

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

Bibliotecas Bucaramanga
Universidad Santo Tomás

USO DE LA FLUORESCENCIA COMO PIGMENTO FOTOSINTÉTICO AUXILIAR
EN EL CULTIVO DE MICROALGAS DE LA ESPECIE *Chlorella vulgaris*

YOLEISY ORDUZ DIAZ

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISION DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015

USO DE LA FLUORESCENCIA COMO PIGMENTO FOTOSINTÉTICO AUXILIAR
EN EL CULTIVO DE MICROALGAS DE LA ESPECIE *Chlorella vulgaris*

YOLEISY ORDUZ DIAZ

TRABAJO DE GRADO

Director del Proyecto
JULIO R. PINZÓN JOYA
Químico *PhD*

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISION DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Bucaramanga, abril de 2015

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar a este momento y no dejarme desfallecer ante las difíciles situaciones.

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente, por su comprensión, ayuda y amor. A ellos que me han dado todo lo que soy como persona, mis valores y principios, gracias a ellos soy lo que soy.

A mis profesores, por su dedicación y la sabiduría transmitida durante mi proceso de formación como profesional.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar doy infinitas gracias a Dios por haberme dado la fuerza y el valor para culminar esta etapa.

Les agradezco a mis padres por su confianza y apoyo, que sin duda alguna han demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A Gabriel Andrés Rondón por su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con él.

A la Universidad Santo Tomás y en especial a mis compañeros de grupo de investigación (GINMEA) por que con sus correcciones y colaboración me ayudaron a sacar este proyecto adelante.

A Julio Pinzón, mi director de tesis, por ser la persona que confió en mí e hizo parte de este proyecto aportando todo su conocimiento.

A Oscar Duarte y Leslie Sierra, auxiliares de laboratorio, que estuvieron presentes brindando su ayuda durante el desarrollo de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
2.	JUSTIFICACIÓN	20
3.	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GENERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4.	MARCO REFERENCIAL	23
4.1	MICROALGAS:	23
4.2	PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LAS MICROALGAS	25
4.3	PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS	27
4.4	ABSORCIÓN DE ENERGÍA POR LAS MICROALGAS	31
4.5	FENÓMENO DE LA FLUORESCENCIA Y SUSTANCIAS FLUORESCENTES	31
4.6	ANTECEDENTES	34
5.	DISEÑO METODOLÓGICO	36
5.1	CULTIVO DE LAS MUESTRAS DE <i>Chlorella vulgaris</i>	36
5.2	SÍNTESIS DE LA FLUORESCEÍNA	37
5.3	PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS GRASOS DE <i>Chlorella vulgaris</i>	41
5.4	EXTRACCIÓN DE LOS TRIGLICÉRIDOS (TGA)	41
5.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
6.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
6.2	PRODUCCIÓN DE BIOMASA	47
6.3	PRODUCCIÓN DE ACEITE	50
7.	CONCLUSIONES	52
8.	DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS	53
9.	RECOMENDACIONES	54
10.	BIBLIOGRAFÍA	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de algunas fuentes de biodiesel	24
Tabla 2. Comparación del contenido de aceite en algunas especies de microalgas	29
Tabla 3. Comparación de las propiedades físicas de diesel convencional y el biodiesel a partir de microalgas	30
Tabla 4. Reactivos para la preparación de caldo de cultivo	36
Tabla 5. Asignación de señales en el ^1H de RMN para la identificación de clases de lípidos en el extracto de <i>Chlorella vulgaris</i> .	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo mundial de energía	18
Figura 2. Imagen de <i>Chlorella vulgaris</i> captada mediante microscopio óptico, 40x.	25
Figura 3. Biosíntesis de lípidos en microalgas	26
Figura 4. Reacción de transesterificación de triglicéridos con alcohol	28
Figura 5. Diagrama de Jablonski (fluorescencia)	32
Figura 6. Estructura molecular de la fluoresceína	32
Figura 7. Desprotonación de la fluoresceína	33
Figura 8. Estructura molecular de la astaxantina	35
Figura 10. Curva de distribución de especies con respecto al pH para las especies de la fluoresceína	39
Figura 9. Diseño del fotobioreactor	40
Figura 11. Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> a diferentes concentraciones de fluoresceína	48
Figura 12. Influencia de la fluoresceína en microalgas de la especie <i>Chlorella vulgaris</i>	49
Figura 13. Comparación espectro ^1H de Aceite de <i>Chlorella vulgaris</i> y Aceite de Oliva (400MHz)	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Espectro ^1H de la fluoresceína (400 MHz)	58
Anexo B. Espectro ^{13}C de la fluoresceína (400MHz)	59
Anexo C. Espectro ^{13}C -DEPT de la fluoresceína (400MHz)	60
Anexo D. Espectro ^1H - ^1H -COSY de la fluoresceína (400MHz)	61
Anexo E. Espectro ^1H - ^{13}C -HMBC de la fluoresceína (400MHz)	62
Anexo F. Espectro ^1H - ^{13}C -HSQC de la fluoresceína (400MHz)	63
Anexo G. Espectro masas-ESI de la fluoresceína	64
Anexo H. Espectro ^1H de aceite de <i>Chlorella vulgaris</i> (400MHz)	65
Anexo I. Espectro ^1H de aceite de <i>Chlorella vulgaris</i> - Ampliación región TGA (400MHz)	66

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ATP	Adenosín trifosfato
BBM	Medio basal de Bold
DL ₅₀	Dosis letal 50
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
GL	Glicolípidos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PL	Fosfolípidos
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RMN	Resonancia magnética nuclear
TAG	Triacilglicéridos
UFA	Ácidos grasos insaturados

GLOSARIO

BIOCOMBUSTIBLE: cualquier combustible hidrocarburo que se produce a partir de materia orgánica en un corto periodo de tiempo (días, semanas o incluso meses).¹

BIODIESEL: mezcla de ésteres de alcoholes de cadena corta con ácidos grasos de cadena larga tales como el láurico, el palmítico, oleico, etc., obtenidos a partir de lípidos renovables, como aceites y grasas de origen vegetal o animal.²

DAÑO FOTO-OXIDATIVO: es la reducción en la eficiencia de la fotosíntesis a causa de largos periodos de exposición de las microalgas a radiación excesiva (luz), también se conoce como “estrés” o foto-inhibición.³

FLUORESCENCIA: es un proceso de emisión basado en la excitación de átomos o moléculas por absorción de un haz de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, devolviendo su exceso de energía como fotones.⁴

FOTOBIOREACTOR: recipiente cerrado alimentado con luz artificial (semejante a la luz solar) en el cual se usa para la producción de biomasa de organismos fotoautótrofos, como las microalgas.⁵

MICROALGA: organismo fotosintético eucariota o procariota que puede crecer rápidamente y que puede vivir en condiciones extremas gracias a su estructura unicelular y/o pluricelular que presentan. Las microalgas se reproducen de manera asexual usando la fotosíntesis para convertir la energía solar en energía química. Principalmente requieren luz solar, y algunos nutrientes.⁶

RESUMEN

La luz visible entre 650 y 700 nm (luz roja) es la más eficiente para el crecimiento de microalgas, mientras que las longitudes de onda inferiores a 430 nm disminuyen la producción de lípidos y la tasa y promueven el daño foto-oxidativo. Este trabajo estudia uso de fluoresceína o sus derivados en el medios de cultivo en la especie de microalgas *Chlorella vulgaris* como mecanismo para aumentar la eficiencia fotosintética. De hecho, la fluoresceína es una sustancia que absorbe azul a la radiación UV y, particularmente, fluoresce con alto rendimiento cuántico en la región de 480-700 nm. El objetivo de incorporar la fluoresceína es lograr la conversión de luz de alta energía en luz visible de baja energía, que podría utilizarse de manera más eficiente por las microalgas y, en consecuencia, sería posible mejorar la producción de aceite.

Chlorella vulgaris fue cultivada en el medio basal de Bold (BBM) mediante el uso de una foto-biorreactor casero, diseñado específicamente para este proyecto. La aireación se proporcionaba por medio de bombas de aire de acuario. Cada montaje experimental se mantuvo en condiciones constantes durante 12 días, con concentraciones variables de fluoresceína de 6,0 a 36,0 mg/L. Las células fueron contadas diariamente mediante cámara de Neubauer. Se observó que al aumentar la concentración de fluoresceína en el medio de cultivo fue posible mejorar el crecimiento de la biomasa de microalgas.

PALABRAS CLAVE: biodiesel, *Chlorella vulgaris*, fluorescencia, inhibición de crecimiento, microalgas, pigmento fotosintético auxiliar.

ABSTRACT

Visible light between 650 to 700 nm (red light) is the most efficient for microalgae growth, while wavelengths below 430 nm decrease the production of lipids and the photosynthesis rate promoting photo-oxidative damage. This work studies the inclusion of fluorescein or its derivatives in the growing media of the microalgae specie *Chlorella vulgaris* as mechanism to increase photosynthetic efficiency. In fact, fluorescein is a substance that absorbs blue to UV radiation and particularly fluoresces with high quantum yield in the 480 to 700 nm region. The goal to incorporate fluorescein in the processes is converting high-energy into low-energy visible light, that might be used more efficiently by the microalgae and consequently it would be possible to improve the oil production.

Chlorella vulgaris was grown in Bold's Basal Medium (BBM) by using a homemade photo-bioreactor, specifically designed for this project. Aeration was provided by means of aquarium air pumps. Each experimental test was maintained at constant conditions for 12 days, feeding Fluorescein in concentrations from 6,0 to 36,0 mg/L. Cells accounting was done daily by using a Neubauer chamber. It was observed that by increasing the fluorescein concentration in the medium was possible to improve the growth of the microalgal biomass.

KEYWORDS: Auxiliary photosynthetic pigment, biodiesel, *Chlorella vulgaris*, fluorescence, inhibition of growth, microalgae.

INTRODUCCIÓN

La demanda de energía ha crecido notablemente en los últimos años. El petróleo es la fuente de energía que aporta el mayor porcentaje de energía que se genera en el mundo. Si la tendencia de consumo continúa, las reservas de petróleo se agotarán en menos de 45 años, causando una crisis energética mundial. El Ministerio de Minas y Energía, señala que en Colombia las reservas probadas de crudo a la fecha son suficientes para apenas 6,6 años.⁷ No sólo el agotamiento de las reservas de petróleo es la problemática de mayor interés, sino también el impacto ambiental que se ha incrementado con los años. Debido a la crisis que se avecina, los países desarrollados y las industrias han prestado atención en la búsqueda de fuentes de energía alternativas.

En Colombia, la producción de biocombustibles no sólo ayuda a no depender del petróleo y aumentar el suministro de combustibles, si no que ofrece grandes oportunidades de incrementar los ingresos y promover empleo en las áreas rurales. La finalidad a largo plazo de los biocombustibles es encontrarle reemplazo a los combustibles fósiles, además de reducir las emisiones de gas invernadero y mejorar la seguridad del abastecimiento energético.

El biodiesel a partir de microalgas posee grandes ventajas sobre el biodiesel producido con aceites de oleaginosas, como la palma, canola y la soya.⁸ Sin embargo, su implementación presenta diferentes desafíos y a la fecha el cultivo de microalgas para la producción de aceite no se ha logrado escalar al nivel de los cultivos de oleaginosas.⁹ Entre los principales desafíos se encuentran: el requerimiento de grandes volúmenes de agua, el alto consumo de nutrientes, el desarrollo y optimización del método de cultivo, la dificultad para la extracción y procesamiento del aceite, entre otros. El rendimiento del cultivo está directamente asociado a la exposición de radiación solar y al suministro de CO₂, debido a esto

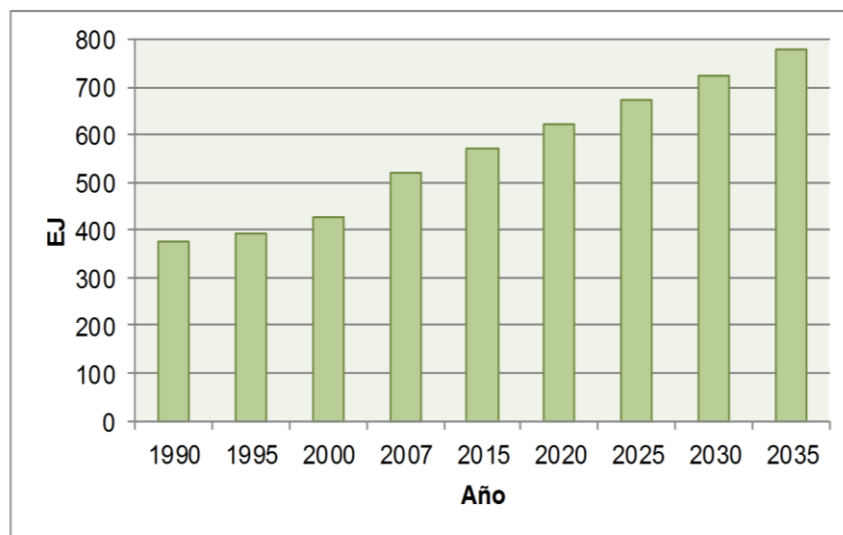
se buscan lugares para los cultivos como los desiertos y la localización cerca de industrias que emitan grandes volúmenes de CO₂; pero a su vez, la alta exposición a la radiación solar produce un aumento del daño foto-oxidativo.

Algunos estudios en fotobioreactores equipados con filtros de diferentes colores, han demostrado que el rendimiento del cultivo mejora cuando las microalgas de la especie *Chrorella vulgaris* tienen filtros de color verde. El problema asociado a la utilización de filtros es que se pierde parte de la energía solar porque es absorbida por el material del filtro y disipada en forma de calor. En este trabajo se propone la utilización de una sustancia fluorescente incorporada dentro del medio de cultivo con el propósito de absorber la radiación visible de alta energía que por efecto de la fluorescencia es parcialmente re-emitida en la región visible del espectro en donde puede ser aprovechada por el aparato fotosintético de la microalga.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los combustibles fósiles son la mayor fuente de energía del planeta y suministran más del 81% de la energía mundial, siendo alrededor de 493EJ/año. Éstos se usan en el sector de transporte, comercial e industrial.¹⁰ En la Figura 1, se muestra el consumo de energía mundial a través del tiempo y extrapolado al año 2035. De acuerdo a la Energy Information Agency (EIA) se reporta que el mundo necesitará en el 2030 al menos el 60% más de energía que se usa actualmente. Si esta tendencia de consumo continúa se estima que las reservas de petróleo se agoten en menos de 45 años. El agotamiento de las reservas de petróleo y el impacto ambiental que se ha generado, ha incentivado a la búsqueda de biocombustibles que reemplacen a los producidos por el petróleo.^{8,11}

Figura 1. Consumo mundial de energía



FUENTE: Autor, basado en reporte de Energy Information Administration, USA, 2010.

