



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS**  
**Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos**

**"Efecto de la limitación de nutrientes en el perfil de ácidos grasos de la microalga  
*Navicula incerta* y su potencial uso biotecnológico como biocombustible"**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el grado de:**

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**Presenta:**

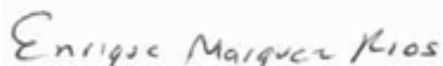
**M.BC. José Jesús Encinas Arzate**

**Hermosillo, Sonora**

**Junio 2021**

## APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “**Efecto de la limitación de nutrientes en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Navicula incerta* y su potencial uso biotecnológico como biocombustible**”, presentada por el M. C. **José Jesús Encinas Arzate**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos.



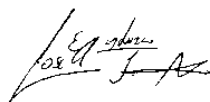
---

Dr. Enrique Márquez Ríos  
Director



---

Dr. Wilfrido Torres Arreola  
Secretario de Tesis



---

Dr. José Antonio López Elías  
Sinodal



---

Dr. José Ángel Huerta Ocampo  
Sinodal



---

Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez  
Sinodal

Hermosillo, Sonora a de 2021.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA  
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada “**Efecto de la limitación de nutrientes en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Navicula incerta* y su potencial uso biotecnológico como biocombustible**”, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Doctor en Ciencias de los Alimentos**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

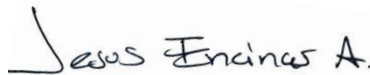
La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.



**LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN**  
Abogado General  
UNIVERSIDAD DE SONORA

**A T E N T A M E N T E**



---

**José Jesús Encinas Arzate**

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DIPA) por bríndame el apoyo y la oportunidad de poder permitirme seguir con mi superación y formación durante todos estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo y beca de manutención otorgada (No. 550564) de este trabajo de tesis **“EFECTO DE LA LIMITACIÓN DE NUTRIENTES EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA MICROALGA *Navicula incerta* Y SU POTENCIAL USO BIOTECNOLÓGICO COMO BIOCOMBUSTIBLE”**.

A todos los integrantes de mi comité de tesis, muchas gracias por enriquecer este trabajo y sus enseñanzas:

Al **Dr. Enrique Márquez Ríos**, primeramente gracias por su confianza, la oportunidad de trabajar con usted y las enseñanzas que me ha brindado todo este tiempo. Por brindarme su apoyo, tiempo y experiencia. Muchas gracias por contribuir no sólo en mi formación académica, sino también, en mi crecimiento como persona. Gracias por aceptarme como su estudiante durante este largo camino. Por su paciencia y sus palabras de apoyo. Por su guía tanto en mi formación académica (de Q.A. a doctor en ciencias) como de investigador. Lo considero más que mi director tesis, es un gran ejemplo a seguir, un gran amigo.

Al **Dr. José Antonio López Elías**, primeramente gracias por brindarme la oportunidad de trabajar con usted, me contagio el gusto del “gran pequeño mundo” de las microalgas. Gracias por sus grandes enseñanzas, no solo dentro del laboratorio o de un salón de clase, si no también fuera ellos. Por su orientación, me recordó que no sólo somos estudiantes, maestros o doctores, que primero somos personas y saber darle tiempo a lo académico, la familia, las amistades y principalmente a uno mismo. Gracias, no solo a su esfuerzo invertido para la realización de este proyecto de tesis, sino también, cuando lo he necesitado, por sus palabras de apoyo y consejos durante todo este tiempo. Por haberme facilitado los medios para llevar a cabo el desarrollo de esta tesis. Lo considero un gran ejemplo para mí. MUCHAS GRACIAS.

Gracias al **Dr. José Ángel Huerta Ocampo** por brindarme el tiempo, apoyo, paciencia y conocimientos. Me sentí como si fuera uno más de sus alumnos en el laboratorio de bioquímica de proteínas y glicanos del CIAD. Hizo que despertara más mi interés por los estudios de proteínas y me hizo comprender que la proteómica no es solo una técnica más, sino un arte.

Gracias al **Dr. Wilfrido Torres Arreola** por su efectiva colaboración. Gracias por su tiempo y experiencia dentro del área de la bioquímica de proteínas y en la elaboración de este proyecto. Nos permitió mejorar en la elaboración de este proyecto y contribuyo en mi experiencia como investigador.

Y finalmente, al **Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez** por su conocimiento y su apoyo dentro del laboratorio de investigación en productos marinos. Gracias por su atenta colaboración durante mi estancia en su laboratorio y, en general, durante toda la parte de caracterización del perfil de ácidos grasos en este proyecto.

Un especial agradecimiento a los maestros y compañeros del laboratorio de generales. Gracias a la **Dra. Ofelia** y al **maestro Guillermo** por su apoyo, tiempo y enseñanzas. Gracias a **Perla** e **Isabel** por su ayuda y el tiempo que pasamos en el laboratorio.

Un especial agradecimiento a mis demás compañeros del CIAD. A especial agradecimiento a mis compañeros del laboratorio de bioquímica de proteínas y glicanos, especialmente a **Martha Morales (Marthita)** por su ayuda y colaboración en el aprendizaje de esta técnica. Un especial agradecimiento a las maestras del laboratorio de investigación de productos marinos, principalmente a la maestra **Gisela Carvalho Ruiz**. Gracias por su tiempo, apoyo, ayuda, amabilidad, amistad y por compartir un poco de su conocimiento. Su paciencia y experiencia nos permitió obtener resultados difícilmente alcanzables. Un especial agradecimiento a mis compañeros del laboratorio Karla, Stephanie y Ofmara.

Un especial agradecimiento a la **Dr. Diana Fimbres** por brindarme todo este tiempo su amistad y una mano más en el laboratorio de acuicultura. Gracias por los momentos que compartimos juntos tanto dentro del laboratorio como fuera de ellos. Gracias por estar ahí en los festejos y en los momentos difíciles. Espero seguir contando con su amistad y seguir trabajando con usted

Para todos los miembros del **Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos**: Muchas gracias a **Coty y Gloria**. Coty, siempre lo he pensado, sin ti el posgrado no sería igual, gracias por todo el apoyo brindado. Gracias a todos los doctores, profesores, compañeros, amigos y personal administrativo y de limpieza. Un especial agradecimiento a mis compañeros María Fernanda (Mafer) y Sócrates, por su tiempo fuera del laboratorio. A la **Dra. Liz del Toro**, aunque no estuvo dentro del comité, sentí que estuvo en un lugar especial dentro. Gracias por su apoyo, amistad y compartir un poco de su conocimiento, por los buenos momentos, me hace sentir que soy parte de su TEAM.

Gracias a mis compañeros de generación de doctorado, por compartir su amistad, compañerismo, conocimientos, festejos, clases, platicas y sufrimientos durante el posgrado. **Los tengo en un lugar especial en el corazón y espero seguir colaborando con todos ustedes. Muchas gracias por todo a Liliana Maribel Pérez (Lilith), Ricardo Iván G. Vega, Raquel Bourne Murrieta, Fátima Mayboca, Mariela Menchaca Armenta y Daniel Valenzuela.** Raquel, te tocó lo más difícil, ser como una segunda mamá de toda esta generación, un especial agradecimiento por estar siempre cuidándonos. Así como nuestras representantes de los alumnos, Lilith y Mariela.

Un muy especial agradecimiento a los Maestros y doctores del laboratorio de acuicultura del DICTUS. A la **Dra. Nolberta**, a la **Dra. Norma**, al **Dr. Luis Martínez**, la **Dra. María del Carmen**, al **maestro Álvaro** y al **maestro José Luis**, por compartir sus tiempo, enseñanzas, experiencias, conocimientos y amistad en todo momento. Especialmente al maestro Álvaro por su gran apoyo, guía y palabras de aliento dentro y fuera del laboratorio.

A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Acuicultura, les estoy muy agradecido por todo este tiempo junto. Gracias por todo el tiempo que compartimos. Gracias por estar ahí tanto en las horas de trabajo como en los festejos. Gracias por los grandes momentos de amistad y paciencia que me brindaron. Muchas gracias **Maria Luisa (Marilu) y Rubria (Team panquecito), Jonathan, Damaris, Pablo, Isabel, Diana Medina, Angélica.**

Un ESPECIAL agradecimiento a mis amigos los **caballeros de la materia gris gris gris: Ricardo Iván** (alias, el “Dr. Vulgarito”), **Carlos Medina (Rueda)** y **Claudia Murrieta**. Gracias por su compañía, amistades, paciencia, palabras de aliento y consejos en todo este trayecto. Gracias por su tiempo en esta etapa de desvelos y celebraciones, ustedes estuvieron

apoyándome tanto en mis caídas y victorias, son los mejores amigos con los que uno puede contar. Gracias de todo corazón. 本当にありがとう.

Un profundo agradecimiento a quienes en algún momento estuvieron compartiendo en este tiempo. **A Roberto** Acosta, gracias por tu paciencia y apoyo en este gran paso de mi vida. Gracias por tus palabras de aliento, por esos momentos que hemos compartido y que me han servido para seguir adelante. Gracias de todo corazón por brindarme tu tiempo. A mis amistades fuera de la universidad **Mafer, Livia, Eduardo, Baltazar, Samaniego, Odel, Trini, Felipe, Miguel...** y a todos los que quizás nunca lean esto, un profundo “**gracias**” de todo corazón.

## DEDICATORIA

A Dios, por prestarme la vida permitirme realizar lo que deseo y mis sueños. Por dejarme estar acompañado de las personas que quiero y amo, muchas gracias por eso y más.

A mis padres Jorge Encinas y Lupita Arzate, gracias por su amor, apoyo, confianza y cuidados. Gracias por las enseñanzas y valores que me han inculcado. Por no dejar que nunca me rinda y seguir adelante. Ustedes son un gran ejemplo para mí.

A mis hermanos, por estar siempre presente en las buenas y en las malas, por las noches de desvelo. Por el apoyo que me han brindado y su paciencia.

A mi abuela Francisca Arnold, siempre estuviste para mí en los buenos y malos momentos. Gracias por tu amor y cuidados. Te extrañamos, que en paz descanses.

A mi amigos y compañeros, gracias por compartir este tiempo conmigo, por el apoyo, enseñanzas y los buenos y malos momentos que vivimos y viviremos juntos. ¡Gracias por estar presentes en esos momentos!

Y finalmente, a mis asesores y maestros que siempre han estado ahí, gracias por sus enseñanzas, pero más que nada, por brindarme su amistad, tiempo y confianza.

DREAM IT – PLAN IT – DO IT.



## RESUMEN

Las diatomeas son microalgas que, a pesar de su abundancia y diversidad, pocas especies se utilizan para obtener productos biológicamente relevantes. *Navicula incerta* es una diatomea bentónica con uso potencial en nutrición, salud y producción de biodiésel. Las limitaciones de nutrientes en el medio de cultivo F de Guillard y Ryther (1962) afectan la biosíntesis de metabolitos en las microalgas, principalmente ácidos grasos, cambiando su perfil lipídico. Por lo que es importante conocer las condiciones óptimas para su crecimiento y producción de compuestos de interés, mejorando su uso potencial. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la limitación de nitratos y silicatos en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Navicula incerta* y su potencial uso como biodiésel. Para los medios de cultivos de *Navicula incerta*, se utilizó como control el medio F/2 Guillard y Ryther y se evaluaron diferentes concentraciones de nitrógeno (N/4, N/8 y N/16) y silicatos (Si/4, Si/8 y Si/16). Se evaluó el efecto de las limitantes de nutrientes sobre la concentración celular, clorofila-a, composición proximal y el perfil de ácidos grasos. Se encontró que diferentes concentraciones de nutrientes afectaron la cinética de crecimiento de la diatomea y la composición química (proteínas, lípidos y carbohidratos), el contenido de cenizas, humedad y clorofila. Se identificaron diez ácidos grasos. Se utilizaron perfiles de ésteres metílicos de ácidos grasos para calcular las propiedades del biodiésel, tales como índice de cetano (IC), índice de yodo (IV) y punto de obstrucción del filtro frío (CFPP °C). Las limitaciones de nutrientes provocaron una disminución en la cantidad de biomasa, clorofila y contenido proximales ( $p < 0.05$ ). Se observó una tendencia ( $p < 0.05$ ) a disminuir los ácidos grasos saturados (AGS) y a aumentar los monoinsaturados en todos los tratamientos limitantes de nutrientes, mientras que en el contenido de poliinsaturados se mostró un aumento en los tratamientos limitantes de nitratos y Si/16. Las propiedades calculadas del biodiésel se compararon de acuerdo con las normas ASTM D6751 (Estados Unidos) y la EN 14214 (Europa). En conclusión, la concentración de nutrientes alteró el metabolismo y la biosíntesis de compuestos en la microalga *Navicula incerta* afectando la concentración celular, el contenido de clorofila-a, perfil químico proximal y perfil de ácidos grasos en todos los tratamientos limitantes de nutrientes, principalmente en los tratamientos N/16 y Si/16 mostrando un potencial uso como biodiésel.

