical Technics. Chapter 17. *En: Técnicas en Fotosíntesis y Bioproduktividad*. Coombs, J., Hall, D. O., Long, S. P., Scorlock, J. M. (Eds.). 358 pp.
- DVORSKY, G.** 2014. What are the most cited researched papers of all time?. Sciencepublishing  
<http://io9.gizmodo.com/what-are-the-most-cited-research-papers-of-all-time-1652707091>
- FAO/WHO** 1970. Amino acid content of Foods and Biological Data on Proteins. FAO Nutritional Studies. No. 24. Roma, Italy. 295 pp.
- FIELD, L. M.**, Fagerberg, W. R., Gatto, K. K., Bottgeri, A. 2017. A comparison of protein extractions methods optimizing high protein yields from marine algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 29: 1271-1278.  
DOI 10.1007/s10811-016-1027-9.
- GUILLARD, R. R. L.**, 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.
- GNAIGER, E.**, Bitterlich, G. 1984. Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia* 62: 289-298.
- GONZÁLEZ LÓPEZ, C. V.**, Cerón García, M. del C., Acien Fernández, F. G., Segovia Bustos, C., Chisti, Y., Fernández Sevilla, J. M. 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*. 101: 7587-7591.
- HARRISON, P. J.**, 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., van Slyke, D. D. 1948. A study of conditions for Kjeldahl determination of nitrogen in proteins. *Journal of Biological Chemistry* 176: 1401-1420.
- KORCHERT, G.** 1978. Protein determination by dye binding. Chapter 9. *En: Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biological Methods*. Hellebust J. A., 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., Huerta Aldaz, N. 1992. Manual de Técnicas Analíticas Aplicadas al Cultivo de Microalgas. CICTUS. Publicaciones Académicas No. 5. Serie Ciencias Marinas. 47 págs.
- LOURENCO, S. O.**, Barbaino, E., Lavín, P. L., Lanfer Marquez, U. M., Aidar, E. 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to protein conversion factors. *European Journal of Phycology* 39(1): 17-32.
- LOWRY, O. H.**, Rosenbrough N. J., Farr, A. L., 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 microalgal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass. 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.

## CAPÍTULO 9

# DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

<sup>1</sup>BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA, <sup>2</sup>BEATRIZ CORDERO ESQUIVEL,  
<sup>3</sup>DOMENICO VOLTOLINA

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, (CIBNOR). La Paz, Baja California Sur.

<sup>2</sup>Departamento de Acuicultura.

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California.

<sup>3</sup>Laboratorio de Estudios Ambientales UAS-CIBNOR, Mazatlán, Sinaloa.

kitty04@cibnor.mx, bcordero@cicese.mx, voltolin04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES
  - 2.1 CURVA ESTÁNDAR UTILIZANDO GLUCOSA ANHIDRA
  - 2.2 PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES
  - 2.3 CÁLCULOS PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE CARBOHIDRATOS
3. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** microalgas, 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 (Abalde *et al.*, 1995). 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 exponencial a estacionario (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 generalmente tienen un mayor contenido de carbohidratos en comparación con las demás microalgas. 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. MÉTODOS PARA LA 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 métodos, el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 densidad 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 entre 5 y 100 µg mL<sup>-1</sup>, es sensible a una amplia variedad de carbohidratos, incluyendo azúcares, azúcares metilados, polisacáridos ácidos y neutros; es poco sensible a la interferencia con proteínas y el color producido es muy estable (Korchert, 1978). El único inconveniente es la interferencia de las pentosas de los ácidos nucleicos, pero por su gran simplicidad es el de uso más extendido en los trabajos con especies microalgales.

Recientemente, Alabalasmeh *et al.*, (2013) desarrollaron el método espectrofotométrico conocido como **ácido sulfúrico-UV** para determinar la concentración y el contenido de carbono en las muestras. Éste depende de la capacidad que tienen los derivados furfúricos (hidrólisis de carbohidratos por el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado) de absorber en la región UV. Entre las ventajas que presenta este método, están: elimina el uso del fenol que se utiliza en el protocolo de Dubois *et al.*, (1956) evitando así, los riesgos en la salud y el medio ambiente, y reduce significativamente el tiempo del análisis. La concentración y contenido de carbono se determina de forma fiable en los monosacáridos, disacáridos y polisacáridos con alto peso molecular. Citamos el trabajo (Alabalasmeh *et al.*, 2013) en este capítulo, ya que es una alternativa que

se recomienda explorar, aunque no se incluirá por el momento, el protocolo hasta que se haya estandarizado.

## 2.1 Curva estándar utilizando glucosa anhidra

La curva de calibración se obtiene usando un gradiente de concentraciones de glucosa anhidra preparadas a partir de una solución de 120 µg mL<sup>-1</sup> (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. Elaboración de la curva de calibración de carbohidratos utilizando glucosa anhidra como estándar.

Vol. Glucosa (µL)	Vol. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (µL)	Vol. total (µL)	Glucosa (µg mL <sup>-1</sup> )	A <sub>485 nm</sub> promedio
0	1000	1000	0	0
200	800	1000	24.08	0.190
400	600	1000	48.16	0.415
600	400	1000	72.24	0.617
800	200	1000	96.32	0.793
1000	0	1000	120.40	0.888

Los datos se grafican y se ajustan por mínimos cuadrados a una ecuación de segundo grado, obteniendo la r<sup>2</sup>, el valor de la pendiente (**m**), utilizando el intercepto (**b**) igual a cero. El valor de r<sup>2</sup> 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 (Figura 1).

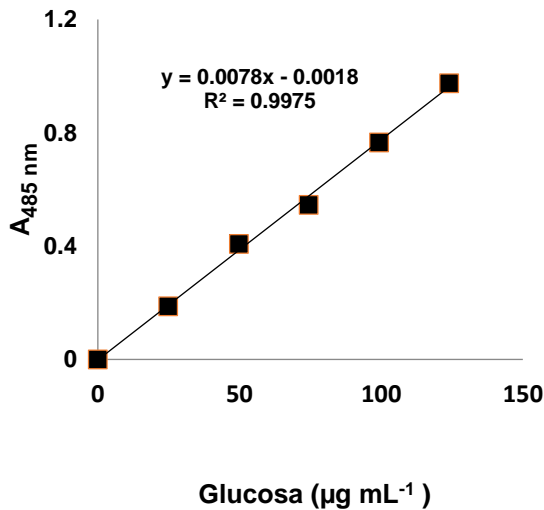


Figura 1. Curva de calibración de carbohidratos.

## 2.2 Protocolo para la determinación de carbohidratos totales

Antes de proceder a la determinación de los carbohidratos, es importante que todo el material esté lavado con el detergente Micro 90, enjuagado con suficiente agua destilada y seco, 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 6). Si 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M (en total se tendrán 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 1,200 xg a 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) Para determinar el volumen del extracto ácido a usar para la determinación de carbohidratos, se recomienda hacer una búsqueda sobre el contenido de carbohidratos de la microalga en estudio, y hacer el cálculo de la alícuota a utilizar, tomando en consideración el punto medio de la curva de calibración hecha con glucosa anhidra. El volumen de la alícuota calculado, se coloca en un tubo de vidrio con tapón de rosca, y se deberá completar a 1 mL con. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 M. Estas muestras se agitan con el vortex para su total homogenización.
  - j) Agregar 1 mL de fenol al 5% y mezclar.
  - k) Dejar reposar 40 min.
  - l) Agregar lentamente 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M.

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

### 2.3 Cálculos para determinar el porcentaje de carbohidratos

Los cálculos para obtener el contenido total absoluto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) o relativo (% de peso seco), se realizan considerando los datos de peso de la muestra de microalga seca o liofilizada ( $P_s$ ), el volumen total del extracto ácido ( $V_e$ ), el volumen del extracto ácido ( $V_m$ ) utilizado para la cuantificación de los carbohidratos y la ecuación de la recta de calibración.

$$\% \text{ Carbohidratos} = \frac{[(A_{485}/m) \times V_e / V_m]}{P_s} \times 100$$

En donde:

$A_{485}$ : absorbancia a 485 nm

$V_e$ : volumen del extracto ácido (mL)

$V_m$ : volumen de la alícuota calculada (mL)

$P_s$ : peso de la muestra liofilizada (mg)

### 3. BIBLIOGRAFÍA

- ALBALASMEH, A. A.**, Berhe, A. A., Ghezzehei, T. A. 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers* 97: 253-261.
- BROWN, M. R.**, Jeffrey, S. W., 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., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- GEIDER, R. J.**, 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.**, Hatcher, P. G. 1972. Improved technique for analysis of carbohydrates in sediments. *Limnology and Oceanography* 17 (6): 938-943.
- GRANUM, E.**, Kirkvold, S., 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.
- 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.
- KORCHERT, G.** 1978. Carbohydrates determination by the phenol-sulfuric acid method. Chapter 10. *En: Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biological Methods.* Hellebust J. A., Craigie J. S. (Eds.). Cambridge University Press. Cambridge, 512 pp.
- LÓPEZ-ELÍAS, J. A.**, Báez-Dueñas, M. del C., Huerta Aldaz, N. 1992. Manual de Técnicas Analíticas Aplicadas al Cultivo de Microalgas. CICTUS. Publicación Académica, No.5. Ciencias Marinas. 47 págs.
- PARSONS, T. R.**, Maita, Y., Lalli C. M. 1984. A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press. 173 pp.
- WEBB, K. L.**, 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., 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.**, Willis, A. J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemistry* 57: 508-514.

## CAPÍTULO 10

# DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS TOTALES POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

<sup>1</sup>BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA, <sup>2</sup>DOMENICO VOLTOLINA

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. La Paz, Baja California Sur, 23096, México.  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR).

<sup>2</sup>Laboratorio de Estudios Ambientales UAS-CIBNOR, Mazatlán, Sinaloa, México.  
kitty04@cibnor.mx, voltolin04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. CLOROFILAS Y CAROTENOIDES
  - 2.1 EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS LIPOSOLUBLES
  - 2.2 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS LIPOSOLUBLES
  - 2.3 ECUACIONES PARA CUANTIFICAR CLOROFILAS Y CAROTENOIDES TOTALES CON DIFERENTES SOLVENTES
3. FICOBILIPROTEINAS Y FICOBILISOMAS
  - 3.1 EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA Y FICOERITRINA
  - 3.2 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA Y FICOERITRINA
4. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** clorofilas, carotenoides, ficobiliproteínas, ficocianina, ficoeritrina

---

### 1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas contienen tres grupos de pigmentos: clorofilas, carotenos y ficobilinas. Los principales pigmentos son las clorofilas y carotenoides que normalmente representan entre el 0.5 y el 5% del peso de la biomasa celular (Ben-Amotz, 1985). Las ficobilinas se localizan en las cianobacterias como *Spirulina (Arthrospira) maxima*, en las rodófitas como

*Porphyridium cruentum* y en las criptomonadinas como *Rhodomonas salina*.

La clorofila *a* (*Chl a*) es el único pigmento que se localiza en el centro de reacción del aparato fotosintético. Las clorofilas se localizan en las **membranas tilacoidales del cloroplasto**. Son compuestos liposolubles por lo que es necesario usar solventes orgánicos para su extracción.

### 2. CLOROFILAS Y CAROTENOIDES

Las clorofilas *a*, *b*, *c* (*c1* y *c2*), y *d*, esta última de origen bacteriano (Chapman, 1988), y los carotenoides, son pigmentos esenciales para la fotosíntesis, que participan en la captación de luz, y en el caso de los carotenoides, en la fotoprotección. Los pigmentos se han utilizado como criterio taxonómico para separar clases y divisiones, así como marcadores filogenéticos. La clorofila es una porfirina que contiene un átomo de Mg<sup>2+</sup> en el centro del anillo de porfirina, que se asocia con lípidos y proteínas hidrofóbicas de las membranas fotosintéticas, mediante una cadena hidrofóbica de alcohol de cadena larga. La *Chl a* es de color verde porque absorbe la luz roja y la azul, y refleja la luz verde.

Las propiedades de un pigmento se expresan por su espectro de absorción, que indica el grado hasta el cual absorbe

luz de diferentes longitudes de onda. El espectro de absorción de células que contienen clorofila a muestra una fuerte absorción de la luz roja (absorción máxima a 680 nm) y de la luz azul (absorción máxima a 430 nm) (Madigan, 1999).

Los carotenoides son poliisoprenoides (cadena de hidrocarburos) que poseen dobles enlaces conjugados y un anillo de ciclohexano en cada extremo de la molécula. Funcionan como fotoprotectores y pigmentos captadores de luz (Cohen, 1986). Cada especie microalgal puede contener entre **5 y 10 carotenoides** distintos.

Existen dos tipos de carotenoides: los **carotenos** que no contienen oxígeno en sus anillos ( $\beta$ -caroteno, licopeno) (Figura 1) y las **xantofilas** (derivados oxigenados del caroteno) que contienen oxígeno (luteína, fucoxantina, astaxantina) (Figura 2). El licopeno es el precursor de todos los carotenoides encontrados en las microalgas.

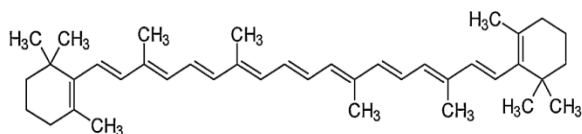


Figura 1. Estructura del caroteno *trans*  $\beta$ -caroteno.

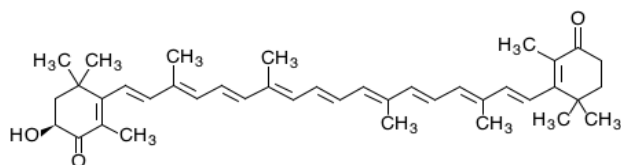


Figura 2. Estructura de la xantofila astaxantina.

El  $\beta$ -caroteno es el carotenoide típico de todas las microalgas y plantas superiores, y se encuentra en mayor proporción en las microalgas verdes. Generalmente representa cerca del 1% de su biomasa seca, aunque en condiciones de estrés salino, deficiencia total de nitrógeno y elevada luminosidad, puede acumularse en proporciones más elevadas como sucede en la microalga halotolerante *Dunaliella salina*, en la cual puede llegar hasta al 10% de su biomasa seca celular (Jin y Polle, 2009). La variedad de los carotenoides es mayor en las microalgas que en las plantas superiores.

Algunos grupos de microalgas tienen nombres comunes que reflejan su contenido en carotenoides. Por ejemplo, las pardas o Phaeophyceae contienen varias xantofilas, sobre todo fucoxantina. La mayoría de los carotenoides son amarillos o anaranjados pero su color puede estar enmascarado por la clorofila (Abalde *et al.*, 1995). La similitud entre las Chlorophyceae y las plantas superiores se debe al elevado contenido de luteína. Las Rhodophyceae y Cryptophyceae también contienen cantidades considerables de este pigmento.

Existen muchos tipos de xantofilas en las microalgas (Tabla 1). Algunos ejemplos: peridina en Dinophyceae; fucoxantina en Phaeophyceae Haptophyceae y Bacillariophyceae (*Pavlova lutheri*, *Chaetoceros gracilis*), astaxantina en Chlorophyceae (*Chlorella vulgaris*, *Haemaotococcus pluviialis*).

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

El espectrofotómetro mide la cantidad de luz que los pigmentos absorben en el rango de longitud de onda visible. Cada pigmento tiene una longitud de onda a la cual tendrá un pico de absorción y puede ser identificado mediante este pico. Del ancho del pico y con el dato de absorbancia, se puede calcular la concentración de cada tipo de pigmento extraído de las células. Este tipo de mediciones es importante para estimar tanto la cantidad de biomasa, para determinar la condición fisiológica de las células, así como la adaptación a niveles altos o bajos de luz, y la edad de la población (Stern, 1988).



**Tabla 1:** Principales pigmentos (clorofilas y carotenoides) de diferentes clases de microalgas. Tomado de Chapman (1988).

Clases	Clorofilas	Carotenoides
Cyanophyceae	a	β-caroteno, equinenona, zeaxantina, mixoxantofila
Rhodophyceae	a	β-caroteno, α-caroteno, luteína, zeaxantina
Euglenophyceae	a, b	β-caroteno, diadinoxantina, neoxantina, zeaxantina
Dinophyceae	a, c <sub>2</sub>	β-caroteno, dinoxantina, diadinoxantina, peridina, piroxantina. <b>NOTA:</b> en algunos dinoflagelados en lugar de peridina está la fucoxantina; en otras pueden estar al mismo tiempo 19'-hexanoiloxifucoxantina y c <sub>1</sub>
Bacillariophyceae	a, c <sub>1</sub> , c <sub>2</sub>	β-caroteno, diadinoxantina, diatoxantina, fucoxantina
Crysophyceae	a, c <sub>1</sub> , c <sub>2</sub>	β-caroteno, fucoxantina, neoxantina, violaxantina, zeaxantina
Prymnesiophyceae	a, c <sub>1</sub> , c <sub>2</sub>	β-caroteno, diadinoxantina, diatoxantina, fucoxantina <b>NOTA:</b> en <i>Emiliana huxleyi</i> en lugar de fucoxantina está 19'-hexanoiloxifucoxantina
Cryptophyceae	a, c <sub>2</sub>	α-caroteno, aloxantina, crocoxantina, monadoxantina
Chlorophyceae-Charophyceae-Ulvophyceae	a, b	β-caroteno, luteína, neoxantina, violaxantina, zeaxantina
Phaeophyceae	a, c <sub>1</sub> , c <sub>2</sub>	β-caroteno, fucoxantina, violaxantina
Xanthophyceae	a, c <sub>1</sub> , c <sub>2</sub> <b>NOTA:</b> c <sub>1</sub> y c <sub>2</sub> en muy baja concentración	β-caroteno, diadinoxantina, diatoxantina, heteroxantina, neoxantina, vauquerixantina
Eustigmatophyceae	a	β-caroteno, neoxantina, vauquerixantina
Chloromonadophyceae	a, c <sub>1</sub> , c <sub>2</sub>	β-caroteno, diadinoxantina, dinoxantina, heteroxantina, vauquerixantina

## 2.1 EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS LIPOSOLUBLES

Los pigmentos son compuestos muy lábiles que se degradan fácilmente por contacto con la luz, aire, sustancias alcalinas y ácidas, provocando **isomerización** y **oxidación** que cambia el color del pigmento y su estructura química. La presencia de pequeñas cantidades de ácido en un solvente induce a la pérdida de Mg<sup>2+</sup> de la clorofila provocando la formación de **feofitinas** e **isomerización** cis/trans de los carotenoides (Chapman, 1988).

Para la extracción de pigmentos se deberá partir de **biomasa fresca** de la microalga recién cosechada. En el caso de que no se pueda realizar inmediatamente la extracción,

se recomienda almacenar la biomasa fresca a -20°C o -80°C en tubos de vidrio de tapón de rosca y en atmósfera de nitrógeno. Almacenadas de esta manera, las muestras se pueden mantener hasta **4 semanas** con mínimos cambios. Sin embargo, es preferible que la extracción y análisis de los pigmentos, se realice lo más pronto posible para evitar la oxidación (Chapman, 1988).

Para la extracción de clorofilas, se han usado varios métodos los cuales presentan diferentes niveles de exactitud, entre ellos, el método de Arnon (1949) que se utilizó por mucho tiempo por ser considerado sencillo y rápido, sin embargo, en la actualidad ya no se recomienda, debido a que los coeficientes de extinción de las clorofilas a y b, no fueron

calculados correctamente (Porra *et al.*, 1989; Porra 2006, 2009).

Porra *et al.*, (1989), usando diferentes solventes, calcularon dichos coeficientes de extinción y propusieron las ecuaciones para la cuantificación de ambas clorofilas, los cuales se consideran de los más exactos, además, se siguen utilizando.

Las determinaciones espectrofotométricas se consideran útiles, aunque uno de los puntos críticos de las ecuaciones definidas para las clorofilas *a* y *b*, fue el haber asumido que, en los extractos no había otros pigmentos (carotenoides u otras clorofilas como *c* y *d*) que pudieran causar interferencias durante las lecturas.

La exactitud y precisión de un método de extracción y su posterior cuantificación por métodos espectrofotométricos, dependen de:

- El solvente utilizado para la extracción de clorofilas.
- El coeficiente de extinción de las ecuaciones definidas para las clorofilas.
- La presencia de productos de la degradación de la clorofila (feofitinas) cuyos espectros son semejantes a la de la clorofila.
- La concentración de clorofilas en los extractos y su proporción relativa.
- La precisión y resolución del espectrofotómetro.

Los métodos espectrofotométricos para la cuantificación de pigmentos (clorofilas y carotenos totales), son de mucha utilidad, ya que de los valores que se obtengan como resultado de aplicar la ecuación seleccionada para determinar el contenido de clorofilas y carotenoides, se podrá calcular por ejemplo, el volumen de muestra (extracto de pigmentos) a inyectar en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) como se explicará más adelante en el capítulo 12.

Como se mencionó, se han utilizado diferentes solventes para la extracción de clorofilas, entre ellos: acetona (pura o al 80 o

90%), cloroformo, metanol (puro o al 90%), dietil éter (puro, libre de agua y/o saturado de agua), dimetil formamida, dimetil sulfóxido, etanol 95% (Lichtenthaler, 1987; Wellburn, 1994; Lichtenthaler y Buschamnn, 2001; Porra, 2006; Ritchie, 2008; Wright y Jeffrey, 2006).

La selección del solvente para la extracción de pigmentos de las microalgas depende de varios criterios que se recomiendan tomar en cuenta cuando el procedimiento implica el uso del HPLC (Jeffrey *et al.*, 1997), siendo éstos:

- **Extractabilidad:** definido como la capacidad de un solvente para extraer la totalidad de los pigmentos (clorofilas, carotenos), independientemente del tipo de microalga.
- **Fidelidad:** los pigmentos deberán extraerse sin enzimas que las degraden ni productos de degradación. Los pigmentos extraídos deberán mantenerse estables al menos por un día para su posterior inyección en el HPLC.
- **Compatibilidad:** los pigmentos extraídos deberán ser compatibles con la columna del HPLC.
- **Precisión:** los resultados que se obtengan deberán con facilidad poderse replicar posteriormente.
- **Sencillo:** se preferirán aquellos protocolos con pocas etapas de extracción para que el personal (estudiantes y técnicos) puedan procesar varias muestras en una sesión.
- **Seguro:** el solvente a usar, **no debe ser tóxico ni inflamable**. Este **criterio es considerado uno de los más importantes**, ya que se deben evitar riesgos de accidentes y problemas de salud, como se indicó en el capítulo 1.

En las tablas 2A y 2B se muestran los diferentes tipos de solventes, los coeficientes de extinción y sus respectivas ecuaciones. Igualmente, se indica la resolución y precisión del espectrofotómetro a utilizar.

Tabla 2A. Ecuaciones para determinar la concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de clorofila *a* (*C<sub>a</sub>*), *b* (*C<sub>b</sub>*) y carotenoides totales (*C<sub>x+c</sub>*) en diferentes solventes. Espectrofotómetro de 1 a 4 nm de resolución. Tomado de Wellburn (1994).

Solvente	Resolución del espectrofotómetro 1 a 4 nm
Acetona 80 %	$C_a = 12.21A_{663} - 2.81A_{646}$ $C_b = 20.13A_{646} - 5.03A_{663}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 3.27C_a - 104C_b}{198}$
Cloroformo	$C_a = 10.91A_{666} - 1.2A_{648}$ $C_b = 16.38A_{648} - 4.57A_{666}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{480} - 1.42C_a - 46.09C_b}{202}$
Dietiléter puro	$C_a = 10.05A_{662} - 0.77A_{644}$ $C_b = 16.37A_{644} - 3.14A_{662}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.28C_a - 56.7C_b}{205}$
Dimetil formamida	$C_a = 11.65A_{664} - 2.69A_{647}$ $C_b = 20.81A_{647} - 4.53A_{664}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{480} - 0.89C_a - 52.02C_b}{245}$
Dimetil sulfóxido	$C_a = 12.19A_{665} - 3.45A_{649}$ $C_b = 21.99A_{649} - 5.32A_{665}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{480} - 2.14C_a - 70.16C_b}{220}$
Metanol puro	$C_a = 15.65A_{666} - 7.34A_{653}$ $C_b = 27.05A_{653} - 11.21A_{666}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 2.86C_a - 129.2C_b}{221}$

Tabla 2B: Ecuaciones para determinar la concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de clorofila *a* (*C<sub>a</sub>*), *b* (*C<sub>b</sub>*) y carotenoides totales *C(x+c)* en diferentes solventes. Espectrofotómetro de 0.1 a 0.5 nm de resolución. Tomado de Lichtenthaler y Buschmann (2001).

Solvente	Resolución del espectrofotómetro 0.1 a 0.5 nm
Acetona pura	$C_a = 11.24A_{661.6} - 2.04A_{644.8}$ $C_b = 20.13A_{644.8} - 4.29A_{661.6}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.9C_a - 63.14C_b}{214}$
Acetona 80 %	$C_a = 12.25A_{663.2} - 2.79A_{646.8}$ $C_b = 21.5A_{646.8} - 5.1A_{663.2}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b}{198}$
Metanol puro	$C_a = 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4}$ $C_b = 34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96C_b}{221}$
Metanol 90 %	$C_a = 16.82A_{665.2} - 9.28A_{652.4}$ $C_b = 36.92A_{652.4} - 16.54A_{665.2}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.91C_a - 95.15C_b}{225}$
Dietiléter puro	$C_a = 10.05A_{660.6} - 0.97A_{642.2}$ $C_b = 16.36A_{642.2} - 2.43A_{660.6}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.43C_a - 35.87C_b}{205}$
Dietiléter (libre de agua)	$C_a = 9.93A_{660.6} - 0.75A_{641.8}$ $C_b = 16.23A_{641.8} - 2.42A_{660.6}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.3C_a - 33.12C_b}{213}$
Dietiléter (saturado de agua)	$C_a = 10.36A_{661.6} - 1.28A_{643.2}$ $C_b = 17.149A_{643.2} - 2.72A_{661.8}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.38C_a - 48.05C_b}{211}$
Etanol 95 %	$C_a = 13.36A_{664.1} - 5.19A_{648.6}$ $C_b = 27.43A_{648.6} - 8.12A_{664.1}$ $C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 2.13C_a - 97.64C_b}{209}$

A continuación, se describe el protocolo para la extracción de pigmentos liposolubles. La selección del solvente dependerá del alcance y objetivo del estudio y/o investigación, pero

sin perder de vista, el criterio de seguridad que anteriormente se mencionó.

## 2.2 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS LIPOSOLUBLES

(Strickland y Parsons, 1972; Jeffrey y Humphrey, 1975; Humphrey, 1979).

a) Para el caso de cultivos poco concentrados, colocar de 30 a 45 mL en tubos cónicos de plástico. Para cultivos concentrados usar 15 mL.

b) Centrifugar a 2,200 xg de 2 a 10 min (dependiendo de la microalga). Si se trata de diatomeas y rodofíceas de 6 a 10 min; y si son dinoflagelados, 2 min a 15°C.

c) Desechar el sobrenadante con una pipeta Pasteur y/o en el caso de que la pastilla celular esté muy compacta, decantar.

d) Colocar la pastilla celular en un tubo de vidrio limpio con tapón de rosca y cubrir con papel aluminio para evitar la fotooxidación.

e) Añadir 3 mL de acetona al 90% o 100% (según la microalga) y agitar en el vortex para permitir la extracción de los pigmentos.

f) Sonicar en baño de hielo dos ciclos durante 5 min. Dejar las muestras en reposo a 4°C durante la noche (12 a 16 h).

g) Volver a sonicar en las condiciones anteriores.

h) Centrifugar a 2200 xg por 10 min a 15°C. Separar el extracto de pigmentos con una pipeta Pasteur limpia y colocarlo en otro tubo limpio y protegido de la luz.

i) Colocar los pigmentos en una celda de cuarzo y leerlos en un espectrofotómetro previamente calibrado con acetona al 90 o 100% a las longitudes indicadas en las ecuaciones.

## 2.3 ECUACIONES PARA CUANTIFICAR CLOROFILAS Y CAROTENOIDE TOTALES CON DIFERENTES SOLVENTES

Para calcular la concentración de clorofilas en diferentes microalgas se recomiendan utilizar las ecuaciones definidas por Jeffrey y Humphrey (1975) y Humphrey (1979).