La biomasa es la materia prima de los biocombustibles y es un recurso renovable de gran abundancia, que además fija el dióxido de carbono (CO_2) por medio de la fotosíntesis. Gracias a estas características la biomasa tiene gran acogida debido a su renovabilidad, sostenibilidad, alta disponibilidad y biodegradabilidad.²

Las algas, el maíz, la soya, la caña de azúcar y otras plantas necesitan principalmente luz solar, CO₂ y agua, y usan la fotosíntesis como el medio para transformar la energía solar en energía química almacenándola en forma de aceites, hidratos de carbono y proteínas. Lo que diferencia a las algas de otros cultivos de oleaginosas, es que éstas alcanzan grandes productividades entre 10.000-20.000 m³ de aceite producido/km² cultivado, mientras que la soya alcanza 40 m³ de aceite producido/km² cultivado y la palma aceitera 600 m³ de aceite producido/km² cultivado.²

Las microalgas, han adquirido gran atención ya que producen una amplia gama de biocombustibles tales como el bioetanol, biodiesel, biohidrógeno y biometano; además producen metabolitos secundarios que tienen gran aplicación en la industria farmacéutica, acuicultura y cosmetología.² A pesar de las grandes soluciones que aportan las microalgas, éstas no se han logrado escalar a nivel industrial, debido a problemas con el requerimiento de agua y nutrientes, y las tecnologías en métodos de cultivo, extracción y procesamiento de aceite.

2. JUSTIFICACIÓN

El cambio climático es el desafío más grande que presenta la humanidad actualmente. Los biocombustibles, ofrecen nuevas oportunidades de aumentar las fuentes de ingresos y el suministro de combustibles, además de encontrarle reemplazo a los combustibles fósiles y reducir así las emisiones de gas invernadero. La producción de biocombustibles a partir de plantas oleaginosas ha tenido gran acogida para su implementación como parte del amplio grupo de energías renovables en el mundo.^{2,6}

La producción de biodiesel a partir de plantas oleaginosas tiene ciertas limitaciones, tales como, el conflicto por las grandes extensiones de tierra de cultivo y la cantidad de agua que se necesita para la producción, poniendo en riesgo la seguridad alimentaria. Entre otros problemas se incluyen las estaciones y la ubicación geográfica. Todas estas limitaciones hacen crecer las esperanzas en las microalgas como una alternativa en la producción de biocombustibles.^{8,12}

Las microalgas se consideran como una alternativa viable, ya que tienen mayor rendimiento que cualquier otro cultivo convencional produciendo 136.900 L/aceite/ha/año.⁶ De igual forma, éstas requieren menos superficie de cultivo, tienen mayores tasas de crecimiento (doblan su peso en 24 horas) y no compiten con la producción alimentaria. Pueden ser cultivadas en agua salada, agua dulce o agua residual. Además, cabe resaltar que las microalgas son captadoras de CO₂ por excelencia y fijan 1,83 kg CO₂/día/kg de masa seca producida.^{9,13}

Algunos estudios en cuanto a la mejora de crecimiento en *Chlorella vulgaris* muestra que con filtros de diferentes colores el rendimiento del cultivo mejora cuando las microalgas tienen filtros en el rango promovido por la luz con el filtro de color verde. En este trabajo se propone desarrollar un método de optimización de

cultivos de microalgas donde se use una sustancia fluorescente para mejorar el rango de absorción de energía.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la influencia de la fluoresceína en la disminución de crecimiento producida por la radiación de alta energía en microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*, que serán usadas como materia prima para la producción de biodiesel.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Cultivar microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* en condiciones controladas de laboratorio.
- 3.2.2 Agregar fluoresceína al medio de cultivo y evaluar la influencia en el crecimiento debido a la captación de radiación de alta energía.
- 3.2.3 Obtener extractos grasos de las microalgas en estudio.
- 3.2.4 Transesterificar los triglicéridos obtenidos y evaluar la distribución de ácidos grasos.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 MICROALGAS:

Las microalgas son organismos procariotas o eucariotas fotosintéticos con una estructura que puede ser unicelular o pluricelular. Además, se consideran como los organismos fotosintéticos más eficientes en la tierra, ya que pueden doblar su masa en sólo 24 horas. No sólo se encuentran en los ecosistemas acuáticos, sino también en la tierra, llegando a vivir en condiciones extremas. Se estima que existen al menos 50.000 especies pero sólo se han estudiado alrededor de 30.000.^{6,14}

Las microalgas utilizan como fuente de electrones el agua, como fuente de energía la luz solar que es transformada en energía química y como fuente de carbono el CO₂, además de otros nutrientes como fósforo y nitrógeno. A su vez éstas producen compuestos, tales como los ácidos grasos, pigmentos, antioxidantes, carotenoides, antibióticos, entre otros, que son usados ampliamente en el sector industrial y químico. De igual forma producen diferentes tipos de combustibles renovables tales como el biohidrógeno, biometano, bioetanol y biodiesel.^{6,14}

Las microalgas no compiten por tierra de cultivo usado para la alimentación. Como se muestra en la Tabla 1 (Columna 3), el cultivo de microalgas no requiere gran área de tierra en comparación con otras fuentes vegetales y gracias a su habilidad de crecer en condiciones extremas pueden ser cultivadas en tierras que no son adecuadas para la agricultura. Asimismo, no requieren herbicidas ni pesticidas.^{6,8,9,13,15}

Las microalgas pueden cultivarse en diferentes tipos de aguas, como dulces, saladas o insalubres. Se usan para el tratamiento de aguas residuales para remover NH₄⁺, NO₃⁻ y PO₄⁻³, siendo éstos contaminantes su fuente de nutrientes. Además, requieren menos agua que las plantas terrestres.^{6,9,11,13}

Otra de las ventajas que tienen las microalgas es que al tener como fuente de carbono el CO₂. Pueden fijar 1,83 kg CO₂/día/kg de masa seca producida, por medio de la biofijación reduciendo así los gases invernadero.^{6,8,9,11} Los residuos desechados después de haber extraído el biodiesel, pueden ser reusados para el alimento de ganado y procesarlo incluso como bioetanol.^{6,13}

Como se muestra en la Tabla 1, las microalgas pueden llegar a ser una fuente potencial de biodiesel que ayude a desplazar el diesel fósil, ya que a diferencia de otros cultivos oleaginosos, las microalgas crecen rápidamente y algunas de ellas son muy ricas en aceite.¹⁶

Tabla 1. Comparación de algunas fuentes de biodiesel.⁶

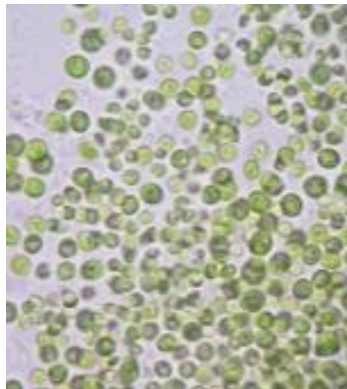
Cultivo	Producción de aceite (L aceite/ha/año)	Terreno necesario (m ² año/kg biodiesel)	Producción de biodiesel (kg biodiesel/ha/año)
Maíz (<i>Zea mays</i>)	172	66	152
Soya (<i>Glycine max</i>)	636	18	562
Canola (<i>Brassica napus</i>)	974	12	862
Jatrofa (<i>Jatropha curcas</i>)	741	15	656
Palma aceitera (<i>Elaeis guineensis</i>)	5366	2	4747
Microalga (poco contenido de aceite)	58700	0,2	51927
Microalga (medio contenido de aceite)	97800	0,1	86515
Microalga (alto contenido de aceite)	136900	0,1	121104

4.1.1 *Chlorella vulgaris*.

La *Chlorella vulgaris* (Figura 2) es un alga unicelular de color verde, esférica y con un diámetro entre 2-10 µm.^{17,18} Se reproduce rápidamente y de forma asexual,

alcanzando a doblar su número de células en 8 horas si se mantiene la temperatura entre 20 y 35°C. Contiene proteínas (42-58%), pigmentos (1-2%), carbohidratos (12-55%) y lípidos (5-40%) (porcentaje de peso seco)^{17,18}. Estos porcentajes dependen de las condiciones en las que se tenga el cultivo. Se utilizan para fabricar complementos alimenticios, productos cosméticos, producción de biodiesel y la desintoxicación de metales pesados.¹⁷ Los lípidos en ésta se componen principalmente de glicolípidos, ceras, hidrocarburos, fosfolípidos y pequeñas cantidades de ácidos grasos libres. Durante condiciones de crecimiento desfavorables (generación de estrés) el contenido de lípidos (compuesto principalmente por triacilglicerol) puede alcanzar hasta un 58%.¹⁸ Esto sumado a su capacidad de crecimiento y duplicación hace que sean ampliamente estudiadas para la producción de biocombustibles, en especial biodiesel.¹⁷

Figura 2. Imagen de *Chlorella vulgaris* captada mediante microscopio óptico, 40x.



FUENTE: Autor

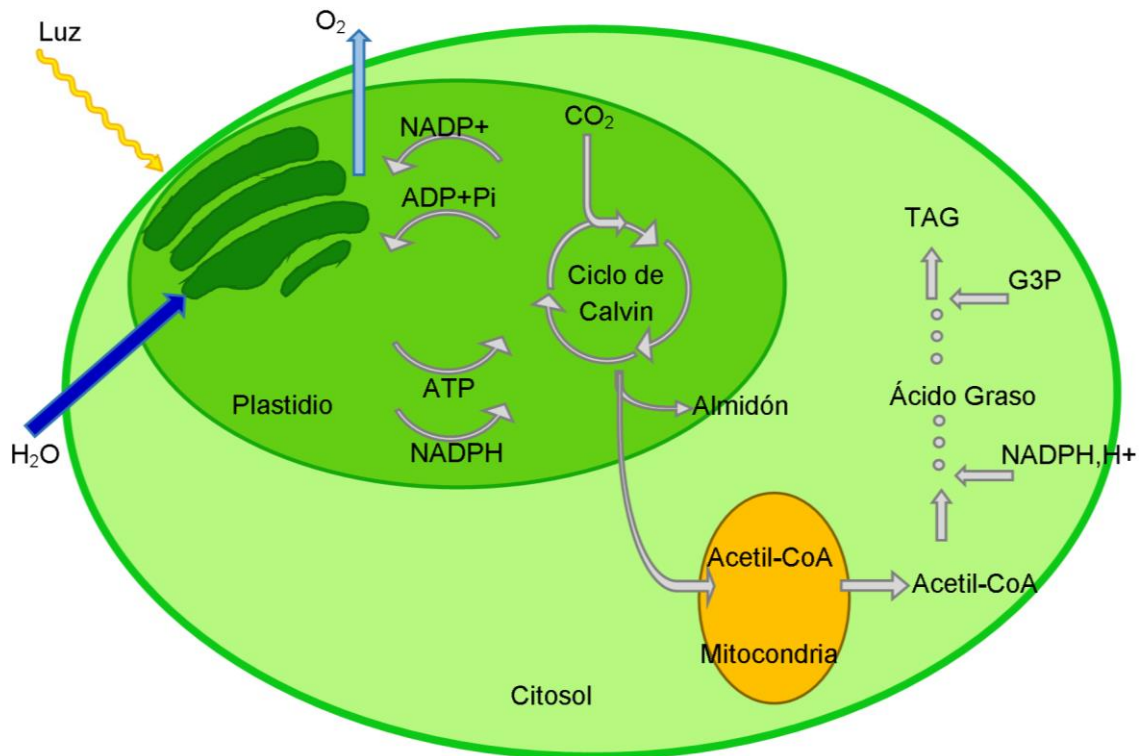
4.2 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LAS MICROALGAS:

Los lípidos de las microalgas son principalmente ésteres de glicerol formados por ácidos grasos con cadenas constituidas de 14-20 átomos de carbono, su función biológica es primordialmente el almacenamiento de energía y señalización intracelular. Su metabolismo en las microalgas es similar al de las plantas superiores, principalmente en la biosíntesis de ácidos grasos, ya que presentan características similares como genes y enzimas de origen vegetal y algal. La

composición y cantidad de los lípidos en las microalgas dependen directamente de la especie y las condiciones de crecimiento.

Los lípidos se dividen en lípidos neutros (triacylglicéridos, colesterol) y lípidos polares (fosfolípidos, galactolípidos).^{15,19} Los triacylglicéridos (TAGs) son un tipo de lípidos que consta de tres ácidos grasos unidos a un esqueleto de glicerol y que puede ser sintetizado por las microalgas, éstos son la materia prima para la producción de biodiesel.^{15,19,20} Para el caso de *Chlorella vulgaris*, a diferencia de otros lípidos, los TAGs no realizan función estructural sino que se almacenan en una gota densa en el citoplasma y en el espacio inter-tilacoide del cloroplasto.¹⁸ En la Figura 3 se presenta un esquema en donde se describe en términos generales la biosíntesis de lípidos en microalgas.