## ABSTRACT

Diatoms are microalgae that despite their abundance and diversity, few species are used to obtain biotechnologically relevant products. *Navicula incerta* is a benthic diatom with potential use in nutrition, health and biodiesel production. Nutrient limitations in the medium affect the biosynthesis of metabolites, principally fatty acid, changing its lipid profile. The limitation of nutrients in the culture medium F/2 of Guillard and Ryther (1962) affect the biosynthesis of metabolites in microalgae, like fatty acids, changing their lipid profile from the microalgae. The aim of this work was to evaluate the effect of the limitation of nitrates and silicates on the fatty acid profile of the microalgae *Navicula incerta* and its potential use as biodiesel. For the microalgae cultures, F/2 media was used as the control, and different concentrations of nitrogen (N/4, N/8 and N/16) and silicates (Si/4, Si/8 and Si/16) were evaluated. Cell concentration, chlorophyll-a, proximal composition and fatty acid (FA) profile were measured. It was found that different concentrations of nutrients affected the growth of diatoms and affected the concentrations of ash, chlorophyll, protein, lipids and carbohydrates. Ten fatty acids were identified. Fatty acid methyl ester profiles were used to calculate the properties of the biodiesel such cetane number (CN), iodine value (IV) and cold filter plugging point (CFPP °C). Nutrient limitations decreased ( $p < 0.05$ ) the amount of biomass, chlorophyll and proximal content. A tendency ( $p < 0.05$ ) of decreasing saturated FA and increase in monounsaturated was observed in all nitrate limitations and Si/16 treatment. The calculated biodiesel properties were compared in agreement with biodiesel standards ASTM D6751 (United States) and the EN 14214 (Europe). In conclusion, nutrient concentration altered the metabolism and biosynthesis of compounds in the microalgae *Navicula incerta* affecting the cellular concentration, chlorophyll-a, proximal chemical and fatty acid profile in all treatments, principally in the N/16 and Si/16 treatment showing potential for biodiesel production.

## CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN.....	i
DERECHOS DE AUTOR.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CONTENIDO.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABLAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Microalgas.....	3
Usos de Microalgas.....	3
Utilización de microalgas en la Acuicultura.....	4
Cultivo de Microalgas.....	5
Factores que afectan el cultivo de microalgas.....	7
Nitrógeno.....	7
Silicatos.....	9
<i>Navicula incerta</i> .....	9
Nutraceútica y Nutrición Humana.....	10
Ácido $\alpha$ -Linolenico (ALA).....	13
Ácido Eicosapentaenoico (EPA) y Ácido Docosahexaenoico (DHA)	16
Ácido Linoleico (LA).....	19
Biocombustible.....	20
Propiedades del biodiésel.....	21
Índice de cetano.....	21
Densidad.....	24
Viscosidad.....	24
Índice de Yodo.....	25
Índice de Acidez.....	25
Punto de Obstrucción de Filtro en Frío.....	26
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO.....	29
Objetivo General.....	29
Objetivos específicos.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Microalga y condiciones de cultivo.....	30
Cinética de Crecimiento.....	30
Contenido de Clorofila.....	32
Composición Química.....	32
Perfil de Ácidos Grasos.....	33
Cálculo de las propiedades del combustible a partir de los perfiles de	

ácidos grasos.....	34
Diseño Experimental.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
Concentración y Tasa de Crecimiento de Microalgas.....	36
Contenido de Clorofila.....	38
Contenido de Proteína.....	40
Contenido de Carbohidratos.....	42
Contenido de Lípidos.....	42
Propiedades calculadas del biodiésel a partir de los perfiles de ácidos grasos de <i>Navicula incerta</i> .....	45
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXOS.....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Imágenes al microscopio de células de <i>Navicula incerta</i> en objetivo de 100X e inmersión de aceite.	11
2	Estructura del 1) ácido eicosapentaenoico (EPA) y 2) ácido docosahexaenoico (DHA).	15
3	Proceso enzimático de desaturación en la síntesis de ácidos grasos $\Omega$ -3 y $\Omega$ -6.	17
4	Recolecta de biomasa de cultivo de <i>Navicula incerta</i> en medio F/2 de Guillard y Ryther (1962). a) tratamiento control, b) tratamiento limitante en nitratos N/16 y c) tratamiento limitante en silicatos Si/16.	31
5	Efecto de la limitación de nitrógeno y silicatos en la cinética de crecimiento de <i>Navicula incerta</i> .	37
6	Efecto de la limitante de nitratos y silicatos en la concentración de clorofila en <i>Navicula incerta</i> .	39

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Nomenclatura de los ácidos grasos esenciales.	14
2	Propiedades del Biodiésel, métodos de prueba y valores límites para diferentes estándares en el mundo.	22
3	Efecto de la limitación de nitrógeno y silicato en el medio F/2 en la composición proximal de <i>Navicula incerta</i> .	41
4	Perfil de ácidos grasos de <i>Navicula incerta</i> a diferentes concentraciones de nitratos (N) y silicatos (S) en el medio F/2 de Guillard y Ryther.	44
5	Efecto de la concentración de nitratos (N/4, 0.44 mol/L; N/, 0.22 mol/L; N/16 0.11 mol/L) o silicatos (Si/4, 0.08 mol/L; Si/8, 0.04 mol/L; Si/16 0.02 mol/L) en medio F/2 Guillard y Ryther en las propiedades del biodiésel del perfil de ácidos grasos de <i>Navicula incerta</i> .	47

## INTRODUCCIÓN

La diatomea marina *Navicula incerta* se ha estudiado recientemente por su capacidad de producir gran cantidad de biomasa y compuestos de interés para el ser humano (Nuño *et al.*, 2013; López-Elías *et al.*, 2015). Entre estos metabolitos se encuentran diferentes pigmentos, proteínas, algunos carbohidratos azufrados y ácidos grasos mono y poliinsaturados. La producción de los metabolitos, principalmente la cantidad de lípidos y el perfil de ácidos grasos presentes en las microalgas, como *Navicula incerta*, es afectada por diversos factores en el medio de cultivo. En este trabajo se utilizaron diferentes concentraciones de nitratos o silicatos en cultivos de *Navicula incerta* en el medio de cultivo F/2 Guillard y Ryther para evaluar su efecto en la composición proximal y el perfil de ácidos grasos. Entre los principales factores que afectan el crecimiento de esta microalga está la temperatura, la intensidad de luz, la concentración de sales, metales y nutrientes presentes en el medio de cultivo. Cuando el contenido de nutrientes como el carbono, nitrógeno, silicio y fósforo (solos o en combinación) son limitados, la tasa de crecimiento celular disminuye, debido a una estrategia de supervivencia celular. En consecuencia, el flujo de energía para la fijación de carbono por fotosíntesis se desvía hacia la síntesis de otros compuestos como lípidos o carbohidratos (Jiang *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2013).

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes en las dietas para el cultivo de microalgas, ya que es el principal regulador del crecimiento celular, así como en la producción y acumulación de proteínas y lípidos (Rodolfi *et al.*, 2009). Sin embargo, en algunos cultivos de microalgas, una mayor concentración de nitrógeno en el medio de cultivo no aumenta la producción de lípidos, teniéndose que utilizar otras estrategias como la variación en la temperatura, la salinidad o la concentración de nutrientes como el fósforo o silicatos sí afectan la producción de estos metabolitos. La limitación de nutrientes es una de las estrategias más usadas y fácil de controlar en los cultivos de microalgas para la producción de metabolitos de interés. En el caso de las diatomeas, el contenido de silicatos es importante para la biosíntesis de la pared celular, produciendo cambios en la biosíntesis de algunos compuestos de interés como los ácidos grasos y en la división celular (Mock *et al.*, 2008;

Muhseen *et al.*, 2015). Por lo anterior, es importante el estudiar, analizar y comprender cómo afecta la cantidad de nutrientes el metabolismo y la producción de compuestos de interés como los ácidos grasos en la microalga *Navicula incerta*.

Los ácidos grasos que produce *Navicula* sp. no solo tienen importancia como nutriente en la acuicultura y salud humana (en particular el Ácido Eicosapentaenoico o EPA), sino también en la producción de biocombustible. Algunos de los usos de los ácidos grasos en la salud humana están relacionados con el cuidado de enfermedades cardíacas, diabetes, colesterol, desarrollo de ojos, cerebro y tejidos, entre otros (González-Aguilar *et al.*, 2014). La característica del biocombustible o biodiésel producido dependerá de la concentración de los ácidos grasos extraídos de las microalgas. Una de las formas de determinar las propiedades del biocombustible es por medio de las ecuaciones de Islam *et al.* (2013) y Krisnangkura (1986) utilizando la cuantificación ácidos grasos de *Navicula incerta*. Dentro las características deseables están el número de cetano, densidad, índice de acidez, punto de obstrucción de filtro en frío, entre otras. Cada país tiene normas sobre los rangos que debe presentar el biodiésel elaborado. México no cuenta con un documento oficial sobre las características que debe presentar el biodiésel; sin embargo, hay normas en otros países como Estados Unidos (EN 14214) y países europeos (ASTM D6715) que señalan los rangos óptimos que deben tener los biocombustibles para su uso. La producción y acumulación de metabolitos como los ácidos grasos dependen principalmente de las condiciones de cultivo; por lo que, dos de las principales consideraciones en los en los medios cultivo de microalgas son la cantidad y fuente de nutrientes.

Es por ello, que en esta investigación se evaluó el efecto de la limitación de nitratos y silicatos en la producción de biomasa, clorofila y principalmente en la producción de ácidos grasos en *Navicula incerta* para poder evaluar su potencial uso biotecnológico, principalmente en la producción de biodiésel. Por medio de este estudio se proponer lograr una alternativa viable y económica para la producción de *Navicula incerta* con una mayor cantidad de biocompuestos de interés como los ácidos grasos mono y poliinsaturados.



## **ANTECEDENTES**

### **Microalgas**

Las microalgas son organismos microscópicos responsables de al menos la mitad de la productividad primaria del planeta. Son microorganismos que poseen clorofila y se encuentran distribuidos en hábitats terrestres y acuáticos (Richmond, 2004). Son clasificadas tradicionalmente según sus pigmentos fotosintéticos, tanto eucariontes (rodofitas, clorofitas, dinofitas, crisofitas, prymnesiofitas, bacillariofitas, xantofitas, eustigmatofitas, raphidofitas y feofitas) como en procariontes (cianobacterias).

### **Usos de Microalgas**

A lo largo de la historia los usos de las microalgas han ido diversificándose, desde su empleo tradicional como fuente de alimento, hasta posibles usos como tratamientos contra enfermedades (Skjånes *et al.*, 2013). Las microalgas se emplean principalmente en la acuicultura, nutracéutica y recientemente en la producción de biocombustible (biodiésel). Debido a su capacidad para producir distintos tipos de metabolitos bajo determinadas condiciones de crecimiento, las microalgas son capaces de generar metabolitos secundarios de importancia en la industria cosmética, farmacéutica, nutracéutica y otras (Chae *et al.*, 2006). Entre otros productos que se pueden desarrollar a base de las microalgas están herbicidas, pesticidas, antibióticos, compuestos anticancerígenos y antivirales, con actividad antiinflamatoria y antidiabética (Patel & Goyal, 2013; Skjånes *et al.*, 2013).

De entre todos los usos comerciales ya mencionados, la generación de productos con aplicación industrial constituye, en la actualidad, el aspecto central de la biotecnología de microalgas. Muchas especies producen, como resultado de su metabolismo, compuestos biológicos de interés como pigmentos, lípidos, polisacáridos y vitaminas, entre otros (Gellenbeck, 2012).