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

$$Ca = 11.97A_{664} - 1.93 A_{647}$$

$$Cb = 20.36 A_{647} - 5.50 A_{664}$$

**Diatomeas y algas pardas (*Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*)** que contienen clorofilas a y  $C_1+C_2$  (**acetona al 90%**):

$$Ca = 11.47A_{664} - 0.4A_{630}$$

$$CC_1+C_2 = 24.36A_{630} - 3.73A_{664}$$

**Dinoflagelados y cryptomonadales** que contienen clorofila a y  $C_2$  (**acetona al 100%**):

$$Ca = 11.43A_{663} - 0.64A_{630}$$

$$CC_2 = 27.09A_{630} - 3.63A_{663}$$

**Dinoflagelados y cryptomonadales** que contienen clorofila a y  $C_2$  (**acetona al 90%**):

$$Ca = 11.43A_{663} - 0.40A_{630}$$

$$CC_2 = 24.88A_{630} - 3.80A_{664}$$

**Mezcla de microalgas** que contienen todos los pigmentos (**acetona al 90%**):

$$Ca = 11.85A_{664} - 1.54A_{647} - 0.08A_{630}$$

$$Cb = - 5.43A_{664} + 21.03A_{647} - 2.66A_{630}$$

$$CC_1+C_2 = -1.67A_{664} - 7.6A_{647} + 24.53A_{630}$$

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

$$Ca = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}$$

$$Cb = 22.9A_{645} - 4.64A_{663}$$

$$Ca+b = 8.02A_{663} + 20.2A_{645}$$

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

$$Ca = 16.5A_{665} - 8.3A_{650}$$

$$Cb = 33.8A_{650} - 12.5A_{665}$$

$$Ca+b = 4.0A_{665} + 25.5A_{650}$$

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

$$Ca = 9.92A_{660} - 0.77A_{642.5}$$

$$Cb = 17.6A_{642.5} - 2.18A_{660}$$

$$Ca+b = 7.12A_{660} + 16.8A_{642.5}$$

**NOTA:** Los resultados se expresan en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extracto, que se multiplican por el volumen del extracto (mL) y se dividen entre el número de mL de la muestra para obtener la concentración de clorofilas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### ECUACIONES PARA CUANTIFICAR CAROTENOIDES TOTALES ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

Para los **carotenoides** se utiliza **acetona al 90%** como solvente y se calculan de acuerdo a las siguientes ecuaciones Strickland y Parsons, 1972):

**Clorófitas y cianobacterias:**

$$\text{Carotenoides} = 7.6 (A_{480} - 1.49 A_{510})$$

**Crisófitas y Pirofitas:**

$$\text{Carotenoides} = 10 A_{480}$$

### ECUACIONES PARA CUANTIFICAR CLOROFILAS ( $\mu\text{g cel}^{-1}$ o $\mu\text{mol cel}^{-1}$ )

Para obtener los valores en  $\mu\text{g Ca}$  o  $\text{Cb}$  o  $\text{Cc}_1+\text{c}_2$  en  $\text{cel}^{-1}$  o en  $\mu\text{mol Ca}$  o  $\text{Cb}$  o  $\text{Cc}_1+\text{c}_2$   $\text{cel}^{-1}$  se usan las siguientes ecuaciones (Stermán, 1988):

$$\frac{\mu\text{g Clorofila}}{\text{cel}} = \frac{\mu\text{g Clorofila en 1 mL de cultivo}}{N}$$

$$\frac{\mu\text{mol Clorofila}}{\text{cel}} = \frac{\mu\text{g Clorofila en extracto}}{\frac{\text{PM Clorofila}}{N}}$$

En donde:

**N:** concentración celular del cultivo ( $\text{cel mL}^{-1}$ )

**PM:** peso molecular de las clorofilas:

**Ca: 894, Cb: 908, Cc: 610**

**Microalgas y diatomeas** que contienen los pigmentos *a, b, c, d* (acetona 90%) (Ritchie, 2008):

$$Ca = -0.3319A_{630} - 1.7485A_{647} + 11.9442A_{664} - 1.4306 A_{691}$$

$$Cb = -1.2825A_{630} - 19.8839A_{647} - 4.886A_{664} - 2.3416A_{691}$$

$$Cc = 23.5902A_{630} - 7.8516A_{647} - 1.5214A_{664} - 1.7443A_{691}$$

$$Cd = -0.5881 A_{630} + 0.0902 A_{647} - 0.1564A_{664} - 11.0473 A_{691}$$

$$\text{Clorofila total} = 21.3877 A_{630} + 10.3739 A_{647} + 5.3805 A_{664} + 5.5309 A_{691}$$

### 3. FICOBILIPROTEINAS Y FICOBILISOMAS

Las ficobiliproteínas son un grupo de cromoproteínas unidas lineal y covalentemente a un grupo prostético tetrapirrol, el cual forma un complejo pigmento-proteína especializado llamado ficobilisoma (Gantt 1980; Glazer 1984). Estos pigmentos están presentes en cianobacterias, rodofíceas, proclorofíceas, glaucofíceas y criptofíceas (Larkum, 2003). Son solubles en agua, y con base en sus características espectrales se dividen en tres clases: ficoeritrina (**PE** por sus iniciales en inglés, roja), ficocianina (**PC** por sus iniciales en inglés, azul) y aloficocianina (**APC** por sus iniciales en inglés, verdeazulada).

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 que es la parte del complejo encargado de convertir la energía radiante en energía química.

En las cianobacterias y microalgas rojas, el pigmento presente en el centro de reacción siempre es una molécula de clorofila *a*. Los ficobilisomas son muy eficientes debido a su estructura muy ordenada. Las biliproteínas que absorben la radiación con el mayor contenido energético (menor longitud de onda) están espacialmente más alejadas del centro de reacción, mientras que las que absorben la de menor contenido energético, están más próximas.

Las biliproteínas están organizadas en arreglos en los cuales los espectros de emisión de un tipo se traslapan con los espectros de absorción de las otras biliproteínas, facilitando la transferencia de energía hacia el centro de reacción. En las cianobacterias y algas rojas, las ficobiliproteínas se ensamblan en los ficobilisomas y en éstos la ruta de transferencia de energía es:



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, 1979).

Las cianobacterias contienen principalmente ficocianina, y las microalgas rojas ficoeritrina. Ambos grupos contienen pequeñas cantidades de aloficocianina. Las ficobilinas captan 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 microalgas 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. Las variaciones de los espectros de las ficobiliproteínas se deben a las interacciones de las proteínas en el sitio específico de los cromóforos (Bennet y Bogorad, 1973; Zhao *et al.*, 2011), por lo que los espectros de absorción sólo pueden compararse cuando se obtienen en condiciones similares.

### 3.1 EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA Y FICOERITRINA

La extracción de ficobiliproteínas de cianobacterias y microalgas con frecuencia se considera un procedimiento lento y complicado, ya que ciertos factores como temperatura (Mahadey, 2005), tiempo de extracción, concentración del buffer de fosfatos (Bennett y Bogorad, 1973; Bryant *et al.*, 1979; Boussiba y Richmond, 1979), o de acetato (Tetzuya, 1988), y pH, influirán en el resultado final (Viskari y Colver, 2003; Lawrenz *et al.*, 2011). Se han realizado diferentes esfuerzos para modificar y optimizar el procedimiento con la finalidad de minimizar costos y maximizar el rendimiento de la extracción (Zimba 2012; Horváth *et al.*, 2013).

Se han publicado un gran número de protocolos para cuantificar PC, PE y APC a

partir de fitoplancton. Diferentes autores colectan sus muestras en filtros (Stewart y Farmer, 1984; Viskari y Colyer, 2003), mientras que otros cosechan por centrifugación (Wedemayer *et al.*, 1991). Algunos protocolos requieren solo buffer de fosfatos, mientras que otros sugieren la adición de enzimas para digerir la pared celular seguida de ruptura celular, y proceder a la extracción (Lawrenz *et al.*, 2011). Otros autores prefieren la ruptura mecánica por sonicación con prensa francesa (Alberte *et al.*, 1984).

El protocolo más eficiente de extracción combina métodos mecánicos y químicos que permiten la liberación de proteínas (Lawrenz *et al.*, 2011). Entre ellos: tratamiento con buffer de fosfatos (Bennett y Bogorad, 1973); digestión con lisozimas (Stewart y Farmer, 1984); uso de asolectinas-CHAPS (Viskari y Colyer, 2003); ciclos de congelamiento-descongelamiento, sonicación y agitación mecánica (Lawrenz *et al.*, 2011; Horváth *et al.*, 2013), electroforesis capilar (Viskari y Colyer, 2003).

Idealmente el protocolo a usar debe ser rápido, seguro, eficiente, de bajo costo y que pueda ser usado de manera rutinaria ya sea en muestras de laboratorio y/o de campo (Lawrenz *et al.*, 2011).

El procedimiento de extracción debe de funcionar bien con células que se pueden romper fácilmente como las criptofíceas (*Rhodomonas salina*), así como con las que son difíciles de romper tales como algunas cianobacterias (*Synechococcus bacillaris*), entre otras.

En este capítulo mencionaremos el protocolo que normalmente se usa para la extracción y cuantificación de PC, PE y APC (Bennet y Bogorad, 1973). La concentración está dada en mg mL<sup>-1</sup> de extracto crudo.

En la figura 3 se muestran algunas de las microalgas y cianobacterias, y sus pigmentos característicos.

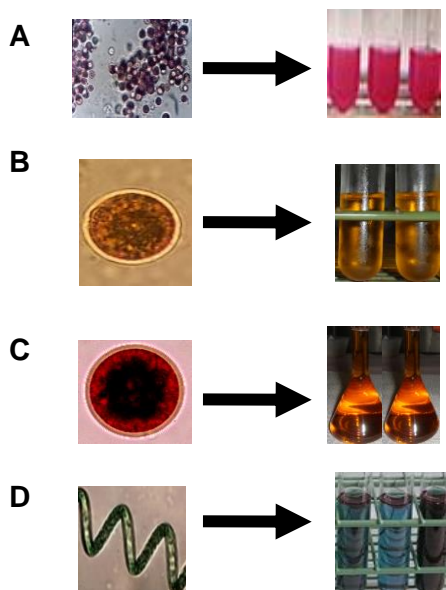


Figura 3: Pigmentos de microalgas y cianobacterias: A) *Porphyridium cruentum* (ficoeritrina), B) *Dunaliella salina* (beta-caroteno), C) *Haematococcus pluvialis* (astaxantina), D) *Spirulina (Arthrospira) maxima* (ficocianina). Imágenes tomadas en el CIBNOR.

### 3.2 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA Y FICOERITRINA

a) En un tubo cónico de plástico, centrifugar 10 a 20 mL del cultivo de una cianobacteria y/o rodofícea a 2,200 xg, 10°C por 15 min. En el caso de la cianobacteria *Spirulina* se recomienda filtrar ya que no se forma totalmente la pastilla celular debido a la flotación de las células. Descartar el sobrenadante.

b) Lavar las células con 10 mL de formato de amonio al 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.

c) 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.

d) Sonicar las células durante 1 a 2 min en un baño de hielo y congelar a  $-80^\circ\text{C}$  durante 2 h.

e) Descongelar a temperatura ambiente. El paso de congelar y descongelar se realiza al menos en dos ocasiones para asegurar la total extracción de los pigmentos.

f) Centrifugar a 2,200 xg a 10°C por 15 min. Separar con una pipeta Pasteur limpia el extracto que contiene el complejo de las ficobiliproteínas (PC, PE y APC) y colocarlo en tubos limpios.

g) La cantidad de PE, PC y APC se lee en el espectrofotómetro a 545, 620 y 650 nm. Las ecuaciones definidas son:

$$PC = \frac{A_{620} - 0.72A_{650}}{7.38}$$

$$APC: \frac{A_{650} - (0.19A_{620})}{5.65}$$

$$PE: \frac{A_{545} - 2.8PC - 1.34APC}{12.70}$$

### 4. BIBLIOGRAFÍA

- ABALDE, J.**, Cid, A., Fidalgo, P., Herrero, C. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. Universidade Da Corunha. España. 210 págs.
- ALBERTE, R. S.**, Wood, A. M., Kursar, A. T., Guillard, R. R. L. 1984. Novel Phycoerythrins in Marine *Synechococcus* spp. Characterization and Evolutionary and Ecological Implications. Plant Physiology 75: 732-739.
- ARNON, D. I.** 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoxidase in *beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15
- BECKER, E. W.** 1994. Measurement of algal growth. En: Microalgae Biotechnology and Microbiology. Cambridge Studies in Biotechnology. Cambridge Press. 56-62pp.
- BEN-AMOTZ, A.**, Tornabene, T. G., Thomas, W. H. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. Journal of Phycology 21: 72-81.
- BENNET, A.**, Bogorad, L. 1973. Complementary chromatic adaptation in

- filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology* 58: 419–435.
- BOUSSIBA, S.**, Richmond, A. 1979. Isolation and purification of phycocyanin from the bluegreen alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology* 120: 155-159.
- BRYANT, D. A.**, Guglielmi, G., Tandeau de Marsac, N., Castets, A. M., Cohen-Bazire, G. 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology* 123: 113- 127.
- CHAPMAN, D. J.** 1988. Qualitative analysis of pigments. *En: Experimental Phycology. A Laboratory Manual.* Lobban, Ch. S., Chapman, D. J., Kremer, B. P. (Eds). Cambridge University Press. 93-103pp.
- COHEN, Z.** (1986). Products From Microalgae. *En: Handbook for Microalgal Mass Culture.* Richmond A. (Ed.). CRC Press. Boca Raton, FL. 421-454 pp.
- GANTT, E.** 1980. Structure and Function of Phycobilisomes: Light Harvesting Pigment Complexes in Red and Blue-Green Algae. *International Review of Cytology* 66: 45-80.
- GLAZER, A. N.** 1984. Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta* 768 (1): 29-51.
- JEFFREY, S. W.**, Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural populations. *Biochimie and Physiology Pflanze* 167: 191- 194.
- JEFFREY, S. W.**, Mantoura, R. F. C., Wright, S. W. 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. *En: Jeffrey S. W., Mantoura, R. F. C., Wright, S. W. (Eds.). Phytoplankton Pigments in Oceanography.* UNESCO, Rome. 261-282 pp.
- HORVÁTH, H.**, Kovács, A. W., Riddick, C., Présing, M. 2013. Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. *European Journal of Phycology* 48: 278–286.
- HUMPHREY, G. F.** 1979. Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light dark regimes. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 40: 63-70.
- JIN, E. S.**, Polle, J. E. W. 2009. Carotenoid Biosynthesis in *Dunaliella* (Chlorophyta). *En: The Alga Dunaliella. Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology.* Ben-Amotz, A., Polle, J. E. W., Subba Rao, D. V. (Eds.). 147-171.
- LARKUM, A. W. D.** 2003. Light harvesting systems in algae. *En: Larkum, A. W. D., Douglas, S. E., Raven, J. A. (Eds). Photosynthesis in algae.* Kluwer, Dordrecht. 277–289 pp.
- LAWRENZ, E.**, Fedewa, E. J., Richardson, T. L. 2001. Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous extracts. *Journal of Applied Phycology* 23: 865-871. DOI 10.1007/s10811-010-9600-0
- LICHTENTHALER, H. K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic bio-membranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- LICHTENTHALER, H. K.**, Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Supplement 1.* F4.3.1-F4.3.8
- MANTOURA, R. F. C.**, Wright, S. W., Jeffrey, S. W., Barlow, R. G., Cummings, D. E. 1997. Filtration and storage of pigments from microalgae. *En: Jeffrey S. W., Mantoura, R. F. C., Wright, S. W. (Eds.). Phytoplankton Pigments in Oceanography.* UNESCO, Rome. 283–306 pp.
- PORRA, R. J.**, Thompson, W. A., Kriedemann, P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying Chls a and b extracted with four different solvents. Verification of the concentration standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochemistry and Biophysics Acta* 975: 384-394.
- PORRA, R. J.** 2006. Spectrophotometric assay for plant, algal and bacterial chlorophylls. *En: Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications.* Grimm, B., Porra, R. J., Rudiger, W.,



- Scheer, H. (Eds.). Springer Dordrecht, The Netherlands, 95-107 pp.
- PORRA, R. J.** 2009. A proven simultaneous equation assay for chlorophylls *a* y *b* using aqueous acetone and similar assays for recalcitrant algae. *En: Phytoplankton Pigments in Oceanography*. Vol. 2. Roy, S., Egleland, E. S., Johnsen, G., Llewellyn, C. (Eds.).
- RITCHIE, R. J.** 2008. Universal chlorophylls equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46(1): 115-126.
- SOBIECHOWSKA-SASIM, M.**, Stoń-Egiert, J., Kosakowska, A. 2014. Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria –an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods. *Journal of Applied Phycology* 26: 2065-2074.  
DOI 10.1007/s10811-014-0244-3
- STERMAN, N. T.** 1988. Spectrophotometric and fluorometric chlorophyll analysis. *En: Experimental Phycology. A Laboratory Manual*. Lobban, C. S., Chapman, D. J., Kremer, B. P. (Eds). Cambridge University Press. 35-46 pp.
- STEWART, D. E.**, Farmer, F. H. 1984. Extraction, identification, and quantitation of phycobiliprotein pigments in phototrophic. *Plankton and Limnology Oceanographic* 29: 392–397.
- STRICKLAND, J. D.**, Parsons, T. R. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Pigments analysis. Spectrophotometric determinations of chlorophylls and total carotenoids. *Fish Resource Building Canada Bulletin* 167-185-199.
- VISKARI, P. J.**, Colyer, C. L. 2003. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry* 319:263–271.
- VONSHAK, A.** 1997. Appendix 1: Chemical Analysis Procedures. *En: Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. Vonshak, A. (Ed.) 214-215 pp.
- WEDEMAYER, G. J.**, Wemmer, D. E., Glazer, A. N. 1991. Phycobilins of cryptophycean algae. Structures of novel bilins with acryloyl substituents from phycoerythrin 566. *Journal of Biological Chemistry* 266(8): 4731-4741
- WELLBURN, A. R.** 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as Total Carotenoids Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 303-313.
- WRIGTH, S. W.**, y Jeffrey, S. W. 2006. Pigments Markers for Phytoplankton Production. *Heidelberg Environmental Chemistry* 2(N): 71-104.  
DOI 10.1007/698-2-003.
- ZHAO, K. H.**, Porra, R. J., Scheer, H. 2011. Phycobiliproteins. *En: Roy, S., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S., Johnsen, G. (Eds). Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge University Press, Cambridge. 375– 411 pp.
- ZIMBA, P. V.** 2012. An improved phycobilin extraction method. *Harmful Algae* 17:35– 39.

## CAPÍTULO 11

# TINCIÓN DE GOTAS DE LÍPIDOS CON EL COLORANTE BODIPY Y SU DETECCIÓN POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

<sup>1</sup>MARTE VIRGEN FÉLIX, <sup>2</sup>MARÍA CONCEPCIÓN LORA VILCHIS

<sup>1</sup>Cepario de Microalgas. <sup>2</sup>Laboratorio de Alimento Vivo.  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR).  
La Paz, Baja California Sur, 23096, México.  
mart04@cibnor.mx, cony04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. EL PROCESO DE FLUORESCENCIA
3. GENERALIDADES DEL COLORANTE BODIPY 505/515
4. TINCIÓN DE LÍPIDOS
5. DETECCIÓN DE LÍPIDOS POR EPIFLUORESCENCIA
6. PROBLEMAS CON LA TINCIÓN
7. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** microalgas, lípidos, Bodipy, fluorescencia

---

### 1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas representan un grupo de organismos muy diverso y especializado, adaptadas a varios hábitats ecológicos como son las que se desarrollan en cuerpos de agua: dulce, marina, hipersalina, con diferentes intervalos de temperatura y disponibilidad de nutrientes. Se han reportado alrededor de 72,500 especies, de éstas se han descrito el 73%. Guiry (2012) ha mencionado que la mayoría de las especies que faltan por describir, son diatomeas de agua dulce y marina.

En los últimos años, las microalgas han llamado la atención como una fuente alternativa de materia prima ideal para la producción de biodiesel, debido a que generan gran cantidad

de biomasa, tienen una elevada eficiencia fotosintética y algunas una alta producción de lípidos (Hu *et al.*, 2008). Bajo condiciones óptimas de crecimiento, las microalgas sintetizan ácidos grasos que son constituyentes de la membrana celular y representan del 5 al 20% del peso seco de la célula (Hu *et al.*, 2008).

Las microalgas oleaginosas almacenan gran cantidad de lípidos y cuando se desarrollan bajo condiciones ambientales desfavorables o de estrés, alteran su ruta metabólica para producir mayor cantidad de lípidos, principalmente neutros, en cantidades que representan entre el 20 y el 50% del peso seco de la célula. Estos lípidos se acumulan en los llamados cuerpos lipídicos, principalmente como triacilglicérolos que se pueden extraer y trans-esterificar en biodiesel, en la forma de ácidos grasos metil esterificados (Azócar *et al.*, 2010).

Los métodos convencionales para la extracción de lípidos totales en las microalgas, utilizan solventes orgánicos, para cuantificarlos por métodos espectrofotométricos y/o gravimetría. Posteriormente, si se desea conocer el perfil de ácidos grasos de esos lípidos totales extraídos, se realiza la transesterificación, para ser identificados por cromatografía en capa fina (TLC), de

gases (GC-FID o GCMS), de líquidos (HPLC) (abreviaciones en inglés). Estas técnicas consumen más tiempo y volumen de muestra.

La tinción de lípidos con colorantes fluorocromos se ha empleado con buenos resultados en microalgas, facilitando la observación de lípidos intracelulares (Brennan *et al.*, 2012; Govender *et al.*, 2012). Entre los más conocidos están el Rojo Nilo que se ha empleado durante los últimos 20 años (Chen *et al.*, 2009) y el BODIPY 505/515 más recientemente usado (Hika, *et al.*, 2013; Rumin *et al.*, 2015).

## 2. EL PROCESO DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia es el resultado de tres estados que ocurren en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterocíclicos) llamados fluoróforos o colorantes fluorescentes. Una sonda fluorescente es un fluoróforo diseñado para localizar una región específica de un espécimen biológico o para responder a un estímulo específico.

**Estado 1: Excitación.** La energía de un fotón, suministrado por una fuente de luz, es absorbida por el fluoróforo, creando un estado electrónico excitado.

**Estado 2: Tiempo de vida de la excitación.** El estado excitado tiene una duración determinada (típicamente entre 1 a 10 nanosegundos). Durante ese tiempo, el fluoróforo se somete a cambios conformacionales y posibles interacciones con su entorno molecular. La energía es parcialmente disipada dejando el fluoróforo en estado de excitación-relajado, desde el cual se origina la fluorescencia.

**Estado 3: Emisión de fluorescencia.** La energía de un fotón es emitida, retornando el fluoróforo a su estado original. Debido a la disipación de la energía durante el tiempo de vida del estado excitado, la energía de este fotón es baja, por lo tanto, tendrá una longitud de onda más larga en comparación con la energía del fotón que produjo el estado excitado.

## 3. GENERALIDADES DEL COLORANTE BODIPY 505/515

El colorante 505/515 (4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4bora-3a-4a-diazeno-s-indaceno) (Figura 1) pertenece a la serie de colorantes fluorescentes BODIPY (4,4-difluoro-3a,4-adiaza-s-indaceno) es excitado a una longitud de onda de 505 nm y emite fluorescencia a 515 nm. Tiene un alto coeficiente aceite/agua, lo que le permite atravesar fácilmente las membranas celulares. También es altamente lipofílico, por lo que puede unirse a una amplia variedad de lípidos tales como ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol, colesteril esteres y ceramidas (Elle *et al.*, 2010).

El BODIPY tiene un espectro de emisión más estrecho (515 nm) que el Rojo Nilo, lo que previene la interferencia con la autofluorescencia de la clorofila en el intervalo espectral del verde (Chen *et al.*, 2009; Hyka *et al.*, 2013). Esto permite observar simultáneamente con un mayor contraste las dos fluorescencias, la roja de la clorofila y la verde del BODIPY unido a los lípidos (Figura 2). Con el Rojo Nilo se observa un menor contraste entre la coloración amarilla-naranja de los lípidos junto a la roja del cloroplasto, lo que puede ser confuso ya que independientemente del fluorocromo empleado, la fluorescencia roja del cloroplasto va decayendo rápidamente, por lo que puede verse como rosada-amarillenta, después de una exposición a la radiación fluorescente. Esto coloca en una posición muy superior al BODIPY respecto al Rojo Nilo cuando se observan o se toman microfotografías de las tinciones (Govender *et al.*, 2012).



Figura 1. Estructura del fluorocromo BODIPY505/515

Una particularidad de este colorante es que la tinción se realiza *in vivo* y no produce la muerte celular (Cooper *et al.*, 2010). Se considera una tinción indicadora que permite observar acúmulos de lípidos de color amarillo-verdoso, lo que contrasta con la fluorescencia roja de los cloroplastos (producido por la clorofila). Es una tinción cualitativa que permite la evaluación rápida del estado de producción lipídica por la célula (Chen *et al.*, 2009; Govender *et al.*, 2012; Hyka *et al.*, 2013).

#### 4. TINCIÓN DE LÍPIDOS

El colorante se prepara disolviéndolo en dimetilsulfóxido anhidro (DMSO). Una manera es preparar el colorante en DMSO a una concentración de  $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Esta solución se mantiene a  $-20^\circ\text{C}$  y es estable por 6 meses. De esta solución se debe adicionar  $25 \mu\text{L}$  por cada  $25 \text{ mL}$  de cultivo o muestra de microalgas. De esta forma se obtendrá una concentración final en la muestra a observar, de  $1$  a  $10 \mu\text{M}$  de BODIPY, y de  $0.02$  a  $2\%$  de DMSO (v/v).

Una vez aplicado el BODIPY, la muestra se deja reposar por  $1-5 \text{ min}$  para que el colorante permee dentro de la célula viva y tiña las moléculas lipídicas.

#### 5. DETECCIÓN DE LÍPIDOS POR EPIFLUORESCENCIA

La detección de lípidos por epifluorescencia se realiza con la ayuda de un microscopio equipado con filtros adecuados con la longitud de onda requerida para excitar y emitir fluorescencia. El

máximo de excitación es de  $505 \text{ nm}$  (luz azul) y el máximo de emisión es de  $515 \text{ nm}$  (luz verde). A la longitud de onda de excitación ( $505 \text{ nm}$ ), los cuerpos lipídicos emiten color verde-amarillo intenso, lo que contrasta con los cloroplastos que se ven de color rojo emitido por la clorofila (Figura 2).

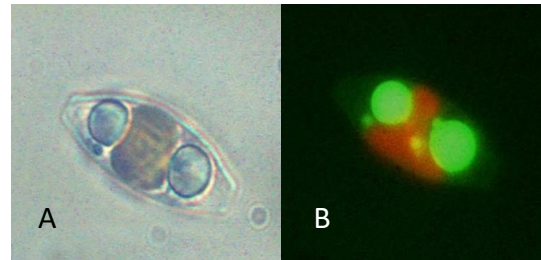


Figura 2. Célula de *Halamphora coffeiformis*. A) Microscopía de luz blanca. Se observan dos cuerpos grasos y el cloroplasto en medio. B) Tinción con BODIPY, microscopía de epifluorescencia. Se observan los cuerpos grasos de color verde y el cloroplasto rojo. Imagen tomada en el CIBNOR.

#### 6. PROBLEMAS CON LA TINCIÓN

Algunas cepas de microalgas que tienen una pared celular muy resistente al paso de sustancias liposolubles (*Chlorella* y *Nannochloropsis*) pueden presentar dificultad en la tinción con el colorante BODIPY. Hay varias maneras de incrementar la penetración del fluorocromo a estas células: un ligero aumento de temperatura ( $2-5^\circ\text{C}$ ), aumentar ligeramente la concentración de DMSO (de  $2$  a  $2.5\%$ ), aplicación de ultrasonido (en baño ultrasónico por  $20 - 30 \text{ s}$ ); una combinación de ultrasonido e incremento de temperatura pueden mejorar aún más la penetración del fluorocromo (Savchenko *et al.*, 2017).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AZÓCAR, L.**, Ciudad, G., Heipieper, H. J., Muñoz, R., Navia, R. 2010. Improving fatty acid methyl ester production yield in lipase-catalyzed process using waste frying oils as feedstock. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109(6): 609-14.
- BRENNAN, L.**, Blanco-Fernández, A., Mostaert, A. S., Owende, P. 2012. Enhancement of BODIPY505/515 lipid fluorescence method for application in biofuel-directed microalgae production. *Journal of Microbiological Methods* 90: 137-143.
- COOPER, M. S.**, Hardin, W. R., Petersen, T. W., Cattolico, R. A. 2010. Visualizing “green oil” in live algal cells. *Journal of Biosciences and Bioengineering* 109(2): 198–201.
- CHEN, W.**, Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q. 2009. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods* 77(1): 41-47.
- ELLE, I.C.**, Olsen, L. C. B., Pultz, D., Rødkær, S. V., Færgeman, N. J. 2010. Something worth dying for: molecular tools for the dissection of lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Letters* 584: 2183–2193.
- GOVENDER, T.**, Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F. 2012. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource Technology* 114: 507-511.
- GUIRY, M. D.** 2012. How many species of algae are there?. *Journal of Phycology* 48:10 57-1063
- HIKA, P.**, Lickova, S., Přebyl, P., Melzoch, K., Kovar, K. 2013. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances* 31(1): 2–16.
- HU, Q.**, Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54: 621-639.
- RUMIN, J.**, Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J. P., Bougaran, G. 2015. The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels* 8:42. DOI: 10.1186/s13068-015-0220-4.
- SAVCHENKO, O.**, Xing, J., Yang, X., Gu, Q., Shaheen, M., Huang, M., Yu, X., Burrell, R., Patra, P., Chena, J. 2017. Algal Cell Response to Pulsed Waved Stimulation and Its Application to Increase Algal Lipid Production. *Scientific Reports* | 7:42003 | DOI: 10.1038/srep42003.

## CAPÍTULO 12

# EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS, LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS DE MICROALGAS

LAURA CARREÓN-PALAU, ARACELI CAZARES SALAZAR,  
VÍCTOR ALONSO GALVÁN ÁLVAREZ, BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

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

Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. La Paz, Baja California Sur, 23096, México.

lcarreon@cibnor.mx, cazares.araceli@gmail.com, alonso.galvan92@gmail.com,

kitty04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS POR HPLC
3. CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS
4. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS
5. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** pigmentos, lípidos, ácidos grasos

---

### 1. INTRODUCCIÓN

La extracción simultánea de ácidos grasos y pigmentos en microalgas se propuso con la finalidad de elucidar el efecto de la luz y el papel de los ácidos grasos en la producción de carotenoides en *Dunaliella salina*, una microalga halotolerante que se caracteriza por una alta producción del pigmento  $\beta$ -caroteno, la cual se ha reportado que puede presentar uno o dos órdenes de magnitud más cantidad que las plantas (Lamers *et al.*, 2010). Dichos autores llegaron a la conclusión de que a medida que se incrementa la cantidad luz incidente en un cultivo de *D. salina*, aumenta la producción de  $\beta$ -caroteno, disminuyendo la superficie del cloroplasto, y la producción de ácidos grasos poliinsaturados 16:4 $\omega$ 3 y 18:3 $\omega$ 3 que forman parte de los monogalactosil y digalactosil

diacilgliceroles de la membrana tilacoidal del cloroplasto (Cho y Thompson, 1987).