Figura 3. Biosíntesis de lípidos en microalgas^{19,21–2319,21–24}



FUENTE: Autor

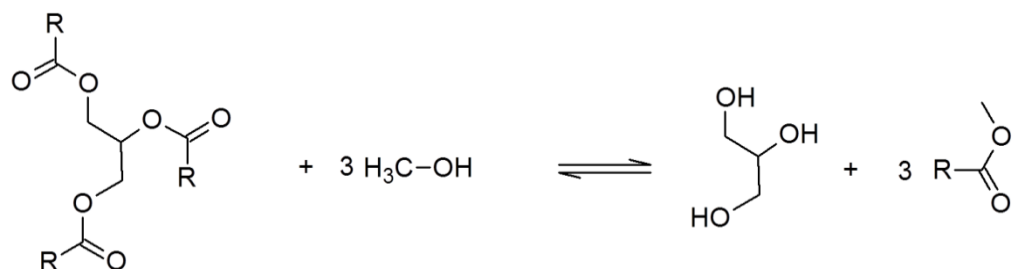
A partir de la energía proporcionada por los fotones presentes en el flujo luminoso, se lleva a cabo la oxidación catalítica del agua en donde se descompone en O_2 , y además posibilitan la obtención de: ATP y NADPH; éstos son el sustrato del ciclo de Calvin, en el cual el CO_2 es fijado como carbohidratos, lípidos y proteínas. En el caso particular de los lípidos microalgales, las moléculas de carbono son transformadas a almidón y acetil-CoA en el cloroplasto, donde las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas y sometidas a numerosos ciclos de adición descarboxilativa y β -reducción para la síntesis de ácidos grasos. El mecanismo de transporte de ácidos grasos al exterior del citoplasma se desconoce. Posteriormente, los ácidos grasos son secuencialmente transferidos con acción de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) para la posterior formación de triacilglicerol (TAG).^{19,21-24}

4.3 PRODUCCIÓN DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS:

El biodiesel se define como los ésteres monoalquílicos producidos por la transesterificación de triglicéridos o ácidos grasos procedentes de aceites vegetales o grasas animales. La transesterificación es la manera más simple, barata y eficiente para la producción de biodiesel en grandes cantidades.^{9,14}

En la Figura 4, se muestra la reacción de transesterificación, normalmente en presencia de un catalizador alcalino tal como hidróxido de sodio (NaOH).¹³

Figura 4. Reacción de transesterificación de triglicéridos con alcohol



FUENTE: Autor, adaptado de Ayhan Demirbas, 2010.¹³

El biodiesel puede hacerse a partir de casi cualquier fuente de aceite renovable. Principalmente proviene de aceite de soya, aceites vegetales, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de colza y de aceite usado. El problema de usar aceite usado es la dificultad para convertirlo en biodiesel, ya que contienen grandes cantidades de ácidos grasos libres, aun así es una buena fuente para los productores a pequeña escala.¹⁵

El biodiesel tiene un sinnúmero de ventajas. En primer lugar, porque el combustible se deriva de fuentes renovables y contribuye a la disminución de las emisiones de CO_2 . En segundo lugar, el biodiesel disminuye la emisión de al menos el 90% de los tóxicos en el aire, ya que se encuentra libre de azufre y compuestos aromáticos. También disminuye el 95% de riesgo en contraer cáncer en comparación con el diesel. En tercer lugar, el biodiesel tiene baja toxicidad y es biodegradable.^{13,15}

Las microalgas que se utilizan en la producción de biodiesel son generalmente algas verdes de la división *Chlorophyta*. Este tipo de microalgas, se caracterizan por que pueden acumular cantidades considerables de lípidos, obteniéndose un alto rendimiento de aceite. Este alto rendimiento de aceite y su capacidad para doblar su densidad de biomasa en 24 horas es ideal para la agricultura intensiva y puede ser una excelente fuente para la producción de biodiesel. El contenido de lípidos puede variar entre el 1% y 70% en peso seco, aunque algunas especies en

ciertas condiciones pueden llegar a alcanzar el 90% de aceite en peso seco. En la Tabla 2, se muestra la diferencia en el contenido de aceite en las diferentes especies de microalgas.^{6,25}

Dependiendo de la especie de alga, la composición de los ácidos grasos cambia, y esto puede tener un efecto significativo en las características del biodiesel producido. De igual forma, las diferentes condiciones ambientales que afecten las microalgas pueden llegar a cambiar las características del biodiesel. El género *Chlorella* se conoce como una muy buena opción para la producción de biodiesel a gran escala. No es un secreto que existen microalgas con mayor eficiencia y productividad pero a la hora de seleccionar la más adecuada, es necesario tener en cuenta otros factores tales como la habilidad del alga para desarrollarse bajo las diferentes condiciones ambientales.^{6,16}

Tabla 2. Comparación del contenido de aceite en algunas especies de microalgas.

16

Especie	Contenido de aceite (% en peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	27-77
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23
<i>Monallanthus salina</i>	>20

Se ha reportado que el biodiesel producido a partir de microalgas tiene propiedades similares al diesel convencional tales como densidad, viscosidad, punto de ignición o encendido, temperatura a la que se sella el filtro de combustible y la capacidad calorífica. La propiedad más difícil de controlar es la temperatura a la que se sella el filtro, ya que al bajar la temperatura las grasas se solidifican. La mayoría de los parámetros antes mencionados cumplen con los límites establecidos por la American Society for Testing Materials (ASTM) para la calidad del biodiesel. El biodiesel a partir de microalgas también cumple con la Norma Internacional de Biodiesel para Vehículos (EN14214).⁸ En la Tabla 3 se muestra una comparación de las propiedades típicas del diesel a partir de combustibles fósiles, el biodiesel a partir de jatrofa y el biodiesel obtenido a partir de microalgas.^{26,27}

Tabla 3. Comparación de las propiedades físicas de diesel convencional, el biodiesel a partir de jatrofa y el biodiesel a partir de microalgas.^{26,27}

Propiedades	Valor típico		
	Biodiesel obtenido de microalgas	Biodiesel obtenido de jatrofa	Diesel convencional
Densidad (Kg/L)	0,864	0,864 – 0,880	0,838
Viscosidad (mm ² s ⁻¹ .cSt a 40°C)	5,2	3,7 – 5,8	1,9-4,1
Punto de Ignición (°C)	115	163 – 238	75
Poder calorífico (MJ/kg)	41	38,5 – 42	40-45

En otros estudios se ha encontrado que los aceites de algas contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados como ácido linoleico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico y ácido oleico,^{28,29} en comparación con aceites

vegetales, lo que hace que los aceites de algas sean susceptibles a la oxidación durante su almacenamiento limitando así su utilización.⁸

4.4 ABSORCIÓN DE ENERGÍA POR LAS MICROALGAS:

Las microalgas absorben la energía de la luz solar (fotones) y la transforman en energía química (ATP y NADP). Estas reacciones ocurren en los fotosistemas de las microalgas.³⁰

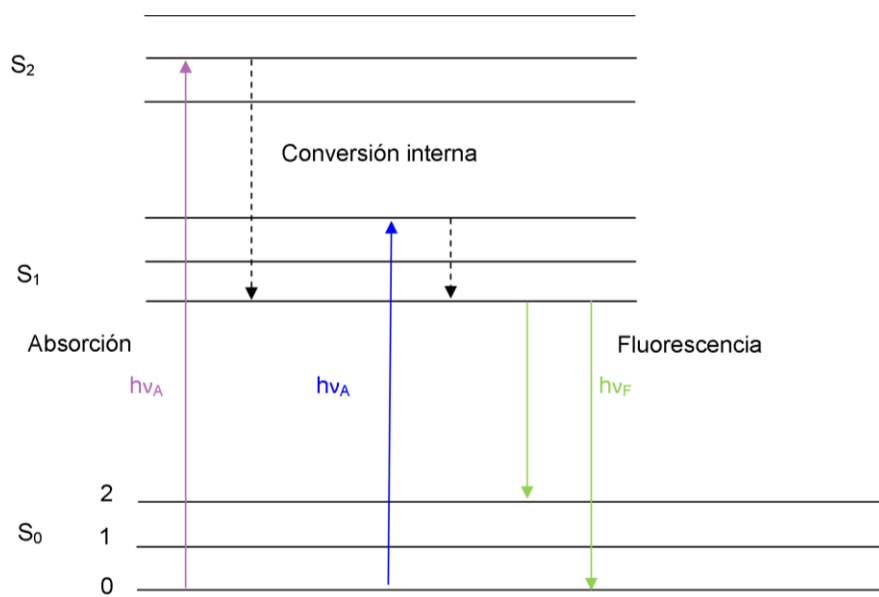
Las microalgas para la fotosíntesis usan luz con longitud de onda entre 400 y 700 nm. Esta longitud de onda depende de la especie de microalga. Las microalgas verdes absorben a través de la clorofila en el rango de 450 a 475 nm y 630 a 675 nm, y a través de los carotenoides entre 400 a 550 nm.³⁰

A lo largo de los años se han reportado diferentes estudios sobre la influencia de las diferentes longitudes de onda en el crecimiento de las microalgas. La luz roja (600-700 nm) y la luz azul (400-500 nm) estimulan el crecimiento y el contenido de lípidos en las microalgas, y pueden llegar a variar dependiendo de la intensidad de la luz.³⁰

4.5 FENÓMENO DE LA FLUORESCENCIA Y SUSTANCIAS FLUORESCENTES

La fluorescencia se conoce como un tipo de luminiscencia. La luminiscencia consiste en la emisión de luz de una sustancia que ocurre por parte de los estados electrónicamente excitados. El diagrama de Jablonski (Figura 5) consiste en una representación de los niveles electrónicos, el proceso de absorción y emisión de luz. La fluorescencia comienza por la excitación de un electrón que se encuentra en estado basal (S_0) con el fin de que se promueva a un nivel electrónico de mayor energía (S_1 o S_2); luego las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones.³¹ La fluorescencia ocurre normalmente en moléculas aromáticas. Las moléculas que presentan fluorescencia se conocen como fluoróforos.³¹

Figura 5. Diagrama de Jablonski (fluorescencia)

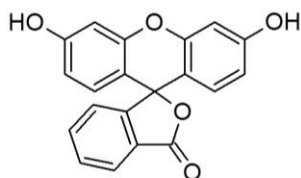


FUENTE: Autor

4.5.1 Fluoresceína:

La fluoresceína (Figura 6) tiene un peso molecular de 332,31 g/mol. Es un polvo de color rojo. Tiene un punto de fusión entre 314-316°C. Es soluble en solventes orgánicos como etanol caliente y ácido acético glacial.³²

Figura 6. Estructura molecular de la fluoresceína



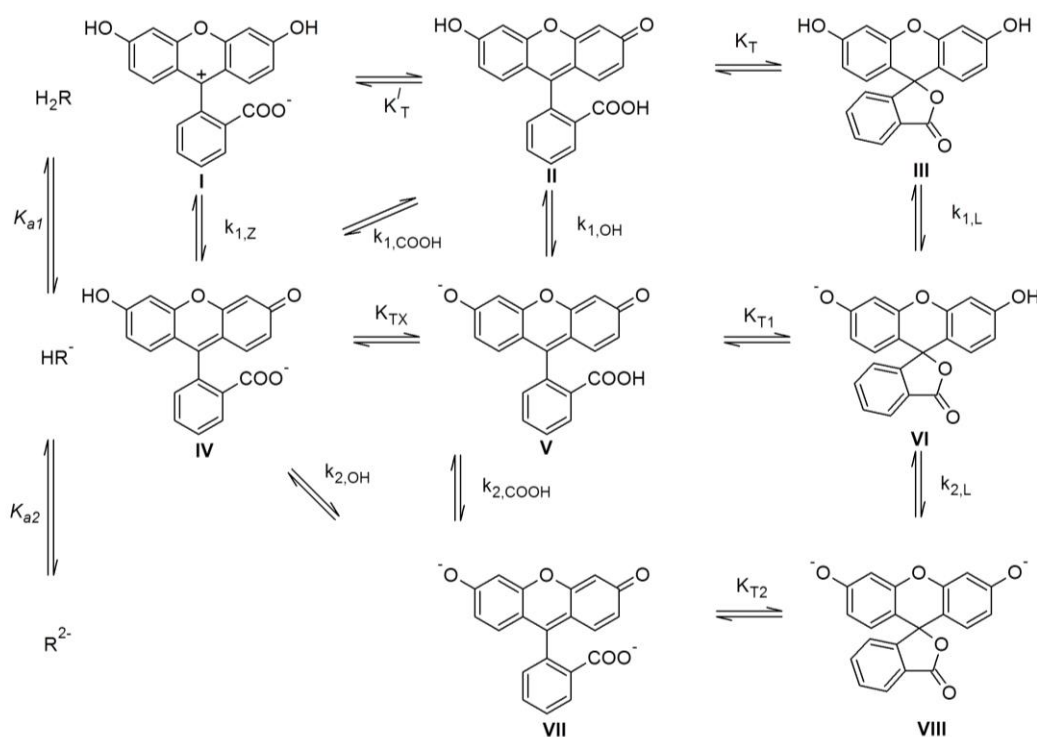
FUENTE: Autor, adaptado de Sharat Gangolli.³³

La fluoresceína es una molécula altamente fluorescente que absorbe la luz a 492 nm y emite a 517 nm en agua, con un rendimiento cuántico de 0,92 a $\text{pH} > 8$.³⁴

La fluoresceína es un colorante orgánico ampliamente usado en inmuno ensayos, como agente de diagnósticos y como trazador para suministros de agua. También es usado en productos farmacéuticos.³² Su DL_{50} intravenosa en ratones 300 mg/kg, DL_{50} intravenosa en conejos es 300 mg/kg y DL_{50} intraperitoneal en ratas 600 mg/kg.³²

La fluoresceína en solución acuosa puede presentarse en forma catiónica, neutra y/o aniónica, y su absorción y fluorescencia dependen del pH. El pKa de la fluoresceína en el agua es de aproximadamente 6,4.³⁴ En la Figura 7 se presenta una gráfica de la dependencia del pH en el equilibrio de la fluoresceína.

Figura 7. Desprotonación de la fluoresceína



FUENTE: Autor, adaptado Mohsenpour et al.³⁵

4.6 ANTECEDENTES

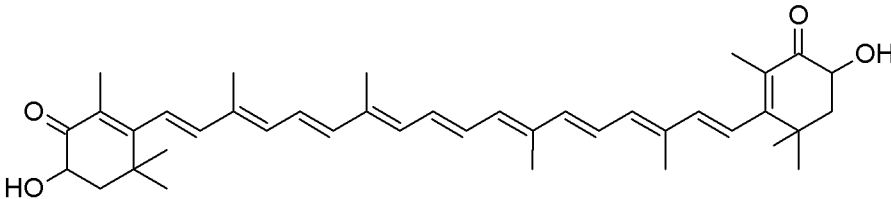
4.5.1 Conversión de la luz para lograr mayores tasas de crecimiento en microalgas.