## Utilización de microalgas en la Acuicultura

En la acuicultura, las microalgas generalmente se utilizan frescas (como componente único o como aditivo alimentario), para la coloración de la carne de salmónidos, inducir actividades biológicas como la maduración gonadal, aumentar el contenido de ácidos grasos como el eicosapentanoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA) en organismos acuáticos. Es por esto que son necesarias para la nutrición de diferentes organismos cultivados. Su consumo puede ser de forma directa (en el caso de moluscos y de camarones peneidos) o indirectamente (alimento para las presas vivas que se usan para alimentar las larvas de peces) (Muller-Feuga, 2000). Las microalgas utilizadas como alimento tienen que cumplir varios criterios, entre los cuales se encuentra la calidad nutrimental, ser de fácil cultivo y no ser tóxicas. Entre los nutrientes más importantes para su consumo se encuentran las proteínas. Las microalgas no sólo deben de presentar una cantidad apropiada de proteínas, sino también un adecuado perfil de aminoácidos. El contenido de ácidos grasos altamente insaturados como el EPA, ácido araquidónico (AA) y DHA es otro parámetro importante. El perfil lipídico es de gran importancia para los organismos acuáticos, ya que es uno de los requisitos importantes para el crecimiento y la metamorfosis de muchas larvas a organismos adultos (Apt & Behrens, 1999). Bajo condiciones donde los nutrientes no están limitados, las microalgas típicamente contienen de 10 a 40% de proteína, 10 a 30% de lípidos, 5 a 30% de carbohidratos y 10 a 40% de cenizas respecto a su peso seco (Renaud *et al.*, 1999; Volkman y Brown, 2005). Otros de los criterios importantes que hay que tener en cuenta para emplear microalgas como alimento en la acuicultura, son el tamaño ideal para ser ingeridas y si presentan pared celular que pueda ser digerible para el organismo.

El principal uso de las microalgas es como alimento en la crianza de varias especies de organismos marinos. La composición nutrimental de las microalgas es un factor importante que determina el éxito en los cultivos (Geng *et al.*, 2016). Incrementar el valor nutrimental de las microalgas utilizadas como alimento aumenta el valor nutrimental de los organismos alimentados con ellas y por ende su valor en el mercado. En la alimentación de salmónidos (Japón y Canadá) se emplean las microalgas con el objetivo de aumentar la cantidad de ácidos

grasos insaturados en los filetes de estos peces y como fuente de pigmentos (Chini Zittelli *et al.*, 1999; Spolaore *et al.*, 2006). En la alimentación de carpas, el uso de *Arthrospira* sp. realza los patrones rojos y amarillos de los especímenes, dejando un color más deseable en el mercado, debido a su contenido de pigmentos (Todd-Lorenz & Cysewski, 2000; Spolaore *et al.*, 2006). En el caso de la alimentación de moluscos, el uso de la diatomea *Haslea ostrearia* en ostras produce una coloración azul-verdoso en sus branquias y palpos labiales aumentando no solo su valor nutrimental, sino también su valor en el mercado hasta en un 40% (Muller-Feuga, 2000; Spolaore *et al.*, 2006).

Distintos estudios han evaluado el efecto que tienen algunas especies de microalgas plantónicas sobre la respuesta fisiológica e inmune en camarones y peces (Spolaore *et al.*, 2006; Borowitzka, 2013; Lomeli-Ortega & Martínez-Díaz, 2014). Medina-Félix *et al.* (2017), trabajando con camarones *Litopenaus vannamei* infectados con *Vibrio parahaemolyticus*, obtuvieron una tasa de supervivencia más alta empleando alimentos suplementados con *Dunaliella* sp. (30.9%) en comparación con el grupo control (20.0%). Madhumathi y Rengasamy (2011) evaluaron el efecto de dietas con *Dunaliella salina* al 1 y 2% en alimentos para camarones *Penaeus monodon*, mostrando la capacidad de la microalga como agente protector contra la infección por el virus de la mancha blanca, mejorando su respuesta inmune. Este incremento de la supervivencia se le ha atribuido a la concentración de pigmentos naturales presentes en las microalgas. Los pigmentos presentes en algunas microalgas han sido evaluados para su uso como fuente de antioxidantes, debido a su alto contenido de pigmento (como los carotenos) (Affan *et al.*, 2007, Gellenbeck, 2012).

### **Cultivo de Microalgas**

Entre los factores más importantes en el establecimiento de un proceso de producción de microalgas para la obtención de un compuesto de interés, tenemos los ambientales como la temperatura, pH, irradiancia, nutrientes y metales solubles, entre otros. Además, es igualmente necesario definir las condiciones de operación, el sistema de cultivo, la fuente de

energía y de carbono que puedan inducir la síntesis/acumulación de diferentes compuestos de interés (Makareviciene *et al.*, 2013). Estas condiciones no solo pueden alterar las rutas metabólicas, sino que además pueden provocar cambios en la cantidad de biomasa y tiempos de cosecha. Por medio de estos factores (como la temperatura, nutrientes, fuente de carbono, etc.) se pueden hacer cultivos dependiendo de sus rutas metabólicas:

- Autotrófico: Utiliza luz, ya sea natural (solar) o artificial (uso de lámparas con focos o LEDS de diferentes longitudes de onda) como fuente de energía y CO<sub>2</sub> como fuente de carbono (Abreu *et al.*, 2012).
- Heterotrófico: No todas las especies de microalgas pueden crecer en este tipo de cultivos. La energía y el carbono se obtienen de la oxidación de sustratos orgánicos sin necesidad de luz. El control del proceso es máximo, pero el costo del proceso es elevado (Pérez-García *et al.*, 2011).
- Mixotrófico: Las microalgas realizan fotosíntesis en presencia simultánea de una fuente de carbono orgánico e inorgánicos (Abreu *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2012).

Además, dependiendo del régimen de operación, los cultivos de microalgas pueden clasificarse en estacionarios, semicontinuos y continuos (Yuan-Kun & Hui, 2004). En el cultivo estacionario se parte de un medio de cultivo y condiciones establecidas. La concentración de la biomasa va incrementándose hasta agotar nutrientes y al final, se cosecha la biomasa. En los cultivos semicontinuos se parte de un medio de cultivo y condiciones establecidas como el cultivo estacionario, sin embargo, en este se realizan diluciones cada cierto tiempo, con el fin de renovar una parte del cultivo. Esto mediante el cosechado parcial de la biomasa y agregando al mismo tiempo medio de cultivo con el fin de recuperar el volumen inicial usando el mismo cultivo e inóculo (Henrard *et al.*, 2011). Los cultivos continuos se caracterizan en que el medio de cultivo se añade continuamente en el biorreactor mientras que una cantidad de la biomasa del cultivo se saca simultáneamente (Henrard *et al.*, 2011).

## **Factores que Afectan el Cultivo de Microalgas**

Para alcanzar la máxima concentración de compuestos de interés producidos por microalgas es importante tener en cuenta los factores que determinan el crecimiento y la biosíntesis del compuesto. Entre los factores de mayor importancia están el medio de cultivo, pH, temperatura e iluminación (Hu, 2004). El medio de cultivo debe suministrar todos los nutrientes requeridos para el crecimiento de la microalga. Entre los nutrientes esenciales se encuentran N, P, S, Mg, Ca, K, algunos metales y en el caso de las diatomeas el Si disuelto. El intercambio de gases debe asegurar el aporte de CO<sub>2</sub> y la retirada del O<sub>2</sub> fotosintético. Otro de los factores determinantes para el crecimiento óptimo de las microalgas es la disponibilidad de luz. La irradiancia promedio recibida por cada célula está determinada por la irradiancia incidente, la geometría del reactor y el sistema de mezclado, así como la fuente de luz (que genere o no calor) y longitud de onda usada (Masojídek *et al.*, 2004; Vonshak & Torzillo, 2004; Ras *et al.*, 2013).

### **Nitrógeno**

Uno de los nutrientes más importantes en los cultivos es el nitrógeno. Éste es uno de los elementos más abundantes de los componentes intracelulares de las algas y un componente clave de las proteínas y los ácidos nucleicos, llegando a representar el 1-10% del peso seco de la mayoría de las microalgas (Perez-García *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2014). En su ausencia las proteínas no pueden ser sintetizadas, por lo que juega un papel importante en el control del crecimiento y el metabolismo de los organismos. Se sabe que la limitación de nitrógeno es un desencadenante de la síntesis de lípidos en algunas especies de algas y microalgas (Huang *et al.*, 2013; Vítová *et al.*, 2015).

El nitrógeno puede ser aprovechado por las microalgas en diferentes estados de oxidación, ya sea en forma de nitratos, nitritos, amonio y compuestos orgánicos, incluyendo

aminoácidos, urea y proteínas, siendo las formas más comunes nitratos, urea y amonio (Taziki *et al.*, 2015). La influencia del nitrógeno como nutriente sobre el perfil lipídico puede ser específico de la cepa y puede afectar la tasa de crecimiento, así como el contenido y tipo de lípidos en diferentes especies. Sin embargo, la elección de una fuente y la concentración de nitrógeno para promover una alta producción de biomasa pueden no apoyar la productividad de lípidos y viceversa, por lo que las concentraciones de nitrógeno y los compuestos nitrogenados específicos necesitan determinarse con precisión para optimizar la síntesis de los productos deseados (Jiang *et al.*, 2015).

La concentración de nitrógeno se considera un factor importante para controlar la biosíntesis lipídica, y su manipulación conduce a cambios notables en el contenido de lípidos y en el perfil de ácidos grasos de las microalgas (Vítová *et al.*, 2015). En la mayoría de los casos, existe una correlación negativa entre la concentración de nitrógeno en el medio y la acumulación de lípidos. Por ejemplo, el contenido de ácidos grasos totales por célula de *Coccomyxa* sp. aumentó en condiciones bajas de nitrógeno (Msanne *et al.*, 2012). Dicha acumulación puede deberse en parte a la transformación de proteínas o péptidos en lípidos o carbohidratos (Siaut *et al.*, 2011). Además, la acumulación de ácidos grasos también puede lograrse mediante la conversión de carbono previamente asimilado en forma de almidón a lípidos no polares o neutros (Msanne *et al.*, 2012). Existen diferentes comportamientos fisiológicos bajo estrés de nitrógeno. Se ha reportado que, un menor contenido de proteínas, debido a la deficiencia de nitrógeno, puede dar lugar a una diferencia en la concentración de algunos lípidos como los triacilgliceroles en diatomeas. En microalgas como *Isochrysis zhangjiangensis*, *Chlamydomonas* sp. *Tetraselmis* sp. y *Tetraselmis suecica* se ha observado que un aumento o disminución de nitrógeno en el medio puede ocasionar un aumento en la concentración de algunos ácidos grasos de interés, como la fracción de ácidos grasos poliinsaturados en el caso de *Tetraselmis* sp., mientras se disminuye la de otros, como el ácido palmítico (16: 0) y ácido oleico (18: 1) (Feng *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016).

## **Silicatos**

Otro nutriente relevante en los cultivos de microalgas, principalmente en diatomeas, son los silicatos. Estas requieren silicio para la biosíntesis de pared celular. Las distintas concentraciones de silicio en el medio de cultivo afectan la regulación de su división celular, la acumulación de compuestos como proteínas, carbohidratos, clorofila y lípidos (Pérez-García *et al.*, 2011), modificando el metabolismo y crecimiento celular (Wen *et al.*, 2003).

En el caso de las diatomeas *Nitzchia perspicua*, *Cyclotella cryptica* y *Navicula laevis* se ha reportado que la concentración de silicatos en los medios de cultivo afecta la biosíntesis de lípidos, ocasionando el aumento o disminución en el porcentaje ácidos grasos de importancia como el ácido eicosapentanoico (Roessler 1988; Wen *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2015; Lari *et al.* 2016). Estudiar el efecto de la concentración de silicatos es importante en el cultivo de microalgas, ya que estos pueden modular la producción de compuestos de gran importancia para el ser humano de acuerdo a la concentración recibida. Además, permiten optimizar las condiciones de cultivo teniendo una menor pérdida de energía, tiempo y contenido de nutrientes.

### ***Navicula incerta***

El género *Navicula*, comprende alrededor de 1200 especies. Son organismos unicelulares o coloniales y su tamaño varía respecto a la especie (Round *et al.*, 1990). Son eucariotas fotosintéticos y su pared celular se encuentra constituida de sílice formando valvas que se sitúan en forma de caja. Su morfología celular es característica dando el aspecto de un pequeño barco. Sus valvas son lanceoladas, estriadas transversalmente en la zona media, en sentido opuesto a los polos y los extremos de la célula son redondeados (Round *et al.*, 1990; Van de Vijver *et al.*, 2011).