El interés del Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del CIBNOR en la producción de  $\beta$ -caroteno empezó a raíz del aislamiento de una cepa de *Dunaliella salina* colectada en el vaso 33 de la compañía Exportadora de Sal ubicada en Guerrero Negro, Baja California Sur, México en el año 2014.

### 2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS POR HPLC

A partir de un cultivo concentrado de *Dunaliella salina* se centrifugó un volumen en un tubo cónico de 50 mL a 4000 xg por 4 min ó 1850 xg por 10 min a 5°C, desechando el sobrenadante.

Para la extracción de pigmentos, a la pastilla celular se agregó 4 mL de la mezcla cloroformo:metanol (2:2.5 v/v) y el antioxidante butil-hidroxitolueno (BHT) a una concentración de 1 mg mL<sup>-1</sup> en cloroformo, cuidando que la cantidad de BHT fuera menor del 1% de los lípidos totales (aproximadamente 5  $\mu$ L) (Lamers *et al.*, 2010).

Se homogeniza con vortex por 1 min y se sonica en baño de hielo por 20 min. Para asegurar una completa extracción de los

pigmentos, se deja toda la noche en refrigeración.

Al siguiente día se vuelve a sonicar en baño de hielo durante 20 min, y se separa la fase acuosa de la fase orgánica. Mulders *et al.*, (2014) sugirieron agregar 2.5 mL de la mezcla TRIS ácido:TRIS base:NaCl 1M (3:0.4:5 v/v) pH 7.5.

Nuevamente se homogeniza en vortex 1 min, se sonica en baño de hielo 20 min, y se vuelve a centrifugar a 400 xg (equivalente a 2500 rpm en un rotor de 20 cm) por 15 min a 10°C.

Los lípidos y pigmentos se disuelven en el cloroformo que se encuentra en la fase inferior, mientras que el metanol se mezcla con el agua salina y los buffers en la fase superior.

La fase inferior se recupera con una pipeta Pasteur nueva mediante burbujeo y se coloca en un tubo de vidrio limpio con tapón de rosca.

Para recuperar los lípidos y pigmentos remanentes, se agrega 1 mL de cloroformo al tubo anterior. Se repiten los pasos de homogenizar, sonicar y centrifugar.

Finalmente, se recupera el segundo extracto (lípidos y pigmentos) con una pipeta Pasteur nueva mediante burbujeo y se coloca en el tubo en donde está el primer extracto.

## 2.1 Recuperación de pigmentos

Ya que los pigmentos y lípidos están mezclados en la fase clorofórmica (extracto clorofórmico), se toma 1 mL de éste, el cual se coloca en un tubo limpio y se concentra a sequedad con nitrógeno gaseoso.

Para recuperar los pigmentos del extracto anterior, se utiliza 1 mL de la mezcla acetona: metanol: acetonitrilo (1.75:0.75:7.5 v/v/v) (Mulders *et al.*, 2014).

Dado que la curva de calibración de los estándares de pigmentos se hizo con acetona 100% grado HPLC, la mezcla anterior se sustituyó por acetona 100%. Ambos solventes se probaron para validar el uso de acetona al 100% grado HPLC.

Las muestras se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos (HPLC), calculando que los pigmentos quedaran en el intervalo lineal de la curva de calibración previamente realizada.

## 2.2 Cálculo del volumen de inyección

Para calcular el volumen de inyección de las muestras, se considera el peso de la muestra (biomasa) y la concentración de carotenoides totales de la misma especie, ó bien de especies similares si no hay información de la(s) especie(s) en estudio. El cálculo se realiza multiplicando la concentración de referencia ( $\text{ng mg}^{-1}$ ) por el peso de la biomasa (mg), obteniendo de esa manera los ng de pigmentos en la muestra.

Se hace una regla de tres: si tenemos X ng en el extracto clorofórmico (2800  $\mu\text{L}$ ) en cuántos  $\mu\text{L}$  tendremos 25 ng.

El valor de 25 ng se obtiene de considerar que la curva de calibración se realizó en un intervalo de 2 a 10 ng para cada pigmento, y el valor medio corresponde a 5 ng.

Si se tiene alrededor de 5 pigmentos por muestra, entonces serán 25 ng en total.

Otra manera de calcular dicho volumen de inyección es utilizar el dato de carotenos + clorofilas totales medidos por espectrofotometría.

Dicho valor está expresado en  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (equivale a  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ).

Los pigmentos extraídos y resuspendidos en 3 mL de acetona al 100% HPLC, se leen en el espectrofotómetro a las longitudes de onda sugeridas para cada clase de microalgas (ver capítulo 10 de este manual).

Para calcular el volumen de inyección se divide 25 (ng) entre la concentración obtenida ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) y se obtiene el volumen de inyección ( $\mu\text{L}$ ).

Los resultados de la comparación entre acetona al 100% grado HPLC y la mezcla acetona: metanol: acetonitrilo (1.75:0.75:7.5 v/v) mostraron que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los pigmentos de *Dunaliella salina* que se identificaron en la prueba (Tablas 1 y 2), por lo que se decidió utilizar acetona al 100%.

Tabla 1. Efecto del solvente de recuperación de pigmentos sobre la concentración ( $\text{ng mg}^{-1}$ ) de los principales pigmentos de *Dunaliella*

salina cultivada en medio F/2 y NaCl 0.6 M. Los valores son el promedio  $\pm$  Intervalo de confianza de 95% de 3 matraces.  $F$ = Estadístico de Fisher y  $p$ = valor de probabilidad.

Pigmento	Acetona: Metanol: Acetonitrilo 1.75:0.75:7.5	Acetona 100%	$F$	$p$
cis-Neoxantina	588 $\pm$ 44	573 $\pm$ 40	0.23	0.654
Violaxantina	281 $\pm$ 93	286 $\pm$ 86	0.01	0.945
Anterioxantina	162 $\pm$ 34	147 $\pm$ 33	0.37	0.574
Luteína	2595 $\pm$ 256	2730 $\pm$ 290	0.54	0.505
Zeaxantina	177 $\pm$ 33	151 $\pm$ 17	1.79	0.252
Clorofila <i>b</i>	4602 $\pm$ 319	4874 $\pm$ 272	1.61	0.273
$\beta$ -caroteno	1390 $\pm$ 45	1392 $\pm$ 1	0.01	0.954
Clorofila <i>a</i>	9358 $\pm$ 2828	9776 $\pm$ 2969	0.01	0.851

Tabla 2. Efecto del solvente de recuperación de pigmentos sobre la concentración (ng mg<sup>-1</sup>) de los principales pigmentos de *Dunaliella salina* cultivada en medio F/2 y NaCl 4M. Los valores son el promedio  $\pm$  intervalo de confianza de 95% de 3 matraces.  $F$ = Estadístico de Fisher y  $p$ = valor de probabilidad.

Pigmento	Acetona: Metanol: Acetonitrilo 1.75:0.75:7.5	Acetona 100%	$F$	$p$
cis-Neoxantina	1006 $\pm$ 7	912 $\pm$ 97	2.16	0.238
Violaxantina	778 $\pm$ 19	716 $\pm$ 76	1.53	0.305
Anterioxantina	348 $\pm$ 17	406 $\pm$ 45	1.06	0.380
Luteína	4434 $\pm$ 46	4050 $\pm$ 436	1.78	0.274
Cantaxantina	679 $\pm$ 306	615 $\pm$ 487	0.41	0.570
Clorofila <i>b</i>	8201 $\pm$ 607	7718 $\pm$ 352	2.17	0.237
$\beta$ -caroteno	2822 $\pm$ 1870	2459 $\pm$ 1489	0.09	0.784
Clorofila <i>a</i>	21153 $\pm$ 151	19505 $\pm$ 2144	1.36	0.328

### Procedimiento para inyectar en el HPLC

Hacer la secuencia con la información de la tabla 3:

Tabla 3. Información necesaria para actualizar la secuencia de inyección.

Sequence	Vial	Name	No. Inj	Data file	Injection volume ( $\mu$ L)
1	1	Acetona	1	Acetona	30
2	2	Std DHI	1	Std DHI	4
3	3	Std SIGMA	1	Std SIGMA	2
4	4	Muestra	1	Std SIGMA	10

Las condiciones de operación del equipo y las características del gradiente de solventes se basan en el método de Vidussi *et al.*, (1996), (ver capítulo 8 Hernández-Sandoval, Ibarra-Martínez, 2007).

### Operación del equipo

Columna	Zorbax C8 SB
(5 $\mu$ m $\times$ 150nm $\times$ 4.6 nm)	
Tiempo de corrida:	18.5 min.
Tiempo de parado:	1.5 min.
Flujo:	1 mL min <sup>-1</sup>
Presión máxima de la bomba:	300 bares
Longitud de onda del detector:	DAD 440nm

### Características del gradiente

**Solución A:** mezcla de metanol-acetato de amonio 1N (70/30, v/v).

**Solución B:** metanol 100 % grado HPLC

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%

### Identificación y cuantificación de pigmentos por HPLC

Los pigmentos presentes en las muestras de microalgas se identifican comparando los tiempos de retención (TR) con los tiempos de los estándares de pigmentos (Tabla 4). La identificación se confirma comparando los espectros de absorción de los pigmentos de la curva de calibración con los de las muestras. La concentración de los pigmentos de las muestras se calcula integrando el área bajo la curva, la



cual es directamente proporcional a la concentración de los pigmentos 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 centrifugada o filtrada):

$$\text{Pigmento} = (\text{Am}/\text{FC}) \times [(\text{VE}/(\text{VAC}/\text{VAL})) \times \text{VI}]/\text{P}$$

$$\text{Pigmento} = (\text{Am}/\text{FC}) \times [(\text{VE}/(\text{VAC}/\text{VAL})) \times \text{VI}] / \text{V}$$

$$\text{Pigmento} = \text{ng mg}^{-1}$$

$$\text{Pigmento} = \text{ng mL}^{-1}$$

En donde:

- Pigmento:** clorofilas, carotenoides y xantofilas  
**Am:** área del pico de la muestra mili Unidades de Absorbancia por segundo (mAU·s)  
**FC:** factor de corrección de cada estándar  
**VE:** volumen de cloroformo utilizado para la extracción (µL)  
**VAL:** Volumen de la alícuota (µL)  
**VAC:** Volumen de acetona (µL)  
**VI:** volumen de muestra inyectado (µL)  
**P:** peso de la muestra (mg)  
**V:** volumen de muestra filtrada o centrifugada (mL)

Tabla 4. Tiempo de retención y factor de corrección de la curva de calibración de siete estándares de pigmentos, en una columna Zorbax SB C8 de 150 mm x 4.6 mm y 5 µm

TR (min)	Pigmento	Factor de corrección	R <sup>2</sup>
8.088	Fucoxantina	63.51	0.9999
9.019	Violaxantina	71.70	0.9997
9.8	Diadinoxantina	61.00	0.9999
9.83	Astaxantina t	96.94	0.9992
12.005	Zeaxantina	54.56	0.9996
12.020	Luteina	83.07	1.0000
14.4	Cantaxantina	41.816	0.9955
14.95	Clorofila b	14.895	0.9908
14.90	Xantofila	20.118	0.9785
14.90	β-caroteno c	57.743	0.9978
15.62	Criptoxantina	42.341	0.9979
16.079	Clorofila a	15.463	0.9908
16.454	Clorofila a	21.065	0.9959
17.042	β-caroteno t	3.0268	0.9969

### 3. CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Se calcula la alícuota correspondiente del extracto total para asegurar que se encuentre en el intervalo lineal de la curva de calibración que va de 30 a 180 µg de lípidos.

Se usan 90 µg para estar en el punto medio de la curva. Para lograrlo se considera el contenido de lípidos totales (µg mg<sup>-1</sup>) publicado previamente para la(s) especie(s) del mismo género.

El cálculo consiste en una regla de tres, si se la especie tiene el 10% de lípidos totales ó 100 µg mg<sup>-1</sup>, y si se pesó 10 mg, entonces se tendrá 1000 µg de lípidos en el extracto total (2.8 mL ó 2800 µL). Así que, si queremos obtener solo 90 µg hacemos una regla de tres, si tengo 1000 µg en 2800 µL en cuantos µL tendremos 90 µg, la forma de calcularlo es la siguiente:

$$\text{Vol. alícuota} = \frac{[\text{Cantidad esperada } (\mu\text{g}) \times \text{Vol. extracto total } (\mu\text{L})]}{\text{Cantidad en la muestra } (\mu\text{g})}$$

Ejemplo:

$$\text{Vol. alícuota} = (90 \times 2800)/1000 = 252 \mu\text{L}$$

El volumen calculado se coloca en un tubo limpio de tapón de rosca.

Se evapora a sequedad con nitrógeno gaseoso.

Agregar 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y tapar la boca del tubo con papel aluminio. Cerrar el tubo hasta el primer tope, y regresar una vuelta para no apretar demasiado.

Colocar la muestra en un horno 200°C±2 por 15 min.

Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Agregar lentamente con el tubo inclinado 3 mL de agua destilada.

Homogenizar con vortex hasta que se mezcle el agua y el ácido y dejar reposar en baño de hielo por 5 min.

Leer en el espectrofotómetro a A<sub>375nm</sub>. Calibrar previamente el equipo con un blanco de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado que se trata de igual manera que las muestras.

Previamente se realizó la curva de calibración utilizando una mezcla de extractos lipídicos de las microalgas *Tetraselmis striata* y *Phaeodactylum tricoratum* como estándar, utilizando cantidades entre 30 a 180 µg.

Se grafican las lecturas de absorbancia  $A_{375\text{nm}}$  vs cantidad de estándar de lípidos y se obtiene la ecuación de la recta en donde la pendiente (m) corresponde al factor de corrección que se utiliza en los cálculos.

Para otro tipo de muestras se usan triacilgliceroles y fosfolípidos como estándares, (ver capítulo 6: Del Angel-Rodríguez *et al.*, 2007).

Para determinar el % de lípidos totales se aplica la siguiente ecuación:

$$\% \text{Lípidos (ps)} = [(((\text{Abs}/m) \times V_E) / V_A) / \text{Ps}] / 10$$

En donde:

$A_{375\text{nm}}$ : absorbancia a 375 nm.

m: pendiente de la curva de calibración

$V_E$ : volumen del extracto (µL)

$V_A$ : volumen de la alícuota (µL)

Ps: peso de la muestra (mg)

#### 4. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Debido a que los lípidos (triacilgliceroles, galactolípidos y fosfolípidos) tienen un alto peso molecular, es necesario preparar derivados no reactivos de los ácidos grasos mediante una reacción de trans-esterificación de los lípidos totales para poderlos inyectar en un cromatógrafo de gases espectrómetro de masas (GCMS).

El procedimiento es:

Colocar el resto del extracto de cloroformo (lípidos totales) en un tubo de tapón de rosca limpio y se evapora a sequedad con nitrógeno gaseoso.

Agregar 2.5 mL de la mezcla de HCl:CH<sub>3</sub>OH (5:95 v/v). El tubo se tapa y se cierra apretando fuerte. Para evitar la evaporación de la muestra se sella con cinta teflón por dentro y fuera de la tapa, la cual debe tener una cubierta de teflón para evitar que los solventes disuelvan los plásticos de la parte interior de la tapa.

Una vez selladas las tapas, los tubos se colocan a 85°C durante 2.5 h en un termobañero. Es importante que el HCl:CH<sub>3</sub>OH no se evapore por lo que se revisa después de 10 minutos de iniciada la reacción.

Los metil-ésteres obtenidos de la reacción de transesterificación (metanolisis) se extraen con 1.5 mL de hexano grado HPLC.

Se repite la extracción dos veces. El extracto total de ácidos grasos en hexano grado HPLC se recupera en un nuevo tubo limpio.

Las muestras se mantienen en congelación a -20°C hasta su posterior inyección en el GCMS.

Para inyectar se calcula el volumen de hexano para tener una concentración de ácidos grasos totales de 1200 µg mL<sup>-1</sup>, y se coloca en un vial ámbar con tapa de aluminio.

Inyectar 1 µL en el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas.

La columna utilizada es SUPELCO Omegawax, cuyas dimensiones son: 30mx0.25mmx0.25µm.

Previamente se prepara la curva de calibración con estándares comerciales (SUPELCO) que contienen una mezcla de 37 ácidos grasos metil esterificados.

La identificación se realiza comparando los tiempos de retención (TR) de los picos de los ácidos grasos de la curva de calibración, confirmándose la identificación mediante los iones característicos del espectro de masas de cada uno de los ácidos grasos, que se generan al ingresar en la cámara de ionización electrónica (ver capítulo 9 Carreón-Palau *et al.*, 2007).

#### Método y programa de separación

##### Condiciones del método

Volumen de inyección automática: 1 µL

Volumen de inyección manual: 1- 5 µL

Gas portador: He alta pureza 99.97%

Flujo del gas portador en la columna: 0.9 mL min<sup>-1</sup>

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<sup>-1</sup> hasta 165°C  
Mantener esa temperatura por 2 min y posteriormente incrementar en 2.2°C min<sup>-1</sup> hasta 209°C.  
Mantener en esa temperatura por 18 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.

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se explica con detalle en el capítulo 9 Carreón-Palau *et al.*, 2007 y en el capítulo 13 de este manual.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- CHO, S. H.**, Thompson, G. A. Jr. 1987. On the metabolic relationships between monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol molecular species in *Dunaliella salina*. *Journal of Biology and Chemistry* 262(16):7586–7593.
- CARRIÓN-PALAU, L.**, Del Ángel-Rodríguez, J. A., Arjona-López, M. O. 2007. Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases espectrometría de masas. *En: Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. Arredondo Vega, B. O., Voltolina, D. (Eds.). Editorial CIBNOR, 97 págs.
- DEL ÁNGEL-RODRÍGUEZ, J. A.**, Carreón-Palau, L., Arjona-López, M. O. 2007. Extracción y cuantificación de lípidos. *En: Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. Arredondo Vega, B. O., Voltolina, D. (Eds.). Editorial CIBNOR, 97 págs.
- HERNÁNDEZ-SANDOVAL, F. E.**, Ibarra-Martínez L. 2007. Determinación de pigmentos por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). *En: Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. Arredondo Vega, B. O., Voltolina, D. (Eds.). Editorial CIBNOR, 97 págs.
- LAMERS, P. P.**, Carlien, C. W. I., Petrouchka, S. K., Jeroen, I., Marcel, J., Ric, C. H. V., Raoul, J. B., Wijffels, R. H. 2010. Carotenoid and Fatty Acid Metabolism in Light-Stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering*. 106(4): 638–648.
- MARSH, B. J.**, Weinstein, B. D. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*. 7: 574-576.
- MULDERS, J. M.**, Weespoel, Y., Bodenes, P., Lamers, P. P., Vincken, J. P., Martens, D. E., Gruppen, H., Wijffels, R. H. 2014. Nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis* produces asthaxantin, ketolutein and their fatty acids esters: a carotenoid metabolism study. *Journal of Applied Phycology*. DOI 10.1007/s10811-014-0333-3.
- SATO, N.**, Murata, N. 1988. Membrane Lipids. *En: Methods in Enzymology* 167: 251-259.
- VIDUSSI, F.**, Claustré, H., Bustillos-Gúzman, J., Cailliau, C., 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.

## CAPÍTULO 13

# DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y ESTEROLES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS

<sup>1</sup>JORGE A. DEL ANGEL-RODRÍGUEZ, <sup>2</sup>LAURA CARREÓN-PALAU, <sup>3</sup>M. OLIVIA ARJONA LÓPEZ

<sup>1</sup>Memorial University of Newfoundland, Ocean Science Centre, St. John's Newfoundland, Canadá. <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

<sup>3</sup>Laboratorio de Metabolismo de Lípidos.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

La Paz, Baja California Sur, México.

delangelj@gmail.com, lcarreon@cibnor.mx, oarjona04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
  - 1.1. ÁCIDOS GRASOS
  - 1.2. ESTEROLES
2. CROMATOGRAFÍA DE GASES
  - 2.1. GAS PORTADOR O DE ARRASTRE
  - 2.2. SISTEMAS DE INYECCIÓN
  - 2.3. COLUMNAS
  - 2.4. DETECTORES
3. DETECTOR IONIZACIÓN DE FLAMA
4. DETECTOR SELECTIVO DE MASAS
  - 4.1. TEORÍA DE LA DESCOMPOSICIÓN DEL IÓN UNIMOLECULAR
  - 4.2. DESCRIPCIÓN Y FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTROMETRO DE MASAS
5. REACCIÓN DE IONIZACIÓN DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS
6. REACCIÓN DE IONIZACIÓN DE TRIMETIL-SILIL ÉSTERES DE ESTEROLES
  - 6.1 CUANTIFICACIÓN DE ESTEROLES
7. SOFTWARE PARA INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS DE MASAS
8. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** ácidos grasos, esteroides, CG, FID, MS.

---

### 1. INTRODUCCIÓN

Los lípidos simples son compuestos que producen no más de dos productos primarios por mol durante la hidrólisis. Normalmente constituyen las reservas de energía en las cadenas tróficas acuáticas, ya que se trata de ácidos grasos (FA, por sus siglas en inglés) unidos por un enlace éster a monoalcoholes como en el caso de las ceras, o bien de ácidos grasos unidos a un polialcohol (glicerol), formando triacilgliceroides o triglicéridos (TAG), diacilgliceroides (DAG) y monoacilgliceroides (MAG). Algunos lípidos simples como los esteroides, que son alcoholes anillados, cumplen funciones estructurales en las membranas celulares (Guschina y Harwood, 2009).

En contraste, los lípidos complejos son compuestos que producen tres o más productos primarios por mol durante la hidrólisis. Normalmente forman la estructura de las membranas celulares, e incluyen a los fosfolípidos o glicerofosfolípidos, constituidos por un glicerol unido a uno o dos ácidos grasos y a un grupo fosfato polar que a su vez se une a otros grupos como las aminas. También incluye a los gliceroalcoholes: un glicerol unido a dos ácidos grasos y a un mono o disacárido, y a los esfingolípidos: ácidos

grasos unidos por enlaces amida a bases de cadena larga (o bases esfingoides) y ocasionalmente a otras aminas (para una descripción más detallada ver Del Angel-Rodríguez *et al.*, 2007).

De acuerdo con Christie (2003) existen varias biomoléculas que también deben ser clasificadas como lípidos. Por ejemplo, los derivados de los ácidos grasos como los ésteres y las amidas; las sustancias relacionadas biosintéticamente a los ácidos grasos como los prostanoídes, y a los éteres alifáticos o alcoholes; así como las sustancias relacionadas funcionalmente con los ácidos grasos como los esteroides e incluso los ácidos biliares.

A pesar de su amplitud, éste criterio aún excluye a 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 solventes orgánicos como cloroformo, benceno, éteres y alcoholes, suelen ser extraídos y cuantificados como lípidos totales. Es por ello que es importante reconocer que una separación fina de los diferentes compuestos lipídicos permite una mejor interpretación de los procesos a estudiar.

### 1.1. Ácidos grasos

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  $9.4 \text{ kcal g}^{-1}$ , 2) como elementos estructurales de las membranas celulares organizados en una doble capa lipídica con propiedades anfipáticas; constituyendo fosfolípidos y esfingolípidos, o bien como galactolípidos en membranas tilacoidales y 3) como precursores de eicosanoides,

sustancias parecidas a las hormonas que regulan procesos de inflamación, vasodilatación, vaso constricción y coagulación.

Las células vegetales tienen dos enzimas que no están presentes en células animales: 1) La  $\Delta 12$ -desaturasa, que introduce una insaturación en la posición 12 del ácido oleico ( $18:1\omega 9$ ) y permite la síntesis del ácido linoléico (cis-9, cis-12 octadienoico o  $18:2\omega 6^1$ ), y 2) la  $\Delta 15$ -desaturasa que usa como sustrato el  $18:2\omega 6$  e introduce una insaturación en la posición 15, promoviendo la síntesis del ácido  $\alpha$ -linoléico (cis-9, cis-12, cis-15-octadecatrienoico o  $18:3\omega 3$ ). Debido a lo anterior, los ácidos linoléico y  $\alpha$ -linoléico se consideran esenciales para los animales y son el origen de las dos principales familias de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega 6$  y  $\omega 3$  (para entender la estructura y nomenclatura de ácidos grasos ver Carreón-Palau *et al.* 2007).

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; y 4) Regulación de la síntesis y el transporte de colesterol (Demetz *et al.*, 2014). A su vez, 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 y 2) Formación de moléculas bioactivas como los tromboxanos A<sub>3</sub>, que evitan la agregación de plaquetas, promueven la dilatación de vasos sanguíneos y una reacción de coagulación más lenta.

---

<sup>1</sup>Los ácidos grasos consisten de una cadena de hidrocarburos con un grupo metilo (CH<sub>3</sub>) en un extremo y un grupo carboxilo (COOH) en el otro. Pueden ser saturados (sin dobles enlaces), monoinsaturados (1 doble enlace), o poliinsaturados ( $\geq 2$  dobles enlaces). El número de átomos de carbono se indica primero y el

número de dobles enlaces después de los dos puntos. Para ácidos grasos insaturados, la posición del primer doble enlace se cuenta a partir del extremo metilo y se escribe después de la letra griega omega ( $\omega$ ).

Los eicosanoides derivados del ácido araquidónico (20:4 $\omega$ 6 o ARA) y el eicosapentaenoico (20:5 $\omega$ 3 o EPA) son antagonistas entre sí y compiten por la enzima ciclooxigenasa (Cohen, *et al.*, 1995). En los humanos, un desbalance en la dieta en favor de los  $\omega$ 6 conduce a problemas como la arteriosclerosis, trombosis, presión sanguínea alta, cáncer de colon y próstata, así como a enfermedades relacionadas con reacciones de inflamación como asma, artritis, psoriasis, lupus eritematoso y nefritis. Dichas enfermedades se pueden controlar con una dieta rica en ácidos grasos  $\omega$ 3 recuperando el balance de los eicosanoides derivados de los  $\omega$ 6 y  $\omega$ 3.

Los ácidos de la serie  $\omega$ 3 como el 20:5 $\omega$ 3 o EPA y el 22:6 $\omega$ 3 o DHA son sintetizados principalmente en las microalgas marinas y en los peces dulceacuícolas, pero se concentran por transferencia trófica en sus consumidores (peces, crustáceos y moluscos). Por ejemplo, en ambientes tropicales se ha observado que el DHA se retiene alrededor de 3 veces por nivel trófico (Carreón-Palau *et al.*, 2013).

En las sociedades occidentales el consumo directo de peces y mariscos es muy bajo, generando una descompensación en la proporción de  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 en la dieta. Actualmente, la fuente comercial más común de EPA y DHA es el aceite de peces marinos. Sin embargo, la obtención de aceite de pescado aumenta la presión de las pesquerías comerciales llevando a muchas especies a la sobreexplotación de sus poblaciones. De manera similar la acuicultura demanda aceite y alimento que se obtiene de la pesca (Tacon y Metian, 2008). Se calcula que para 2020 el aceite de pescado será una limitante para la acuicultura por lo que actualmente se explora la obtención de precursores de EPA y DHA a partir de aceite vegetal (Hixson *et al.*, 2013). La otra alternativa son las microalgas marinas que sintetizan los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Por ejemplo, los monogalactosildiacilgliceroles (MGDG) y los digalactosildiacilgliceroles (DGDG) de las diatomeas contienen altas cantidades de EPA. Además de que son una fuente más limpia de éstos, su calidad puede ser controlada

mediante el desarrollo de métodos eficientes de cultivo, cosecha y purificación para microalgas previamente seleccionadas del medio natural.

## **1.2. Esteroides**

Los esteroides, conocidos como alcoholes esteroideos, son compuestos tetracíclicos (4 anillos), son un subgrupo de los esteroides con un grupo hidroxilo (alcohol -OH, con terminación "ol") en la posición 3 del primer anillo. Se consideran lípidos anfipáticos dado que el grupo hidroxilo en el anillo A es polar y el resto de la cadena alifática es no-polar. Son sintetizados a partir de la acetil-coenzima A vía la ruta de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa).

Los esteroides y los compuestos relacionados son una clase de moléculas orgánicas que desempeñan papeles importantes en la fisiología de los organismos eucariontes. Por ejemplo, el colesterol forma parte de la membrana celular en animales afectando la fluidez de la membrana, y funge como segundo mensajero en señales del desarrollo. En animales, los corticosteroides como el cortisol, actúan como señales en la comunicación celular y el metabolismo en general. Los esteroides son un componente común de los aceites de la piel humana.

El tipo de esteroide más común en animales es el colesterol, que es vital para la estructura de la membrana de la célula animal, y funciona como un precursor de vitaminas solubles en grasas y hormonas esteroideas. En los hongos, el ergosterol está presente en las membranas celulares y cumple una función similar al colesterol en células animales. Los esteroides en las células vegetales de plantas y microalgas son llamados fitosteroides, y son compuestos muy similares al colesterol pero que varían en la cadena lateral o en la presencia y/o ausencia de dobles enlaces. Los fitosteroides extraídos de aceites son insolubles en agua, relativamente soluble en aceite y solubles en alcohol. Entre ellos están: el campesterol, sitosterol y estigmasterol comunes en plantas, el brassicasterol y 24-metilcolesterol comunes en diatomeas y

fucoesterol común en macroalgas cafés. Los esteroides también se han utilizado como biomarcadores de la fuente de carbono orgánico para distinguir entre fuentes naturales y antropocéntricas en ecosistemas costeros (Carreón-Palau, 2015, Carreón-Palau *et al.* 2017). Los estanoles son esteroides saturados (sin doble enlace en la estructura anillada), y entre los más comunes en la dieta humana están el sitostanol y el campestanol.