El alga verde *Chlorella vulgaris* y la cianobacteria *Gloeotheca* sp. fueron sometidas a distintas condiciones de luz mediante la filtración de varias longitudes de onda con el fin de evaluar su crecimiento. Se tenía una fuente de luz día como control. Las hojas de acrílico que se usaron como filtro contenían colorantes como el rojo, violeta, verde y naranja. Como resultado se obtuvieron mayores tasas de crecimiento para *C. vulgaris* en el rango promovido por la luz con el filtro de color verde, mientras que para *Gloeotheca* sp. la de color violeta. Se encontró que la luz roja tiene menor eficiencia en la conversión de energía luminosa en biomasa para las dos, indicando que las diferentes longitudes de onda de luz visible influyen en el crecimiento en *Chlorella vulgaris*.³⁵

En algas de la especie *Spirulina platensis*, una clase de alga verde-azul con alto contenido de proteínas, β -caroteno, vitaminas, ficocianina y ácido γ -linolénico se evaluaron la luz roja y azul en la influencia de crecimiento. Se encontró que la luz roja presenta mayor eficiencia en la conversión de fotones a biomasa, mientras que la luz azul presenta menor eficiencia.³⁶

El alga *Haematococcus pluvialis* es conocida por su producción de un antioxidante muy potente llamado astaxantina (Figura 8). Se reportó que la luz azul generada por LEDS azules mejora la producción de astaxantina. Los LEDS permitirán reducir el consumo energético mediante la selección de un rango específico de longitud de onda adecuada para cada cultivo. La acumulación de astaxantina, mostró una dependencia mucho más fuerte en la intensidad de luz, por que ésta se produce por las células de *H. pluvialis* para proteger las células de la fuerte intensidad de luz.³⁷

Figura 8. Estructura molecular de la astaxantina



FUENTE: Autor, adaptado de Jomova et al.³⁸

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 CULTIVO DE LAS MUESTRAS DE *Chlorella vulgaris*.

El material vegetal se cultivó en un fotobiorreactor alimentado con luz artificial (LEDs 470 nm) que se mantuvo en el Laboratorio de Química Ambiental en la Universidad Santo Tomás, a partir de una cepa obtenida en el Laboratorio de Cultivo de Algas del Departamento de Biología en la Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 4. Reactivos para la preparación de caldo de cultivo ³⁹

Nutriente	Componente	Solución base	Cantidad requerida (mL)
Macronutrientes	NaNO ₃	2,50 g	10
	CaCl ₂	1,88 g	10
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,75 g	10
	K ₂ HPO ₄	0,75 g	10
	KH ₂ PO ₄	1,75 g	10
	NaCl	0,25 g	10
Solución alcalina	EDTA·Na ₂	5,00 g	1
	KOH	3,10 g	
Solución ácida	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	0,69 g	1
	H ₂ SO ₄	1,00 mL	
Solución de boro	H ₃ BO ₃	1,14 g	1
Micronutrientes	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,88 g	1
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,12 g	
	(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,87 g	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,16 g	
	CoCl ₂	0,04 g	

5.1.1 Preparación del caldo de cultivo.

El caldo para el cultivo de las microalgas se preparó como aparece especificado en la Tabla 4. Se tuvo en cuenta que las cantidades de solución base son específicas para preparar 100 mL de cada nutriente. Luego de preparar cada una de las soluciones, se agregó la cantidad requerida y se llevó a 1,0 L. Se empleó agua deionizada para preparar las soluciones y el medio de cultivo.³⁹

5.1.2 Diseño y medición de parámetros en el fotobiorreactor.

Como fotobiorreactor se usó un modelo diseñado especialmente para el proyecto (Figura 9). Se usaron leds azules (470 nm $\pm$ 10nm) para tener un rango de longitudes de onda definido. El caudal de aire se mantuvo constante.⁴⁰

5.1.3 Elección de la sustancia fluorescente

Se consideraron cuatro sustancias fluorescentes: la cumarina, la tartrazina, la oxazona de azul nilo y la fluoresceína. Se seleccionó la fluoresceína porque su máximo de absorción al pH del medio de cultivo de las microalgas ocurre a 484 nm, su rendimiento cuántico es alto (0,92 a pH > 8)³⁴ y emite en la zona del espectro que según los reportes en la bibliografía se registra el mayor crecimiento para *Chlorella vulgaris*.³⁵ Además, su preparación es sencilla y los materiales para su síntesis se consiguen fácilmente.

5.2 SÍNTESIS DE LA FLUORESCEÍNA

5.2.1 Síntesis de la fluoresceína

En un matraz de 50 mL equipado con un agitador magnético se colocaron 3,2489 g de anhídrido ftálico ($2,194 \times 10^{-2}$ moles) y 4,8305 g de resorcinol ($4,3870 \times 10^{-2}$ moles), luego se añadieron cuidadosamente 2,6 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se encendió la agitación y se calentó la mezcla entre 180 y 200°C en un baño de aceite por 30 minutos.

Luego la solución se dejó enfriar y se observó la aparición de un sólido. El sólido resultante se filtró y se lavó en un embudo 3 veces con alícuotas de 10 mL de agua deionizada. El producto fue transferido a un nuevo filtro y lavado nuevamente con 53 mL de etanol y 269 mL de agua deionizada. Finalmente, el producto fue secado y almacenado en un desecador, obteniéndose 4,2421 g ($1,276 \times 10^{-2}$ moles) de fluoresceína. Se realizó el análisis de RMN.

RMN ^1H (DMSO- d_6 , TMS, 400 MHz) δ (ppm): 6.543 (4H; m; 1,2-H); 6.679 (2H; t; 3-H); 7.258 (1H; dd; $J_{4,6}=7,6$ (orto)); 7.702 (1H; dt; $J_{6,5}=7,6$ (orto) $J_{6,7}=1,0$ (meta)); 7.782 (1H; dt; $J_{5,6}=7,6$ (orto) $J_{5,4}=1,2$ (meta)); 7.981 (1H; dd; $J_{7,5}=7,6$ (orto), $J_{7,6}=1,0$ (meta)); 10,143 (2H; s; 8,9-H)

Masas ESI-IT (ACN): $\text{M}^- + \text{H}$: 332,1 m/z

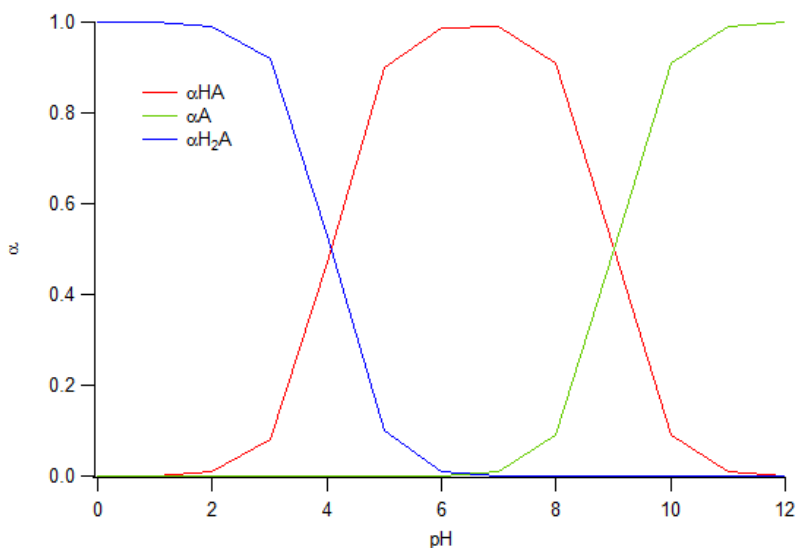
5.2.2 Curva de distribución de especies

Se calculó la curva de distribución de especies Figura 9 con los valores de pKa reportados en la literatura con el fin de determinar la concentración de cada especie presente al pH del medio de cultivo.

5.2.3 Prueba de solubilidad en el medio cultivo

Se pesaron 100 mg de fluoresceína y se agregaron a un matraz de 500 mL que contenía el medio de cultivo. Se dejó en el ultrasonido por 10 minutos para lograr que se disolviera la mayor cantidad de fluoresceína. Luego se filtró la mezcla con vacío y se dejó el sólido en el desecador. Finalmente, se pesó con el fin de conocer la cantidad de fluoresceína que no se disolvió.

Figura 9. Curva de distribución de especies con respecto al pH para las especies de la fluoresceína

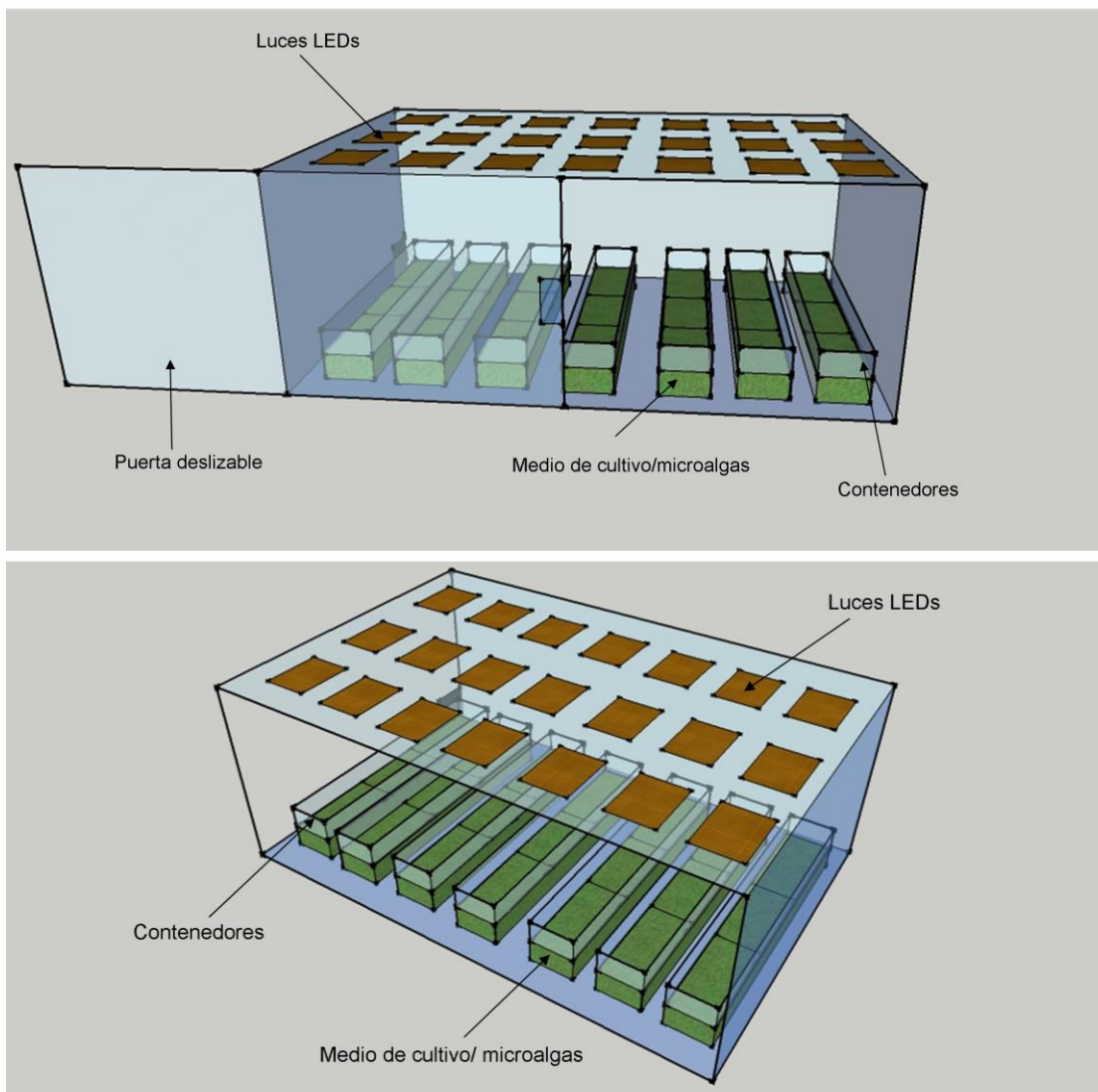


FUENTE: Autor

5.2.4 Adición de fluoresceína.

Se tomaron las siguientes concentraciones de fluoresceína: 0; 6,0; 12,0; 18,0; 24,0; 30,0 y 36,0 mg/L teniendo en cuenta la solubilidad del compuesto en el medio de cultivo es de 38,6 mg/L y como concentración de referencia 0 mg/L. Se realizaron 3 montajes en 3 tiempos diferentes. Cada concentración de fluoresceína fue evaluada por triplicado. En total para cada concentración se contó con 9 resultados.

Figura 10. Diseño del fotobioreactor



FUENTE: Autor

5.2.5 Curva de crecimiento

Se inocularon en cada uno de los contenedores 1×10^6 cel/mL. Se mantuvieron los cultivos de microalgas durante 12 días, a condiciones constantes. Se tomaron 40 μ L de cada contenedor de diferente concentración en tubos de ensayo. Los conteos se realizaron diariamente con una cámara de Neubauer siguiendo el protocolo descrito a continuación. Se tomaron 10 μ L de cada muestra y se colocaron dentro de la cámara. Se realizó el conteo en forma de zig-zag con el microscopio con aumento de 40X, se anotó la concentración, se lavó la cámara y se prosiguió con la siguiente concentración.³⁹

5.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS GRASOS DE *Chlorella vulgaris*.

La biomasa microalgal se separó del medio de cultivo mediante centrifuga a 6000 rpm. La masa celular se filtró, se lavó 3 veces con agua desionizada y se dejó secar en una estufa a 60°C por 24 horas hasta conseguir su secado completo. Las microalgas secas se dispusieron en un matraz con el solvente (hexano/metanol 70:30) y con agitación durante 24 horas (el matraz se encontraba tapado para evitar la evaporación del solvente). El extracto resultante se concentró en un rotoevaporador con el fin de eliminar los disolventes.

5.4 EXTRACCIÓN DE LOS TRIGLICÉRIDOS (TGA)

La muestra de aceite de microalgas se eluyó con 20 mL de hexano a través de un cartucho de florisil con el fin de lograr la separación de los TGA's. El resultante se concentró mediante la evaporación del solvente en una plancha de calentamiento. Se realizó caracterización por RMN.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de los recuentos de células/ mL fueron incluidos en una hoja de Excel y digitados dos veces para la validación de la base de datos. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, Inc.). Se estableció la distribución de la variable recuento, aplicando el test de Normalidad de Shapiro Wilk según el tamaño de la muestra; se asumió distribución Normal con valores de p menores de 0,05, de mantenerse el comportamiento no normal de los datos se realizó el análisis descriptivo en términos de medianas y rangos y se aplicaron pruebas no paramétricas para el análisis bi-variado.