En general, las microalgas bentónicas como *Navicula* sp. se emplean en la alimentación de erizos, moluscos bivalvos y camarones, principalmente en las postlarvas del camarón y abulón (Leal *et al.*, 2013). Se ha reportado el aumento en supervivencia, tamaño, peso y calidad en los cultivos alimentados con *Navicula incerta* (Affan *et al.*, 2007). La microalga *Navicula incerta* (Figura 1) presenta ventajas en la cantidad de biomasa y facilidad de cosecha; sin embargo, ha sido poco estudiada. Se sabe que contiene pigmentos de interés como la clorofila y carotenoides debido a su sistema fotosintético, además de otros compuestos que pueden proveer beneficios a la salud (Kim *et al.*, 2014) como algunos compuestos antioxidantes y derivados de carbohidratos por ejemplo, los carbohidratos azufrados como alginatos y carragenatos (Affan *et al.*, 2007; Fimbres-Olivarria *et al.*, 2015). Existen varias estrategias para modular la producción de metabolitos de interés en los cultivos de *Navicula incerta* como la modificación de la concentración de nutrientes como el nitrógeno y silicio, la salinidad y temperatura en el medio (Fimbres-Olivarria *et al.*, 2015).

### **Nutracéutica y Nutrición Humana**

Un producto nutracéutico se puede definir como un alimento o producto alimenticio que proporciona beneficios médicos y a la salud ayudando a la prevención y el tratamiento contra enfermedades (Borowitzka, 2013). Dentro de la nutracéutica, la importancia de las microalgas radica en el gran número de moléculas bioactivas que producen, y que son de gran utilidad en alimentación y salud humana. Las microalgas representan una valiosa fuente de vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico) (Becker, 2004). Además, son ricas en pigmentos como los carotenoides (0.1% a 0.2% del peso seco en promedio y, hasta 14% del peso seco, de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella* sp.) y ácidos grasos saturados (AGS) o ácidos grasos insaturados (AGI) (de 12 a 22 átomos de carbono), los cuales son  $\Omega$ -3 y  $\Omega$ -6 (Tzovenis *et al.*, 2003; Spolaore *et al.*, 2006).



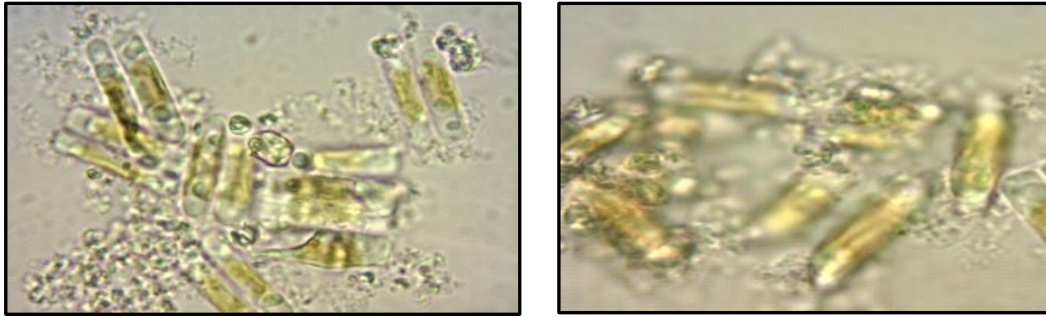


Figura 1. Imágenes al microscopio óptico de células de *Navicula incerta* en objetivo de 100X e inmersión de aceite.

Debido a su composición y características químicas, las microalgas pueden actuar como suplementos nutricionales y colorantes naturales para alimentos. El consumo regular de microalgas tiene varios efectos saludables, como la atenuación de la hiperlipidemia, supresión de la hipertensión, protección contra fallas renales y la disminución del nivel de azúcar en plasma, entre otros (Muller-Feuga, 2000; Chae *et al.*, 2006).

Como ejemplos del uso de microalgas en la nutraceutica están *Arthrospira* sp. y *Chlorella* sp. La primera se utiliza en la nutrición humana debido a su alto contenido de proteína y su excelente valor nutritivo, presentando posibles efectos promotores de la salud, como la reducción de la hiperlipidemia, la supresión de la hipertensión, la protección contra la insuficiencia renal, la promoción del crecimiento de *Lactobacillus* en el intestino y disminución del nivel de glucosa en suero (Liang *et al.*, 2004; Rangel-Yagui *et al.*, 2004; Soletto *et al.*, 2005; Spolaore *et al.*, 2006). Por otro lado, *Chlorella* sp. contiene el inmunoestimulador  $\beta$ -1,3-glucano, además de ser un agente reductor de radicales libres y de lípidos en la sangre. Otra microalga empleada como nutraceutico es *Nannochloropsis* sp, debido principalmente a sus ácidos grasos que se emplean en aplicaciones cosméticas y cuidados de la piel, hasta la nutrición y cuidados del corazón (Gellenbeck, 2012).

Los ácidos grasos son nutrientes esenciales que junto a las proteínas, carbohidratos y minerales constituyen la base de la dieta humana. Desde el punto de vista químico, los ácidos grasos (AG) son cadenas rectas de hidrocarburos que poseen en un grupo carboxilo en un extremo final y un grupo metilo en el otro. Estos compuestos son moléculas de estructura variable de naturaleza apolar que forman parte de las membranas biológicas, constituyen las reservas energéticas del organismo y tienen importantes funciones de señalización dentro de la célula (Arrazola A., 1994).

Existen distintos ácidos grasos y formas de clasificarlos: 1) por la longitud de su cadena, como ácidos grasos de cadena corta (4-6 carbonos), media (8-12 carbonos), larga (14 o más carbonos). 2) Por su grado de saturación, si no presentan dobles enlaces se denominan ácidos

grasos saturados (AGS), si tienen un solo doble enlace se denominan ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y si tienen más de uno se denominan ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Los AGS forman parte de las grasas y las mantecas. Los AGM son abundantes en aceites vegetales tales como el aceite de oliva, canola y aguacate, mientras que los AGPI están presentes en las grasas animales, en aceites vegetales y alimentos de origen marino. 3) De acuerdo con la posición del primer doble enlace de la cadena partiendo del grupo metilo, denominado *omega* ( $\Omega$ ), existiendo tres familias de AGPI  $\Omega$ -3,  $\Omega$ -6 y  $\Omega$ -9. Algunos AG se clasifican como “ácidos grasos esenciales” (AGE; Tabla 1) porque no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y además son necesarios para funciones vitales (FAO/OMS, 1997; Chow, 1992).

Los AGPI  $\Omega$ -3,  $\Omega$ -6 y  $\Omega$ -9 presentan funciones muy distintas y en cierto modo antagónicas. Los AGPI  $\Omega$ -3 tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el docosahexaenoico (DHA) (Figura 2) presentan propiedades vasodilatadoras y antiinflamatorias (González-Aguilar, 2014). Los ácidos grasos  $\Omega$ -6 como el ácido araquidónico (ARA) son la fuente principal para la generación de moléculas vasoconstrictoras y proinflamatorias como los tromboxanos, las prostaglandinas y leucotrienos. Los  $\Omega$ -9 reducen los niveles de colesterol, fortalecen el sistema inmunológico y contribuyen al disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebro-vasculares (Lands 2005).

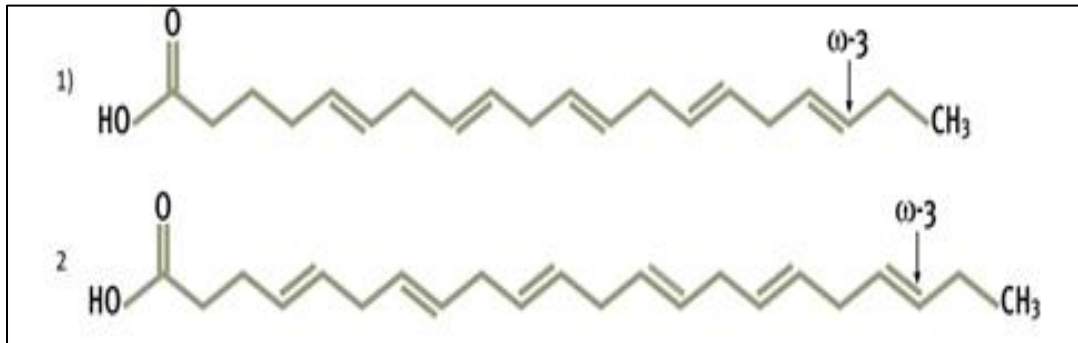
### **Ácido $\alpha$ -Linolénico (ALA)**

El ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) es el ácido graso que presenta la cadena más corta de la familia de los  $\Omega$ -3. Este ácido graso se encuentra en plantas, animales, fitoplancton y especies marinas, siendo los aceites vegetales la principal fuente de éstos en la dieta humana (González-Aguilar, 2014). Es esencial como precursor en la síntesis de ácidos grasos insaturados de cadena más larga como el EPA, DHA y el ácido docosahexaenoico (DPA). Además, se ha demostrado su participación en el desarrollo de los ojos, cerebro y tejidos, tanto en fetos, niños y adultos (Bourre, 2007). Una dieta que contiene ALA como único ácido

**Tabla 1.** Nomenclatura de los ácidos grasos esenciales.

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura	Fórmula
<i>Familia <math>\Omega</math>-6:</i>			
Linoleico (LA)	Cis 9,12 –octadecadienoico	18:2 $\Omega$ -6	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
$\gamma$ – linolénico	Cis 6,9,12 + ocaecatrenoico	18:3 $\Omega$ -6	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Dihomo- $\gamma$ -linolénico	Cis 8,11,14 –eicosatrienoico	20:3 $\Omega$ -6	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Araquidónico (ARA)	Cis 5,8, 11, 14 -eicosatetraenoico	20:4 $\Omega$ -6	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Adrénico	Cis 7,10,13,16 -docosatetraenoico	22:4 $\Omega$ -6	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Osmond	Cis 4,7,10,13,16 -docosapentaenoico	22:5 $\Omega$ -6	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
<i>Familia <math>\Omega</math>-3:</i>			
$\alpha$ -linolénico (ALA)	Cis 9,12,15 –octadecatrienoico	18:3 $\Omega$ -3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Estearidónico	Cis 6,9,12,15 –octadecatetraenoico	18:4 $\Omega$ -3	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Timnodónico (EPA)	Cis 5,8,11,14,17 –eicosapentaenoico	20:5 $\Omega$ -3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Clupanodónico (DPA)	Cis 7,10,13,16,19 –docosapentaenoico	22:5 $\Omega$ -3	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Cervónico (DHA)	Cis 4,7,10,13,16,19 –docosahexaenoico	22:6 $\Omega$ -3	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>

Fuente: González-Aguilar (2014).



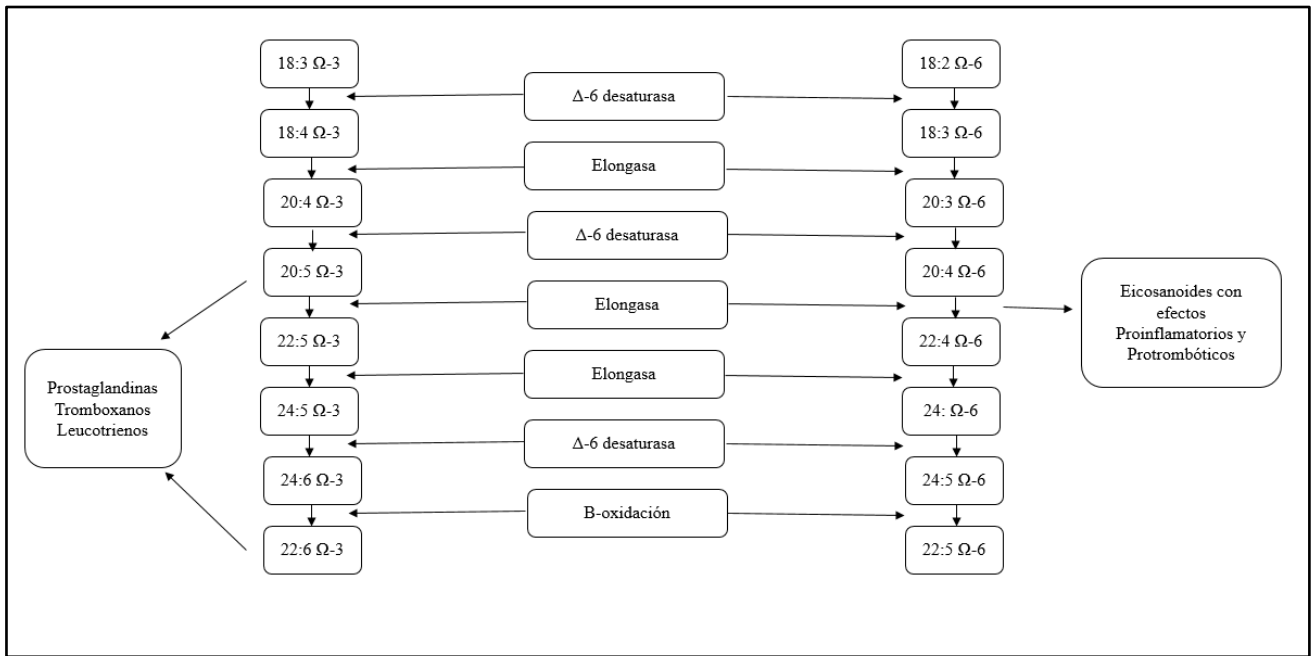
**Figura 2.** Estructura del 1) ácido eicosapentaenoico (EPA) y 2) ácido docosahexaenoico (DHA).