En pruebas clínicas se ha demostrado que los fitosteroides bloquean los sitios de absorción del colesterol en el intestino humano, por lo que se emplean como aditivos de alimento, aunque la poca investigación en los efectos colaterales hace que solo se recomienden para personas con niveles altos de colesterol, pero no para mujeres embarazadas o lactantes. La investigación preliminar sugiere que los fitosteroides pueden disminuir la incidencia de cáncer (Ramprasath y Awad, 2015)

## **2. CROMATOGRAFIA DE GASES**

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la cromatografía es un método de separación química en la cual los componentes a separar son distribuidos entre dos fases, una de ellas es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se desplaza en una dirección definida. Los procesos cromatográficos son nombrados de acuerdo al estado físico de la fase móvil. En cromatografía de gases la fase móvil es un gas (GC) y en cromatografía líquida la fase móvil es un líquido (LC). Existe una subclasificación en función de la fase estacionaria; esto es, si la fase estacionaria es sólida, la técnica es llamada cromatografía gas-sólida (GSC) y si es líquida, se nombra cromatografía gas-líquida (GLC) (McNair y Miller, 1997).

Después de las primeras separaciones de ácidos grasos volátiles realizadas por James y Martín (1952), la cromatografía de gases (GC) acoplada a detectores de ionización de flama (FID) y selectores de masas (MS), se ha convertido durante más de medio siglo, en el método predilecto para el análisis de

moléculas termoestables. Las moléculas de microalgas que se pueden analizar con cromatografía de gases- FID y/o gases-masas incluyen a los ácidos grasos, hidrocarburos, esteroides, alcoholes y aminoácidos entre otras moléculas.

### **2.1. Gas portador o de arrastre**

Los gases portadores o de arrastre, deben ser químicamente inertes, entre los cuales se utilizan 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. Adicionalmente, los gases 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, 2012).

### **2.2. Sistemas de inyección**

El método más común de inyección es a través de una micro-jeringa para inyectar una muestra (~1 µL), líquida o gaseosa, a través de un septo de goma o silicona en una cámara de vaporización (puerto de inyección), situada en la cabeza de la columna. La temperatura de dicha cámara debe garantizar que los componentes de la muestra se gasifiquen a fin de asegurar su posterior separación (McNair, 1981; Christian, 1981; Lederer y Lederer, 1957). Existen diversos tipos de sistemas de inyección en los que la muestra es dividida en el puerto de inyección (split); no es dividida (splitless); es dividida durante unos segundos (split-splitless); o no pasa por el puerto de inyección si ya está gasificada (on-column), entre otros.

### **2.3. Columna**

En cromatografía de gases existen dos tipos de columnas: las empacadas y las capilares. Actualmente, las columnas capilares son las más utilizadas porque aceptan pequeñas cantidades de muestra, y por tanto, la sensibilidad de respuesta aumenta, siempre y

cuando se utilice un gas de arrastre como hidrógeno, helio o nitrógeno (Ackman, 2002). La temperatura del horno donde se encuentra la columna es un factor importante para una buena resolución y eficiencia de los compuestos a separar. La temperatura óptima de la columna depende de las características físico-químicas de los componentes a separar y de la capacidad de selectividad de la fase estacionaria.

## 2.4. 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 mensurable, en una señal medible. 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, sin embargo, los detectores que se utilizan para el análisis de ácidos grasos metil esterificados (FAME, por sus siglas en inglés) son: el detector de ionización de flama (FID) y el detector selectivo de masas (MS).

## 3. DETECTOR IONIZACION DE FLAMA

En este tipo de detector, el analito en el efluente (gas de arrastre), entra a la flama del detector de ionización (FID) y pasa a través de la flama hidrogeno/aire, ocasionando la formación de iones y electrones, originando una corriente eléctrica entre dos electrodos (cátodo y ánodo). El FID tiene un amplio rango de linealidad y es considerado como un detector de tipo universal (Kitson *et al.*, 1996). Los analitos que tienen mayor número de carbonos son los que producen una señal mayor.

## 4. DETECTOR SELECTIVO DE MASAS

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 (Figura 1).

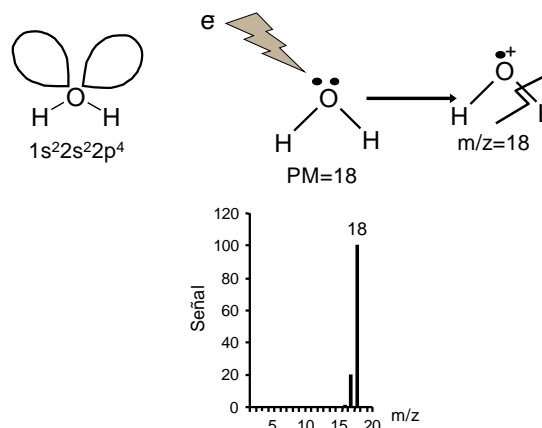


Figura 1. Ionización de la molécula de agua

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 (Figura 2). En la abscisa se indica 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 (McLaferty y Tureček, 1993).

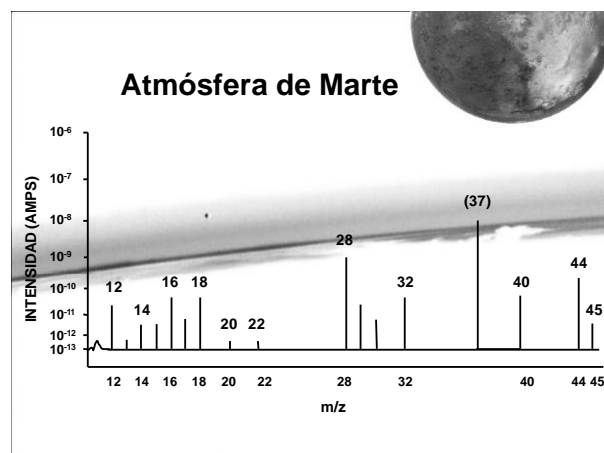




Figura 2. Espectro de masas de la atmósfera de Marte en donde se representa la relación masa carga vs. la intensidad eléctrica de cada ión. Fuente: McLafferty y Tureček, 1993.

#### 4.1. Teoría de la descomposición del ión unimolecular

Para entender los alcances y limitaciones de la espectrometría de masas, se necesita comprender los aspectos teóricos básicos de la descomposición del ión unimolecular. Según la teoría del ión unimolecular, para los iones gaseosos, solamente se pueden generar reacciones unimoleculares (un ión por molécula) a partir de la molécula de la muestra (Figura 3). La probabilidad de que se forme cada ión dependerá de la estructura de la molécula y de su energía interna; dado que se trata de una población de moléculas podemos ver distintas proporciones de iones. El ión que necesita menos energía para formarse es la molécula entera ionizada (ión molecular) cuya proporción sirve como identificador en un espectro de masas. Si la energía de electroionización disminuye, la proporción del ión molecular se incrementará y la proporción del resto de los iones disminuirá. De tal manera que el espectro de masas se puede modificar dependiendo de la energía de la fuente de iones (McLafferty y Tureček, 1993).

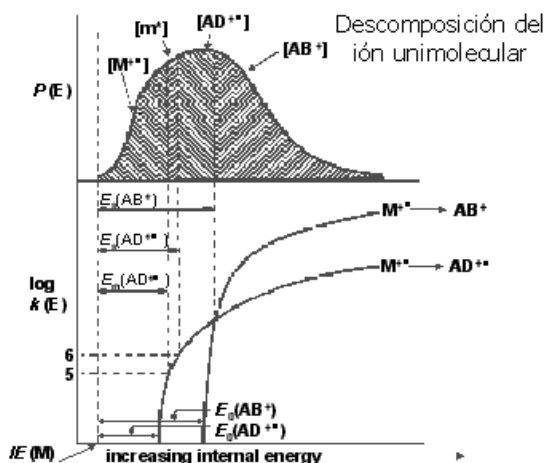


Figura 3. Probabilidad de formación del ión molecular o sus productos en función de la energía interna de la molécula. Fuente: McLafferty y Tureček, 1993.

#### 4.2. 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 (Figura 4).

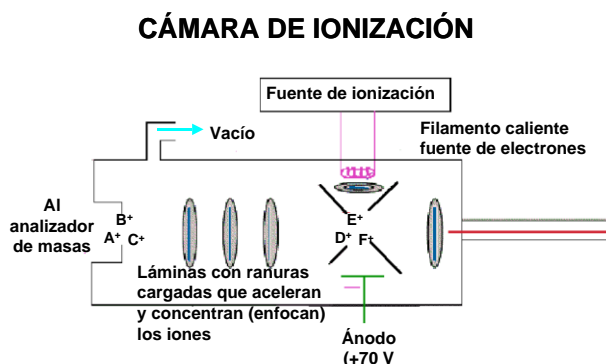


Figura 4. Representación esquemática de la cámara de ionización.

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 (Figura 5).

### ESI-Q

Al analizador de masas de Cuadrupolo (Q) se le llama "Filtro de Masas" porque normalmente transmite iones de un pequeño rango de  $m/z$ , todos los otros iones son neutralizados y eliminados.

Consiste en cuatro barras cilíndricas metálicas que sirven de electrodos del filtro de masas

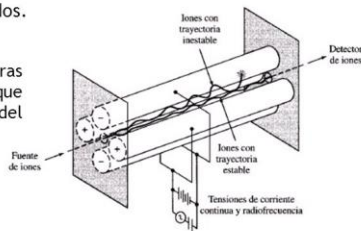


Figura 11-4. Espectrómetro de masas cuadrupolo.

Figura 5. Analizador de masas, en este caso es un filtro cuadrupolo. Fuente: <http://slideplayer.es>

Una bomba de vacío acelera los iones hasta el detector donde la corriente iónica se amplifica generando una señal que es interpretada por un software (

## 5. REACCIÓN DE IONIZACIÓN DE METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS

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 insaturación de las cadenas (el número de dobles enlaces). El sitio más susceptible de reacciones de ionización es el grupo funcional éster (Figura 7). Tanto el oxígeno del carbonilo, como el átomo de oxígeno saturado de los ésteres, pueden actuar como sitios de iniciación de la reacción, dando lugar a patrones específicos dentro del espectro de masas (McLafferty y Tureček, 1993).

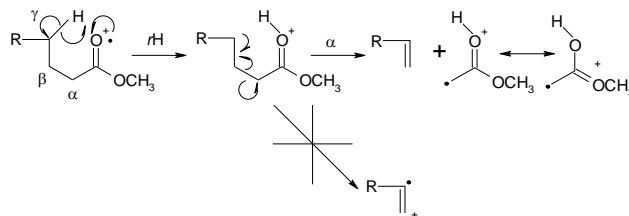


Figura 7. Reacciones de McLafferty para ácidos grasos metil esterificados (McLafferty y Tureček, 1993).

Figura 6) y representada por un espectro de masas (McLafferty, 1993; Siuzdak, 1996; Gunstone, 1996).

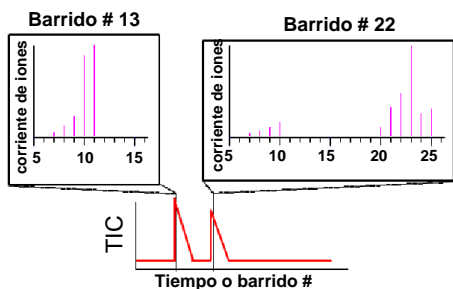


Figura 6. Espectros de masas de cada pico. En el cromatograma la señal se compone por la corriente iónica total.

Los iones producidos son siempre los mismos y sus abundancias relativas en el espectro son constantes, por lo tanto, 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 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.

La interpretación de los espectros también nos permite identificar ácidos grasos sin tener el estándar. Por ejemplo, el ión  $m/z=74$  es el más abundante (ión base) en los ácidos grasos saturados; mientras que el  $m/z=55$  es más abundante en los monoinsaturados. Los ácidos grasos con 2 insaturaciones tienen típicamente los iones  $m/z=67$ , 81 y 95 como iones base y los poliinsaturados el  $m/z=79$ . El grado de insaturación en los ácidos grasos poliinsaturados se puede determinar quitando dos unidades de  $m/z$  por cada doble enlace.

Así, por ejemplo, para el PUFA de 16 carbonos, si el peso molecular del 16:0 es de 270, el del 16:1 será de 268, el del 16:2 de 266, y así sucesivamente. La

Tabla 2 muestra los iones característicos de los ácidos grasos que se encuentran en las microalgas.

## 6. REACCIÓN DE IONIZACIÓN DE TRIMETIL-SILIL ESTERES DE ESTEROLES

Los esteroides son mejor analizados separadamente de otros compuestos en fases no polares, tanto en forma libre como en forma de trimetil-silil ésteres (TMSE), en donde un átomo de sílice unido a tres grupos metilo  $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$  sustituyen al hidrógeno del grupo alcohol (OH) del esteroide. La Figura 8 representa la asignación de los átomos de carbono en la molécula de colesterol trimetil sililado. Dicha numeración es empleada tanto en las fórmulas como en las reacciones de ionización. Nótese como los metilos del TMS no son incluidos en la numeración.

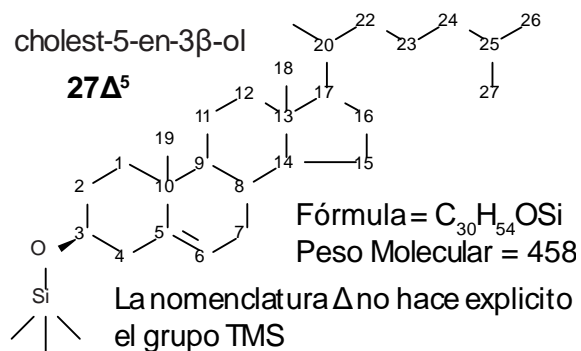


Figura 8. Esquema del colesterol trimetil sililado, nombre IUPAC, peso molecular y otras notaciones.

Durante la ionización, las fragmentaciones del anillo D y la pérdida de la cadena R (a partir del C20) son características de esteroides sustituidos en C17, pero no dependen de la presencia y naturaleza de sustituyentes en los anillos A y B. Por tanto, a pesar de que las siguientes reacciones están descritas para esteroides (sin el grupo OH en el C3), también son aplicables a esteroides y a los derivados TMSE de éstos.

Uno de los iones más comunes que se forma es el ión  $(\text{M}-\text{CH}_3)^+$  que surge de la pérdida de los grupos metilo angulares (C18 y principalmente C19), favoreciendo la unión entre el C13 y el C17 (en el anillo D) produciendo un ion carbenio estable. Las reacciones en el sitio del radical de esta especie, pueden proceder por transferencia recíproca de hidrógeno y unión de C14 y C15 para dar por resultado el ion de  $m/z=218$  (o  $m/z=307$  en los TMSE (Figura 9).

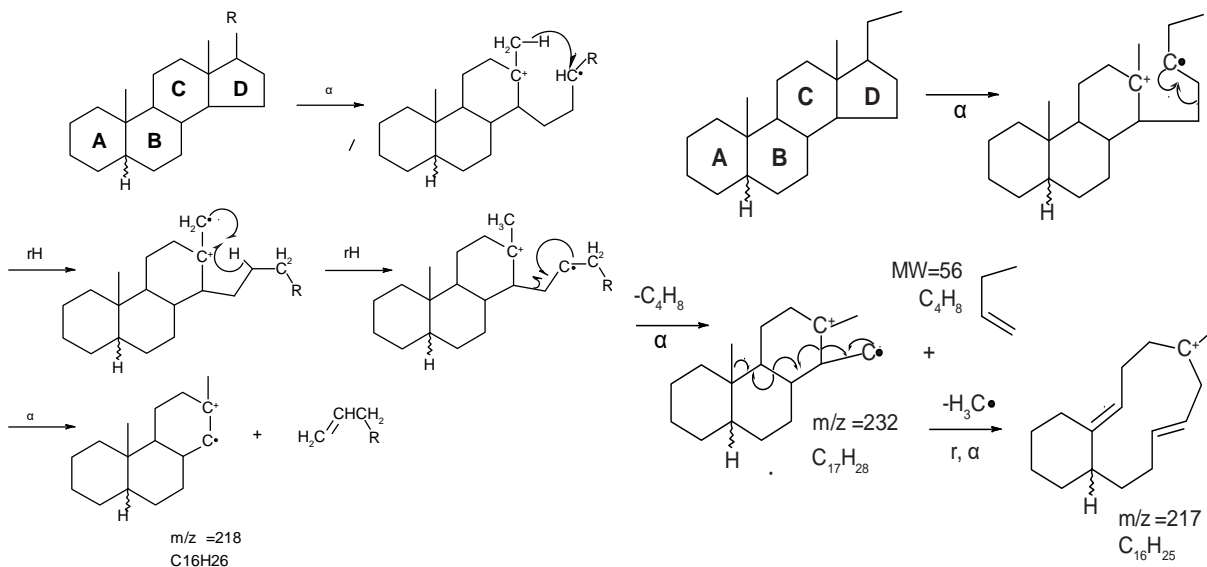


Figura 9. Reacciones de producción del ión carbenio y transferencia recíproca de hidrógeno y ligadura de C14 y C15 (McLaferty y Tureček, 1993).

Dado que el ión carbenio es estable, la pérdida de  $C_2H_5$  por la fragmentación exocíclica (fuera de los anillos) en el enlace entre C17 y C20 es despreciable.

En contraste, cuando el proceso continúa a través de la donación del electrón hacia el enlace vecino, producirán el ion  $m/z=232$  (o  $m/z=321$  en TMSE) producto del enlace entre C15 y C16 (Figura 10). En esta ruta, una porción sustancial del ion en  $m/z$  217 (o 306 en TMSE) se debe a la pérdida del metilo en C19 desde  $m/z$  232 (o 321 en TMSE). Finalmente, el ion  $m/z$  149 (238 TMSE) está compuesto principalmente de los anillos A y B, pero es formado por un complejo mecanismo en conjunto con la triple transferencia de hidrógeno. A pesar de este aparente grado de aleatoriedad, la estereoquímica de los anillos A/B tiene un efecto característico en el proceso: en el espectro de masas del isómero 5- $\beta$ -(cis), la relación  $[m/z$  149]/ $[m/z$  151] (o  $[m/z$  238]/ $[m/z$  240] en TMSE) es mucho menor que aquella del isómero 5- $\alpha$ . Este efecto es relativamente independiente del sustituyente en C17.

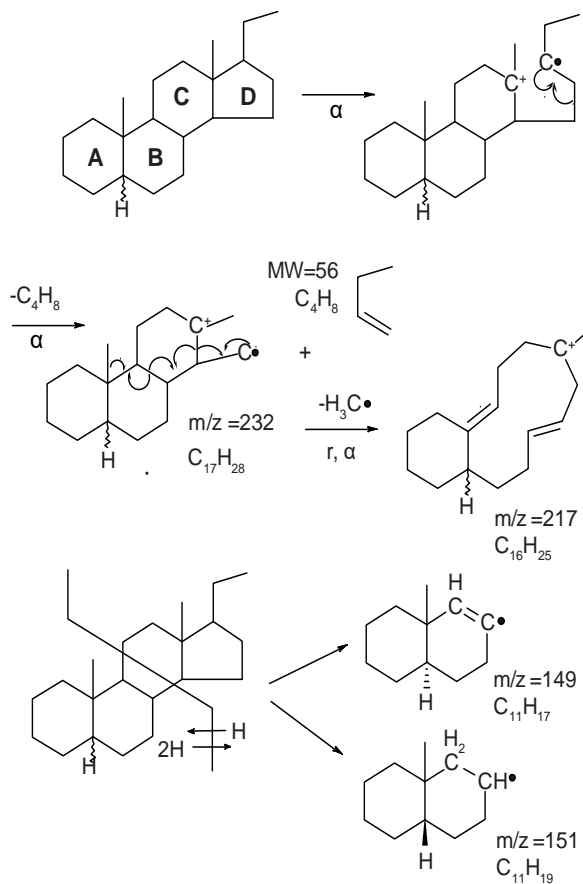


Figura 10. Donación de electrón hacia el enlace vecino en esteroides (McLaferty y Tureček, 1993).

En la mayoría de los casos de ionización de los TMSE se conserva el ion molecular ( $M^+$ ), por lo que se puede deducir tanto el número de carbonos como el de dobles enlaces y otros detalles importantes en la identificación de la molécula (

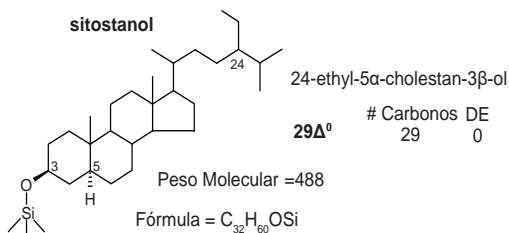
Tabla 1). Así, por ejemplo, el colesterol (PM=458) es una molécula de 27 carbonos y 1 doble enlace en el carbono 5 ( $27\Delta^5$ ).

Tabla 1. Peso molecular de esteroides en función del número de carbonos y de dobles enlaces (#DE) presentes en la molécula.

# DE	Número de carbonos en esteroil				
	26	27	28	29	30
0	446	460	474	488	502
1	444	458	472	486	500
2	442	456	470	484	498
3	440	454	468	482	496
4	438	452	466	480	494

Así, por ejemplo, en el caso del sitostanol, donde los iones característicos pueden ser

deducidos mediante la sustracción de los diferentes fragmentos ( Figura 11).



MW =	416	M <sup>+</sup> MW + Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> - H =	488
CH <sub>3</sub> =	15	M <sup>+</sup> - 15 =	473
Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> =	73	M <sup>+</sup> - 73 =	415
Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> O =	89	M <sup>+</sup> - 89 =	399
Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> OH =	90	M <sup>+</sup> - 90 =	398
Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> OH + CH <sub>3</sub> =	105	M <sup>+</sup> - 90 - 15 =	383
Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(Δ <sup>5</sup> ) =	129	M <sup>+</sup> - 129 =	359
C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> (Δ <sup>5,22</sup> ) =	255	M <sup>+</sup> - 255 =	233

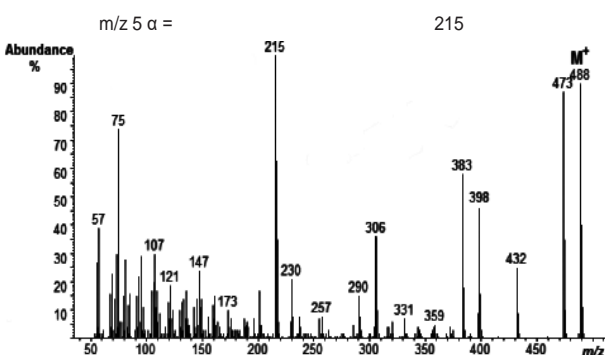


Figura 11. Sitostanol: estructura de la molécula, iones característicos y espectro de masas.

## 6.1. Cuantificación de esteroides

Los esteroides se extraen siguiendo el mismo procedimiento empleado para la extracción de ácidos grasos (capítulo 12 de este manual).

a) Después de inyectar los ácidos grasos metil esterificados, se seca el hexano con nitrógeno gaseoso y se agregan 100  $\mu$ L de bis-trimetil silil-trifluoro acetamida (BSTFA), se tapa y sella con cinta de teflón y se calienta en el horno a 85°C durante 15 min. Se seca con nitrógeno gaseoso y se agrega la cantidad de hexano necesaria para tener 1200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

b) Para la separación de esteroides se emplea la columna DB-5 MS: 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m usando helio como gas acarreador.

c) El método cromatográfico consiste en lo siguiente: flujo de helio 1.2 mL min<sup>-1</sup>, temperatura del inyector 250°C. Posterior a la inyección, la temperatura de la columna inicia con 60°C durante 1 min, incrementando a 100°C a una tasa de 25°C min<sup>-1</sup>, para posteriormente incrementar a 150°C a una tasa de 15°C min<sup>-1</sup>. La última rampa es un incremento a 315°C a una tasa de 3°C min<sup>-1</sup>. El cuadrupolo se ajusta a 150°C y la fuente de iones en el espectrómetro de masas (MS) a 270°C y 70 eV.

d) La identificación de esteroides se basa en los iones observados por Jones *et al.* (1994) y en el programa NIST-Search 2.0.

La Tabla muestra los esteroides y sus iones característicos detectados en una red trófica asociada a un arrecife coralino. Incluye esteroides característicos de diatomeas (24-metilenfenol y brasicasterol), de macroalgas cafés (fucosterol y priferasterol), de dinoflagelados simbioses del coral o zooxantelas (gorgosterol), de pastos marinos (Trans-22-dehidrocolesterol) y de residuos urbanos (coprostanol).

f) Una vez identificados los esteroides, se inyectan en un cromatógrafo de gases FID y se comparan los tiempos de retención del cromatógrafo de gases que emplea un detector de espectrometría de masas (Hewlett Packard 6890 GC-MS) con los tiempos de retención de un cromatógrafo de gases que emplea un detector de ionización de flama (Varian CP 3800 GC-FID). En este último caso, la columna se recomienda una columna DB-5 30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m empleando el mismo método cromatográfico (Tabla).

g) Para calcular la concentración de los esteroides presentes, se integra el área bajo los picos y se interpola con un curva de calibración que relaciona 5 concentraciones conocidas (10, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) de cada estándar de esteroides tri-metil sililados con su respectiva área bajo el pico.

h) La concentración se calcula de la siguiente manera:

$$C = [(A/FC) * V_H] / P_s$$

donde:

C = Concentración ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) peso seco

A = Área

FC = pendiente de la curva de calibración

$V_H$  = volumen de hexano (mL)

$P_s$  = peso de la muestra (mg)

i) Se considera la suma de las concentraciones ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) como el 100% y con una regla de 3 se calcula el porcentaje de cada esteroide.

## **7. SOFTWARE PARA INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS DE MASAS**

En la actualidad, los equipos de cromatografía de gases que se encuentran conectados a un espectrómetro de masas (GC-MS), disponen de software especializado para el procesamiento de los espectros de masas y permiten cierto nivel de interpretación. Desafortunadamente cada fabricante produce archivos en formatos distintos que no necesariamente son compatibles entre sí. Además, en la mayoría de los casos dicho software es propietario y se considera ilegal instalarlo en máquinas distintas a las que originalmente pertenece la licencia del mismo fabricante del producto.

Existen paquetes alternativos y gratuitos que suelen tener capacidades para leer cualquier tipo de formato de archivo. El paquete creado por el National Institute of Standards and Technology (NIST) comprende dos programas principales: 1) "AMDIS": que extrae los espectros de masas de los componentes individuales en un archivo de GC-MS, y 2) "MS Search Program": que es un programa que ayuda en la búsqueda de espectros de sustancias conocidas. También existe una base de datos de espectros conocidos que se vende vía distribuidores.

Ambos paquetes junto con el manual se pueden descargar en:

<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/ms-search/>

*Determinación de ácidos grasos y esteroides por cromatografía de gases espectrometría de masas*

Tabla 2. Iones característicos de los ácidos grasos de microalgas. FC= Factor de corrección para el CG-MS HP1800B con el software Wsearch

TR	FAME	FC	R <sup>2</sup>	SFA	MUFA	DUFA	PUFA	M <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> -31	M <sup>+</sup> -32	M <sup>+</sup> -43	PUFA M <sup>+</sup> -74	MUFA, PUFA M <sup>+</sup> -116	ω3	ω6	BFA M <sup>+</sup> -15	iso M <sup>+</sup> -55	iso M <sup>+</sup> -56	iso M <sup>+</sup> -65	anteiso M <sup>+</sup> -29	anteiso M <sup>+</sup> -61	
4.014	10:0	160397	0.998	74				186	155	154	143	112	70									
4.868	11:0	226950	0.973	74				200	169	168	157	126	84									
5.594	12:0	219483	0.992	74				214	183	182	171	140	98									
6.466	13:0	210324	0.985	74				228	197	196	185	154	112									
7.590	14:0	214371	0.966	74				242	211	210	199	168	126									
8.072	14:1ω5	198444	0.994		55			240	209	208	197	166	124									
8.580	14:2ω6	161695				67, 81, 95		238	207	206	195	164	122									
8.76	i14:0	216184		74				256	225	224	213	182	140			241	201	200	191			
9.010	ai14:0	216184		74				256	225	224	213	182	140			241				227	195	
8.992	15:0	216184	0.981	74				256	225	224	213	182	140									
9.600	15:1ω5	191946	0.986		55			254	223	222	211	180	138									
9.850	i15:0	205866		74				270	239	238	227	196	154			255	215	214	205			
10.750	16:0	205866	0.964	74				270	239	238	227	196	154									
10.950	16:1ω11	193389			55			268	237	236	225	194	152									
11.010	16:1ω9	193389			55			268	237	236	225	194	152									
11.224	16:1ω7	193389	0.934		55			268	237	236	225	194	152									
11.390	i16:0	211141		74				284	253	252	241	210	168				229	228	219			
11.710	ai16:0	211141		74				284	253	252	241	210	168							255	223	
11.820	16:1ω9t	193389			55			268	237	236	225	194	152									
11.950	16:2ω6	161695				67, 81, 95		266	235	234	223	192	150		150							
12.620	16:2ω4	161695				67, 81, 95		266	235	234	223	192	150									
12.802	17:0	211141	0.984	74				284	253	252	241	210	168									
13.420	16:3ω6	147042					79	264	233	232	221	190	148		150							
13.368	17:1ω7	190782	0.966		55			282	251	250	239	208	166									
13.510	17:1ω3																					
13.830	16:3ω3	147898					79	264	233	232	221	190	148	108								
14.150	16:4ω3	128125					79	262	231	230	219	188	146	108								
15.192	18:0	207220	0.984	74				298	267	266	255	224	182									

M<sup>+</sup>= Ion Molecular, DE=Dobles Enlaces, SFA=Ácidos Grasos Saturados, BFA= Ácidos Grasos Ramificados, MUFA= Ácidos Grasos Monoinsaturados, PUFA=Ácidos Grasos Poliinsaturados, iso= BFA con ramificación en el penúltimo carbono, anteiso= BFA con ramificación en el antepenúltimo carbono.