Las diferencias estadísticas entre los recuentos de células/mL según las diferentes concentraciones de fluoresceína y el tiempo en los grupos de estudio, se determinaron a través del test de Kruskal Wallis. Finalmente, se utilizó el test de comparaciones múltiples de Dunnett para identificar los grupos en donde se encontraba dicha diferencia. Se consideró diferencia estadística significativa con valores de $p < 0,05$, con los que se rechazaron las hipótesis nulas y se aceptaron las hipótesis alternas.

5.5.1 Hipótesis:

- Hipótesis Nula:
 1. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de células/mL a través del tiempo de crecimiento en cada una de las concentraciones de fluoresceína.
 2. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de células/mL en cada una de las concentraciones de fluoresceína a través del tiempo de crecimiento.

- Hipótesis alterna:
 1. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de células/mL a través del tiempo de crecimiento en cada una de las concentraciones de fluoresceína.
 2. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de células/mL en cada una de las concentraciones de fluoresceína a través del tiempo de crecimiento.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se estableció la distribución no normal de los recuentos de cel/mL, por ser un sistema vivo tiene la tendencia a ser no normal debido a que éstos pueden ser afectados por diferentes factores como condiciones en el ambiente o en el desarrollo.

Respecto a los recuentos de células de la microalga *Chlorella vulgaris* se evidenció mayor crecimiento en todas las concentraciones de fluoresceína con respecto al control. Así mismo, el máximo crecimiento se presentó a las 255 horas y el mayor valor se determinó en la concentración de 36 mg/L de fluoresceína. También, se estableció que a las 279 horas se presentó en todas las concentraciones y el control, disminución en el crecimiento en donde se inicia fase de declive o muerte. En la Tabla 5, se muestran las medianas y rangos de las cel/mL en las diferentes concentraciones de fluoresceína y el control a través del tiempo. Únicamente, se evaluaron aquellos tiempos que metodológicamente se puedan comparar con el control.

Con respecto, al efecto de la fluoresceína en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* a través del tiempo; mediante una prueba de Kruskal Wallis se estableció que existen diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de células/mL en cada uno de los tiempos según la concentración ($p < 0,05$) (Ver Tabla 6). Por tanto, se aplicó el test de comparaciones múltiples de Dunnet demostrando que dichas diferencias se encontraban en 111, 135, 159, 255 y 279 h con el control y entre 6 mg/L y 36 mg/L en 111, 135, 159 y 255 h.

Tabla 5. Recuentos de cel/mL ($\times 10^6$) de *Chlorella vulgaris* de acuerdo a la concentración de fluoresceína y el tiempo de crecimiento.

Tiempo (horas)		15	111	135	159	183	255	279	
Concentración (mg/L)	6	Me	23,5	34,0	39,0	42,0	68,5	65,0	41,0
		R	10,0-	22,0-	33,0-	38,0-	45,0-	55,0-	20,0-
			40,0	70,0	88,0	95,0	119,0	130,0	110,0
	12	Me	43,5	50,0	55,0	62,0	97,5	100,0	65,0
		R	20,0-	35,0-	45,0-	50,0-	61,0-	62,0-	51,0-
			62,0	107,0	118,0	120,0	158,0	231,0	220,0
	18	Me	21,5	59,0	77,0	82,0	102,5	117,0	68,0
		R	19,0-	54,0-	65,0-	72,0-	78,0-	40,0-	40,0-
			66,0	118,0	137,0	142,0	152,0	206,0	141,0
	24	Me	41,0	55,5	68,0	74,5	117,0	107,0	70,0
		R	28,0-	36,0-	45,0-	58,0-	88,0-	90,0-	36,0-
			64,0	105,0	116,0	118,0	137,0	186,0	93,0
	30	Me	54,5	83,0	92,0	101,0	111,5	133,0	72,0
		R	24,0-	38,0-	59,0-	59,0-	70,0-	74,0-	63,0-
71,0			95,0	106,0	153,0	140,0	170,0	105,0	
36	Me	65,0	91,0	101,0	114,0	141,5	148,5	100,00	
	R	50,0-	58,0-	61,0-	64,0-	108,0-	96,0-	60,0-	
		79,0	127,0	144,0	148,0	201,0	217,0	207,0	
Control	Me	8,0	15,0	23,0	28,0	37,5	57,0	29,0	
	R	5,0-	10,0-	20,0-	20,0-	27,0-	40,0-	25,0-	
		12,0	26,0	34,0	40,0	52,0	60,0	44,0	
Me: Mediana; R: rango (Valor máximo - Valor mínimo)									

Tabla 6. Valores de p en los grupos de estudio según el tiempo usando Kruskal Wallis y comparaciones múltiples de Dunnet

Tiempo (horas)	P*	Post	P
111	< 0,0001	Control 111h vs. 18 mg/L 111 h	<0,01
		Control 111h vs. 24 mg/L 111 h	<0,05
		Control 111h vs. 30 mg/L 111 h	<0,001
		Control 111h vs. 36 mg/L 111h	<0,001
		6 mg/L 111 h vs. 36 mg/L 111h	<0,01
135	< 0,0001	Control 135 h vs. 18 mg/L 135 h	<0,01
		Control 135 h vs. 24 mg/L 135 h	<0,01
		Control 135 h vs. 30 mg/L 135 h	<0,001
		Control 135 h vs. 36 mg/L 135 h	<0,001
		6 mg/L 135 h vs. 36 mg/L 135 h	<0,01
159	< 0,0001	Control 159 h vs. 18 mg/L 159 h	<0,01
		Control 159 h vs. 24 mg/L 159 h	<0,05
		Control 159 h vs. 30 mg/L 159 h	<0,001
		Control 159 h vs. 36 mg/L 159 h	<0,001
		6 mg/L 159 h vs. 30 mg/L 159 h	<0,05
255	< 0,0001	6 mg/L 159 h vs. 36 mg/L 159 h	<0,01
		Control 255 h vs. 12 mg/L 255 h	<0,05
		Control 255 h vs. 18 mg/L 255 h	<0,001
		Control 255 h vs. 24 mg/L 255 h	<0,05
		Control 255 h vs. 30 mg/L 255 h	<0,01
279	0,0004	Control 255 h vs. 36 mg/L 255 h	<0,001
		Control 279 h vs. 12 mg/L 279 h	<0,05
		Control 279 h vs. 18 mg/L 279 h	<0,05
		Control 279 h vs. 30 mg/L 279 h	<0,01
		Control 279 h vs. 36 mg/L 279 h	<0,001

Por otra parte, se determinaron las diferencias estadísticas en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* de acuerdo a la concentración de fluoresceína (Ver Tabla 7). Se establecieron diferencias estadísticas en todas las concentraciones de acuerdo al tiempo de crecimiento.

Tabla 7. Valores de p en los grupos de estudio según Kruskal Wallis y comparaciones múltiples de Dunnet

Concentración (mg/L)	P*	Post	P
6	0,0078	6 mg/L 111 h vs. 6 mg/L 255 h	<0,01
12	<0,01	12 mg/L 111 h vs. 12 mg/L 255 h	<0,01
		18 mg/L 111 h vs. 18 mg/L 159 h	<0,05
18	< 0,0001	18 mg/L 111 h vs. 18 mg/L 255 h	<0,001
		18 mg/L 255 h vs. 18 mg/L 279 h	<0,01
24	0,0084	24 mg/L 111 h vs. 24 mg/L 255 h	<0,05
		24 mg/L 255 h vs. 24 mg/L 279 h	<0,05
30	0,0033	30 mg/L 111 h vs. 30 mg/L 255 h	<0,05
		30 mg/L 255 h vs. 30 mg/L 279 h	<0,05
36	0,0332	36 mg/L 111h vs. 36 mg/L 255 h	<0,05
		Control 111h vs. Control 255 h	<0,001
Control	< 0,0001	Control 111h vs. Control 279 h	<0,05
		Control 135 h vs. Control 255 h	<0,001

6.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA

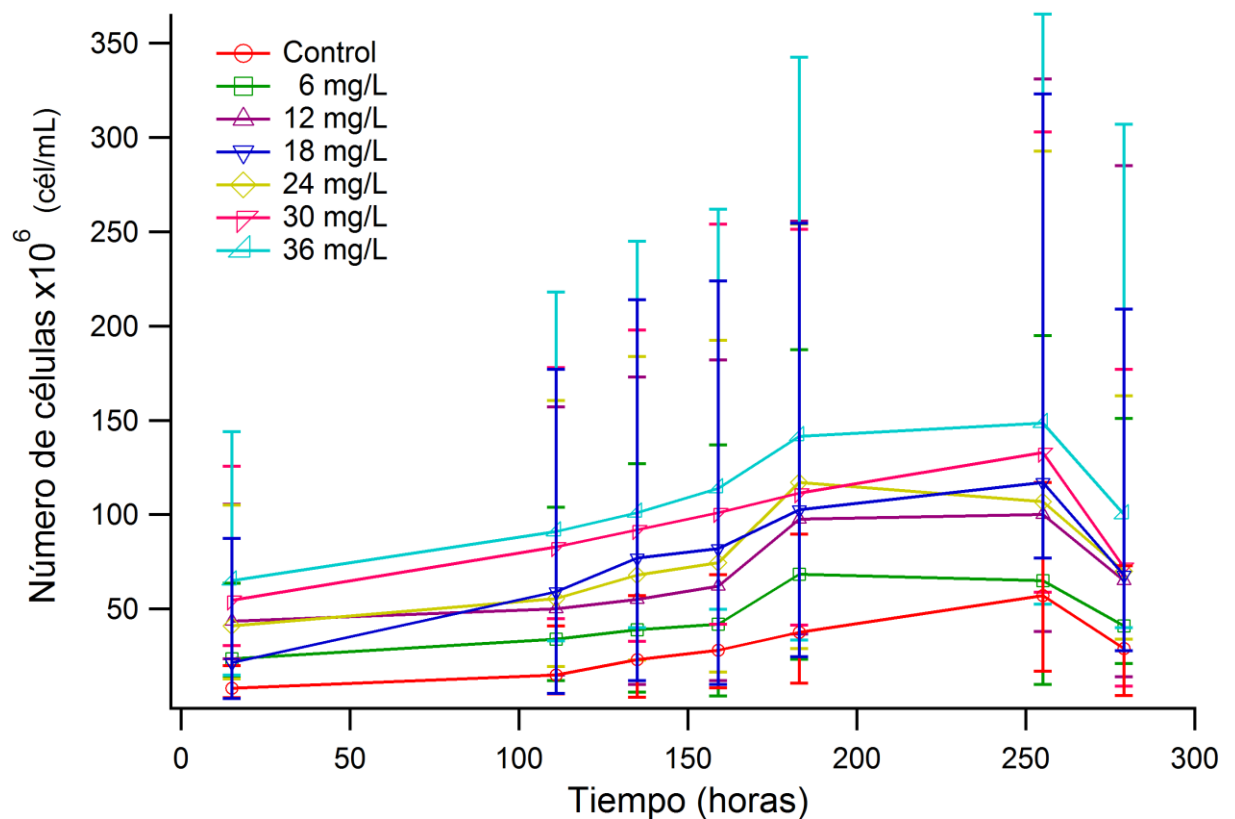
6.2.1 Crecimiento microalgal

La concentración más alta de fluoresceína (36,0 mg/L) produjo mayor protección a las longitudes de onda producidas por los LEDS favoreciendo el crecimiento de las células de las microalgas. La concentración de biomasa versus tiempo se presentan en la Figura 11 en donde se muestra el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en seis concentraciones diferentes de fluoresceína.

La máxima concentración de fluoresceína (36,0 mg/L) produjo una mayor concentración de microalgas durante el experimento, presentando un máximo de

217X10⁶ células/mL, sin embargo las microalgas expuestas sin fluoresceína no presentaron un crecimiento significativo con un máximo de concentración de células de 60X10⁶ células/mL. Como se muestra en la Figura 11 la incidencia de la fluoresceína en los experimentos es notable, ya que con la mínima concentración de fluoresceína se presenta un aumento del crecimiento en comparación con el control. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos en durante el experimento teniendo en cuenta los valores de mediana y los rangos, obtenidos en el tratamiento estadístico. La gráfica se realizó con Igor Pro 6,32A (WaveMetrics).

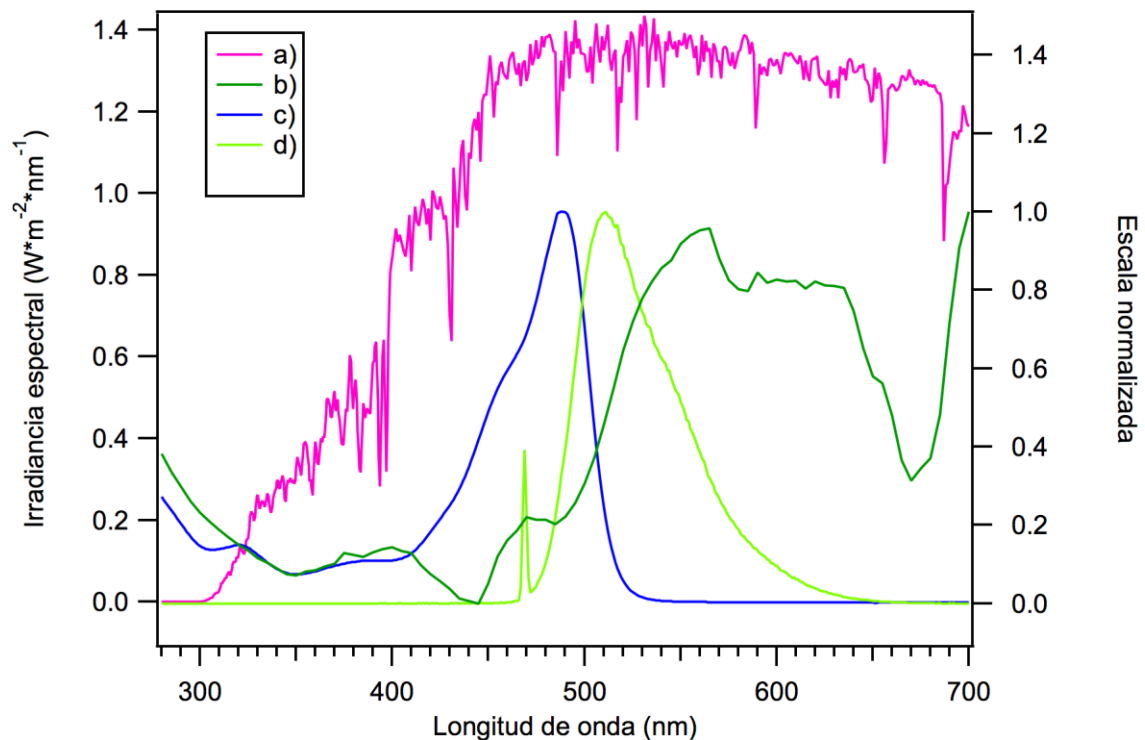
Figura 11. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de fluoresceína



FUENTE: Autor

En la Figura 12 se muestra la influencia de la fluoresceína en *Chlorella vulgaris*. La sustancia fluorescente (fluoresceína) absorbe la radiación de alta energía y fluoresce en la región del verde, en donde las microalgas tienen mayor absorción de luz; es decir que éstas pueden aprovechar mejor la radiación solar que les causa daño (radiación visible de alta energía), causando en ellas un crecimiento en mayor proporción. Gracias a esta radiación, las microalgas se reproducen más. La gráfica se realizó con Igor Pro 6,32A (WaveMetrics).