Fuente: Tu gestor de Salud: <https://tugestordesalud.com/que-son-los-acidos-grasos-omega-3> (2017).

graso  $\Omega$ -3 restaura los niveles de plasma y glóbulos rojos en sangre, además ayuda al funcionamiento del cerebro, ojos y del sistema nervioso en el cuerpo humano (Vedtofte *et al.*, 2011). Al mismo tiempo, tiene importancia en el cuidado y funcionamiento de la piel, como constituyente de la estructura de la membrana celular ayudando en la permeabilidad del agua epidérmica (Hanse & Jensen, 1985), así como actividad antiproliferativa (Ziboh *et al.*, 2000) y antiinflamatoria. ALA y DHA pueden suprimir la expresión de citocinas proinflamatorias. El ALA dietético podría presentar efectos antiinflamatorios a través de la activación del receptor de peroxisoma-proliferador activado gama. Una dieta enriquecida con ALA muestra una disminución en los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad o LDL-C (Barceló-Coblijn *et al.*, 2009). Los niveles elevados de colesterol en sangre predisponen a una aterosclerosis prematura, produciendo un infarto de miocardio como consecuencia de las alteraciones de las arterias coronarias. Se ha documentado que el ALA se encuentra en membranas citoplasmáticas de la célula, en donde se sintetiza a partir del ácido Linoleico (LA), el cual se deriva del acetato. Además de que el consumo de ALA ocasiona una reducción favorable en la variabilidad de la frecuencia cardiaca, la cual es un predictor de la arritmia. El mecanismo de la arritmia supone la modificación de los canales iónicos mediante la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados en el fosfolípido de la membrana de las células del músculo cardiaco (cardiomiocitos). Por lo que una ingesta de ALA logra producir un ligero efecto cardioprotector (Barceló-Coblijn *et al.* 2009). El ALA dietético puede contribuir a la síntesis y depósito de niveles adecuados de DHA. Sin embargo, el contenido de ALA en la dieta y la acumulación de DHA en el cerebro presentan una relación bastante compleja y un contenido muy alto de ALA en la dieta no implica un aumento correspondiente de DHA del cerebro.

### **Ácido Eicosapentaenoico (EPA) y Ácido Docosahexaenoico (DHA)**

El EPA es un ácido graso del grupo de los  $\Omega$ -3, de 20 carbonos, que presenta 5 dobles enlaces en su estructura. La síntesis del EPA y DHA se lleva a cabo por medio de la elongación y desaturación del ALA (Figura 3). La mayor fuente de EPA es el fitoplancton y las algas marinas (Narayan *et al.*, 2006). Se ha señalado la importancia del consumo de EPA



**Figura 3.** Proceso enzimático de desaturación en la síntesis de ácidos grasos  $\Omega$ -3 y  $\Omega$ -6.

Fuente: González-Aguilar (2014).

en el tratamiento de desórdenes cerebrales (Peet M., 2004) y en ciertas condiciones en pacientes con cáncer (Tisdale, 1999). En el caso de los desórdenes cerebrales como la esquizofrenia (Narayan *et al.*, 2006), se ha demostrado la capacidad del EPA para modificar anomalías en los fosfolípidos, por medio de la inhibición de la fosfolipasa A2 (Richardson *et al.*, 2000). Se ha documentado la capacidad del EPA y DHA en la reducción del riesgo de trastornos neuropsiquiátricos. Su efecto benéfico es atribuido al impacto que ejerce en los receptores de neurotransmisores y proteínas G, a través de los efectos en las propiedades biofísicas de las membranas celulares y los mensajeros secundarios (Narayan *et al.*, 2006). Se ha documentado que, tanto el DHA como el EPA actúan en la biosíntesis de la estructura de membrana (componentes de fosfolípidos, neuronas y retina) y en contra de enfermedades crónicas como la diabetes (por medio de la absorción y metabolización de la glucosa) y el cáncer, por medio de la inhibición de ciclooxigenasa (reduciendo la cantidad de prostaglandinas) y el incremento de lipoxigenasa (retardo en la proliferación de células cancerosas). Además, se ha reportado que el EPA aumenta la capacidad de los eritrocitos para eliminar la glucosa en sujetos con diabetes tipo II (Narayan *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, se ha relacionado el uso de estos ácidos contra enfermedades del corazón (reducción de triglicéridos y efecto antitrombótico), pulmón (EPA, efectos benéficos en tratamientos de fibrosis quística y enfisema) y desórdenes neuropsiquiátricos (receptor de neurotransmisores) (González-Aguilar, 2014). En el caso de problemas de presión arterial, Narayan *et al.* (2006) reportan que el uso de EPA previene el desarrollo de hipertensión como aterosclerosis o accidentes cardiovasculares debido a que regula la concentración plasmática del colesterol y siendo un precursor de prostaglandinas (regulando funciones como la coagulación sanguínea, respuesta inflamatoria alérgica y presión sanguínea). En el caso de los problemas pulmonares, el uso de DHA y EPA se debe a la capacidad que tienen en participar en los procesos de inflamación crónica, aumentando la permeabilidad vascular, siendo constrictores potentes de la musculatura lisa, como las presentes en las vías aéreas periféricas de los pulmones (Connor, 1994).

El DHA es un ácido graso poliinsaturado  $\Omega$ -3, que presenta 6 dobles enlaces en su estructura de 22 carbonos. Sin embargo, su síntesis en el cuerpo humano no es suficiente para cubrir las



necesidades, por lo que se requiere consumir como parte de la dieta. La principal fuente de obtención son los alimentos de origen marino como el pescado y los mariscos. Es un ácido graso esencial a nivel cerebral. El DHA es el principal componente estructural de la materia gris del cerebro, la retina y es un componente importante en el tejido cardíaco (Birch *et al.*, 2007), siendo su consumo de mayor importancia durante la formación del feto en el embarazo. Se ha documentado el efecto del EPA y DHA en la absorción y metabolización de la glucosa en los tejidos de manera más eficiente en ausencia de insulina (Narayan *et al.*, 2006). El uso del DHA en trastornos de la presión se debe a que este ácido graso es un componente de las membranas plaquetarias dando como resultado una presión arterial diastólica significativamente más baja y una mayor variabilidad de la frecuencia cardíaca (González-Aguilar *et al.*, 2014).

### **Ácido Linoleico (LA)**

En el organismo, la mayoría del LA consumido se emplea en la  $\beta$ -oxidación y el acetato que se produce se convierte en colesterol, AGS y AGM. Parte del LA consumido se puede encontrar siendo parte de piel y cabello. El ácido linoleico conjugado posee la misma longitud que el LA, sin embargo, sus dobles enlaces se encuentran conjugados en vez de separados por dobles enlaces. Se origina debido a la hidrogenación a partir del ácido vaccénico (AV) por acción de la enzima  $\Delta$ -9desaturasa (Griinari *et al.*, 2000). Se le atribuyen efectos benéficos contra enfermedades cardíacas (disminuye colesterol en sangre), diabetes (reducción de azúcar, triglicéridos e insulina), cáncer (reducción de metástasis); además de ayudar en tratamientos contra la obesidad, respuesta inmune, inflamatoria y cuidado de los huesos (incremento en: niveles de osteocalcina, actividad en la fosfatasa alcalina y absorción del calcio) (González-Aguilar, 2014).

## Biocombustible

La situación energética actual ha dado un nuevo impulso a la búsqueda de diferentes fuentes de biocombustible. La idea inicial de producir lípidos a partir de microalgas para su transformación en combustibles es muy antigua (Harder y Von Witsh, 1942). Inicialmente, la producción de biocombustibles se realizó por medio de la digestión y fermentación del almidón proveniente de granos de cereales como maíz o trigo generando bioetanol y biobutanol (Brennan & Owende, 2010). Posteriormente, se descubrió otra forma de elaborar biocombustibles (biodiésel) por medio de aceites de plantas oleaginosas como los frutos de la palma. Este tipo de materias primas son la base de la nutrición humana, no obstante, han ganado interés como combustible alternativo debido a la disminución en las fuentes de petróleo y al amplio impacto negativo que este ha tenido sobre el medio ambiente. En general, el biodiésel se considera un combustible renovable, biodegradable y de combustión limpia, lo que le da una ventaja en comparación con el uso del petróleo.

Una de las alternativas para la producción de biodiésel son las microalgas. Éstas contienen entre 2 y 30% (en peso seco) de lípidos, aunque pocas producen más del 30% de aceite, se pueden manipular las condiciones de cultivo y llegar a producir una mayor cantidad de lípidos. La acumulación de lípidos en algas normalmente ocurre durante períodos de estrés ambiental, incluyendo el crecimiento en condiciones deficientes en nutrientes (Procházková *et al.*, 2014). El cultivo de microalgas requiere la adición de fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, así como minerales y vitaminas. Por lo que, el contenido de lípidos puede variar con las condiciones del medio cultivo (principalmente la cantidad de nutrientes, temperatura y el tiempo de vida del cultivo). El potencial de la biomasa de microalgas como fuente de materias primas para biocombustible se basa en su rápido crecimiento, alta productividad, no competencia con la agricultura tradicional, posibilidad de utilización de agua residual como marina y elevado contenido de lípidos y azúcares en algunas especies (Douskova *et al.*, 2009).

## **Propiedades del biodiésel**

La Sociedad Estadounidense para Pruebas y Materiales (American Society for Testing and Materials o ASTM por sus siglas en inglés) define el biodiésel como un combustible de ésteres monoalquílicos de cadena larga de ácidos grasos (Garrido, 2010), es decir, es un combustible obtenido por reacción de transesterificación entre un aceite vegetal y un alcohol (Knothe *et al.*, 2005), el cual es una alternativa al consumo del diésel originado de hidrocarburos fósiles (Sierra *et al.*, 2010). Generalmente el biodiésel está compuesto por ésteres metílicos de cadena larga (C14-C22) de ácidos grasos como el ácido láurico, palmítico, esteárico y oleico, además de alcoholes de cadena corta, como el metanol o el etanol (Demirbas, 2009). Para ser empleado como combustible de motores, el biodiésel debe cumplir con las características y requerimientos de calidad establecidos. Cada país tiene sus normas sobre los requerimientos y características del biodiésel (Tabla 2). Como ejemplo, para ser empleado como combustible en motores diésel en Estados Unidos, se debe cumplir con los estándares establecidos siguiendo las metodologías de la ASTM D975, en Colombia, debe cumplir con todas las características y requerimientos de calidad establecidos en la norma NTC 5444 (Sierra *et al.*, 2010). En México no existe un documento oficial para las características y metodologías a seguir para el biodiésel. Sin embargo, existe la Norma Oficial Mexicana NOM-016-CRE-2016 (estándar ASTM D975 para diésel), que contiene las especificaciones de calidad de los petrolíferos.