*Determinación de ácidos grasos y esteroides por cromatografía de gases espectrometría de masas*

Tabla 2. (Continuación) Iones característicos de los ácidos grasos de microalgas

TR	FAME	FC	R <sup>2</sup>	SFA	MUFA	DUFA	PUFA M <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> -31	M <sup>+</sup> -32	M <sup>+</sup> -43	PUFA M <sup>+</sup> -74	MUFA y PUFA M <sup>+</sup> -116	ω3	ω6
15.650	18:1ω9 c	184446	0.993		55		296	265	264	253	222		180	
16.804	18:2ω6 c	161695	0.982			67, 81, 95	294	263	262	251	220		178	150
16.952	18:2ω6 t	150859	0.995			67, 81, 95	294	263	262	251	220		178	150
17.608	18:3ω6	147042	0.992				79	292	261	260	249	218	176	150
18.544	18:3ω3	147898	0.984				79	292	261	260	249	218	176	108
19.320	19:0	200181		74			312	281	280	269	238		196	
19.420	18:4ω3	128125					79	290	259	258	247	216	174	108
20.628	20:0	200181	0.989	74			326	295	294	283	252		210	
21.106	20:1ω9	175230	0.986		55		324	293	292	281	250		208	
21.320	20:1ω7	175230			55		322	291	290	279	248		206	
21.520	20:1ω5	175230			55		322	291	290	279	248		206	
22.476	20:2ω6	156579	0.996			67, 81, 95	322	291	290	279	248		206	150
23.234	20:3ω6	132552	0.99				79	320	289	288	277	246	204	150
23.540	21:0	183957	0.981	74			340	309	308	297	266		224	
23.878	20:4ω6	128125	0.991				79	318	287	286	275	244	202	150
24.398	20:4ω3	128125					79	318	287	286	275	244	202	108
25.210	20:3ω3	134845	0.996				79	320	289	288	277	246	204	108
25.836	20:5ω3	114944	0.99				79	316	285	284	273	242	200	108
26.560	22:0	179351	0.966	74			354	323	322	311	280		238	
27.230	22:1ω11	148545			55		352	321	320	309	278		236	
27.086	22:1ω9	148545	0.926		55		352	321	320	309	278		236	
28.632	22:2ω6	179873	0.891			67, 81, 95	350	319	318	307	276		234	150
29.550	22:3ω3	134845				67, 81, 96	348	317	316	305	274		232	108
30.026	23:0	150177	0.889	74			368	337	336	325	294		252	
30.666	22:4ω6	223242	0.89				79	346	315	314	303	272	230	150
31.630	22:5ω6	89124					79	344	313	312	301	270	228	150
33.220	22:5ω3	89124	0.822				79	344	313	312	301	270	228	108
34.142	24:0	143030	0.887	74			382	351	350	339	308		266	
34.598	22:6ω3	83705	0.868				79	342	311	310	299	268	226	108
35.076	24:1ω9	125885	0.848		55		380	349	348	337	306		264	



*Determinación de ácidos grasos y esteroides por cromatografía de gases espectrometría de masas*

Tabla 3. Iones característicos de esteroides presentes en una red trófica de arrecife coralino. TR= Tiempo de retención, MS=Espectrómetro de Masas, FID= Detector de Ionización de Flama, PM=Peso Molecular. Fuente: Carreón-Palau, (2015).

TR GC-MS	TR GC-FID	Compuesto	PM	Iones clave en la identificación	Estructura
41.86	44.54	24-nordehidrocolesterol	442	69, 97, 211, 353, 366, 442	24-norcolesta-5, 22E-dien-3 $\beta$ -ol
46.92	49.02	coprostanol	460	75, 215, 257, 355, 370, 403, 445, 460	5 $\beta$ -colestan-3 $\beta$ -ol TMS
44.40	47.37	24-Nor-22, 23 metilencolest-5-en-3- $\beta$ -ol	456	55, 69, 111, 129, 327, 366, 456	24-Nor-22, 23 metilencolest-5-en-3 $\beta$ -ol
44.81	47.10	occelasterol	456	55, 69, 111, 129, 255, 327, 351, 366, 441, 456	27-nor-24-metilcoolest-5, 22E-dien-3 $\beta$ -ol
45.01	48.23	trans 22 dehidrocolestanol	458	73, 91, 345, 374, 458	5 $\alpha$ -colest-22E-en-3 $\beta$ -ol
45.01	48.25	patinosterol	458	69, 81, 107, 257, 345, 374, 389, 404, 443, 458	27-nor-24-methyl-5 $\alpha$ -cholest-22E-en-3 $\beta$ -ol
45.60	48.28	colesterol	458	73, 129, 329, 353, 368, 443, 458	colesta-5-en-3 $\beta$ -ol
45.75	48.44	colestanol	460	75, 215, 305, 355, 370, 403, 445, 460	5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol
45.98	49.39	desmosterol	456	69, 129, 253, 327, 343, 366, 441, 456	colesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol
45.99	49.28	7-dehidrocolesterol	456	75, 182, 351, 368, 386, 441, 456	colesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol
46.39	49.12	brasicasterol	470	69, 129, 255, 340, 365, 380, 455, 470	24-metilcolesta-5,22E-dien-3 $\beta$ -ol
46.45	50.13	brasicastanol	472	75, 109, 257, 345, 374, 458, 472	24-metil-5 $\alpha$ -colest-22E-en-3 $\beta$ -ol
46.64	49.29	ergost-7-enol	472	213, 229, 255, 343, 367, 378, 457, 472	24-metil-5 $\alpha$ -colest-7-en-3 $\beta$ -ol
46.84	50.31	ergosterol	468	69, 75, 131, 253, 327, 342, 363, 378, 468	24-metilcolesta-5,7,22E-trien-3 $\beta$ -ol
47.39	50.05	stelasterol	470	73, 129, 213, 229, 255, 343, 455, 470	colesta-7, 22E-dien-3 $\beta$ -ol
47.40	50.00	dihidrobrasicasterol	472	75, 209, 267, 343, 386, 472	24b-metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol
47.45	50.10	ergost-8(14)-enol	470	75, 91, 229, 255, 343, 378, 457, 470	24-metil-5 $\alpha$ -cholest-24(28)-en-3 $\beta$ -ol
47.54	50.19	24- metilencolesterol	470	253, 257, 296, 341, 365, 386, 455, 470	24-metilcolesta-5, 24(28)-dien-3 $\beta$ -ol
47.72	50.37	campesterol	472	73, 129, 255, 343, 367, 382, 457, 472	24 $\alpha$ -metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol
48.18	51.53	latosterol	458	73, 255, 303, 353, 443, 458	5 $\alpha$ colest-7-en-3 $\beta$ -ol
48.24	51.18	estigmasterol	484	83, 129, 255, 355, 379, 394, 484	24-ethylcolesta-5, 22E-dien-3 $\beta$ -ol
48.34	51.34	23-24 dimetilcolest 5, 7-dien-3 $\beta$ -ol	486	98, 129, 283, 342, 381, 433, 486	23-24 dimetilcolest 5, 7-dien-3 $\beta$ -ol
48.73	51.44	24-methylenphenol	470	75, 131, 213, 253, 365, 386, 455, 470	24-methyl-5 $\alpha$ -cholesta-7, 24(28)-dien-3 $\beta$ -ol
49.05	52.49	4-24 dimetil 5, 7-dien-3- $\beta$ -ol	484	69, 129, 283, 343, 355, 379, 394, 469, 484	4-24 dimethyl 5, 7-dien-3 $\beta$ -ol
49.14	52.61	poriferasterol	484	69, 129, 283, 343, 355, 379, 394, 469	24-etilcolesta-5, 22Z-dien-3 $\beta$ -ol
49.14	52.02	espinasterol	484	55, 73, 129, 213, 255, 343, 372, 469, 484	24-etil-5 $\alpha$ -colesta-7, 22E-dien-3 $\beta$ -ol
49.49	52.04	$\beta$ -Sitosterol	486	73, 129, 255, 357, 381, 396, 471, 486	24-etilcolesta-5-en-3 $\beta$ -ol
49.42	52.94	fucosterol	484	55, 73, 129, 257, 281, 296, 355, 371, 386,	24-etilcolesta-5,24(28)E-dien-3 $\beta$ -ol
49.61	52.22	sitostanol	488	75, 218, 229, 358, 381, 398, 488	24-ethyl-5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol
49.76	53.20	Isomero de fucosterol	484	73, 129, 281, 296, 386, 469, 484	24-etilcolesta-5,24(28)Z-dien-3 $\beta$ -ol
49.78	53.16	4, 23, 24 trimetil 5 $\alpha$ colesteno	500	57, 283, 297, 359, 373, 387, 485, 500	4, 23, 24 trimetil-5 $\alpha$ -colest-24(28)-en-3 $\beta$ -ol
49.87	52.55	Dinosterol	500	69, 359, 457, 500	4,23,24-trimetil-5 $\alpha$ -colest-22E-en-3 $\beta$ -ol
50.15	52.87	Dinostanol	502	57, 73, 487, 397, 502	4,23,24-trimetil-5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol
50.80	53.68	4, 23, 24 trimetilcolesteno	500	143, 227, 243, 269, 395, 410, 485, 500	4, 23, 24 trimetil-5 $\alpha$ -colest-7-en-3 $\beta$ -ol
50.23	53.74	Isofucosterol	484	55, 73, 129, 257, 281, 296, 386, 469, 484	24-etilcolesta-5,24(28)Z-dien-3 $\beta$ -ol
50.50	53.82	Cicloartenol	498	73, 95, 109, 189, 369, 393, 483, 498	9,19-Ciclo-24-lanosten-3 $\beta$ -ol
51.86	55.36	Gorgosterol	498	73, 129, 255, 343, 386, 408, 483, 498	Gorgost-5-en-3 $\beta$ -ol

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ACKMAN, G. R.** 2002. The gas chromatograph in practical analyses of common and uncommon fatty acids for the 21 st century. *Analytica Chimica*. 465:175-192.
- AGILENT TECHNOLOGIES**, 2012. Agilent GC/MSD ChemStation and instrument operation. Course number I (H4043A) Agilent Technologies, INC., USA. 3-10 pp.
- CHRISTIAN, G. D.** 1981. *Química Analítica*. 2ª. Edición. Limusa México. 684 pp. Elsevier Publishing Company. Amsterdam Netherlands. 711 pp.
- COHEN, Z.**, Norman H. A., Heimer Y. M. 1995. Microalgae as a source of omega-3 fatty acids. *En: Simopoulos, A. P. (Ed.) World Review of Nutrition and Dietetics. Plants in Human Nutrition* 77: 1-31. Karger, Basel.
- CARREON-PALAU, L.**, Del Angel-Rodríguez, J. A., Arjona-López M. O. 2007. Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases espectrometría de masas. *En: Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. Editores B. O. Arredondo Vega y D. Voltolina. Editorial CIBNOR 97 pp.
- CARREÓN-PALAU, L.**, Parrish C. C., Del Angel-Rodríguez, J. A., Pérez-España, H., Aguiñiga-García, S. 2013. Revealing organic carbon sources fueling a coral reef food web in the Gulf of Mexico using stable isotopes and fatty acids. *Limnology and Oceanography*, 58(2): 593–612.
- CARREÓN-PALAU, L.** 2015. Organic carbon sources and their transfer in a Gulf of Mexico coral reef ecosystem. Doctoral (PhD) thesis, Memorial University of Newfoundland. 268 pp. <http://research.library.mun.ca>
- CARREÓN-PALAU, L.**, C. C. Parrish, H. Pérez-España. 2017. Urban sewage lipids in the suspended particulate matter of a coral reef under river influence in the South West Gulf of Mexico. *Water Research* 123: 192-205.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.061>
- DEL ANGEL-RODRÍGUEZ, J. A.**, Carreón-Palau, L., Arjona-López, M. O. 2007. Extracción y cuantificación de lípidos. *En: Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. B. O. Arredondo Vega, D. Voltolina (Eds). Editorial CIBNOR 97 págs.
- DEMETZ, E.**, Schroll, A., Auer, K., Heim, C., Patsch, J. R., Eller, P., Tancevski, I. 2014. The arachidonic acid metabolome serves as a conserved regulator of cholesterol metabolism. *Cell Metabolism*, 20(5): 787-798. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.09.004
- GUNSTONE, F. D.** 1996. *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. London: Blackie Academic and Professional. 252 pp.
- GUSHINA, I. A.**, Harwood, J. L. 2009. Algal Lipids and Effect of the Environment on their Biochemistry. M.T. Arts *et al.* (Eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*, Springer Science + Business Media, LLC.
- HIXSON, S. M.**, Parrish, C. C., Anderson, D. M. 2013. Effect of replacement of fish oil with camelina (*Camelina sativa*) oil on growth, lipid class and fatty acid composition of farmed juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 39:1441–1456.
- HTTP://SLIDEPLAYER.ES/slide/1672494/7/images/47/ESIQ+Espectrometr%C3%ADa+d e+masa.jpg**
- JAMES, A. T.**, Martin, A. J. P. 1952. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemistry Journal*. 50: 679-690.
- JONES G. J.**, Nichols, P. D., Shaw P. M. 1994. Analysis of microbial sterols and hopanoids. *En: Goodfellow M, O'Donnell AG (Eds). Chemical methods in prokaryotic systematics*. Wiley, Chichester, 63–195 pp.
- KITSON, F. G.**, Larsen, B. S., McEwen, C. N. 1996. *Gas chromatography and mass spectrometry*. Academic Press, USA. 9-8 pp.
- LEDERER E.**, Lederer, M. 1957. *Chromatography, a review of principles and applications* 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier, Amsterdam. 711pp.
- MCLAFFERTY, F. W.**, Turecek, F. 1993. *Interpretation of mass spectra*. Fourth edition. University Science Books, Mill Valley, California. 23(6): 379 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.**, Miller J. M. 1997. Basic gas chromatography. New York, E.U. A. 101-123
- RAMPRASATH, V. R.**, Awad, A. B., 2015. Role of Phytosterols in Cancer Prevention and Treatment. Journal of the AOAC International. 98 (3): 735–738.
- SIUZDAK, G.** 1996. Mass spectrometry for biotechnology. San Diego, Calif, Academic Press. 161 pp.
- TACON, A.**, Metian, M. 2008 Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. Aquaculture 285:146–158.

## CAPÍTULO 14

# DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

<sup>1</sup>ORLANDO LUGO LUGO, <sup>1</sup>TANIA ZENTENO SAVÍN,  
<sup>2</sup>FREDY HERNÁNDEZ URIBE, <sup>2</sup>BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

<sup>1</sup>Laboratorio de Estrés Oxidativo. <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

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

La Paz, Baja California Sur, 23096, México.

tzenteno04@cibnor.mx, olugo04@cibnor.mx, fhuribe90@gmail.com, kitty04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL
3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES
4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS
6. CURVA ESTÁNDAR
7. CÁLCULOS
8. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** capacidad antioxidante, microalgas, cianobacterias

---

### 1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas y cianobacterias son microorganismos que producen oxígeno por fotosíntesis y que contienen moléculas con capacidad antioxidante. Bajo condiciones de estrés, la intensidad del transporte de electrones impulsado por la luz supera la velocidad de consumo de electrones durante la fijación de CO<sub>2</sub>, por lo que se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) que son los causantes del daño oxidativo. La resistencia frente a las ERO se basa en la acción protectora del sistema antioxidante enzimático dado por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión

peroxidasas (GPx), glutatión reductasas (GR), ascorbato peroxidasas (APX), así como por los antioxidantes no enzimáticos como carotenoides,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), fenol oxidasa, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) y glutatión (GSH) (Polle, 1996). Los sistemas antioxidantes son esenciales para el mantenimiento de la actividad fotosintética y de otras funciones metabólicas (Eltzner, 1982; Halliwell, 1982; Asada y Takahashi, 1987; Allen, 1997; Latifi *et al.*, 2009).

### 2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Las técnicas desarrolladas para medir la capacidad antioxidante total en muestras biológicas valoran la habilidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en la célula, para reducir las especies oxidantes introducidas (iniciador) en el sistema de ensayo, por lo que son, en general, clasificados como métodos de inhibición directos o indirectos del poder oxidante de una molécula estándar determinada que es el iniciador.

El bloqueo de ERO es el mecanismo principal mediante el cual actúan los antioxidantes. Uno de los métodos más utilizados para medir la actividad antioxidante de un extracto se basa en la

capacidad del antioxidante de atrapar ERO en un disolvente orgánico.

La actividad antioxidante total se determina mediante el ensayo de bloqueo del radical libre 2,2-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995). El método se fundamenta en la evaluación de la capacidad de las células para secuestrar radicales libres. Este método consiste en la neutralización del DPPH por los compuestos antioxidantes de las muestras. La cuantificación se realiza siguiendo la disminución de la absorbancia de la muestra a 520 nm. Se puede observar de esta manera un cambio del color inicial morado, que es cuando el DPPH está en forma de radical, a amarillo que es cuando los radicales han sido bloqueados por la acción antioxidante (Figura 1).

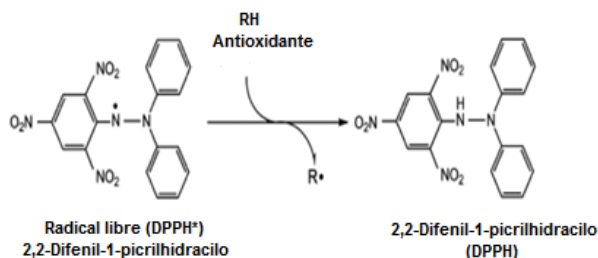


Figura 1. Reacción entre el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH<sup>•</sup>) (morado) y antioxidantes para la formación de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo no radical (DPPH) (amarillo). Modificado de Moon y Shibamoto (2009).

### 3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- Preparar una solución de DPPH de 125  $\mu\text{M}$  en metanol. Ésta debe prepararse en fresco o mantenerse en refrigeración no más de 3 días.
- Preparar la mezcla de extracción con  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{CH}_3\text{COCH}_3$  (2:3:5) (v/v). La proporción de los solventes dependerá del tipo de muestra, para el caso de *Spirulina* se recomienda incrementar la proporción de agua para favorecer la extracción de las ficobiliproteínas debido a su naturaleza hidrosoluble y capacidad antioxidante.

### 4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Pesar 250 mg de biomasa fresca (con porcentaje de humedad conocido) en tubo de ensayo cubierto con papel aluminio para evitar el contacto con la luz.
- Agregar 2.5 mL de mezcla de extracción a temperatura ambiente.
- Homogenizar en vortex por 2 min.
- Sonicar en frío por 15 min.
- Incubar a temperatura ambiente en agitación suave durante 1 h.
- Obtener el extracto (sobrenadante) por centrifugación a 2,200  $\text{xg}$ , a 4°C durante 15 min, o por filtración con jeringa y filtro (0.2  $\mu\text{m}$ ).

### 5. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

- En una microplaca colocar por triplicado 20  $\mu\text{L}$  de cada extracto y de cada punto de la curva de calibración, dejando libre un pozo para el blanco.
- Adicionar a cada pozo 200  $\mu\text{L}$  de la solución de DPPH 125  $\mu\text{M}$  para iniciar la reacción. Al blanco adicionar solamente DPPH.
- Cubrir la microplaca para evitar contacto con la luz.
- Mezclar con agitación suave y dejar que proceda la reacción por 30 min a temperatura ambiente.
- Posterior a la incubación y reacción de reducción del radical DPPH<sup>•</sup> por los antioxidantes contenidos en el extracto, registrar la absorbancia de la solución en un lector de microplaca a 515 nm.

**Nota:** Deberá ajustarse la cantidad de muestra, o diluirla para que la absorbancia caiga dentro de la curva de calibración. Tomar en cuenta estos ajustes al momento de realizar los cálculos.

### 6. CURVA ESTÁNDAR

La curva de calibración se prepara con una solución concentrada de ácido gálico a 200  $\mu\text{M}$  en la mezcla de extracción, a partir de la cual se hace un gradiente de concentración desde 0 a 200  $\mu\text{M}$  (Tabla 1). Todas las

diluciones se realizan por triplicado y una vez que se tienen las diferentes concentraciones de ácido gálico, se continúa la curva como se menciona en el punto 5, sustituyendo el volumen del extracto por el volumen de las diluciones preparadas anteriormente.

Tabla 1. Elaboración de la curva de calibración de la capacidad antioxidante total utilizando ácido gálico como estándar. Las lecturas de absorbancia que se reportan se obtuvieron en un experimento que se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

Solución ácido gálico 200 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{L}$ )	Mezcla de extracción ( $\mu\text{L}$ )	Ácido gálico ( $\mu\text{M}$ )	Promedio $A_{515\text{nm}}$
0	100	0	0.836
10	90	20	0.738
20	80	40	0.659
30	70	60	0.587
40	60	80	0.516
50	50	100	0.463
60	40	120	0.42
70	30	140	0.371
80	20	160	0.31
90	10	180	0.29
100	0	200	0.213

Los datos anteriores se grafican y se ajustan por mínimos cuadrados a una ecuación lineal, obteniendo la "r<sup>2</sup>", el valor de la pendiente (m), utilizando el intercepto (b) (Figura 2). El valor de r<sup>2</sup> deberá ser superior a 0.98. Si se obtiene un valor inferior, se repite la curva de calibración con una nueva serie de diluciones y, si el resultado es similar, entonces se recomienda preparar soluciones nuevas.

A partir de la ecuación generada de la curva de calibración, se despeja "x" y la capacidad antioxidante se calcula como:

$$x = \frac{y - b}{m} \dots \text{Ecuación 1}$$

Tomando en cuenta el peso inicial de cada muestra, los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico en  $\mu\text{M g}^{-1}$  de peso.

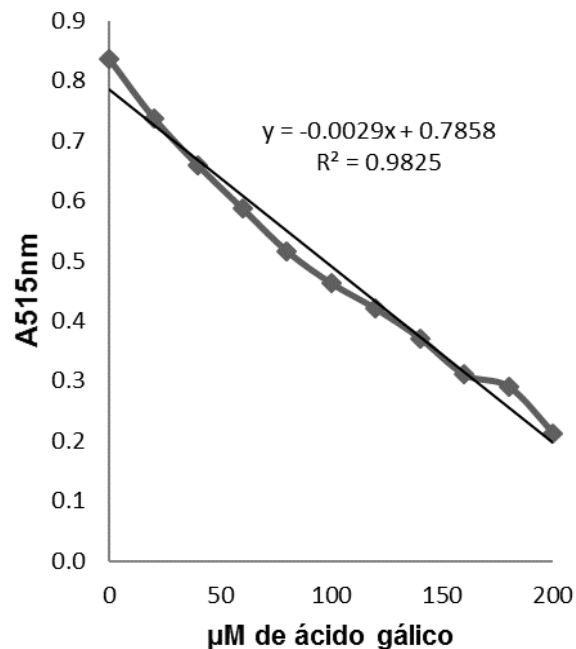


Figura 2. Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante total utilizando ácido gálico como estándar.

## 7. CÁLCULOS

Considerando los datos de la ecuación de la línea recta generada en la curva de calibración, se calcula el valor de la capacidad antioxidante total en equivalentes de ácido gálico ( $\mu\text{M}$ ).

Tomando la ecuación de la curva de calibración y despejando la concentración (eje X) se obtiene la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y - 0.7858}{-0.0029} \dots \text{Ecuación 2}$$

Se da un ejemplo de estos cálculos usando datos obtenidos en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y en el Laboratorio de Estrés Oxidativo, a partir de un cultivo de la cianobacteria *Spirulina maxima* cultivada en medio Jourdan (2006) en condiciones normales (+N+PAR) y sometida a estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). De una prueba de n=3 tenemos por tratamiento los datos que se aprecian en la tabla 2 (Hernández-Uribe, 2016).

Tabla 2. Datos de absorbancias para determinar la capacidad antioxidante total en *Spirulina (Arthrospira) maxima* en dos tratamientos: condiciones normales (+N+PAR) y estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR).

Tratamiento	A <sub>515nm</sub>	Promedio
+N+PAR	0.606	0.556
	0.539	
	0.572	
-N+PAR	0.614	0.613
	0.618	
	0.607	

Sustituyendo el valor promedio de los tratamientos en la ecuación 2, tenemos que +N+PAR= 79.41  $\mu$ M y -N+PAR= 59.59  $\mu$ M. Como en los extractos se realizó una dilución 1:5, entonces se multiplican los valores anteriores por 5, por lo tanto, la capacidad antioxidante total por tratamiento fue: +N+PAR 397  $\mu$ M y -N+PAR= 297  $\mu$ M (Figura 3).

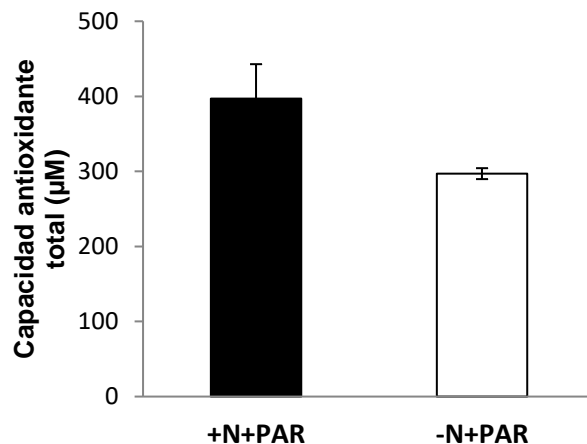


Figura 3. Actividad antioxidante total de la cianobacteria *Spirulina maxima* cultivada en medio Jourdan (2006) en condiciones normales (+N+PAR) y en estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR).

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, J. F.** 1997. Superoxide and photosynthetic reduction of oxygen. *In*: Michelson, A. M. (Ed.). Superoxide and superoxide dismutases. Academic Press. New York. 417-436.
- ASADA, K.,** Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *In*: Kyle, D. J., Osmond, C. B., Arntzen, C. J. (Eds.). Photoinhibition. Science, Amsterdam 89-109.
- BRAND-WILLIAMS, W.,** Cuvelier, M. E., Berst, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30.
- ELSTNER, E. F.** 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review of Plant Biology* 33: 73-96.
- HERNÁNDEZ-URIBE, F.** 2016. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en la actividad fotosintética y en los compuestos antioxidantes de las cianobacterias *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum*. Tesis de Maestría. CIBNOR. 241págs.
- HALLIWEL, B.** 1982. The toxic effect on

plant tissue. *In*: Oberley, L. W. (Ed.). Superoxide dismutase. Vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida 89-123pp.

**JOURDAN, J. P.** 2006. Grow your own *Spirulina*. Manual artisan culture for the production of *Spirulina*. 146pp.

**LATIFI, A.,** Ruiz, M., Zhang, C-C. 2009. Oxidative stress in cyanobacteria. FEMS Microbiology Review. 33: 258-278.

**MOON, J. K.,** Shibamoto, T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 1655-1666.

**POLLE, A.** 1996. Protection from oxidative stress in trees as affected by elevated CO<sub>2</sub> and environmental stress. *In*: Koch, G. y Mooney, H. (Eds.). Terrestrial Ecosystem Response to elevated CO<sub>2</sub>. Academic, Press, New York, 299-315pp.



## CAPÍTULO 15

# DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

<sup>1</sup>ORLANDO LUGO LUGO, <sup>1</sup>TANIA ZENTENO SAVÍN,  
<sup>2</sup>FREDY HERNÁNDEZ URIBE, <sup>2</sup>BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

<sup>1</sup>Laboratorio de Estrés Oxidativo. <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

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

La Paz, Baja California Sur, 23096, México.

olugo04@cibnor.mx, tzenteno04@cibnor.mx, fhuribe90@gmail.com, kitty04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES
3. PROTOCOLO DE ANÁLISIS
  - 3.1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES
  - 3.2. REACCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS CON EL AGENTE OXIDANTE
4. CURVA ESTÁNDAR
5. EJEMPLO DE CÁLCULOS
6. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** compuestos fenólicos, microalgas, cianobacterias.

---

### 1. INTRODUCCIÓN

Las microalgas y cianobacterias son biofábricas de una amplia gama de compuestos bioactivos. La síntesis de estos compuestos es parte de su metabolismo primario y secundario. Dentro de estos últimos están los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se producen como mecanismo antioxidante debido a su capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical hidroxilo y superóxido, implicados al inicio de la

lipoperoxidación (Javonovic *et al.*, 1998). Además, se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosaenoides (con respuestas anti-prostanoide y antiinflamatoria) y de proteger de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (Geleijnse *et al.*, 2002). Se considera que su propiedad antioxidante resulta de una combinación de su capacidad para quelar  $Fe^{2+}$  y atrapar radicales libres, además de inhibir enzimas oxidasas, como lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y xantina oxidasa. Estas propiedades contribuyen a evitar la formación de ERO y de hidroxiperóxidos orgánicos (Escamilla *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos, que poseen uno o más grupos fenol ( $C_6H_5OH$ ) en su estructura molecular (Taiz y Zeiger, 2006), con base en ella también pueden ser agrupados (Figura 1). Los ácidos fenólicos como ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cumárico y ácido sináptico, derivados del ácido hidroxicinámico, y los flavonoides (chalconas, flavonas, flavonoles, flavandioles, antocianinas y taninos condensados) comparten una estructura común de difenil pirano, permitiendo generar una multitud de variaciones para dar lugar a una gran cantidad de compuestos (Karou *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2007).

Los compuestos fenólicos se sintetizan al final de la fase de crecimiento exponencial y durante la fase estacionaria (Robbins, 2003). La síntesis de compuestos fenólicos puede estar influenciada por factores ambientales como radiación ultravioleta (UV), en particular la UV-B (Zhang y Björn, 2009).

## 2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

El método espectrofotométrico para determinar la concentración de compuestos fenólicos totales que aquí se describe, emplea el reactivo de Folin-Ciocalteu y se fundamenta en la capacidad de los compuestos fenólicos en reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, sustancias que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando un complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico.