Figura 12. Influencia de la fluoresceína en microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*



- a) Espectro solar que irradia la tierra; b) Espectro de absorción de *Chlorella vulgaris*; c) Espectro de absorción de la fluoresceína; d) Espectro de fluorescencia de la fluoresceína.

FUENTE: Autor

6.3 PRODUCCIÓN DE ACEITE

Se obtuvieron 0,7546 g de biomasa en peso seco de microalgas, de los cuáles se extrajeron 0,1112 g de aceite, con un porcentaje de rendimiento de 14,74%. Este valor se encuentra entre los límites reportados en la literatura.^{17,18} Cada clase de lípido presenta una señal representativa en el espectro de RMN⁴¹, a continuación en la Tabla 8 se relacionan las señales y la clase de lípido dentro del espectro realizado al aceite final de *Chlorella vulgaris*.

Tabla 8. Asignación de señales en el ¹H de RMN para la identificación de clases de lípidos en el extracto de *Chlorella vulgaris*.

Desplazamiento químico (ppm)	Clase de lípido a la que pertenece la señal
4,052-4,244	TAG
4,508-4,526	PL + GL
2,684-2,751	PUFA
1,972-1,987	UFA

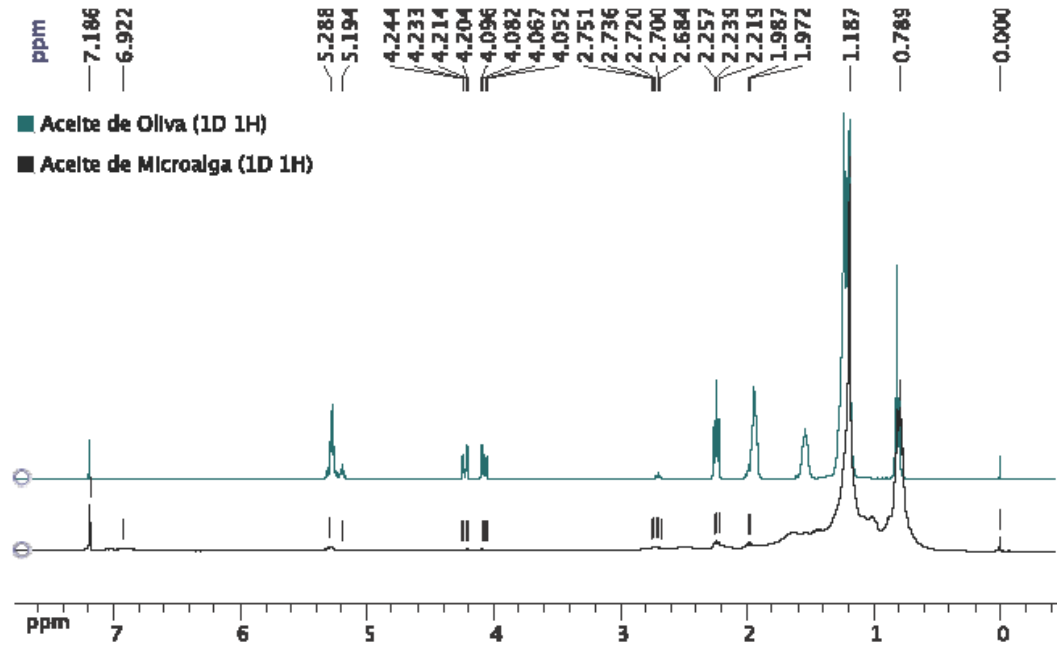
TAG: Triglicéridos, PL: Fosfolípidos, GL: Glicolípidos, PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados, UFA: Ácidos grasos insaturados.

En la Figura 13 se presenta la comparación de los resultados obtenidos en los espectros de ¹H de RMN de aceite de oliva y de aceite de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*. Se tomó el aceite de oliva como referencia debido a que su perfil de ácidos grasos es similar al del aceite de microalgas.^{41,42}

La señal de los TGA en el aceite de microalgas es poco notoria, debido a que los TGA sufren reacciones de hidrólisis que causan su descomposición. Estas reacciones pueden ser catalizadas por medio ácido, básico o enzimático. En el caso de las microalgas el medio tiene un pH cercano a 7,0 por lo que se descarta la hidrólisis catalizada por medio ácido o básico, pero estas reacciones pueden ocurrir debido al medio acuoso donde se encuentran las microalgas y por la presencia de enzimas hidrolíticas que se generan como respuesta a la restricción

de nutrientes. Estas enzimas se sintetizan para la liberación intra/extra celular de los nutrientes.²³

Figura 13. Comparación espectro ^1H de Aceite de *Chlorella vulgaris* y Aceite de Oliva (400MHz)



7. CONCLUSIONES

La adición de fluoresceína al medio de cultivo Basal Bold incrementa significativamente el crecimiento de *Chlorella vulgaris*. En los resultados se obtuvieron mayores tasas de crecimiento para aquellos cultivos en los que se añadió la mayor concentración de fluoresceína (36,0 mg/L) obteniéndose un máximo de 217×10^6 células/mL en un rango de 250-255 horas. Este tipo de técnicas en donde se añaden sustancias fluorescentes permitiría mayores tasas de crecimiento en microalgas, ya que éstas aprovecharían rangos de la luz solar (radiación visible de alta energía) que les causa daño.

Las condiciones en las que se encuentran las microalgas no permiten una fácil extracción de los triglicéridos. A pesar de que el aceite de microalgas contiene triglicéridos, éstos no representan una muestra significativa frente a las otras clases de lípidos que contiene la muestra. Este estudio abre nuevos caminos a otras investigaciones en donde se busque la producción de biodiesel a partir de microalgas.

8. DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Se escribió un artículo para publicación en la revista *Bioresource Technology*. (Elsevier, ISSN: 0960-8524)
2. Se realizó la presentación de un póster en Expoenergías 2014, Universidad Industrial de Santander.
3. Se realizó una ponencia para presentación en 249th American Chemical Society Meeting & Exposition 2015, Denver. USA.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un cultivo a mayor escala para obtener más cantidad de aceite el cuál permita su análisis y caracterización; en donde se incluya, el índice de yodo, el índice de acidez, índice de saponificación, índice de peróxidos y distribución de ácidos grasos, además de verificar si la composición no se ve alterada por las variaciones de las condiciones de cultivo con respecto a los valores reportados en la literatura.

También se recomienda evaluar otras sustancias fluorescentes; en especial aquellas cuya emisión resultado del proceso de fluorescencia ocurra en longitudes de onda más desplazadas hacia el rojo. Además, habrá que tener en cuenta la evaluación de estas sustancias en otras especies de microalgas que reporten mayor rendimiento de grasas.

De igual forma se propone realizar una prueba toxicológica, ya que la fluoresceína es una sustancia tóxica y se desconoce los efectos que pueda causar y su comportamiento en la fisiología del alga.

Por último, se sugiere estudiar la factibilidad de obtener mezclas combustibles mediante licuefacción hidro-térmica de biomasa de microalgas.

10. BIBLIOGRAFÍA

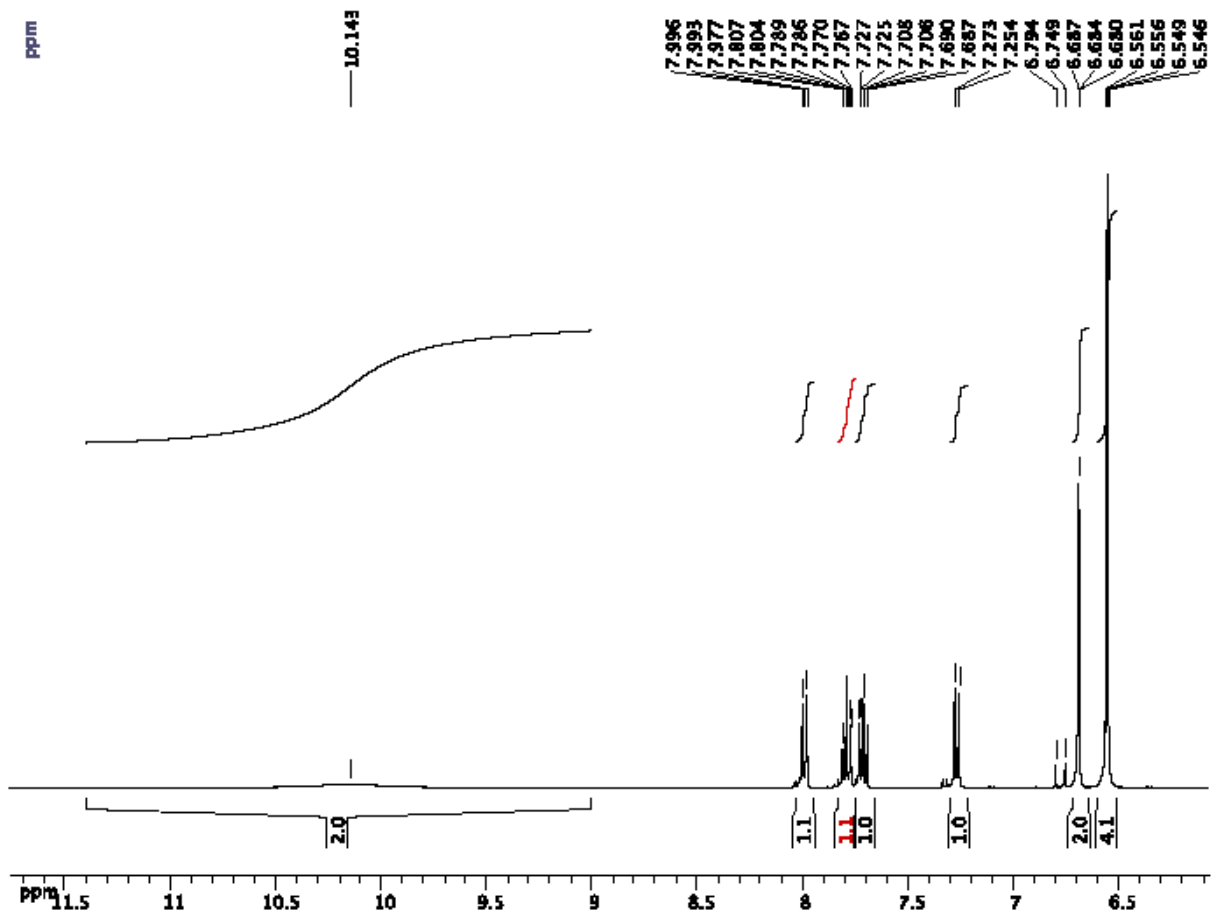
- (1) Biofuels information <http://biofuel.org.uk/>.
- (2) Demirbas, A. *Algae Energy*; Springer, Ed.; Londres, 2010; p. 199.
- (3) Ambasht, R. .; Ambasht, N. K. *Modern Trends in Applied Aquatic Ecology*; XV.; Springer: Nueva York, 2003; p. 379.
- (4) West, S. *Fundamentos de Química Analítica*; Reverté, Ed.; 4th ed.; Barcelona, 1997; p. 604.
- (5) Anderson, R. *Elsevier* **2005**, Londres, 1–21.
- (6) Mata, T. M.; Martins, A. a.; Caetano, N. S. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2010**, *14*, 217–232.
- (7) Caracol, R. Colombia tiene reservas de petróleo para 6.6 años: Minminas www.caracol.com.co.
- (8) Ahmad, L.; Yasin, N.; Derek, C.; Lim, J. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2011**, *15*, 584–593.
- (9) Rawat, I.; Ranjith Kumar, R.; Mutanda, T.; Bux, F. *Applied Energy* **2013**, *103*, 444–467.
- (10) Pilon, L.; Berberoğlu, H.; Kandilian, R. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **2011**, *112*, 2639–2660.
- (11) Demirbas, A. *Energy Conversion and Management* **2010**, *51*, 2738–2749.
- (12) Huang, G.; Chen, F.; Wei, D.; Zhang, X.; Chen, G. *Applied Energy* **2010**, *87*, 38–46.
- (13) Demirbas, A. *Applied Energy* **2011**, *88*, 3541–3547.
- (14) Surendhiran, D.; Vijay, M. *Journal of Chemical Sciences* **2012**, *2*, 71–82.
- (15) Huang, G.; Chen, F.; Wei, D.; Zhang, X.; Chen, G. *Applied Energy* **2010**, *87*, 38–46.

- (16) Chisti, Y. *Biotechnology advances* **2007**, 25, 294–306.
- (17) Månsson, S. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in nutrient solution from greenhouse tomato production, Swedish University of Agricultural Sciences, 2012, p. 32.
- (18) Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pontalier, P.-Y.; Vaca-Garcia, C. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, 35, 265–278.
- (19) Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M.; Darzins, A. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **2008**, 54, 621–639.
- (20) Maity, J. P.; Bundschuh, J.; Chen, C.-Y.; Bhattacharya, P. *Energy* **2014**, *In Press*, 1–10.
- (21) Fischer, C. R.; Klein-Marcuschamer, D.; Stephanopoulos, G. *Metabolic engineering* **2008**, 10, 295–304.
- (22) Beer, L. L.; Boyd, E. S.; Peters, J. W.; Posewitz, M. C. *Current opinion in biotechnology* **2009**, 20, 264–271.
- (23) Rosenberg, J. N.; Oyler, G. a; Wilkinson, L.; Betenbaugh, M. J. *Current opinion in biotechnology* **2008**, 19, 430–436.
- (24) Radakovits, R.; Jinkerson, R. E.; Darzins, A.; Posewitz, M. C. *Eukaryotic cell* **2010**, 9, 486–501.
- (25) Amaro, H. M.; Guedes, a. C.; Malcata, F. X. *Applied Energy* **2011**, 88, 3402–3410.
- (26) Ashraful, A. M.; Masjuki, H. H.; Kalam, M. A.; Fattah, I. M. R.; Imtenan, S.; Shahir, S. A.; Mobarak, H. M. *Energy Conversion and Management* **2014**, 80, 202–228.
- (27) Bharathiraja, B.; Chakravarthy, M.; Kumar, R. R.; Yuvaraj, D.; Jayamuthunagai, J.; Kumar, R. P.; Palani, S. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, 38, 368–382.
- (28) Lam, M. K.; Lee, K. T. **2013**, 110, 242–248.
- (29) Doan, T. T. Y.; Sivaloganathan, B.; Obbard, J. P. *Biomass and Bioenergy* **2011**, 35, 2534–2544.