## **Índice de cetano**

El índice de cetano (IC) o número de cetano (NC) es uno de los parámetros más importantes que caracterizan un combustible diésel desde el punto de vista químico y de su proceso de combustión (Sánchez-Borroto *et al.*, 2012; Lujaji *et al.*, 2010). El NC es un indicador adimensional que caracteriza la calidad de ignición de los combustibles para motores de encendido por compresión. Teóricamente, se define en el rango de 15-100 y sirve para

**Tabla 2.** Propiedades del Biodiésel, métodos de prueba y valores límites para diferentes estándares en el mundo.

<b>Propiedad</b>	<b>Método de prueba</b>	<b>Límites</b>	<b>Unidad</b>
<b>Densidad 15 °C</b>	Norma Europea EN 14213 (EN ISO 3675, EN ISO 12185)	860 – 900	kg/m <sup>3</sup>
	Norma Australiana de Biodiésel (AST D1298, EN ISO 3675)	860 – 890	
	Norma Hindú para Biodiésel (ISO 3675/P32)	860 – 900	
	Especificación Africana de Biodiésel (ISO 3675)	860 - 900	
	Especificación Japonesa de Biodiésel (JIS K 2249)	0.86 -0.90	g/ml
<b>Viscosidad 40 °C</b>	Norma Europea EN 14213 (EN ISO 3104, ISO 3105)	3.5 – 5.0	mm <sup>2</sup> /s
	Norma Americana de Biodiésel (D 445)	1.9 – 6.0	
	Norma Australiana de Biodiésel (AST D445)	3.5 – 5.0	
	Norma Hindú para Biodiésel (ISO 3104/P25)	2.5 – 6.0	
	Especificación Japonesa de Biodiésel (JIS K 2283)	3.5 – 5.0 3.5 – 5.0	
	Especificación Africana de Biodiésel (ISO 3104)		
<b>Número de Cetano</b>	Norma Europea de Biodiésel EN 14214 (EN ISO 5165)	>51	
	Norma Americana de Biodiésel (D 613)	>47	
	Norma Australiana de Biodiésel (EN ISO 5165, D613)	>51	
	Norma Hindú para Biodiésel (ISO 5156/P9)	>51	
	Especificación Japonesa de Biodiésel (JIS K 2280)	>51 >51	
	Especificación Africana de Biodiésel (ISO 5165)		
<b>Índice de yodo</b>	Norma Europea de Biodiésel EN 14214 (EN 14111)	<120 Se Reporta	g I <sub>2</sub> /100 g
	Norma Hindú para Biodiésel (en 14104)	<120	
	Especificación Japonesa de Biodiésel (JIS K 0070)	<140	
	Especificación Africana de Biodiésel (EN 14111)		
<b>CFPP °C</b>	Norma europea EN 14213 (EN116)	NR	°C
	Norma Australiana de Biodiésel	Se Reporta	
	Especificación Africana de Biodiésel (EN116)	-4 / 3	
<b>Índice de acidez</b>	Norma Americana de Biodiésel (D 664)	<0.05	mg de
	Norma Australiana de Biodiésel (AST D664)	<0.80	KOH/g
	Norma Hindú para Biodiésel (P1)	<0.50	
	Especificación Japonesa de Biodiésel (JIS K 2501, JIS K 0070)	<0.5	
<b>Contenido de ácido Linoleico</b>	Norma Europea de Biodiésel EN 14214 (Método EN 14103)	<12	% (m/m)
	Especificación Africana de Biodiésel (EN 14103)	<12	

Fuente: Barabás & Todoruț, (2011).

describir la calidad del combustible y la facilidad de su autoencendido (Barabás & Todoruț, 2011). Para calcular experimentalmente el NC se utilizan dos combustibles de referencia que presentan la misma fórmula química (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>). Para el valor máximo se utiliza un hidrocarburo de cadena larga sensible a la ignición (hexadecano o n-cetano), mientras que el valor mínimo es determinado por un hidrocarburo de cadena ramificada con alta resistencia a la ignición (2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano o isocetano) (Barabás & Todoruț, 2011). Es decir, el NC del combustible de prueba es el porcentaje en volumen de cetano e isocetano que presenta las mismas características de ignición y es determinado por la fórmula:

$$NC = \text{cetano} [\% v/v] + 0.15 * \text{isocetano}[\% v/v]$$

Un valor bajo en el NC nos indica la dificultad del combustible para arrancar el motor, trabajando de manera desigual y presentando ruidos, especialmente a bajas temperaturas (Sánchez-Borroto *et al.*, 2012). En el caso de presentar valores altos en el número de cetano (mayores a 60), la ignición se realizará antes de que se lleve a cabo una mezcla adecuada de aire y combustible, dando como resultado una combustión incompleta y el aumento de la cantidad de humo de escape (Sánchez-Borroto *et al.*, 2012). El rango óptimo de NC está entre 41 y 56, pero no debe ser superior a 65 (Bățașu *et al.*, 2003). Cada país tiene su norma y rango de NC para combustibles como biodiésel (Tabla 2).

El valor obtenido del NC depende de la estructura molecular de la mezcla de compuestos presentes en el combustible. En el caso del biodiésel elaborado de aceite de plantas o microalgas, se basa en el porcentaje de ésteres metílicos derivados de ácidos grasos en su perfil lipídico. En general, el NC disminuye con el número de dobles enlaces presentes en las moléculas de éster de ácido graso y aumenta con el número de átomos de carbono. Por lo tanto, el NC depende de la composición química del combustible analizado (Piloto-Rodríguez *et al.*, 2010). Por lo que es importante saber el perfil de ácidos grasos presentes y cómo pueden manipularse con el objetivo de mejorar la calidad del combustible.

## **Densidad**

El funcionamiento de los motores y las propiedades del combustible son afectados por la densidad del biodiésel. Dado que la densidad es fuertemente influenciada por la temperatura, los estándares de calidad establecen la determinación de la densidad a 15 °C. Propiedades como el Número de Cetano, el valor de calentamiento y la viscosidad están fuertemente relacionados con la densidad. Al mismo tiempo, se afecta la calidad de la atomización y la combustión en los motores debido al cambio en la masa de combustible que llega a la cámara de combustión alterando la relación combustible / aire y la potencia del motor (Barabás & Todoruț, 2011). Este parámetro también puede usarse como un indicador de contaminación del biodiésel.

## **Viscosidad**

La viscosidad es una de las propiedades más importantes del biodiésel. En los combustibles, la viscosidad es la propiedad para resistir la tendencia relativa al movimiento de sus capas, debido a las fuerzas de atracción intermolecular, es decir, la viscosidad es la resistencia a fluir (Barabás & Todoruț, 2011). Algunas propiedades del biodiésel que pueden afectar el funcionamiento del motor por la viscosidad son la facilidad de arranque, la calidad del rociado, el tamaño de las gotas o partículas, así como la calidad de la mezcla de combustible y aire (Barabás & Todoruț, 2011).

La viscosidad del combustible tiene un límite superior e inferior. Una baja viscosidad proporciona gotas pequeñas y velocidad baja, provocando la formación de humo negro, específico de una combustión con poco oxígeno (Bățaș et al., 2003). Un biodiésel con alta viscosidad producirá gotas demasiado grandes, lo que afectará el funcionamiento del motor provocando enfriamiento del cilindro interrumpiendo la reacción de combustión y se dará la formación de humo azul como producto de una combustión intermedia (Bățaș et al., 2003).

Además, una viscosidad demasiado alta conduce al aumento de los depósitos en la cámara de combustión, aumento de la energía de bombeo de combustible necesario, un mayor desgaste de la bomba y los elementos del inyector debido a un mayor esfuerzo mecánico y puede causar problemas operativos a bajas temperaturas (Barabás & Todoruț, 2011).

### **Índice de yodo**

El índice de yodo (IY) se introdujo en los estándares de calidad de biodiésel para evaluar su estabilidad a la oxidación. El IY es una medida de la insaturación total de ácidos grasos presentes, que es medido en cantidad de gramos de yodo necesarios para neutralizar 100 gramos de muestra de biodiésel ( $\text{mg I}_2 / 100 \text{ g muestra}$ ) (Barabás & Todoruț, 2011). La importancia de esta prueba nos sirve para estimar la oxidación en contacto con el aire (Barabás & Todoruț, 2011). El IY está limitado en varias regiones del mundo, dependiendo de los estándares establecidos para cada región es el límite máximo del IY (Tabla I). Valores altos del IY pueden ocasionar problemas de polimerización y formación de depósitos en las boquillas de los inyectores, aros y las ranuras de los aros. La tendencia a la polimerización aumenta con el grado de insaturación de los ácidos grasos (Bățașă *et al.*, 2003).

### **Índice de acidez**

El índice de acidez se refiere a la cantidad de base, expresada en miligramos de hidróxido de potasio por gramo de muestra, requerida para neutralizar la muestra (Barabás & Todoruț, 2011). Es decir, es una medida de cantidad de ácidos grasos libres en el biodiésel. La presencia de ácidos grasos en el biocombustible puede causar corrosión e incrementa la probabilidad de presencia de agua. Esta determinación se puede realizar mediante el método descrito en la norma ASTM D 664 siendo el valor máximo aceptado de 0.80 mg KOH/g de muestra (Van Gerpen *et al.*, 2004).

## Punto de obstrucción de filtro en frío

Las bajas temperaturas causan cambios en las propiedades de los combustibles como en la viscosidad y fluidez, el cual puede causar problemas en el funcionamiento de los motores. Esto es debido a la formación de pequeños cristales suspendidos en la fase líquida, disminuyendo la fluidez del combustible provocando la obstrucción de los filtros de forma parcial o total (Barabás & Todoruț, 2011).

La prueba de punto de obstrucción del filtro frío (cold filter plugging point o CFPP, en inglés) o POFF constituye un método alternativo a los puntos de nube y fluidez. Permite evaluar la filtrabilidad del combustible a bajas temperaturas y su valor se regula en función de las condiciones climáticas de cada región o país. Se define en el estándar de la American Society for Testing and Materials (ASTM D6371) como la temperatura más alta a la cual una cantidad dada de combustible (20 mL) al ser enfriada bajo condiciones controladas (a una tasa de 40 °C por hora) no fluye por un tiempo dado (60 segundos) a través de un filtro prescrito (malla de 45  $\mu$ ) bajo condiciones de succión definidas (2 kPa de vacío) (Barabás & Todoruț, 2011).

En los últimos años, diferentes especies de microalgas se consideran una fuente de ácidos grasos esenciales. El estudio de la concentración de nutrientes en los medios de cultivo de microalgas como *Navicula incerta*, no solo tiene un impacto en el crecimiento y producción de biomasa, sino en la biosíntesis de compuestos de interés como son las proteínas, carbohidratos y lípidos, principalmente en la composición de los ácidos grasos mono y poliinsaturados. No solo se afecta la producción de compuestos, también se reduce el costo y tiempo de cultivo de las microalgas. El nitrógeno y los silicatos son macronutrientes importantes para el crecimiento y metabolismo de microalgas como las diatomeas. El nitrógeno es un elemento fundamental para la formación de proteínas y ácidos nucleicos. Mientras que los silicatos son componentes esenciales de la frústula. Estos ácidos grasos son importantes no sólo en la acuicultura, sino también para mejorar la nutrición y la salud humana, y recientemente, en la producción de biodiésel. En el caso de la producción de



biodiésel, la insaturación de los ácidos grasos es crucial para el rendimiento, propiedades y calidad de los biocombustibles (Islam *et al.*, 2013).

## **HIPÓTESIS**

El crecimiento de *Navicula incerta* en medio de cultivo con nutrientes limitados en nitratos y silicatos afectará el crecimiento y el metabolismo del organismo, reflejándose en una mayor producción de ácidos grasos mono y poliinsaturados, que lograrán impactar favorablemente en su potencial biotecnológico como en las propiedades del biodiésel.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar el efecto de la limitación de nitratos y silicatos en el perfil de ácidos grasos de la microalga *Navicula incerta* y su potencial uso biotecnológico como biodiésel.

### Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de cultivo para la microalga *Navicula incerta*, en medios con limitantes de nitrógeno (N/4, 0.44 mol/L; N/8, 0.22 mol / L; y N/16 0.11 mol/L) o metasilicatos (Si/4, 0.08 mol/L; Si/8, 0.04 mol / L; y Si/16 0.02 mol/L).
- Identificar y caracterizar el perfil de ácidos grasos en *Navicula incerta* en condiciones limitantes de nitrógeno y silicio.
- Calcular y evaluar las propiedades del biocombustible (biodiésel) a partir del perfil de ácidos grasos de *Navicula incerta* en condiciones limitantes de nitrógeno y silicio.