La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos en óxidos, formando cromógenos de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ) de color azul intenso (Figura 2). En estas reacciones, la intensidad del color azul es directamente proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula. La concentración de compuestos fenólicos se determina por el cambio en la absorbancia a 760 nm (Singleton y Rossi, 1965).

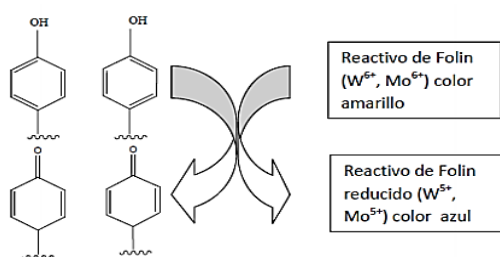


Figura 2. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu en la determinación de compuestos fenólicos totales. Tomado de García-Martínez *et al.*, 2015.

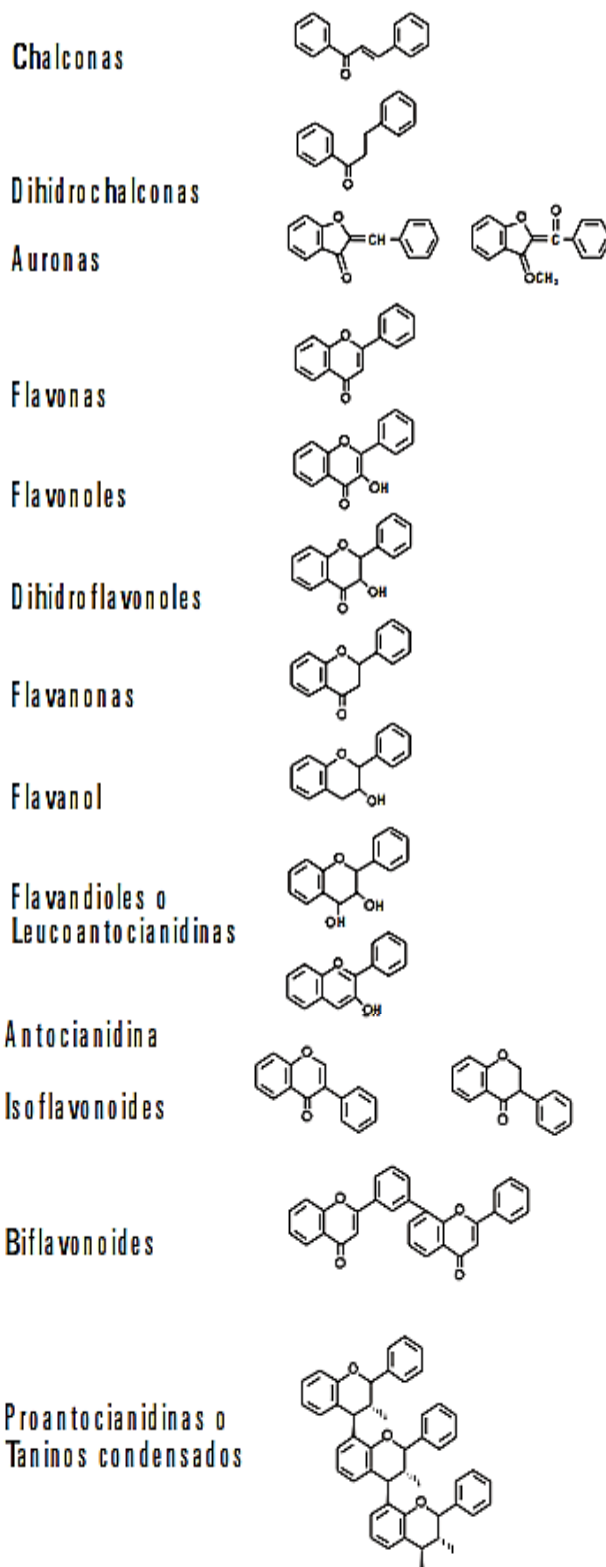


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos con base a su estructura química. Tomado de Pérez-Trueba (2003).

### 3. PROTOCOLO DE ANÁLISIS

#### 3.1 Extracción de compuestos fenólicos totales

- Pesar 250 mg de biomasa fresca (con humedad conocida) en tubos de ensayo, cubrirlos con papel aluminio para evitar el contacto y cambios por exposición a la luz.
- Adicionar 2.5 mL de la mezcla de extracción: agua: metanol: acetona (5:3:1 v/v/v).

**NOTA:** Es importante mantener la relación entre el peso de la biomasa fresca y el volumen de la mezcla de extracción. Ejemplo, si se pesa 100 mg de biomasa fresca se debe de adicionar 1 mL de mezcla de extracción.

- Homogenizar la mezcla anterior en vortex durante 2 min e incubar en agitación constante por 1 h a temperatura ambiente (25°C).
- Eliminar los sólidos disueltos con jeringa y filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  o por centrifugación a 2,200  $\text{xg}$  por 15 min a 10°C.
- Recuperar el extracto hidroalcohólico.

#### 3.2 Reacción de los compuestos fenólicos con el agente oxidante

En cada corrida, preparar la curva de calibración con ácido gálico (rango de concentraciones de 0 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) utilizando la mezcla de extracción como solvente. Se recomienda que la curva patrón incluya de 5 a 7 puntos.

- En una microplaca, cargar por triplicado el extracto hidroalcohólico de cada uno de los puntos de la curva de calibración (10  $\mu\text{L}$ ) con 15  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 v/v) e incubar durante 1 min. (Figura 3).

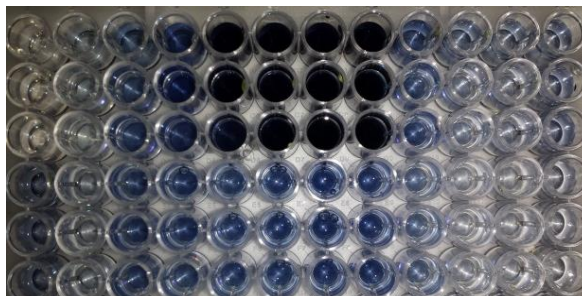


Figura 3. Microplaca cargada por triplicado con los puntos de la curva de calibración. A mayor intensidad de color corresponde mayor concentración de ácido gálico.

- Adicionar 100  $\mu\text{L}$  de la solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% p/v) y 100  $\mu\text{L}$  de una solución de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$  al 0.4% p/v).
- Cubrir la microplaca y agitar suavemente para homogenizar la mezcla para permitir el inicio de la reacción. Incubar a temperatura ambiente por 20 min.
- Registrar la absorbancia en un lector de microplaca a 760 nm.

#### 4. CURVA ESTÁNDAR

La curva de calibración se prepara a partir de una solución patrón de ácido gálico (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) en un gradiente de concentración de 0 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , usando la mezcla de extracción como solvente (Tabla 1). Todas las diluciones se preparan por triplicado, y una vez que se tienen las diferentes concentraciones de ácido gálico, se continúa el procedimiento utilizando los reactivos que se describen en el apartado 3.2 de este capítulo.

Con los valores de absorbancia (Y) de los triplicados de las diluciones se calculan los promedios correspondientes y se grafican para cada valor de concentración (X), como se muestra en la figura 4.

Por ajuste de mínimos cuadrados a una ecuación lineal se obtiene la " $r^2$ ", el valor de la pendiente (**m**) y la intercepción con "y" (**b**). El valor de la  $r^2$  debe ser igual o mayor a **0.98**. Si se obtiene un valor menor, repetir la curva de calibración con una nueva serie de diluciones. Utilizando la ecuación de la curva

de calibración, se calcula la concentración de compuestos fenólicos totales ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para cada una de las muestras. Tomando en cuenta el peso de la biomasa fresca (quitando la humedad) de cada muestra. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de compuestos fenólicos totales por  $\text{mg}^{-1}$  o  $\mu\text{g}^{-1}$  de peso seco.

Tabla 1. Datos para la curva de calibración de compuestos fenólicos totales. Como estándar se utilizó ácido gálico. Las absorbancias que se reportan se obtuvieron en un experimento ( $n=3$ ) realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y en el Laboratorio de Estrés Oxidativo (Hernández Uribe, 2016).

$\mu\text{L}$ ácido gálico $1 \text{ mg mL}^{-1}$	$\mu\text{L}$ mezcla de extracción	$\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico	Promedio $A_{760\text{nm}}$
0	1000	0	0.071
50	950	50	0.244
75	925	75	0.318
100	900	100	0.506
150	850	150	0.647
200	800	200	0.833

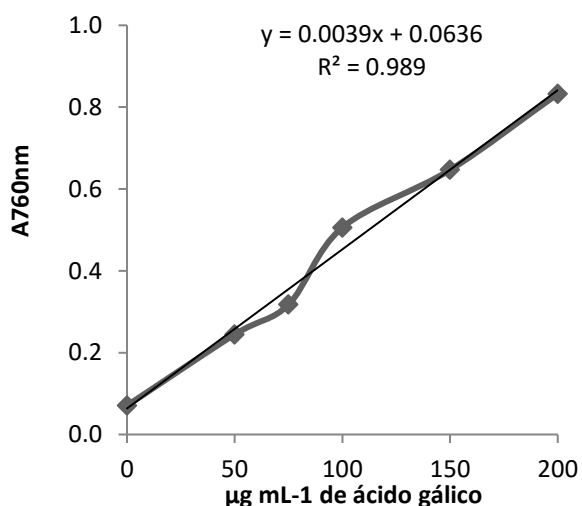


Figura 4. Curva de calibración de compuestos fenólicos totales con ácido gálico como estándar.

## 5. EJEMPLO DE CÁLCULOS

Los datos que se usan como ejemplo para el cálculo de la concentración de compuestos fenólicos totales corresponden a la biomasa obtenida del cultivo de *Spirulina (Arthrospira) maxima* en condiciones normales (+N+PAR) y en deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) (Hernández-Uribe, 2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Datos para el cálculo de la concentración de compuestos fenólicos totales en la biomasa de *Spirulina (Arthrospira) maxima* cultivada en condiciones normales (+N+PAR) y en deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). Los datos se obtuvieron en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y en el Laboratorio de Estrés Oxidativo (Hernández-Uribe, 2016).

Muestra	Promedio $A_{760 \text{ nm}}$	Peso biomasa seca (mg)
+N+PAR	0.252	10
-N+PAR	0.138	8

Tomando la ecuación de la curva de calibración y despejando la variable X:

$$X = \frac{y - 0.0636}{0.0039} \quad \text{Ecuación 1}$$

Sustituyendo los valores promedio de  $A_{760 \text{ nm}}$  para cada muestra en la ecuación 1:

$$+N+PAR = \frac{0.252 - 0.0636}{0.0039} = 48.30 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$-N+PAR = \frac{0.138 - 0.0636}{0.0039} = 19.07 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Dividiendo entre el contenido de biomasa seca para cambio de unidades:

$$+N+PAR = \frac{48.30}{10} = 4.830 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ peso seco}$$

$$-N+PAR = \frac{19.07}{8} = 1.907 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ peso seco}$$

Gráficamente se observa en la figura 5.

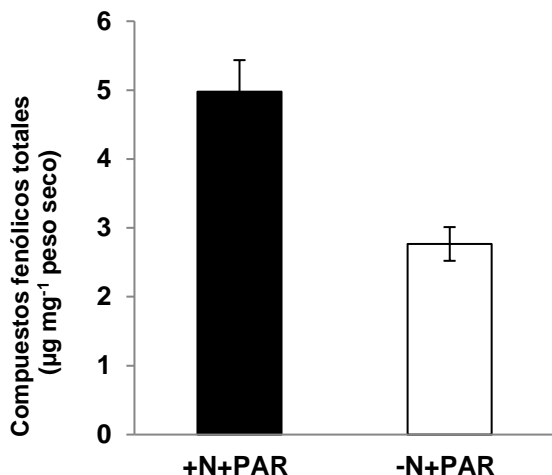


Figura 5. Concentración de compuestos fenólicos totales en *Spirulina (Arthrospira) maxima* cultivada en condiciones normales (+N+PAR) y en deficiencia de nitrógeno (-N+PAR).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ESCAMILLA-JIMÉNEZ**, C. I., Cuevas-Martínez, E. Y., Guevara-Fonseca, J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista Facultad de Medicina, UNAM. 52: 73-75.
- GARCÍA-MARTÍNEZ**, E., Fernández I., Fuentes A. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, España. 778 págs.
- GELEIJNSE**, J. M., Launer L. J., Van der Kuip D. A., Hofman A., Witteman J. C. 2002. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam study. The American Journal of Clinical Nutrition 75: 880-886.
- HERNÁNDEZ-URIBE**, F. 2016. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en la actividad fotosintética y en los compuestos antioxidantes de las cianobacterias *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum*. Tesis de Maestría. CIBNOR. 241págs.
- JOVANOVIC**, S. V., Steenken S., Simic M. G., Hara Y. 1998. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. *En*: Rice Evans C, Parker L (Eds.): Flavonoids in Health and Disease. Marcel Dekker, Nueva York, 137-161.
- KAROU**, D., Dicko, M. H., Simpore, J., Traore, A. S. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedical plants of Burkina Faso. African Journal of Biotechnology.4: 823-828.
- PÉREZ-TRUEBA** G. 2003. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. Revista Cubana de Investigación Biomédica 22(1): 48-57.
- PRAKASH**, D., Suri, S., Upadhyay, G., Singh, B. N. 2007. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medical plants. International Journal of Food Sciences and Nutrition 58: 18-28.
- ROBBINS**, R. J. 2003. Phenolic acids in food: an overview of analytical methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 2866-2887.
- SINGLETON** V. L., Rossi J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic- Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.
- TAIZ** L., Zeiger E. 2006. Secondary Metabolites and Plant Defense. *En*: Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. 778 pp.
- ZHANG** W. J., Björn L. O. 2009. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medical compounds in plants. Fitoterapia 80: 207-218.

## CAPÍTULO 16

# DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD), CATALASA (CAT) Y PEROXIDASAS TOTALES (POX) POR MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

<sup>1</sup>ORLANDO LUGO LUGO, <sup>1</sup>TANIA ZENTENO SAVÍN,  
<sup>2</sup>FREDY HERNÁNDEZ URIBE, <sup>2</sup>BERTHA OLIVIA ARREDONDO VEGA

<sup>1</sup>Laboratorio de Estrés Oxidativo. <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

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

La Paz, Baja California Sur, 23096, México.

olugo04@cibnor.mx, tzenteno04@cibnor.mx, fhuribe90@gmail.com, kitty04@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA
3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SUPERÓXIDO DISMUTASA EC
  - 1.15.1.1 TOTAL (SOD)
- 3.1. REACCIÓN ENZIMÁTICA
- 3.2. CÁLCULOS
  - 3.2.1 EJEMPLO DE CÁLCULOS
4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CATALASA EC 1.11.1.6 (CAT)
  - 4.1 REACCIÓN ENZIMÁTICA
  - 4.2 CÁLCULOS
    - 4.2.1 EJEMPLO DE CÁLCULOS
5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PEROXIDASAS TOTALES (POX)
  - 5.1 REACCIÓN ENZIMÁTICA
  - 5.2 CÁLCULOS
    - 5.2.1 EJEMPLO DE CÁLCULOS
6. RECOMENDACIONES
7. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** Antioxidantes, enzimas, SOD, CAT, POX.

---

### 1. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son átomos, moléculas o iones con un electrón desapareado. Las especies reactivas, incluyendo los radicales

libres, son altamente inestables y activas, por lo tanto, desencadenan reacciones químicas de oxidación en biomoléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Figura 1).

Los radicales libres se derivan principalmente de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre. Las especies reactivas incluyen radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroperóxido ( $HO_2^{\bullet}$ ), radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ), óxido nítrico (NO) y otras especies como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl) y peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) (Lu *et al.*, 2010).

En los organismos vivos, las especies reactivas se producen de manera normal como parte del metabolismo, en la mitocondria (organismos heterótrofos) así como en el cloroplasto de los organismos fotosintéticos (plantas, algas, microalgas), a través de la xantina oxidasa, peroxisomas, vía del ácido araquidónico y procesos de fagocitosis. Factores externos como radiación UV, contaminación ambiental, pesticidas, ozono entre otros, favorecen la producción de especies reactivas (Lobo *et al.*, 2010).

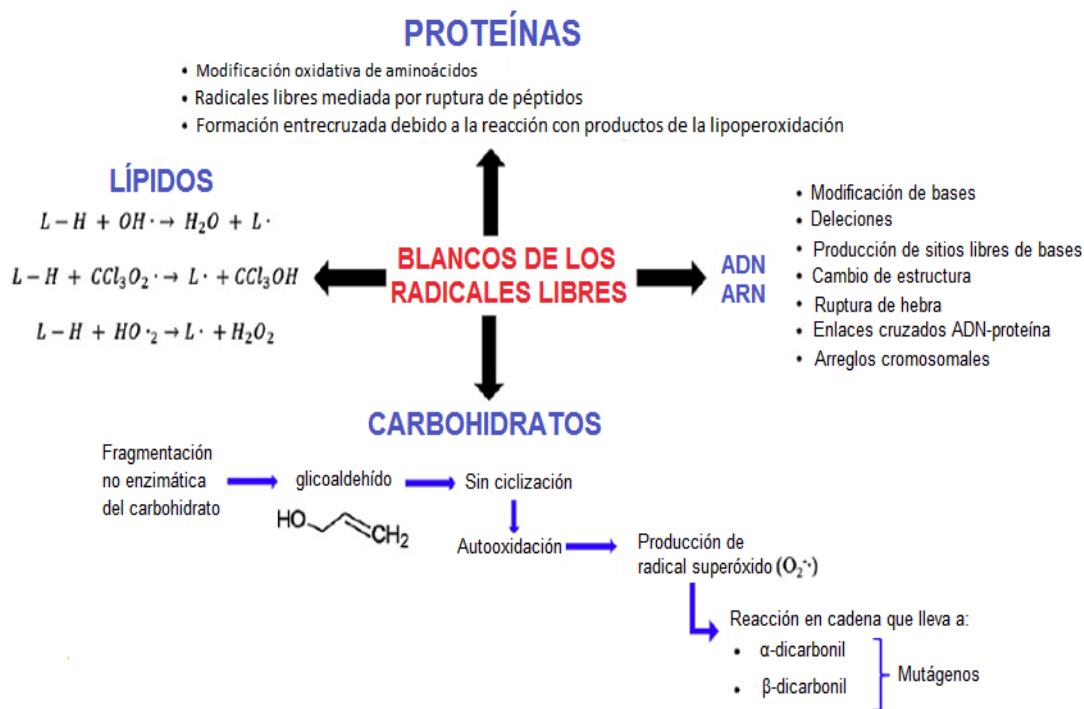


Figura 1. Blancos de oxidación de especies reactivas y radicales libres. Modificado de Dizdaroglu *et al.*, (2002); Valko *et al.*, (2004); Benov y Beema, (2003); Halliwell y Chirico, (1993) y Lobo *et al.*, (2010). Tomado de Caroch y Ferreira, (2013).

El equilibrio entre la producción de especies reactivas y su neutralización por los antioxidantes, es un proceso muy delicado ya que si este equilibrio se pierde, las células empiezan a sufrir las consecuencias del estrés oxidativo (Wiernsperger, 2003).

Los antioxidantes se encuentran naturalmente en todas las células de las microalgas y cianobacterias. Se clasifican con base a su forma de actuar en enzimáticos y no enzimáticos (Pietta, 2000; Ratnam *et al.*, 2006; Godman *et al.*, 2011) (Figura 2).

Los antioxidantes enzimáticos previenen la formación de otras especies reactivas, convirtiéndolas en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar, o también evitan la formación de radicales libres a partir de otras moléculas.

Ejemplo de ellos son las enzimas superóxido dismutasa (SOD) catalasa, (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Birben *et al.*, 2012).

Se han reportado diversas metodologías para la cuantificación de la actividad de las enzimas antioxidantes en sistemas biológicos. Quizás las más utilizadas son aquellas basadas en métodos espectrofotométricos, posiblemente debido a la sencillez del procedimiento; los requerimientos de equipos relativamente sencillos y la adaptabilidad a diferentes tipos de muestras biológicas. En este capítulo presentamos la información para el análisis de la actividad enzimática de tres de las enzimas antioxidantes en microalgas y cianobacterias (Hernández-Urbe, 2016).

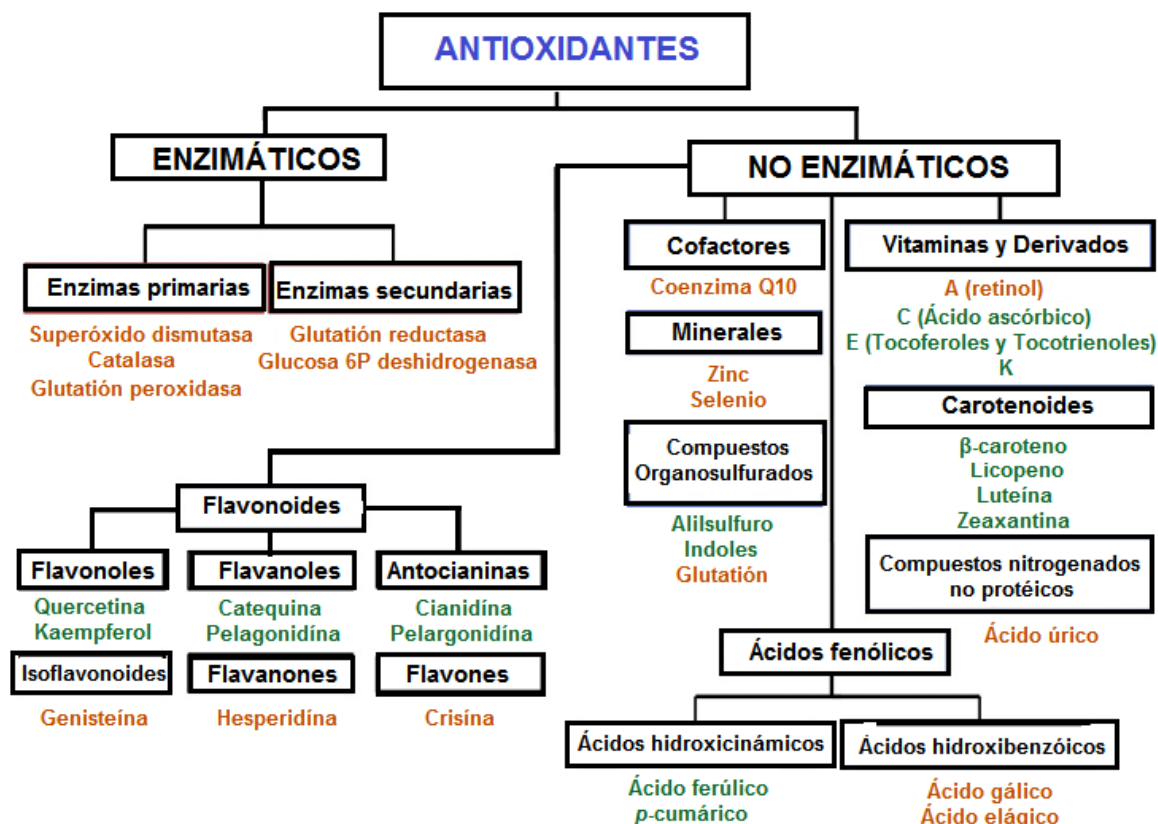


Figura 2. Clasificación de los antioxidantes con base a su forma de actuar. Modificado de Pietta, (2000); Ratnam *et al.*, (2006) y Godman *et al.*, (2011). Tomado de Carochó y Ferreira (2013).

## 2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la determinación de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) (Beyer y Fridovich, 1987) y catalasa (CAT) (Aebi, 1984), preparar la muestra de la siguiente manera:

- En tubos limpios, pesar 100 mg de biomasa fresca.
- Homogenizar y centrifugar (273 xg, 40 s en frío) con 2 mL de la solución para homogenizar (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7.5), y 20 µL de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF 1 mM en etanol).
- Centrifugar el homogenizado a 2,200 xg a 4°C durante 15 min.

## 3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD). EC 1.15.1.1

La determinación de la actividad enzimática de SOD se realiza de acuerdo al protocolo propuesto por Suzuki (2000) el cual se fundamenta en la generación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de manera constante a partir del sistema xantina/xantina oxidasa (Figura 3). El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> entra en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT), lo reduce y produce formazán, cuyo cambio puede ser detectado por el espectrofotómetro cuando la SOD inhibe la reducción del NBT a 560 nm.

**NOTA:** El extracto debe ser empleado inmediatamente para cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes.



Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasas totales (POX) por métodos espectrofotométricos

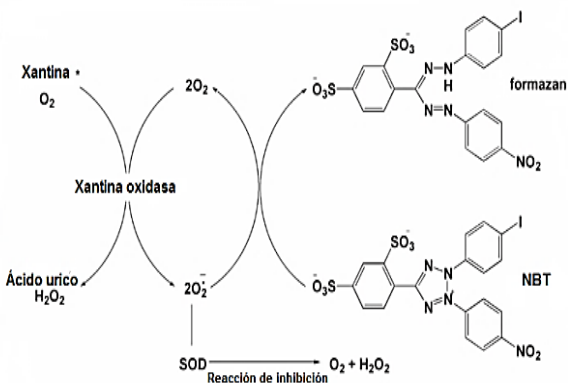


Figura 3. Fundamento para la determinación de SOD: el sistema xantina/xantina oxidasa produce el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> entra en contacto con el nitro azul de tetrazolio (NBT) lo reduce y genera formazán, cuyo cambio se puede detectar en el espectrofotómetro, cuando la SOD inhibe la reducción del NBT. Modificado de www.dojindo.com

### 3.1 Reacción enzimática

Todos los reactivos se mantienen en baño de agua a 25°C.

- En una celda de plástico, se mezcla 1.45 mL de la solución de trabajo (solución amortiguadora carbonato de sodio 50 mM, xantina 0.1 mM, NBT 0.025 mM, EDTA 0.1 mM), 25 µL de xantina oxidasa (0.1 U mL<sup>-1</sup> en sulfato de amonio 2 M) y 25 µL del extracto enzimático.
- El blanco se prepara sustituyendo el volumen de extracto enzimático con solución para homogenizar.
- Registrar en un espectrofotómetro el cambio de absorbancia a 560 nm (ΔA<sub>560</sub>) cada 30 s durante 5 min, calibrando el equipo con agua destilada.

### 3.2 Cálculos

Para realizar los cálculos es necesario definir que una unidad de SOD es la concentración de enzima necesaria para la inhibición del 50% de la máxima reacción del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> con el NBT. Por lo tanto, se debe calcular el cambio en la absorbancia a 560 nm (ΔAbs<sub>560</sub>) como la pendiente de la parte lineal de la gráfica absorbancia (Y) contra tiempo (X). La

actividad de la enzima se puede expresar como porcentaje de inhibición a partir del cambio de absorbancia a 560 nm por minuto (Ecuación 1) o en U de SOD mg<sup>-1</sup> proteína conociendo el contenido de proteína en la muestra en cuestión (Ecuación 2); sin embargo, la segunda forma es la mayormente utilizada y recomendada.

**Nota:** En caso de haber realizado una dilución del extracto enzimático, debe considerarse en los cálculos finales.

#### Ecuación 1

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\Delta A_{560} \text{ blanco} - \Delta A_{560} \text{ muestra})}{\Delta A_{560} \text{ blanco}} * 100$$

#### Ecuación 2

$$\frac{\text{U de SOD}}{\text{mg de proteína}} = \left( \frac{\% \text{ inhibición}}{50\% * \text{mL muestra}} \right) \text{ mg mL}^{-1} \text{ proteína}$$

### 3.2.1 Ejemplo de cálculos

Un ejemplo del cálculo para determinar la actividad antioxidante de la SOD de un cultivo de la cianobacteria *Phormidium persicinum* cultivada en medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) en condiciones normal (+N+PAR) y en estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) en un experimento realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y el Laboratorio de Estrés Oxidativo (Tabla 1) (Hernández-Urbe, 2016).

**Nota:** El contenido de proteínas fue determinado mediante la técnica de Lowry *et al.* (1951) descrito en el capítulo 7 de este manual.

Utilizando la ecuación 1 y los datos de la tabla 1 para el cálculo del % de inhibición en los dos tratamientos en *Phormidium persicinum* +N+PAR y -N+PAR tenemos:

**Para +N+PAR:**

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(0.008 - 0.004)}{0.008} * 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = 50$$

Tabla 1. Datos para determinar la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en un cultivo de la cianobacteria *Phormidium persicinum* cultivada en medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) en condiciones de crecimiento normal (+N+PAR) y en estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) en un experimento realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y el Laboratorio de Estrés Oxidativo (Hernández-Urbe, 2016).

Tratamientos	$\Delta A_{560nm}$ blanco	Promedio	$\Delta A_{560nm}$ muestra	Promedio	Proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Dilución
+N+PAR	0.0086	0.008	0.004	0.004	0.743	No aplica
	0.0083		0.004			
	0.0072		0.004			
-N+PAR	0.0121	0.011	0.010	0.010	0.859	1:40
	0.0123		0.010			
	0.0099		0.011			

Para -N+PAR:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(0.011 - 0.010)}{0.011} * 100$$

% Inhibición = **9.09**

Conocidos los % de inhibición para cada tratamiento, se calcula la actividad en términos de U de SOD mg<sup>-1</sup> proteína.