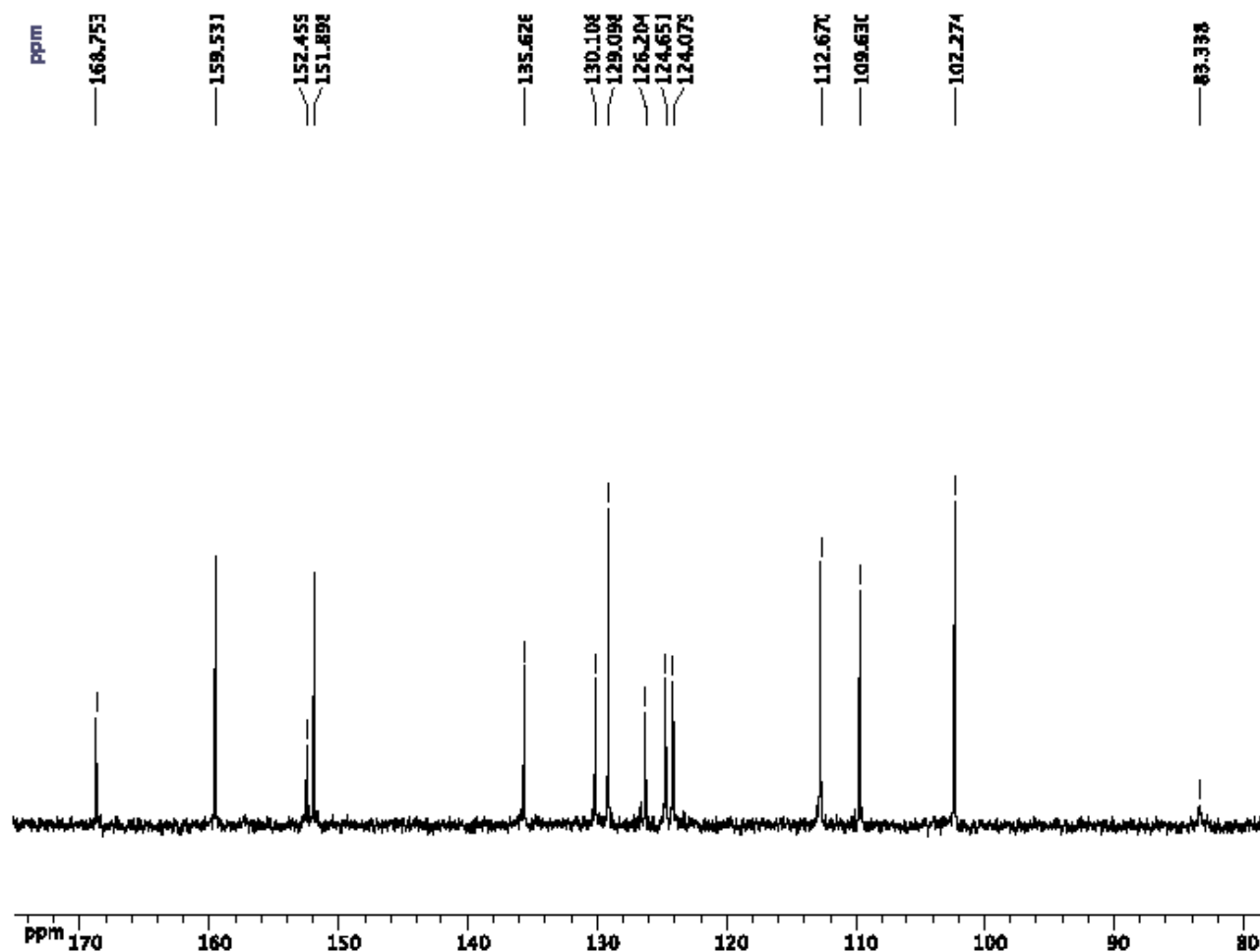
- (30) Kim, T.-H.; Lee, Y.; Han, S.-H.; Hwang, S.-J. *Bioresource technology* **2013**, *130*, 75–80.
- (31) Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, Ed.; 3rd ed.; 2006; p. 954.
- (32) Gangolli, S. *The Dictionary of Substances and Their Effects*; Royal Society of Chemistry, 1999.
- (33) Gangolli, S. *The Dictionary of Substances and their Effects*; The Royal Society of Chemistry: Reino Unido, 1999; p. 869.
- (34) Sun, W.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P. *Journal Organic Chemistry* **1997**, *62*, 6469–6475.
- (35) Mohsenpour, S. F.; Richards, B.; Willoughby, N. *Bioresource technology* **2012**, *125*, 75–81.
- (36) Wang, C.-Y.; Fu, C.-C.; Liu, Y.-C. *Biochemical Engineering Journal* **2007**, *37*, 21–25.
- (37) Katsuda, T.; Shimahara, K.; Shiraishi, H.; Yamagami, K.; Ranjbar, R.; Katoh, S. *Journal of bioscience and bioengineering* **2006**, *102*, 442–446.
- (38) Jomova, K.; Valko, M. *European journal of medicinal chemistry* **2013**, *70*, 102–110.
- (39) Anderson, R. *Algal Culturing Techniques*; Elsevier, Ed.; 2005; p. 570.
- (40) Kleinová, a.; Cvengrošová, Z.; Rimarčík, J.; Buzetzi, E.; Mikulec, J.; Cvengroš, J. *Procedia Engineering* **2012**, *42*, 231–238.
- (41) Nuzzo, G.; Gallo, C.; D'Ippolito, G.; Cutignano, A.; Sardo, A.; Fontana, A. *Marine drugs* **2013**, *11*, 3742–3753.
- (42) Barison, A.; Da Silva, C. W. P.; Campos, F. R.; Simonelli, F.; Lenz, C. A.; Ferreira, A. G. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **2010**, *48*, 642–650.

11. ANEXOS

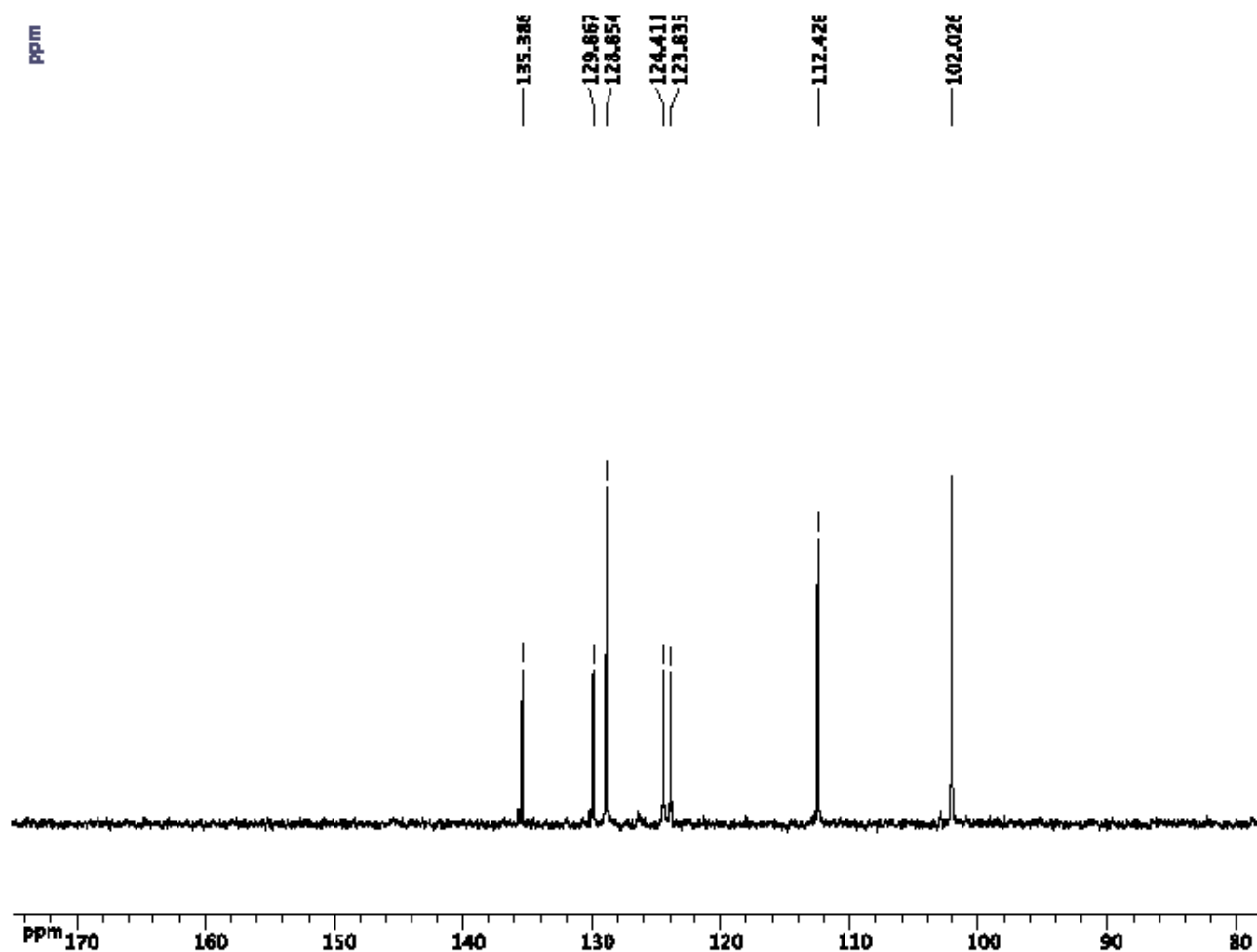
Anexo A. Espectro ^1H de la fluoresceína (400 MHz)



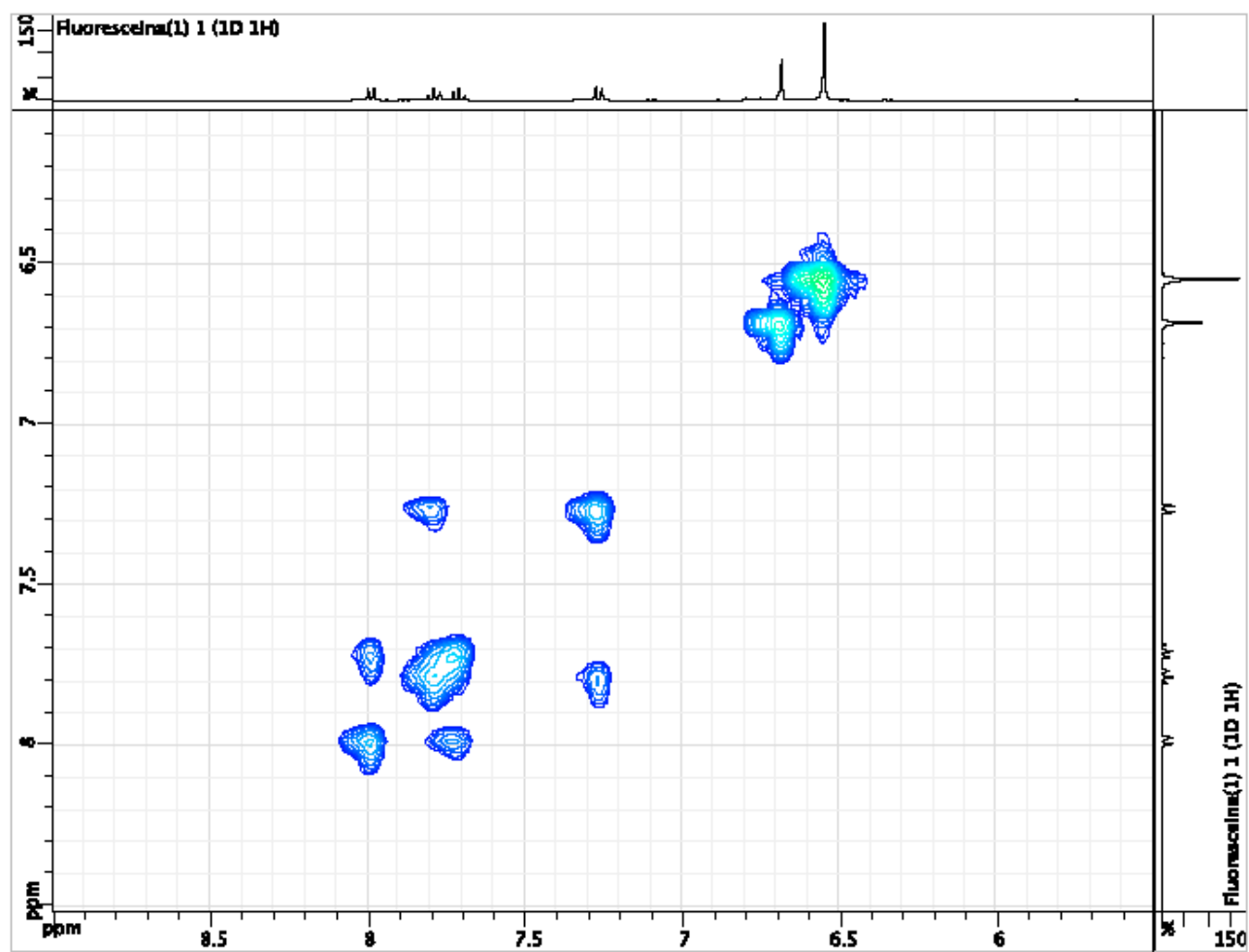
Anexo B. Espectro ^{13}C de la fluoresceína (400MHz)