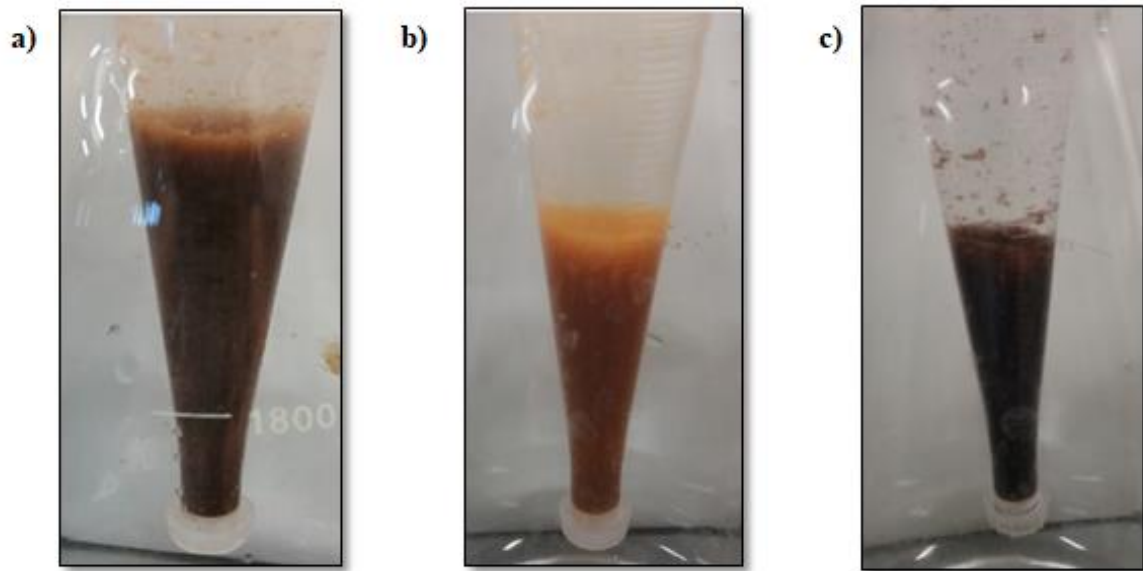
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microalga y condiciones de cultivo

La microalga *Navicula incerta* se obtuvo del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), estado de Baja California, México. La microalga se cultivó en medio F/2 de Guillard y Ryther (Renaud *et al.*, 1994) con 0.88 mol/L de nitrógeno y 36 unidades prácticas de salinidad (PSU) a 25 °C (medio control) cultivadas en matraces de 1 L, en condiciones estándar de laboratorio. Para cada tratamiento, se utilizaron diferentes concentraciones de nitratos (N/4: 0.44 mol/L, N/8: 0.22 mol/L y N/16: 0.11 mol/L) y silicato (S/i/4: 0.16 mol /L, Si/8 0.08 mol/L y Si/16: 0.04 mol/L) en el medio F/2 de Guillard & Ryther (1962). En el caso de los cultivos masivos, se llevaron a cabo en el sistema de cultivo Baja Californiano con recipientes con tapa transparente con un volumen de 40 L de medio de cultivo con las mismas condiciones de laboratorio. La biomasa de la microalga se cosechó por decantación al final de la fase exponencial, se centrifugó ( $3,000 \times g$  a 4 °C durante 15 min) y se recolectó el precipitado para eliminar el exceso de agua (Figura 4). La biomasa de microalgas se lavó con formiato de sodio para eliminar la sal. Posteriormente, se liofilizó en un liofilizador (Yamato Scientific Co., Ltd., Japón) durante 36 h y se guardó a -80 °C.

### Cinética de Crecimiento

La cinética de crecimiento y la producción de biomasa se llevaron a cabo para conocer la densidad celular, el desarrollo y la calidad del cultivo. Para las determinaciones de la cinética de crecimiento y la curva de clorofila, la microalga se cultivó en un matraz de 1 L con un contenido de 700 mL de medio cultivo. La concentración celular se midió utilizando una cámara de Neubauer (0.1 mm de profundidad) y un microscopio óptico Olympus, y se calculó con la siguiente ecuación (López-Elías *et al.*, 1995):



**Figura 4.** Recolecta de biomasa de cultivo de *Navicula incerta* en medio F/2 de Guillar y Ryther (1962). a) tratamiento control, b) tratamiento limitante en nitratos N/16 y c) tratamiento limitante en silicatos Si/16.

Número de células = (# células / 8) × 10000 = (# Células) / mL

### Contenido de Clorofila

La clorofila (chl a) se midió con la metodología de Tran *et al.* (2016). Para su cuantificación se centrifugaron 10 mL del cultivo previamente homogeneizado a  $3,500 \times g$  a 4 °C durante 15 min. El sedimento se suspendió en 10 mL de metanol al 90%. Las células se incubaron en la oscuridad a 4 °C durante 24 h, y se determinó chl a utilizando un espectrofotómetro (Spectronic Model 20D +, Milton Roy) de acuerdo con la ecuación:

$$\text{chl a} = (\text{mg} / \text{L}) = 13.43 \times \text{OD665}$$

donde OD665 es la densidad óptica (OD) medida a 665 nm.

### Composición Química

Para determinar la composición química de la microalga *Navicula incerta* recolectada, se utilizaron cultivos liofilizados producidos de cultivos masivos. El contenido de humedad y cenizas se calculó por medio de las mediciones gravimétricas utilizando materia fresca previamente filtrada en filtros de fibra de vidrio Whatman #1. Para pesar los filtros se utilizó una balanza analítica modelo OHAUS AS 200 (USA). Para estimar la humedad se utilizó una temperatura de 105 °C en una estufa convencional por un periodo de 24 h, mientras que para cenizas una mufla a 560 °C por 4 h. Para determinar el porcentaje de proteína, lípidos y los perfiles de ácidos grasos se utilizó biomasa de los cultivos masivos previamente liofilizados. El porcentaje de proteína se evaluó por el método de Kjeldahl y el de grasa

mediante el método de Soxhlet (AOAC 2000). El contenido de carbohidratos se obtuvo por diferencia de peso.

### **Perfil de Ácidos Grasos**

Para determinar el perfil de ácidos grasos se utilizó la derivatización del éster metílico y el análisis por cromatografía de gases. Para la extracción de los ácidos grasos, se utilizó el método descrito por Ryckebosh *et al.* (2012) en condiciones anaerobias por medio de una descarga de gas nitrógeno. Se pesaron 200 mg de las muestras liofilizadas y se homogeneizaron con cloroformo y metanol (solución 1:1). Se añadió misma cantidad de agua destilada y se centrifugó ( $2,000 \times g$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min). La fase acuosa se separó y los disolventes se evaporaron a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La derivatización se llevó a cabo en las mismas condiciones anaerobias de la extracción utilizándose una mezcla de ácido sulfúrico (1% en metanol) y tolueno. La solución se dejó incubar durante un período de 8 h a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se añadió una solución de NaCl al 5% y hexano, se homogenizó y transfiriéndose la capa superior de hexano a un vial, el cual se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis por cromatografía de gases.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos se determinaron inyectando  $1\text{ }\mu\text{L}$  del extracto derivatizado en una columna capilar de sílice (Supelco DB-23  $60\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$  de diámetro, espesor de película  $0.25\text{ }\mu\text{m}$ ) en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890, Tokio, Japón) equipado con un auto inyector. Las temperaturas del inyector y del detector de ionización de llama se controlaron a  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El nitrógeno fue utilizado como gas portador. La temperatura de la columna se programó utilizando una rampa de  $175$  a  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Los ácidos grasos se identificaron mediante la comparación del tiempo de retención relativo con los estándares de referencia (Supelco 37 Componente FAME Mix, Bellefonte, PA, EE. UU.).

## Cálculo de las propiedades del combustible a partir de perfiles de ácidos grasos

Las propiedades del biodiésel (índice de cetano, índice de yodo, punto de obstrucción del filtro frío, factor de saturación de cadena larga) se calcularon a partir de la identificación y cuantificación del perfil lipídico de *Navicula incerta* (Islam *et al.*, 2013). El índice de cetano (IC) se determinó usando la siguiente ecuación (Krisnangkura, 1986; Islam *et al.*, 2013):

$$IC = 46.3 + \left( \frac{5458}{\text{Índice de Saponificación}} \right) - (0.225 \times \text{Índice de Iodo})$$

El índice de saponificación (IS) en mg KOH/g y el índice de yodo (IY) en g I<sub>2</sub>/100 g del perfil lipídico se predijo mediante las siguientes ecuaciones (Islam *et al.*, 2013):

$$IS = \sum_i \left( \frac{(560 \times N_i)}{\text{Peso molecular del } i - \text{écimo ácido graso}} \right)$$

$$IY = \sum_i \left( \frac{(254 \times N_i \times D_i)}{\text{Peso molecular del ácido graso}} \right)$$

Donde N<sub>i</sub> es el porcentaje de cada uno de los ácidos grasos identificados y D<sub>i</sub> es el número de dobles enlaces en cada uno de los ácidos grasos presentes.

El grado de insaturación (GI) del aceite fue determinado por la ecuación propuesta por Ramos *et al.* (2009) basado en la fracción de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados presentes:

$$GI = \sum \text{ácidos grasos monoinsaturados} + (2 \times AGI)$$



El factor de saturación de cadena larga (FSCL) y el punto de obstrucción de filtro en frío (POFF °C por sus siglas en inglés: cold filter plugging point in °C, CFPP °C) fueron calculadas por la siguiente ecuación:

$$FSCL = ( 0.1 \times C16:0 ) + ( 0.5 \times C18:0 ) + ( 1 \times C20:0 ) + ( 2 \times C24:0 )$$

$$POFF \text{ } ^\circ C = ( 3.1417 \times FSCL ) - 16.477$$

### **Diseño Experimental**

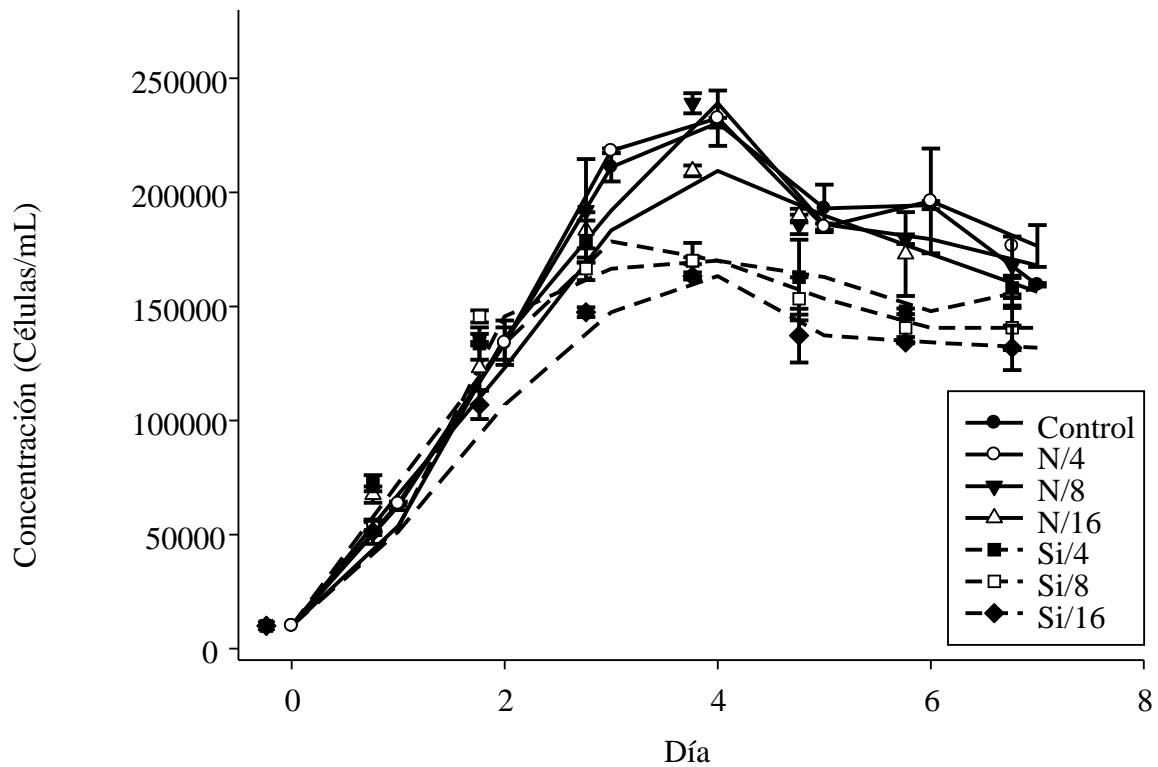
Se utilizó un análisis de varianza y comparación de medias mediante Tukey por medio del programa estadístico InfoStat 2017; con un rango de significancia de 5%. Para la determinación de la cantidad de clorofila, cenizas, proteínas, y lípidos se utilizaron tres muestras con dos réplicas cada una. En el caso del perfil lipídico, se realizaron cuatro extracciones con tres réplicas cada una. Se identificó y calculó el promedio del porcentaje de cada ácido graso extraído en los diferentes tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Concentración y Tasa de Crecimiento de las Microalgas.