Para +N+PAR:

$$\frac{\text{U de SOD}}{\text{mg de proteína}} = \frac{\left( \frac{50}{50 * 0.025} \right)}{0.743}$$

$$\frac{\text{U de SOD}}{\text{mg de proteína}} = \mathbf{53.83}$$

Para -N+PAR:

$$\frac{\text{U de SOD}}{\text{mg de proteína}} = \frac{\left( \frac{9.09}{50 * 0.025} \right)}{0.859}$$

$$\frac{\text{U de SOD}}{\text{mg de proteína}} = \mathbf{8.47}$$

Considerando la dilución presentada en la tabla 1 para esta muestra tenemos:

$$\mathbf{8.47 * 40 = 338.80}$$

Gráficamente lo observamos en la figura 4.

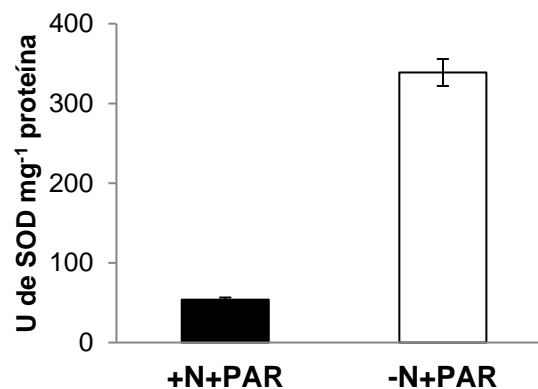


Figura 4. Actividad antioxidante de *Phormidium persicinum* en unidades (U) de superóxido dismutasa (SOD) mg<sup>-1</sup> proteína en condiciones normales de cultivo (+N+PAR) y en estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR).

#### 4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CATALASA (CAT). EC 1.11.1.6

La determinación de la actividad de la enzima CAT (Aebi, 1984) se fundamenta en la capacidad que tiene ésta en descomponer peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en agua y

oxígeno, por lo que se cuantifica la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un espectrofotómetro a 240 nm (Figura 5).



Figura 5. Reacción química de la descomposición de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en agua y oxígeno mediada por la enzima catalasa (CAT).

#### 4.1 Reacción enzimática

Todos los reactivos se mantienen en baño de agua a 25°C. La solución de trabajo para la enzima catalasa utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) como sustrato, el cual se debe preparar en fresco a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) que se diluye (1:1 v/v) con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M) antes de realizar la reacción enzimática.

- En una celda de cuarzo mezclar 1.5 mL de la solución de trabajo con 10 µL del extracto enzimático.
- Registrar el cambio en la absorbancia a 240 nm cada 15 s durante 3 min en un espectrofotómetro previamente calibrado con agua destilada.

**NOTA:** Si la reacción genera burbujas, la actividad de CAT es muy elevada, por lo que es necesario diluir con solución para homogenizar.

#### 4.2 Cálculos

Una unidad de CAT se define como la concentración de enzima necesaria para reducir 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por min. Para la determinación de la actividad de la enzima, es necesario calcular el cambio en la absorbancia a 240 nm ( $\Delta A_{240\text{nm}}$ ) por min como la pendiente de la parte lineal de la gráfica de A<sub>240</sub> (Y) contra tiempo (X). La actividad de CAT se calcula utilizando el cambio de absorbancia (Ecuación 3). Para expresarla en unidades con las que comúnmente se reporta, es necesario utilizar la concentración de proteínas en el extracto para expresarla como U de CAT mg<sup>-1</sup> proteína (Ecuación 4).

$$\frac{U \text{ CAT}}{\text{mL}} = \frac{\Delta A_{240\text{nm}}}{0.0394} * 1000 \dots \text{Ecuación 3}$$

En donde:

0.0394 es el coeficiente de extinción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm.

Utilizando la concentración de proteínas se tiene:

$$\frac{U \text{ CAT}}{\text{mg de proteína}} = \frac{\frac{\Delta A_{240\text{nm}} * 1000}{0.0394}}{\frac{\text{mg}}{\text{mg mL}^{-1} \text{ proteína}}} \dots \text{Ecuación 4}$$

#### 4.2.1 Ejemplo de cálculos

Los cálculos necesarios para determinar la actividad enzimática de CAT se realizan considerando el cambio de absorbancia ( $\Delta A_{240\text{nm}}$ ) y la concentración de proteínas.

Como ejemplo se dan los datos obtenidos (Tabla 2) a partir de un cultivo de la cianobacteria *Spirulina (Arthrospira) maxima* (Hernández-Urbe, 2016) cultivada en medio Jourdan (2006) en condiciones normales (+N+PAR) y sometida a estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR).

**Nota:** El contenido de proteínas fue determinado mediante la técnica de Lowry *et al.* (1951) descrito en el capítulo 7 de este manual.

Tabla 2. Datos de absorbancia para determinar la actividad enzimática de la catalasa (CAT) en *Spirulina (Arthrospira) maxima* en condiciones normales de cultivo (+N+PAR) y sometida a deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) (Hernández-Urbe, 2016).

Tratamiento	$\Delta A_{240\text{nm}}$	Promedio	Proteína (mg mL <sup>-1</sup> )
+N+PAR	0.0002	0.0002	0.8044
	0.0002		
	0.0001		
-N+PAR	0.0007	0.0003	0.4950
	0.0001		
	0.0001		

Utilizando las ecuaciones 1 y 2 para +N+PAR:

$$\frac{U \text{ CAT}}{\text{mL}} = \frac{0.0002}{0.0394} * 1000 = 5.08$$

Corrigiendo la ecuación con la concentración de proteínas en la muestra:

$$\frac{U \text{ CAT}}{\text{mg mL}^{-1} \text{ proteína}} = \frac{5.08}{0.8044} = 6.31$$

Haciendo los mismos cálculos para -N+PAR tenemos que:

$$\frac{U \text{ CAT}}{\text{mL}} = \frac{0.0003}{0.0394} * 1000 = 7.61$$

$$\frac{U \text{ CAT}}{\text{mg mL}^{-1} \text{ proteína}} = \frac{7.61}{0.4950} = 15.38$$

Gráficamente lo observamos en la figura 6.

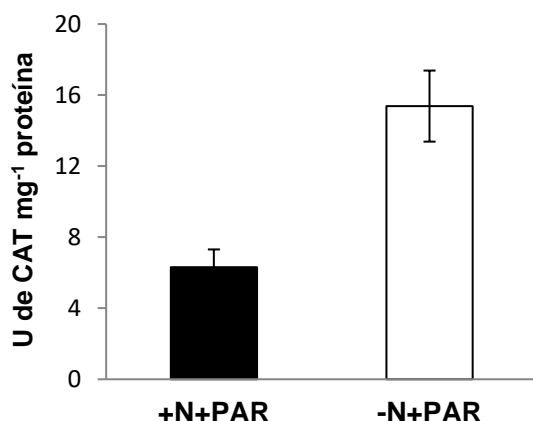


Figura 6. Actividad antioxidante de *Spirulina (Arthrospira) maxima* expresada en unidades (U) de catalasa (CAT) mg<sup>-1</sup> proteína en condiciones normales de cultivo (+N+PAR) y en estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR).

## 5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PEROXIDASAS TOTALES (POX)

La actividad de las enzimas POX se determina mediante la técnica propuesta por Kar y Mishra (1976). Las muestras de biomasa fresca se homogenizan de la misma forma como se describe en el apartado de preparación de muestras de este capítulo.

### 5.1 Reacción enzimática

- En celdas de cuarzo mezclar 1350 µL de agua, 125 µL de solución amortiguadora de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM, pH 7), 24.5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 mM), 500 µL de pirogalol (50 mM) y 500 µL del extracto enzimático.
- Incubar la mezcla de reacción durante 1 min a 25°C.
- Detener la reacción agregando de 250 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 % v/v).

**Nota:** Para el blanco, se mezclan todos los reactivos especificados anteriormente y en el mismo orden, sólo que la reacción se detiene inmediatamente después de agregar el volumen de extracto y se incuba.

### 5.2 CÁLCULOS

La actividad se determina en un espectrofotómetro a 420 nm. Una unidad (U) de actividad de POX se define como la concentración de enzima necesaria para incrementar 0.1 unidades de absorbancia por min. La actividad específica de POX se puede expresar con base en el cambio de absorbancia por min a 420 nm (Ecuación 5) o como U de POX mg<sup>-1</sup> proteína considerando la concentración de proteínas en la muestra (Ecuación 6).

$$\frac{U \text{ de POX}}{\text{mL}} = \frac{(\Delta A_{420} \text{ muestra} - \Delta A_{420} \text{ blanco})}{0.1} \dots \text{Ecuación 5}$$

$$\frac{U \text{ de POX}}{\text{mg de proteína}} = \frac{\left(\frac{U \text{ de POX}}{\text{mL}}\right)}{\text{mg mL}^{-1} \text{ proteína}} \dots \dots \text{Ecuación 6}$$

#### 5.2.1 Ejemplo de cálculos

Se presenta un ejemplo del cálculo para determinar la actividad antioxidante de las POX de un cultivo de la cianobacteria *Phormidium persicinum* cultivada en medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) en condiciones normales (+N+PAR) y en estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR) en un experimento realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y el Laboratorio de Estrés Oxidativo (Tabla 3) (Hernández-Urbe, 2016).

Tabla 3. Datos para determinar la actividad antioxidante de las peroxidasa total (POX) en un cultivo de la cianobacteria *Phormidium persicinum* cultivada en medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) en condiciones normal (+N+PAR) y en estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR). Experimento realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y el Laboratorio de Estrés Oxidativo (Hernández-Urbe, 2016).

Tratamiento	$\Delta A_{420nm}$ blanco	Promedio	$\Delta A_{420nm}$ muestra	Promedio	Proteína (mg/mL)
+N+PAR	0.0115	0.012	0.0286	0.028	0.7433
	0.0139		0.0283		
	0.0097		0.0278		
-N+PAR	0.023	0.025	0.062	0.060	0.8594
	0.022		0.060		
	0.029		0.061		

**Nota:** El contenido de proteínas fue determinado mediante la técnica de Lowry *et al.* (1951) descrito en el capítulo 7 de este manual.

Utilizando la ecuación 5 para ambos tratamientos tenemos:

**Para +N+PAR**

$$\frac{\text{U de POX}}{\text{mL}} = \frac{(0.028 - 0.012)}{0.1} = 0.16$$

**Para -N+PAR**

$$\frac{\text{U de POX}}{\text{mL}} = \frac{(0.060 - 0.025)}{0.1} = 0.35$$

Corrigiendo por la concentración de proteínas en las muestras:

**Para +N+PAR**

$$\frac{\text{U de POX}}{\text{mg mL}^{-1} \text{ proteína}} = \frac{0.16}{0.7433} = 0.215$$

**Para -N+PAR**

$$\frac{\text{U de POX}}{\text{mg mL}^{-1} \text{ proteína}} = \frac{0.35}{0.8594} = 0.407$$

Gráficamente lo observamos en la figura 7.

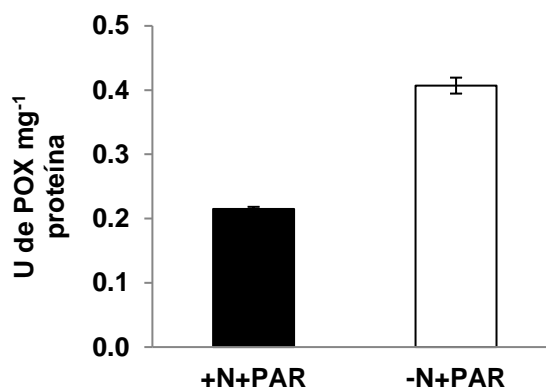


Figura 7. Actividad antioxidante de *Phormidium persicinum* expresada en unidades (U) de peroxidasa total (POX) mg<sup>-1</sup> proteína en condiciones normales de cultivo (+N+PAR) y en estrés por deficiencia de nitrógeno (-N+PAR).

## 6. RECOMENDACIONES

Para cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes, utilizar muestras frescas. Si no es posible procesar las muestras al momento de la cosecha de la biomasa, se deben mantener en el ultracongelador hasta su análisis, cubriendo los viales con papel aluminio para minimizar la exposición a la luz. Es preferible no prolongar el tiempo de almacenamiento de las muestras de microalgas y cianobacterias más allá de 3 meses posteriores a la cosecha.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AEBI, H.** 1984. Catalase *in vitro*. *En: Packer, L. (Ed.). Methods in Enzymology, Oxygen Radicals in Biological Systems*. Academic Press, Inc. EUA. 105: 121-126.
- BENOV, L., Beema, A. F.** 2003. Superoxide-dependence of the short chain sugars induced mutagenesis. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine* 34: 429–433.
- BEYER, W., Fridovich, I.** 1987. Assaying for superoxidase dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161: 559-566.
- CAROCHO, M., Ferreira, I. C. F. R.** 2013. A review of antioxidants, pro-oxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51: 15-25.
- BIRBEN, E., Murat-Sahiner U., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O.** 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* 5: 9-19.
- DIZDAROGLU, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodríguez, H.** 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine* 32: 1102–1115.
- GUILLARD, R. R. L., Ryther J. H.** 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal Microbiology*. 8: 229-239.
- GODMAN, M., Bostick, R. M., Kucuk, O., Jones, D. P.** 2011. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present and future. *Free Radicals Biology Medicine* 51: 1068-1084.
- HALLIWELL, B., Chirico, S.** 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 57: 715–724.
- HERNÁNDEZ-URIBE, F.** 2016. Efecto de la deficiencia de nitrógeno y la radiación UV en la actividad fotosintética y en los compuestos antioxidantes de las cianobacterias *Spirulina (Arthrospira) maxima* y *Phormidium persicinum*. Tesis de Maestría. CIBNOR. 241págs.
- JOURDAN, J. P.** 2006. Grow your own *Spirulina*. Manual artisan culture for the production of *Spiruline*. 146pp.
- LOBO, V., Phatak, A., Chandra, N.** 2010. Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4: 118–126.
- LOWRY, O. H., Rosenbrough N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry* 193: 265-272.
- LU, J., Lin, P. H., Yao, Q., Chen, C.** 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14: 840-860
- PIETTA, P. G.** 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7): 1035-1042.
- SUZUKI, K.** 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. *En: Taniguchi, N., Gutteridge, J. (Eds.). Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species*. Oxford University Press. R. U. 91-95 pp.
- KAR, M., Mishra D.** 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57: 315-319.
- RATNAM, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Shanana, D. K., Kumar, N. M. V. R.** 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal Control Release* 113: 189-207.
- VALKO, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., Telser, J.** 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266: 37–56.
- WIERNSPERGER, N. F.** 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metabolism* 29: 579–585.

## CAPÍTULO 17

# TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE MICROALGAS

<sup>1</sup>MARIO ARCE MONTOYA, <sup>2</sup>JULIO A. HERNÁNDEZ GONZÁLEZ,  
<sup>2</sup>MARIO ROJAS ARZALUZ, <sup>3</sup>OSKAR A. PALACIOS LÓPEZ,  
<sup>1,2</sup>HÉCTOR D. GARZA AVELAR, <sup>2</sup>GRACIA A. GÓMEZ ANDURO

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal. <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular de Plantas.

<sup>3</sup>Laboratorio de Microbiología Ambiental.

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

La Paz, Baja California Sur, 23096, México.

marce04@cibnor.mx, jahernan04@cibnor.mx, rojasarzaluz@gmail.com,  
oskar.palacios27@gmail.com, hdga88@hotmail.com, ggomez@cibnor.mx

---

### CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. TRANSFORMACIÓN DE *Chlorella sorokiniana* POR CO-CULTIVO CON *Agrobacterium tumefaciens*
- 2.1. REACTIVACIÓN Y CULTIVO DE *A. tumefaciens* y *C. sorokiniana*
- 2.2. CO-CULTIVO Y SELECCIÓN CON ANTIBIÓTICOS
3. TRANSFORMACIÓN DE *Neochloris oleoabundans* POR ELECTROPORACIÓN
- 3.1. CRECIMIENTO DE *N. oleoabundans*
- 3.2. PREPARACIÓN DEL ADN
- 3.3. ELECTROPORACIÓN Y SELECCIÓN
4. CONFIRMACIÓN MOLECULAR DE LA TRANSFORMACIÓN
- 4.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL
- 4.2. PREPARACIÓN DEL cADN
- 4.3. EXTRACCIÓN DE ADN
- 4.4. PCR
5. CONFIRMACIÓN HISTOQUÍMICA DE LA TRANSFORMACIÓN
- 5.1. PROTEÍNAS FLUORESCENTES
- 5.2. GUS
6. BIBLIOGRAFÍA

**Palabras clave:** Ingeniería genética, electroporación, ADN recombinante, proteína recombinante.

---

### 1. INTRODUCCIÓN

La modificación del patrón genético de una población de organismos ha permitido contar con modelos de estudio para una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en su respuesta a las condiciones ambientales o durante su interacción con otras especies; pero de manera significativa, las estrategias desarrolladas para ello, así como el conocimiento generado, ha permitido obtener mejor calidad y rendimiento de los productos y servicios derivados del aprovechamiento de estos recursos biológicos por las sociedades humanas, como parte de lo que hoy día se conoce como biotecnología.

En el caso de las plantas superiores y como parte del desarrollo de la agricultura en el mundo, se aplicaron estrategias basadas en la selección de individuos sobresalientes que serían empleados como progenitores de las nuevas forma en

que se apareaban estos, (endogamia y cruzamiento). Más tarde se desarrollaron estrategias no convencionales como la mutagénesis, donde se ocasionan mutaciones a nivel cromosómico o de la secuencia de ADN mediante la aplicación de agentes químicos o físicos; así como aquellas otras que se derivaron del desarrollo de las técnicas para el cultivo *in vitro* de células, órganos o tejidos vegetales y la capacidad para regenerar plantas completas a partir de ellos. Entre éstas se encuentran: la selección *in vitro*, la variación somaclonal o gametoclinal, la hibridación somática y cibridación, mediante la fusión de protoplastos, la dihaploidización y la generación de líneas isogénicas. El desarrollo de las técnicas moleculares de ADN recombinante ha permitido realizar la selección asistida por marcadores moleculares y la transformación genética. Esta última consiste en la modificación permanente y heredable del genotipo de un organismo, mediante la alteración de su propio genoma o por la introducción de uno o más genes foráneos, a través de una vía no sexual y empleando ADN recombinante.

La transformación genética de organismos vegetales puede efectuarse por vía indirecta, empleando *Agrobacterium tumefaciens* como organismo vector del ADN recombinante portando los genes a ser introducidos en la célula vegetal receptora; o también a través de diversos métodos que de manera directa introducen el ADN recombinante al citoplasma o al organelo blanco, entre los que se encuentran: la fusión con liposomas, la endocitosis del ADN foráneo, la microinyección, la sonicación con perlas de vidrio o con microfibras de carburo de sílice, la electroporación y la biobalística. Así mismo, en los últimos años se está desarrollando una estrategia para la edición del ADN de la célula blanco, empleando el sistema CRISPR/Cas que ofrece ventajas sobre otros métodos por su alta especificidad (Puchta, 2017).

En microalgas, a partir del trabajo pionero de Boynton *et al.* (1988) para la transformación de *Chlamydomonas reinhardtii* se han descrito diversos métodos que permiten la introducción de ADN foráneo, logrando superar las

limitaciones impuestas por la constitución de la pared celular en las diversas especies, pero fue hasta el 2004 cuando se describió la transformación de *C. reinhardtii* mediada por *A. tumefaciens* (Kumar *et al.*, 2004). A partir de entonces, el número de especies de microalgas transformadas genéticamente ha aumentado. En la tabla 1, se incluyen los primeros casos y actualmente se hace énfasis en su aplicación para la producción de proteínas recombinantes (Barrera y Mayfield, 2013) y en la modificación de rutas metabólicas involucradas en la síntesis de ácidos grasos para la producción de biocombustibles (Yu *et al.*, 2011), entre otras.

## **2. TRANSFORMACIÓN DE *Chlorella sorokiniana* POR CO-CULTIVO CON *Agrobacterium tumefaciens***

Se han reportado diversos métodos de transformación de microalgas con distintos niveles de eficacia. Uno de ellos es el empleo de *A. tumefaciens* como organismo vector para introducir genes foráneos en microalgas, al igual que se ha hecho en plantas superiores. Esto es posible por el plásmido pTi que se encuentra en las cepas patogénicas de esta bacteria. Una región de dicho plásmido, denominada T-DNA es transferida al genoma nuclear de las células vegetales mediante un mecanismo que no ha sido elucidado en su totalidad, sin embargo, la cantidad de reportes sobre la aplicación de este método en diversas especies de organismos vegetales es muestra de su efectividad (Gelvin, 2000). En el género de *Chlorella*, los primeros reportes de su transformación genética se realizaron empleando los métodos de biobalística (Dawson *et al.*, 1997; El-Sheekh, 1999), electroporación (Maruyama *et al.*, 1994; Chow y Tung, 1999) o mediante endocitosis empleando



Tabla 1. Métodos reportados para la transformación genética de microalgas hasta 2004.

Especie	Método de Transformación	Marcador de Selección	Construcción	Organelo blanco	Método de confirmación	Estabilidad	Referencia
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Biobalística	Medio mínimo HS (Sin fuente de carbono)	pBR313::Bam10frag (conteniendo <i>atpB</i> )	Cloroplasto	Restitución de la capacidad fotosintética	estable	Boynton et al., 1988
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Biobalística	Medio selectivo con nitrato	pMN24::Sall-BglIIFrag (conteniendo <i>nif1</i> )	Núcleo	Restitución de la actividad de Nitrato Reductasa	estable	Kindle et al., 1989
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Perlas de vidrio y PEG	Medios auxotróficos	Varias	Núcleo	Restitución de la actividad enzimática y estructural	estable	Kindle, 1990
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Microfibras de carburo de silice	Medio selectivo con nitrato	pMN24::Sall-BglIIFrag (conteniendo <i>nif1</i> )	Núcleo	Restitución de la actividad de Nitrato Reductasa	estable	Dunahay, 1993
<i>Volvox carteri</i>	Biobalística	Medio selectivo con nitrato	pJOE890::inseto incluye el gen <i>nif1</i>	Núcleo	Restitución de la actividad de Nitrato Reductasa	estable	Schiedlmeier et al., 1994
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Biobalística	Zeocin, Phleomycin	pfcpA/cat/B::sh ble	Núcleo	Southern blot, Northern blot, Western blot	estable	Apt et al., 1996
<i>Amphidinium</i> sp., <i>Symbiodinium microadriaticum</i>	Microfibras de carburo de silice	Hyg, G418, Kan	pMT NPT/GUS	Núcleo	GUS	inestable	ten Lohuis y Miller, 1998
<i>Chlorella kessleri</i>	Biobalística	Kan	pBI121	No reportado	GUS, PCR, Southern blot	estable	El-Sheekh, 1999
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Hyg	pCAMBIA1304	Núcleo	GFP, GUS, PCR	estable	Kumar et al., 2004

PEG (Kim *et al.*, 2012). Es hasta 2012 cuando se reportó por primera vez la transformación genética mediada por *Agrobacterium* en *C. vulgaris* (Cha *et al.*, 2012), quienes evaluaron diversos factores como la duración del precultivo, la densidad de bacterias, el pH del medio empleado durante el co-cultivo, así como la temperatura, la duración del período de co-cultivo y la concentración de acetosiringona, sobre la eficiencia de transformación en esta especie.

### 2.1 Reactivación y cultivo de *A. tumefaciens* y *C. sorokiniana*

1. *A. tumefaciens* fue reactivada de un stock en glicerol almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , inoculando 20 mL de medio LB ( $10\text{ g L}^{-1}$ ) de triptona;  $5\text{ g L}^{-1}$  de extracto de levadura;  $10\text{ g L}^{-1}$  de NaCl), suplementado con  $25\text{ mg L}^{-1}$  de rifampicina y  $50\text{ mg L}^{-1}$  de kanamicina como antibiótico de selección, de acuerdo a las cepas empleadas.
2. Se incuban por 2 días en agitación en oscuridad a  $27^{\circ}\text{C}$ , y al término, los cultivos son resembrados en el mismo medio y antibióticos por 24 h para obtener la suspensión a emplear en la transformación.
3. Para el co-cultivo, 1 mL del cultivo bacteriano se transfiere a tubos eppendorf de 1.6 mL y se concentran por centrifugación a  $2,431\times g$  por 5 min.
4. Se decanta el sobrenadante y la pastilla bacteriana se lava en dos ocasiones mediante centrifugación bajo las mismas condiciones, y decantando para eliminar los antibióticos y el medio LB, empleando para ello 1 mL de medio de inducción, consistente en Medio NB ( $8\text{ g L}^{-1}$  de Caldo Nutritivo), al cual se adiciona  $100\text{ }\mu\text{M}$  de acetosiringona, partiendo de un stock 1M (acetosiringona), disuelta en DMSO (dimetilsulfóxido).
5. Finalmente, se resuspende en medio de inducción a una  $\text{OD}_{600} = 0.2$  a  $0.5$ .
6. Por otra parte, a partir de cultivos con 4 días de edad de *C. sorokiniana*, las

microalgas son precultivadas, sembrándolas en placa conteniendo medio NB solidificado con 1.2% de agar y cultivándolas durante 2 días a  $28^{\circ}\text{C}$ .

7. Después de ese período, se vierte sobre la placa 1 mL de medio de inducción y con un asa triangular se resuspenden las células de la placa, recuperándolas con una pipeta Pasteur para transferirlas a un tubo eppendorf de 2 mL.

### 2.2. Co-cultivo y selección con antibióticos

1. Para el co-cultivo, las células de *C. sorokiniana* se concentran por centrifugación a  $2,431\times g$  por 5 min, se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y posteriormente se agregan  $200\text{ }\mu\text{L}$  de la suspensión de *A. tumefaciens* preparada previamente. Se mezclan resuspendiendo las células de *C. sorokiniana*.
2. Se concentran las células por centrifugación a  $2,431\times g$  por 5 min, se reduce el volumen del sobrenadante a  $50\text{ }\mu\text{L}$  que son inoculados en placas conteniendo medio de inducción. Se cultivan por 3 días en oscuridad a  $27^{\circ}\text{C}$ .
3. Al término del co-cultivo, las células se recuperan con 1 mL de medio líquido NB adicionado con  $250\text{ mg L}^{-1}$  de cefotaxima, transfiriéndolas a un tubo cónico de 50 mL donde el volumen del medio se completa a 7 mL para ser incubados en agitación a 120 rpm a  $27^{\circ}\text{C}$  y oscuridad por 2 días.
4. Al término de ese período, se concentran las células en 1 mL mediante centrifugación a  $1,031\times g$  por 10 min; se transfieren a tubos eppendorf y se concentran a un volumen de  $50\text{ }\mu\text{L}$  que son resembrados en placa conteniendo medio NB adicionado con  $50\text{ mg L}^{-1}$  de kanamicina y  $250\text{ mg L}^{-1}$  de cefotaxima.
5. Se cultivan durante 3 días en oscuridad y posteriormente se exponen a la luz bajo a un fotoperíodo de 16:8 h luz:oscuridad para la posterior selección de colonias

resistentes a kanamicina y la comprobación de la transformación.

### 3. TRANSFORMACIÓN DE *Neochloris oleoabundans* POR ELECTROPORACIÓN

La transformación nuclear estable de algunas especies de microalgas se ha logrado exponiendo la pared celular a pulsos de campos eléctricos de alta intensidad lo que se conoce como electroporación (Qin *et al.*, 2012). Este método consiste en aplicar pulsos eléctricos variados en intensidad, duración y número, para controlar la eficiencia de entrada de ADN exógeno a la célula (Coll, 2006).

Recientemente se ha reportado la aplicación de este método en *Neochloris oleoabundans* (Chungjatupornchai *et al.*, 2016) aunque deben considerarse diversos factores para estandarizar un protocolo de transformación en cada especie y aún entre diversas cepas. La resistencia del buffer de electroporación debe superar los 600 ohms, ya que la intensidad del voltaje pudiera superar la capacitancia del equipo. La concentración de sales o de buffer amortiguador incide directamente en la resistencia del mismo, a mayor concentración de éstas, menor es la resistencia y viceversa.

Por otra parte, el volumen de la muestra en la cubeta es inversamente proporcional a la resistencia, a menor volumen se obtiene una mayor resistencia del medio. Estos parámetros sirven al momento de considerar el tamaño de cubeta que se va a emplear (0.1, 0.2 o 0.4 cm). Uno de los parámetros que es ajustado en primera instancia es el voltaje, pues la combinación de voltaje y el tiempo de aplicación del mismo, inciden de manera directa en la eficiencia de la transformación.

La selección de transformantes se consigue gracias al uso de marcadores de selección, como son los genes de resistencia a antibióticos kanamicina o higromicina B por ejemplo.

Otro de los elementos que se debe considerar al planificar una estrategia de transformación,

en el caso de que se deseen producir proteínas recombinantes, es el uso de un promotor adecuado que dirija atinadamente la expresión del gen de interés.

Algunos de los promotores empleados en transformación genética de microalgas son por ejemplo,  $\beta$ 2-Tubulina ( $\beta$ 2-Tub) o el promotor híbrido HSP70A-RBCS2 (AR), ambos de *C. reinhardtii*. Se ha demostrado también que el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV) ha sido empleado para dirigir la expresión de genes heterólogos en microalgas como *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* (Kim *et al.*, 2002). Una manera de analizar la actividad de los promotores es por medio de genes reporteros como la proteína verde fluorescente (GFP) o  $\beta$ -glucoronidasa (GUS), los cuales permiten evaluar de una manera cualitativa y cuantitativa la actividad del promotor empleado.

#### 3.1. Crecimiento de *Neochloris oleoabundans*

1. Las células de *N. oleoabundans* deben de estar en fase logarítmica ( $OD_{750}$  0.4-0.5). Transferir 25 mL del cultivo a un tubo cónico de 50 mL.
2. Centrifugar las células a 1,031xg por 10 min, retirar el medio de cultivo hasta dejar un volumen máximo de 5 mL. Transferir 500  $\mu$ L del cultivo concentrado a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
3. Centrifugar a 14,005xg por 10 min. Decantar el exceso de medio de cultivo y lavar la pastilla celular con 500  $\mu$ L de buffer de electroporación (500 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM  $CaCl_2$ , 20 mM HEPES, 200 mM Manitol, 200 mM Sorbitol, pH 7.6).
4. Resuspender las células con vortex. Centrifugar nuevamente el cultivo y decantar el exceso de buffer.
5. Resuspender la pastilla celular en 60  $\mu$ L de buffer de electroporación.