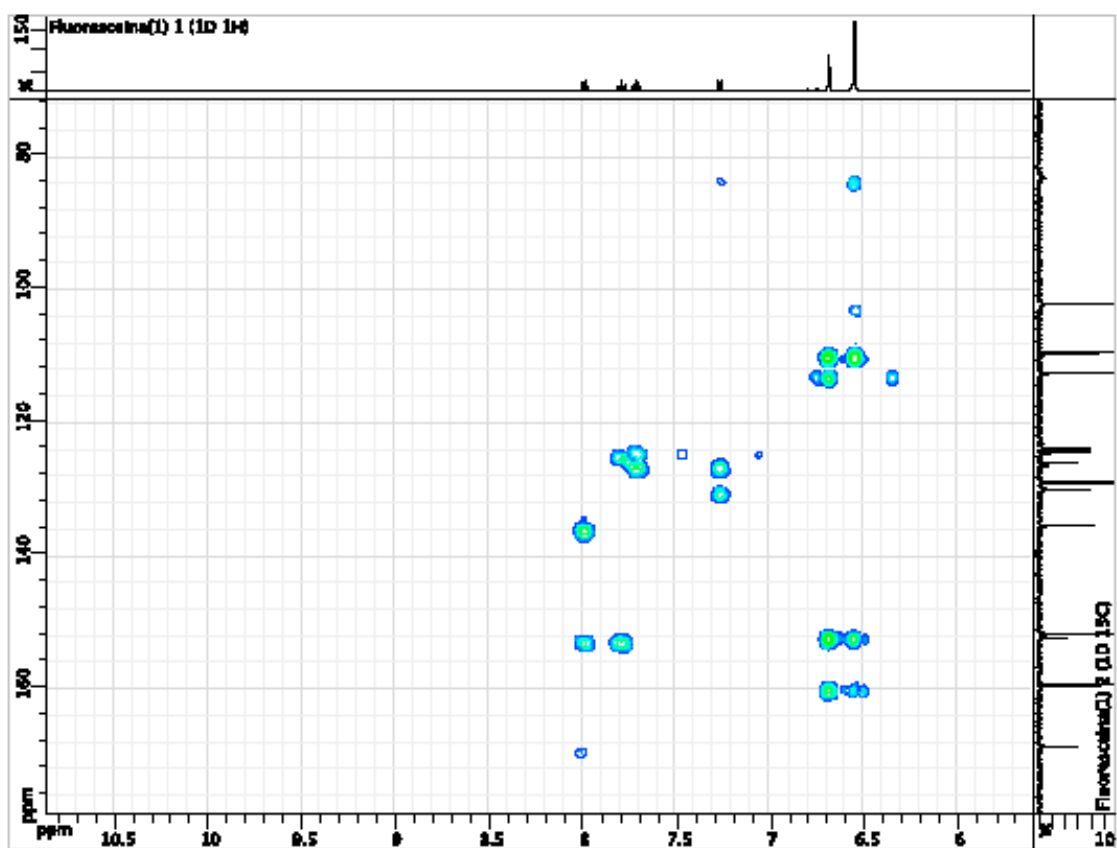
Anexo C. Espectro ^{13}C -DEPT de la fluoresceína (400MHz)



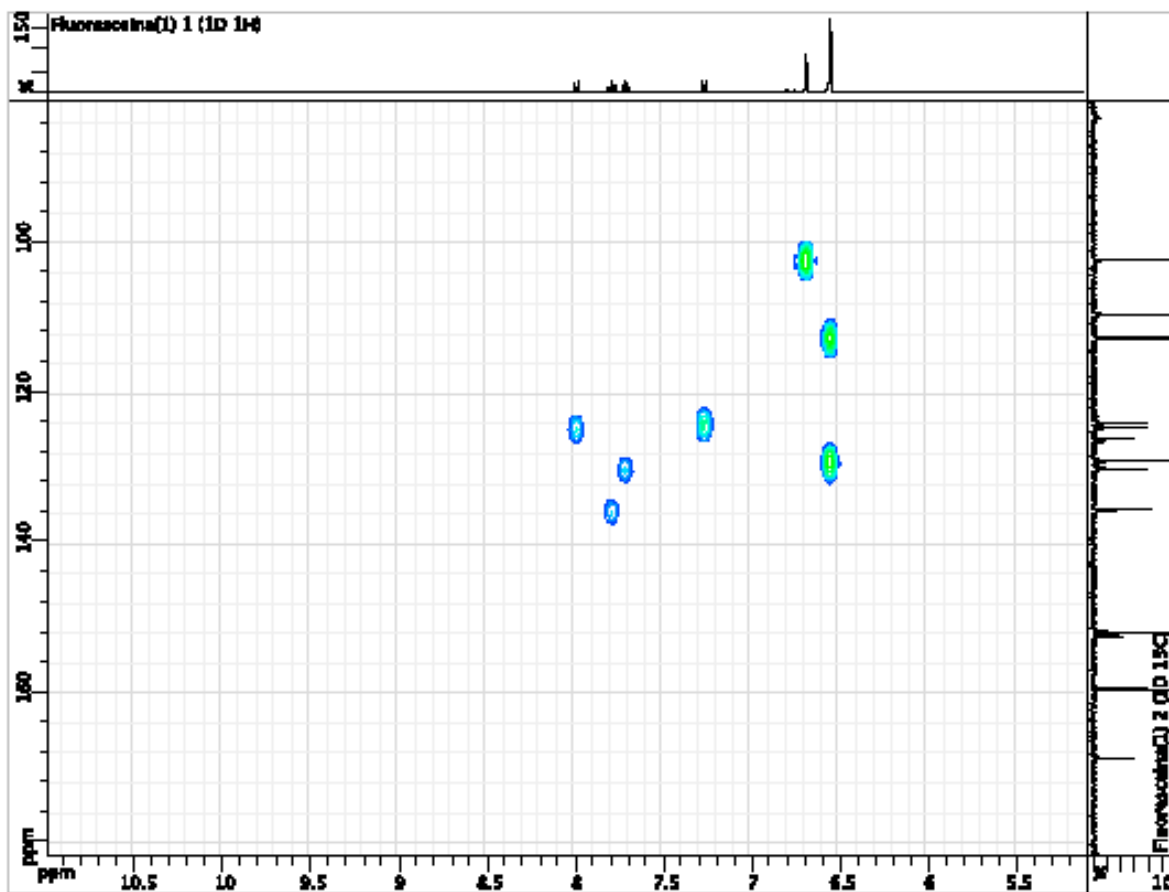
Anexo D. Espectro ^1H - ^1H -COSY de la fluoresceína (400MHz)



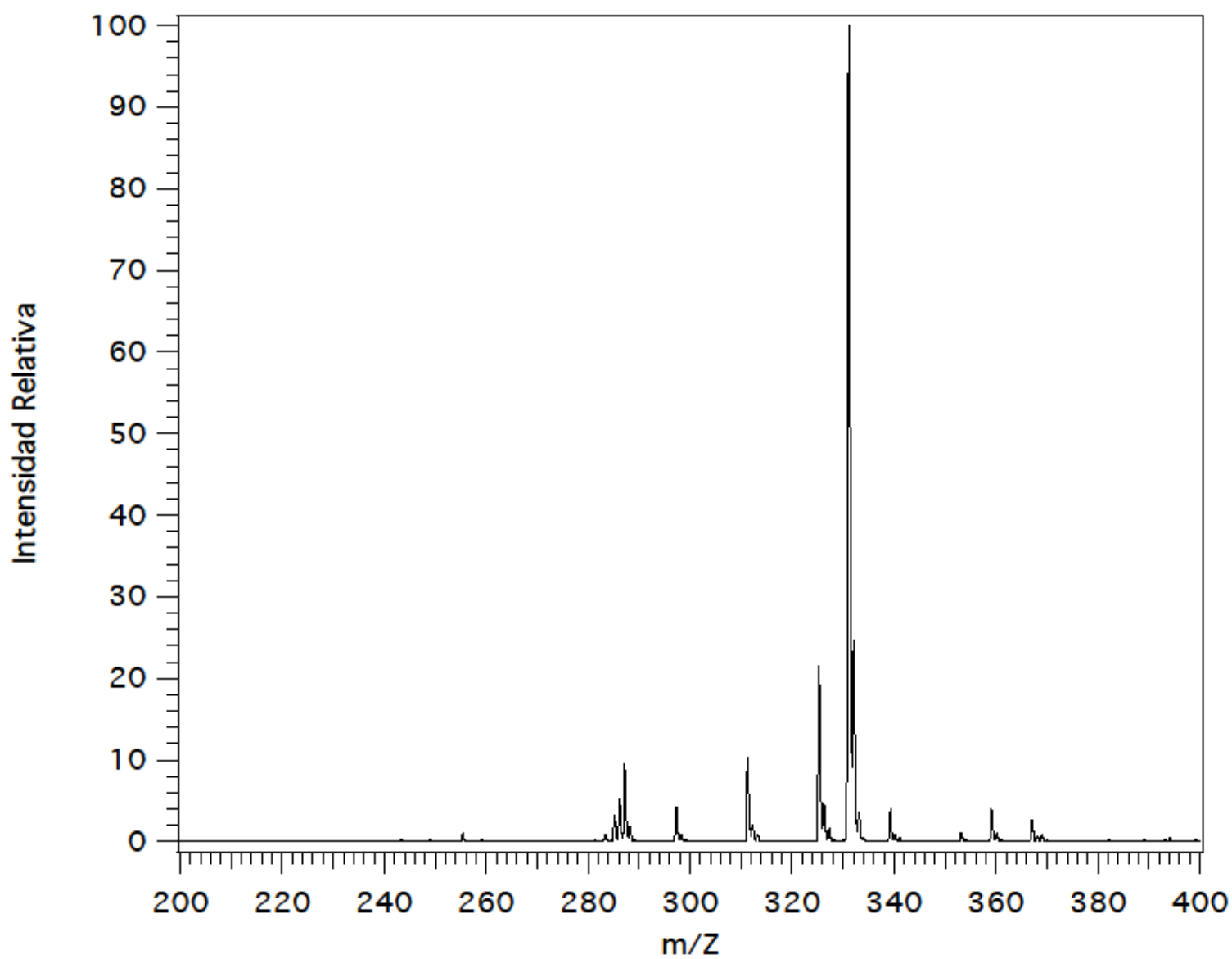
Anexo E. Espectro ^1H - ^{13}C -HMBC de la fluoresceína (400MHz)



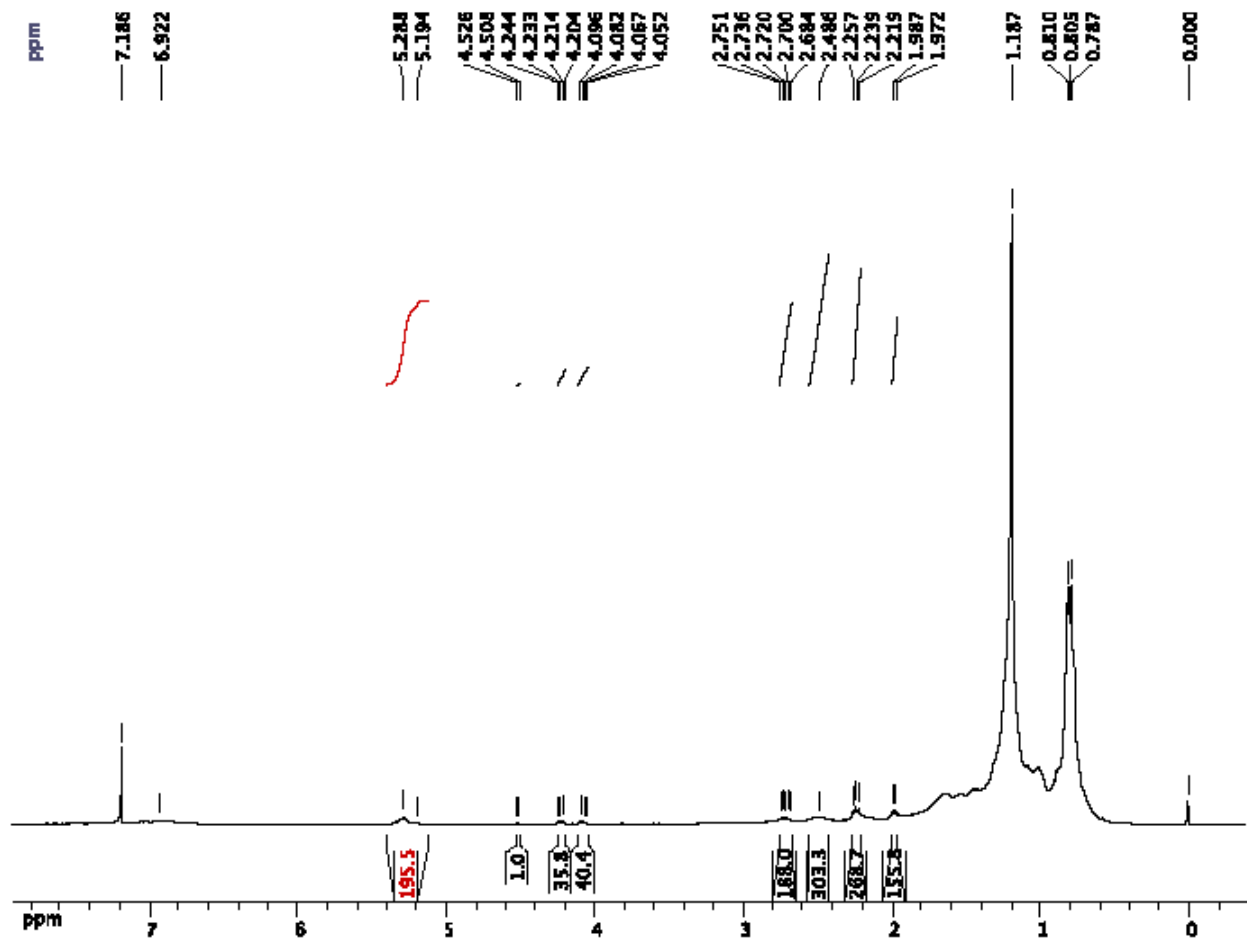
Anexo F. Espectro ^1H - ^{13}C -HSQC de la fluoresceína (400MHz)



Anexo G. Espectro masas-ESI de la fluoresceína



Anexo H. Espectro ^1H de aceite de *Chlorella vulgaris* (400MHz)



Anexo I. Espectro ^1H de aceite de *Chlorella vulgaris*- Ampliación región TGA (400MHz)