### 3.2 Preparación del ADN

Agregar de 5 a 20  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico preferentemente a partir de una solución con una concentración de 1  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de ADN. Homogenizar la mezcla con la punta de la micropipeta.

### 3.3 Electroporación y selección

1. Transferir el volumen total de las células a las celdas de electroporación.
2. Dejar incubar en hielo por 5 min.
3. Configurar el electroporador con 0.7 kV  $\text{cm}^{-1}$  de voltaje y 2 ms de duración.
4. Colocar la celda en el carril y cuidar que las placas estén completamente secas.
5. Meter el carril hasta hacer contacto con los electrodos.
6. Presionar el botón de "pulse" y esperar hasta que el equipo emita un sonido.
7. Incubar la celda en hielo durante 5 min. Agregar 350  $\mu\text{L}$  de medio NB, mezclar bien con el cultivo y recuperar con una pipeta Pasteur.
8. Transferir el cultivo a un tubo eppendorf de 1.5 mL y dejar incubando al menos 30 min en agitación constante a 27°C.
9. Tomar 25  $\mu\text{L}$  del cultivo y sembrar en medio NB y NB + 50  $\mu\text{g } \text{L}^{-1}$  de kanamicina.
10. Dejar incubando a 27°C con fotoperíodo de 16:8 h luz:oscuridad hasta el desarrollo de colonias. Una vez que hayan crecido las colonias, se debe proceder a aislarlas usando un palillo estéril, inoculando una placa con medio de selección nueva y enjuagar el palillo en agua Milli-Q® (MQ) para realizar la confirmación de la transformación mediante PCR de colonia.

## 4. CONFIRMACIÓN MOLECULAR DE LA TRANSFORMACIÓN

### 4.1 Extracción de ARN total

La importancia del estudio del ARN en organismos eucariotas radica en que es la información genética que se está

transcribiendo en el preciso momento en que se toma la muestra. En los organismos genéticamente modificados es crucial demostrar que los eventos son funcionales. Estos eventos pueden estar compuestos por promotores inducibles, es decir, que sean regulados por un fenómeno biológico, como pueden ser la luz, la sequía, patógenos, estrés, entre otros (Kuhlemeier *et al.*, 1989; Banerjee *et al.*, 2013). Estos promotores a diferencia de los promotores constitutivos permiten que se transcriba el ARN del gen de la construcción cuando éste sea necesario y no todo el tiempo. En plantas vasculares se han identificado promotores para la expresión de genes de manera constitutiva, expresión de manera inducible y promotores tejido-específico, que sólo se expresan en frutas, semillas, flores, raíces o tejidos vasculares (Dutt *et al.*, 2014). En años recientes se han descrito transcriptomas y genomas de varias especies de microalgas (Corteggiani *et al.*, 2014, Ngan *et al.*, 2015, Vieler *et al.*, 2012, Zheng *et al.*, 2013), lo que servirá de base para el estudio de promotores inducibles.

La extracción de ARN y la posterior síntesis de cADN (ADN complementario) permitirá que por medio de una reacción de PCR se demuestre que el gen de interés del evento se transcribe.

En 1987 Chomczynski y Sacchi, desarrollaron una técnica de extracción de ARN de un solo paso, empleando una solución de isotiocianato de guanidina, fenol y cloroformo, donde el homogenizado es extraído a pH  $4.3 \pm 0.2$ . Con base en este reporte se desarrolló el reactivo de trizol (patente en E.U.A. No. 5346994) que consiste en una solución monofásica de isotiocianato de guanidina y fenol. La extracción se fundamenta en el uso de un agente caotrópico (isotiocianato de guanidina) que rompe los enlaces de hidrógeno que se presenta entre las moléculas de agua y las macromoléculas, desnaturalizando y disolviendo proteínas y ácidos nucleicos. La separación del ARN con respecto al ADN y a las proteínas, resulta del uso de una solución ácida (isotiocianato de guanidina, acetato de

sodio, fenol y cloroformo) donde el ARN total permanece en la fase superior acuosa de la mezcla, mientras que el ADN y las proteínas permanecen en la interfase o en la fase inferior orgánica. Finalmente se recupera el ARN mediante una precipitación con isopropanol (Sambrook y Russell, 2001).

**Puntos críticos:** Evitar contaminación por RNAsas, estas enzimas son muy estables y difíciles de inactivar ya que no requieren de cofactores, por esta razón todas las soluciones que se utilizan se preparan con una solución de dietilpicrocarbonato (DEPC), el cual se une covalentemente a las RNAsas inhibiéndolas (Sambrook y Russell, 2001).

Procedimiento:

1. Todo el material se esteriliza en una autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atm de presión. La mesa y las micropipetas se tratan con RnaseZAP.
2. Concentrar el cultivo de *C. sorokiniana* mediante centrifugación a 3,451xg por 5 min. Pasado el tiempo, decantar el medio y resuspender en vortex la pastilla celular con el medio sobrante.
3. Transferir a un mortero frío el cultivo concentrado. Agregar nitrógeno líquido y macerar (realizar este macerado 2 veces).
4. Agregar Trizol, evitando que el macerado se descongele y procurando que el mortero y el pistilo se mantengan fríos, para macerar nuevamente con el Trizol.
5. Con ayuda de una micropipeta mezclar bien y pasar 1 mL de la mezcla a tubos eppendor de 1.5 mL de capacidad.
6. Centrifugar los tubos a 11,000xg durante 15 min a 4°C
7. Tomar 500 µL y pasar a un tubo nuevo; agregar 125 µL de cloroformo y mezclar por inversión 15 veces
8. Centrifugar a 13,000xg por 15 min a 4°C.
9. Recuperar en un tubo nuevo 300 µL del sobrenadante y agregar 250 µL de isopropanol 100 %, mezclar por inversión 5 veces e incubar 10 min a 4°C.

10. Centrifugar a 14,000xg por 15 min a 4°C.
11. Decantar el isopropanol y dejar secar la pastilla (máximo 20 min).
12. Lavar la pastilla con 100 µL de etanol al 70% (preparado con agua DEPC), aplicando semi-inversión 3 veces.
13. Centrifugar a 16,000xg por 8 min a 4°C. Decantar el etanol y dejar secar la pastilla (máximo 20 min).
14. Resuspender en 30 µL con agua DEPC e incubar a 65°C por 5 min. Posteriormente pasar a hielo.
15. Almacenar a -80°C.
16. Correr una electroforesis con 500 ng de ARN, previamente elaborar un gel de agarosa al 1% en TAE con 5% de hipoclorito de sodio (Aranda *et. al.*, 2012).

#### 4.2 Preparación de cADN

La síntesis de cADN debe realizarse con un *primer* específico al gen que se quiere obtener o con un *primer* oligo dT.

El siguiente procedimiento es conforme al manual de la enzima ImProm-II™ Transcriptasa Reversa A3802 de Promega:

#### A. Previo a la preparación del templado se degrada el ADN genómico que pueda tener el ARN.

1. En un tubo de 0.6 mL se prepara la mezcla:

Componentes	Cantidad
Templado de ARN total	1 µg
Amortiguador 10X de la reacción de DNase I	0.5 µL
DNase I (1U µL <sup>-1</sup> )	0.5 µL
Agua DEPC	cbp 5 µL

2. Incubar por 15 min a temperatura ambiente.

- Inactivar la DNase I adicionando 0.5  $\mu\text{L}$  de EDTA 25 mM y calentando a 65°C por 10 min.

**B. Preparación de ARN templado con el primer.**

- Poner en hielo tubos de PCR de pared delgada y para cada 20  $\mu\text{L}$  de reacción de transcriptasa reversa (RT), combinar:

Componentes	Cantidad
Templado de ARN total	1 $\mu\text{g}$
Primer	20 pmol o 0.5 $\mu\text{g}$
Agua DEPC	cbp 5 $\mu\text{L}$

- Inmediatamente incubar a 70°C por 5 min.
- Enfriar inmediatamente en un baño de hielo por lo menos 5 min y mantener en hielo hasta después de agregar la mezcla con la RT.

**C. Preparar la mezcla maestra (master mix) de la transcriptasa reversa.** Mantener en hielo la mezcla en todo momento.

- Para 20  $\mu\text{L}$  de la reacción de RT, combina:

Componente	Concentración final	Master Mix
		Volumen 1X
Agua-DEPC		5.6 $\mu\text{L}$
ImProm-II buffer 5X	1X	4 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	3 mM	2.4 $\mu\text{L}$
Mezcla dNTP	0.5 mM	1 $\mu\text{L}$
RNasin recombinante	1 U $\mu\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{L}$
Agitar la mezcla con vortex		

Transcriptas a reversa Improm-II		1 $\mu\text{L}$
Volumen final		15 $\mu\text{L}$

- Mezclar suavemente usando el vortex y centrifugar dando un pulso.
- Colocar 15  $\mu\text{L}$ .

**D. Adicionar mezcla de reacción al templado de ARN:**

A cada 5  $\mu\text{L}$  de templado y primer, añadir 15  $\mu\text{L}$  de mezcla de RT. El volumen de cada reacción debe ser de 20  $\mu\text{L}$ .

**E. Transcripción reversa**

En un termociclador correr el siguiente programa

- Alineamiento del primer con el ARN templado a 25°C por 5 min.
- Extensión de la primera cadena a 42°C por 60 min.
- Inactivación de la transcriptasa reversa, incubando a 70°C por 15 min.
- Almacenar a -20°C o elaborar una reacción de PCR como se describió previamente.

**4.3 Extracción de ADN**

Existen varios protocolos diseñados para extraer ADN. La selección del protocolo depende del material a emplear y del uso que se espere dar al ADN extraído, considerando el rendimiento, la pureza, la reproducibilidad, además debe de minimizar el riesgo de contaminación cruzada. Un paso inevitable en la extracción de ácidos nucleicos es la disrupción de tejidos, células y la desnaturalización de los complejos de nucleoproteínas.

Para homogenizar el tejido en plantas vasculares se utiliza nitrógeno líquido, además de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) al 3% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 0.2%. Estos compuestos

se emplean para romper las membranas celulares, separar los carbohidratos y desnaturalizar las proteínas (Doyle y Doyle 1987).

En microalgas se han empleado métodos de extracción similares, empleando CTAB y  $\beta$ -mercaptoetanol al 2% (Dawson *et al.*, 1997; Li y Tsai, 2009).

El fundamento de la extracción es que el CTAB, al ser un detergente no iónico, precipita ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos en soluciones de fuerza iónica baja (Sambrook y Russell, 2001); mientras que las proteínas y los polisacáridos neutros están solubles. En cambio en soluciones de fuerza iónica alta, el CTAB no precipita los ácidos nucleicos y formará complejos con proteínas. Posteriormente se emplean solventes orgánicos como el cloroformo para eliminar las proteínas que hayan quedado en la solución junto al ADN y finalmente se eliminan las sales restantes con lavados de alcohol etílico al 70%.

#### Procedimiento:

1. Todo el material se esteriliza en autoclave a 121°C por 20 min a 1 atm de presión.
2. Cosechar 40 mL de cada cultivo de microalgas, centrifugando a 1,031xg por 10 min. Decantar el sobrenadante.
3. Resuspender las microalgas en los restos de sobrenadante y transferirlo a un tubo eppendorf de 2 mL.
4. Centrifugar a 2,478xg por 2 min, eliminar el sobrenadante por decantación. Agregar 700  $\mu$ L de la solución de lisis, nuevamente centrifugar a 2,478xg por 2 min.
5. Macerar las células con un pistilo por 30 s e inmediatamente después incubar a 65°C por 30 min, mezclar invirtiendo el tubo varias veces cada 5 min.
6. Agregar 600  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) homogenizando por inversión, posteriormente centrifugar a 9,911xg por 10 min.

7. Recuperar la fase acuosa (fase superior) en un tubo de 1.6 mL y precipitar el ADN, adicionando 500  $\mu$ L de isopropanol y mezclar por inversión e incubar a -20°C por 30 min.
8. Centrifugar a 16,750xg por 15 min. Eliminar el sobrenadante.
9. Lavar la pastilla de ADN, agregando 1 mL de etanol al 70%.
10. Centrifugar a 16,750xg por 15 min y eliminar el sobrenadante.
11. Secar el ADN, dejando invertidos los tubos durante 5 min.
12. Resuspender la pastilla con 20  $\mu$ L de agua MQ.
13. Determinar la concentración del ADN a partir de la absorbancia a 260 nm empleando el Nanodrop.

#### 4.4 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, se usa para obtener millones de copias de un fragmento de ADN; para esto se requiere de un ADN templado, la enzima ADN polimerasa y de un par de *primers* o iniciadores. Los *primers* indican donde comenzará a trabajar la enzima ADN polimerasa.

Los usos de esta reacción van desde la obtención de un gen de interés, el diagnóstico de la presencia de una bacteria, hongo o virus (Díaz-Quíñonez *et al.*, 2016) que sea agente causal de una enfermedad y más recientemente en las técnicas de secuenciación masiva (Mutz *et al.*, 2013).

Una práctica usual antes de amplificar un gen problema, es amplificar un gen ya estandarizado en el organismo de interés. Taberlet y cols. (1991), diseñaron *primers* que amplifican una región del ADN de cloroplastos; de algas, briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas, resultando en un excelente control positivo de las reacciones de PCR en ADN de organismos con cloroplastos.

**Procedimiento:**

1. En un tubo estéril, combinar los siguientes reactivos, excepto el ADN. Mantener todo el tiempo el tubo en hielo. Preparar la mezcla maestra (master mix), calculando el volumen de cada reactivo de acuerdo al número de muestras.

Componente	Concentración final	Master Mix
		Volumen 1X
Buffer de reacción 5X	1X	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.5 mM	1.25 µL
dNTP's 2.5 mM cada uno	0.05 mM	0.25 µL
Primer Forward 10 µM	0.5 µM	0.625 µL
Primer Reverse 10 µM	0.5 µM	0.625 µL
Taq polimerasa 5 U µL <sup>-1</sup>	0.625 U	0.125 µL
ADN 50 ng µL <sup>-1</sup>	4 ng µL <sup>-1</sup>	1 µL
Agua milliQ		6.125 µL
Volumen total		12.5 µL

Es muy importante descongelar completamente y agitar con vortex todos los reactivos excepto la enzima ADN polimerasa.

2. Mezclar con vortex la mezcla maestra, centrifugar dando un pulso.
3. Agregar 11.5 µL de mezcla maestra a cada tubo de reacción de PCR.
4. Agregar 1 µL de templado con una concentración de 50 ng/µL.
5. Centrifugar los tubos de PCR para bajar todo el volumen.

6. Colocar los tubos en el termociclador, seleccionar el programa con los pasos de la reacción:

Paso	Temperatura	Tiempo	Núm. de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	0.5 min	35
Alineamiento	55°C	0.5 min	
Extensión	72°C	0.5 min	
Extensión final	72°C	10 min	1
Mantener	25°C	∞	1

7. Agregar 2 µL de la solución carga a cada tubo de PCR
8. Elaborar un gel de electroforesis al 1% de agarosa en TAE 1X.
9. En cada pozo del gel, cargar 8 µL de cada muestra, y en otro pozo, 4 µL del marcador de número de bases, 1Kb Plus DNA Ladder (Promega).
10. Visualizar y documentar el gel en un fotodocumentador.

**5. CONFIRMACIÓN HISTOQUÍMICA DE LA TRANSFORMACIÓN**

Dentro de los ensayos de transformación de organismos resulta necesario dar seguimiento a los productos de nuestras construcciones genéticas, una vez que estas han sido transferidas a las células blanco, para cumplir diversos objetivos como puede ser: estudiar la regulación de la expresión de un promotor en específico en el organismo de interés e identificar patrones de expresión (si es tejido- específica, espacio-temporal, constitutiva o inducible), la localización sub-celular de algún péptido, entre otros.

En ingeniería genética se hace uso de genes reporteros que van a ser expresados de manera independiente, paralela o fusionados



para la producción de un solo péptido junto a la proteína de interés, donde el objetivo principal es evidenciar la presencia y/o actividad del arreglo genético.

En organismos fotosintéticos los más ampliamente utilizados son: las proteínas con actividad bioluminiscente conocida como luciferasa (*i.e.* gen *ff-LUC*; Ow *et al.*, 1986); las proteínas con características autofluorescentes como la proteína verde fluorescente GFP (*i.e.* gen *gfp* Haselhof y Amos, 1995); y la enzima  $\beta$ -glucoronidasa (*i.e.* Gen *udiA*; Farrel y Beachy, 1990).

En el caso el gen reportero *udiA* que codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa E.C. 3.2.1.31 (GUS), se han implementado técnicas cualitativas y cuantitativas haciendo uso de sustratos como: X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-glucoronido), el cual por medio de la actividad enzimática de GUS corta el enlace glucosídico y posteriormente ocurre una dimerización de la aglicona resultante y produce el característico precipitado color azul índigo.

Otro sustrato es 4-MUG (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucoronido), en cuyo caso la aglicona 4-metilumbeliferil es liberada por medio de la reacción enzimática y puede ser cuantificada por la emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 455 nm siguiendo a una excitación con 365 nm (Kim *et al.*, 2006).

### 5.1 Proteínas fluorescentes

Las proteínas fluorescentes (FP) se emplean ampliamente como gen reportero en diversos estudios de transformación genética. En la actualidad existen proteínas fluorescentes con rangos distintos de excitación y emisión en el espectro, generados a partir de la modificación genética de la Proteína Verde Fluorescente o GFP (por sus iniciales en inglés), las cuales han sido utilizadas en microalgas (Rasala *et al.*, 2013).

Tal es el caso de la proteína fluorescente cian (CFP) (Lim *et al.*, 2013), amarillo (YFP) (Neupert *et al.*, 2009), rojo o mCherry (Yang *et al.*, 2014); las cuales se excitan y emiten a

diferentes longitudes de onda y pueden ser observadas directamente en microscopio de epifluorescencia, con las siguientes combinaciones de filtros:

Proteína	Excitación (nm)	Emisión (nm)
GFP	488	510
CFP	405	485
YFP	495-510	520-550
mCherry	587	610

### 5.2 GUS

1. Las células son cosechadas a partir del medio de selección ya sea por centrifugación 1000xg por 5 min. (En medio líquido o por asada en medio sólido) en un tubo de 1.5 mL.

**IMPORTANTE:** A partir de este momento trabajar sin una fuente de luz externa o cubrir los recipientes o contenedores de reacción con papel aluminio.

2. En caso de medio líquido decantar el sobrenadante. Lavar con 500  $\mu$ L de buffer de tinción de GUS.
3. Preparar el 2X-buffer de tinción: 100 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (pH 7.0) / 10 mM EDTA (pH 7.0) / 0.3 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  / 0.3 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  / 0.1% Tritón X-100.
4. Preparar el Stock X-GLUC: 20 mM X-GLUC disuelto en metanol.
5. Por cada muestra preparar 3 volúmenes de buffer de tinción agregando X-GLUC a una concentración final de 1 mM.
6. Agregar la cantidad suficiente de buffer de tinción 1 mM X-GLUC, para cubrir al menos tres veces el tamaño del paquete celular.
7. Colocar el tubo de 1.5 mL con la tapa abierta en una gradilla dentro de una desecador, y aplicar vacío con la ayuda de una bomba.

8. Colocar el desecador cubierto con papel aluminio en incubación a 37°C durante toda la noche al menos 12 h (de preferencia con agitación suave).

**NOTA:** Los tiempos de incubación pueden ser variables dependiendo de los niveles de expresión de GUS (2-16 h).

9. Centrifugar 1000xg por 5 min y descartar el sobrenadante

**OPCIONAL:** Para eliminar los pigmentos: Agregar acetona al 70% y llevar a agitación suave durante 2 h (3X).

10. Visualizar al microscopio óptico.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- APT, K. E.** Kroth-Pancic, P. G., Grossman, A. R. 1996. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Molecular and General Genetics* 252: 572-579.
- ARANDA P.S.,** Lajolie D. M, Jorcuk, C. L., 2012. Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analysing RNA Quality. *Electrophoresis* 33: 366-369.
- BANERJEE J.,** Sshoo, D. K., Dey, N., Houtz, R. L., Maiti, I. B. 2013. An Intergenic Region Shared by At4g35985 and At4g35987 in *Arabidopsis thaliana* is a Tissue Specific and Stress Inducible Bidirectional Promoter Analyzed in Transgenic *Arabidopsis* and Tobacco Plants. *PLoS One* 8(11).
- BARRERA D. J.,** Mayfield, S. P. 2013. High-value Recombinant Protein Production in Microalgae. *En: Richmond A., Hu Q. (Eds.). Handbook of Microalgal Culture. Applied Phycology and Biotechnology, 2<sup>d</sup> Ed. John Wiley and Sons, Ltd. Published by Blackwell Publishing Ltd. 532-544 pp*
- BOYNTON J. E.,** Gillhan, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson A. M., Jones, A. R., Randolph-Andeseron B. L., Robertson D., Klein, T. M., Shark, K. B., Sanford, J. C. 1988. Chloroplast Transformation in *Chlamydomonas* with High Velocity Microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.
- CHA T. S.,** Yee, W., Aziz, A. 2012. Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1771-1779.
- CHOMCZYNSKI P.,** Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- CHOW, K-C.,** Tung, W. L. 1999. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Reports* 18: 778-780.
- CHUNGJATUPORNCHAI W.,** Kitraksa, P., Fa-Aroonsawat, S. 2016. Stable nuclear transformation of the oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by electroporation. *Journal of Applied Phycology* 28: 191-199.
- COLL J. M.,** 2006. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4: 316-330.
- CORTEGGIANI C. E.,** Telatin, A., Vitulo, N., Forcato, C., D'Angelo, M., Schiavon, R., Vezzi, A., Giacometti, G. M., Morosinotto, T., Valle, G. 2014. Chromosome Scale Genome Assembly and Transcriptome Profiling of *Nannochloropsis gaditana* in Nitrogen Depletion. *Molecular Plant* 7: 323-335.
- DAWSON H. N.,** Burlingame, R., Cannons, A. C., 1997. Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Current Microbiology* 35: 356-362.
- DÍAZ-QUIÑONEZ J. A.,** Escobar-Escamilla, N., Wong-Arámbula C., Vázquez-Pichardo M., Torres-Longoria, B., López-Martínez, I., Ruiz-Matus, C., Kuri-Morales P., Ramírez\_González, J. E., 2016. Asian Genotype Zika Virus Detected in Traveler Returning to Mexico from Colombia. *Emerging Infectious Diseases* 22: 937-939.
- DOYLE J. J,** Doyle, J. L, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- DUNAHAY T. G.,** 1993. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon

- carbide whiskers. *Biotechniques* 15:452-460
- DUTT M.**, Dhekney, S. A., Soriano, L., Kandel, R., Grosser, J. W., 2014. Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Horticulture Research*, 1, 14047; doi:10.1038/hortres.2014.47.
- EL-SHEEKH, M. M.** 1999. Stable transformation of the intact cells of *Chorella kessleri* with high velocity microprojectiles. *Biologia Plantarum* 42: 209-216.
- FARRELL L. B.**, Beachy R. N., 1990. Manipulation of  $\beta$ -glucuronidase for use as a reporter in vacuolar targeting studies. *Plant Molecular Biology* 15: 821-825.
- GELVIN S. B.**, 2000. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 223-256.
- HASELOFF J.**, Amos, B. 1995. GFP in plants. *Trends in Genetics*, 11: 328-329.
- KIM D.**, Kim, Y. T., Cho, J. J., Bae, J. H., Hur, S. B., Hwang, I., Choi, T. J. 2002. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Marine Biotechnology*. 4: 63–67
- KIM K. W.**, Franceschi, V. R., Davin, L. B., Lewis, N. G. 2006.  $\beta$ -Glucuronidase as reporter gene. *Arabidopsis Protocols*, pp 263-273.
- KINDLE K. L.** 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of National Academy of Science USA* 87: 1228-1232.
- KINDLE K. L.**, Schnell, R. A., Fermindez, E., Lefebvre, P. A., 1989. Stable Nuclear Transformation of *Chlamydomonas* Using the *Chlamydomonas* Gene for Nitrate Reductase. *The Journal of Cell Biology* 109: 2589-2601.
- KUHLEMEIER C.**, Strittmater, G., Ward, K., Chua, N.-H., 1989. The Pea *rbcS-3A* Promoter Mediates Light Responsiveness but not Organ Specificity. *The Plant Cell* 1: 471-478.
- KUMAR S. V.**, Misquitta, R. W., Reddy, V. S., Raob B. J., Rajama, M. V., 2004. Genetic transformation of the green alga-*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 166: 731-738
- LI SI-SHEN**, Tsai Huai-Jen, 2009. Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. *Fish and Shellfish Immunology* 26: 316-325.
- LIM J. M.**, Ahnj-W., Hwangbo, K., Choi, D.-W., Park, E.-J., Hwang, M. S., Liu, J. R., Jeong, W.-J., 2013. Development of cyan fluorescent protein (CFP) reporter system in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and macroalgae *Pyropia* sp. *Plant Biotechnology Reports* 7: 407-414.
- MARUYAMA, M.**, Hoákova, I., Honda, H., Xing, X.-H., Shirsgsmi, N., Unno, H. 1994. Introduction of foreign DNA into *Chlorella saccharophila* by electroporation. *Biotechnology Techniques* 8: 821-826.
- MUTZ K.-O.**, HEILKENBRINKER A., LÖNNE M., WALTER J.-G., STAHL F., 2013. Transcriptome analysis using next-generation sequencing, *Current Opinion in Biotechnology* 24:22-30
- NEUPERT J., KARCHER D., BOCK R., 2009.** Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *The Plant Journal* 57:1140-1150.
- NGAN C.-Y.**, Wong, C.-H., Choi, C., Yoshinaga, A. Y., Louie, K., Jia, J., Chen, C., Bowen, B., Cheng, H., Leonelli, L., Kuo, R., Baran, R., García-Cerdán, J. G., Pratap, A., Wang, M., Lim, J., Tice, H., Daum, C., Xu, J., Northen, T., Visela, A., Bristow, J., Niyogi, K. K., Wei, C.-L. 2015. Lineage-specific chromatin signatures reveal a regulator of lipid metabolism in microalgae. *Nature Plants*, July; DOI:10.1038/NPLANTS.2015.107
- OW D. W.**, Wood, K. V., Deluca, M., Dewet, J. R., Helinski, D. R., Howell, S. H. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science*, 234: 856-859.
- PUCHTA H.**, 2017. Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. *Current Opinion in Plant Biology* 36: 1-8
- QIN S.**, Lin, H., Jiang, P. 2012. Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnology Advances* 30: 1602-1613.
- RASALA B. A.**, Barrera, D. J., Ng, J., Plucinak, T. M., Rosenberg, J. N., Weeks, D. P., Oyler, G. A., Peterson, T. C., Haerizadeh, F.,

- Mayfield, S. P. 2013. Expanding the spectral palette of fluorescent proteins for the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* 74: 545-556.
- SAMBROOK J.**, Russel, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 3<sup>rd</sup> Ed. 2344 pp.
- SCHIEDLMEIER B.**, Schmitt, R., Muller, W., Kirk, M. M., Gruber, H., Mages, W., Kirk, D. L. 1994. Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proceedings of National Academy of Science USA* 91: 5080-5084
- TABERLET P.**, Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- TEN LOHUIS M. R.**, Miller, D. J. 1998. Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *The Plant Journal* 13: 427-435.
- VIELER A.**, Wu, G., Tsai, C.-H., Bullard, B., Cornish, A. J., Harvey, C., Reza, I. B., Thornburg, C., Achawanantakun, R., Buehl, C. J., Campbell, M. S., Cavalier, D., Childs, K. L., Clark, T. J., Deshpande, R., Erickson, E., Ferguson, A. A., Handee, W., Kong, Q., Li, X., Liu, B., Lundback, S., Peng, C., Roston, R. L., Sanjaya, Simpson, J. P., Terbush, A., Warakanont, J., Zaunders, S., Farre, E. M., Hegg, E. L., Jiang, N., Kuo, M. H., Lu, Y., Niyogi, K. K., Ohlrogge, J., Osteryoung, K. W., Shachar-Hill, Y., Sears, B. B., Sun, Y., Takahashi, H., Yandell, M., Shiu, S.-H., Benning, C., 2012. Genome, functional gene annotation and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genetics* 8:e1003064. doi: 10.1371/journal.pgen.1003064.
- YANG W.**, CATALANOTTI, C., D'ADAMO, S., WITTKOPP, T., INGRAM-SMITH, C., MACKINDER, L., MILLER T.E., HEUBERGER A.L., PEERS G., SMITH K.S., JONIKAS M.C., GROSSMAN A.R., POSEWITZ, M.C., 2014. Alternative acetate production pathways in *Chlamydomonas reinhardtii* during dark anoxia and the dominant role of chloroplasts in fermentative acetate production. *The Plant Cell* 26:4499-4518.
- YU W.-L.**, Ansari, W., Schoepp, N. G., Hannon, M. J., Mayfield, S. P., Burkart, M. D. 2011. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial Cell Factories* 10: 91
- ZHENG M.**, Tian, J., Yang, G., Zheng, L., Chen, G., Chen, J., Wang, B. 2013. Transcriptome sequencing, annotation and expression analysis of *Nannochloropsis* sp. at different growth phases. *Gene* 523: 117-121.

El libro

**Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la  
Biomasa Microalgal**

se terminó de imprimir en los Talleres Gráficos de

**Pandora Impresores**

en el mes de septiembre del 2017.

Su tiraje fue de 500 ejemplares.