La concentración celular de *Navicula incerta* en medio F/2 de Guillard y Ryther, y los diferentes tratamientos se presentan en la figura 5. En ambos tratamientos, la fase estacionaria se inició entre los días 3 y 4. El tratamiento con limitante de nitrógeno presentó un mayor número de células que con el limitante de silicato. El tratamiento limitante en nitrógeno N/8 presentó la mayor concentración celular ( $2.182 \times 10^5$  células/mL), mientras que la concentración celular más baja se encontró en el tratamiento limitado en silicatos Si/16 ( $1.633 \times 10^5$  células/mL) mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambos tratamientos. En todos los experimentos obtuvieron un promedio de 2.16 divisiones por día, obteniendo el medio con limitación en silicatos el número más bajo de divisiones celulares, en comparación con el medio limitante de nitrógeno y el medio control. La tasa de crecimiento disminuyó a valores cercanos a 0 en todos los tratamientos. La mayor tasa de división celular promedio se presentó en el medio control con  $0.66 \pm 0.03$  y el menor en el medio limitante en silicatos Si/16 con  $0.140 \pm 0.006$  divisiones mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Courtoise *et al.* (2012), al trabajar con diatomeas, concluyeron que la densidad del inóculo y las limitantes de nutrientes afectan la tasa de crecimiento y la concentración celular. Además, los diferentes tamaños celulares y la síntesis de compuestos biológicos comprenden una estrategia de supervivencia para varios factores, como el pH, temperatura y las concentraciones de nutrientes. Se sabe que en las diatomeas, la concentración de silicato afecta la concentración celular (células/m<sup>3</sup>) en el medio, pero disminuye la tasa de crecimiento por el papel que juega en la formación de la frústula de la pared celular (Jiang *et al.*, 2015). Por otro lado, el nitrógeno tiene un papel importante en todo el metabolismo, ya que es parte de moléculas como la clorofila y proteínas.

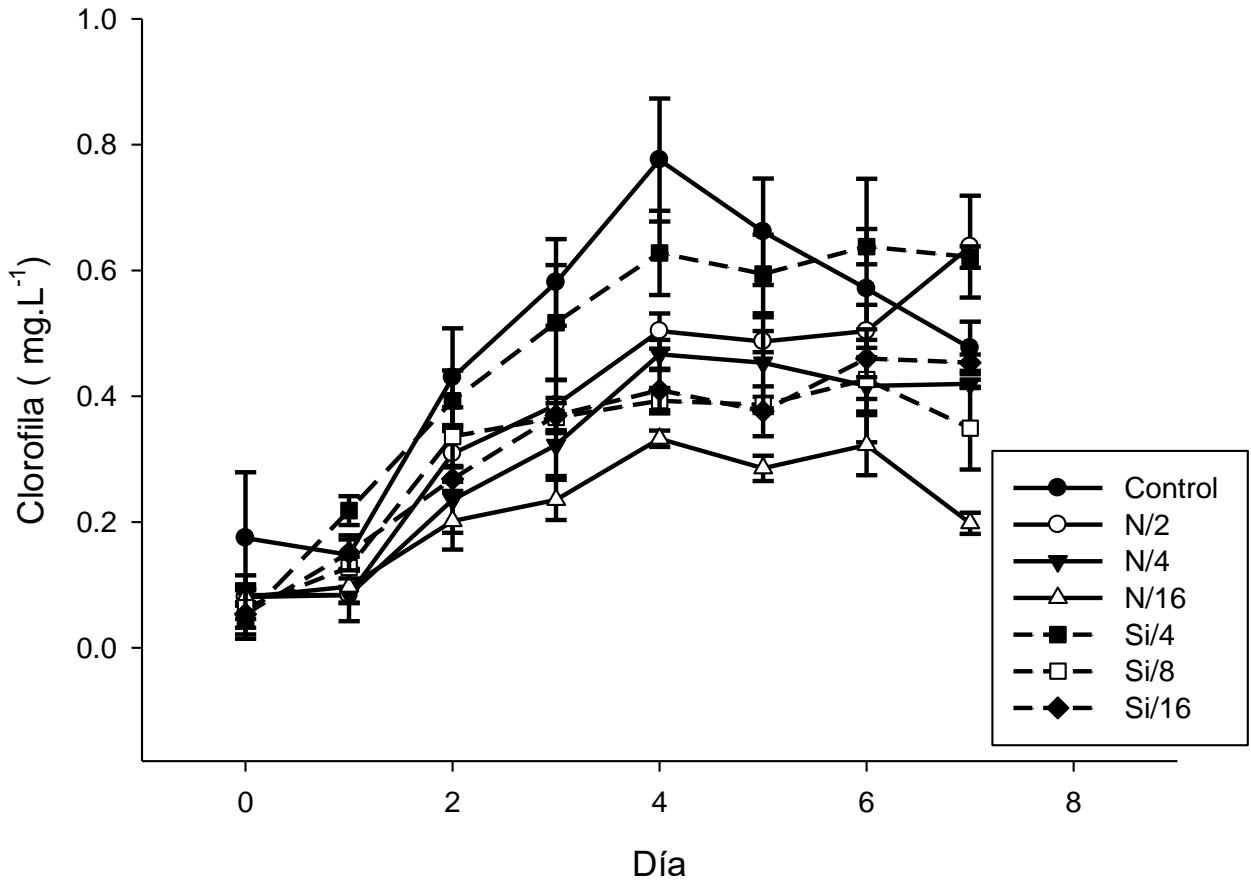


**Figura 5.** Efecto de la limitación de nitrógeno y silicatos en la cinética de crecimiento de *Navicula incerta*. Diferentes concentraciones de nitrógeno (N/4, 0.44 mol/L; N/8, 0.22 mol/L; y N/16 0.11 mol/L) o silicato (Si/4, 0.08 mol/L; Si/8, 0.04 mol/L; y Si/16 0.02 mol/L) en medio F / 2 expresadas como porcentaje de peso seco (media  $\pm$  desviación estándar, n = 6).

## Clorofila

El contenido de clorofila en diatomeas como *Navicula* sp. es uno de los indicadores para la cantidad de biomasa. La clorofila no solo proporciona información sobre la recolección, transferencia y conversión de energía, sino también sobre la respuesta al crecimiento celular de microalgas en condiciones de estrés como la limitación de nutrientes. En la figura 6 se observa la curva de producción de clorofila en cada uno de los tratamientos y el medio control. Los resultados muestran una menor producción de este componente en ambos tratamientos con respecto al control. La concentración más alta de clorofila se presentó en el medio control en el día 4 con  $0.77 \pm 0.096$  mg/mL, posteriormente dicha concentración fue disminuyendo. En todos tratamientos limitantes de nutrientes se mostró una cantidad menor de clorofila que el medio control, presentando su mayor cantidad de clorofila en cada tratamiento en el día 4 de cultivo, como en el tratamiento control. La menor concentración de clorofila fue para el tratamiento limitante en nitrógeno N/16 con  $0.33 \pm 0.01$  mg/mL, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con los demás tratamientos. Para el caso de limitantes de silicatos, no hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos Si/8 y Si/16 con concentraciones de  $0.393 \pm 0.02$  mg/mL y  $0.409 \pm 0.03$  mg/mL respectivamente. Este comportamiento era de esperarse debido a que el nitrógeno es un elemento que se encuentra como componente en la molécula de clorofila.

La conversión de la energía solar en energía química a una tasa de crecimiento baja es una estrategia de supervivencia a bajas concentraciones de nutrientes. En el caso de un medio bajo en nitrato, se esperaba una baja concentración de clorofila, ya que el nitrógeno es un componente clave en la síntesis de clorofila, así como de la proteína. Song *et al.* (2016) encontraron que, a altas concentraciones de nitrógeno (relación N:P 16:1), es posible observar valores más altos de clorofila (2.3 mg/L) que a concentraciones más bajas (relación N:P, 1: 1) en *Dunaliella tertiolecta*, este comportamiento no es afectado por la fuente de nitrógeno (urea o nitratos). Además, a bajas concentraciones de nitrógeno en el medio, las células son incapaces de utilizar nitrógeno intracelular para la síntesis de clorofila celular en la producción de nuevas células.



**Figura 6.** Efecto de la limitante de nitratos y silicatos en la concentración de clorofila en *Navicula incerta*. Diferentes concentraciones de nitrógeno (N/4, 0.44 mol/L; N/8, 0.22 mol/L; y N/16 0.11 mol/L) o silicato (Si/4, 0.08 mol/L; Si/8, 0.04 mol/L; y Si/16 0.02 mol/L) en medio F/2 expresadas como porcentaje de peso seco (media  $\pm$  desviación estándar, n = 6).

## Contenido de Proteína

La disminución en el contenido de proteínas se esperaba en medios con bajas concentraciones de nitratos; sin embargo, el mismo caso se observó en el medio limitado en silicato. El análisis proximal de *Navicula incerta* bajo los diferentes tratamientos se observa en la Tabla 3. El contenido de proteína en los tratamientos limitantes en nitrógeno disminuyó en todos los tratamientos, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el medio control ( $35\% \pm 3.35$ ). El tratamiento N/16 fue el más bajo con una concentración del  $14.85\% \pm 1.28$  mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). En el tratamiento con limitantes de silicato, la concentración disminuyó de  $31.38\% \pm 1.58$  en Si/8 a  $28\% \pm 1.19$  en Si/4.

Otras investigaciones con *Navicula* spp. en medios limitantes de silicato reportan porcentajes de proteína más altos. Para *Navicula germanopolomica*, se reportó el 21% en contenido de proteínas (Leal *et al.*, 2013), mientras que para *Navicula incerta*, se encontró una concentración de proteína similar a la obtenida en este estudio (Sánchez & Núñez 2012). El nitrógeno es un componente importante de varios compuestos, como las proteínas, el ADN y las clorofilas. Por lo tanto, la privación de este nutriente afecta la concentración de las biomoléculas del organismo, generando una condición de estrés. Jiang *et al.* (2015), trabajando con *Nitzschia perpicua*, informaron que la disminución de los silicatos en el medio afecta la cantidad de proteína y la relación lípido/proteína en las diatomeas. La condición de estrés en bajas concentraciones de silicatos disminuye la concentración de proteínas y aumenta la formación de lípidos. Sin embargo, para *Navicula incerta*, este comportamiento sobre la disminución en la cantidad de proteínas se observa en mayor grado en los medios con limitación de nitrógeno, mostrando diferencias significativas con el tratamiento control. En los tratamientos limitantes en silicatos, se observó un aumento en la cantidad de proteína y una disminución en el porcentaje de lípidos, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento control, pero no entre los tratamientos con limitante de silicatos.

**Tabla 3.** Efecto de la limitación de nitrógeno y silicato en el medio F/2 en la composición proximal de *Navicula incerta*.

Tratamiento	Ceniza (%)	Lípidos (%)	Proteína (%)	<sup>a</sup> CHO (%)
Control F/2	31.39 <sup>ab</sup> ± 1.94	21.38 <sup>bc</sup> ± 0.23	35.66 <sup>a</sup> ± 3.35	3.21 <sup>f</sup> ± 1.05
Limitación Nitrógeno				
Tratamiento N/4	32.90 <sup>a</sup> ± 1.64	21.87 <sup>b</sup> ± 1.94	29.52 <sup>b</sup> ± 0.68	6.76 <sup>c</sup> ± 1.23
Tratamiento N/8	32.84 <sup>a</sup> ± 0.38	27.09 <sup>a</sup> ± 1.75	17.84 <sup>c</sup> ± 1.96	10.50 <sup>d</sup> ± 0.44
Tratamiento N/16	33.53 <sup>a</sup> ± 0.47	21.15 <sup>bc</sup> ± 1.80	14.85 <sup>c</sup> ± 1.28	23.31 <sup>a</sup> ± 2.12
Limitación Silicatos				
Tratamiento Si/4	30.05 <sup>b</sup> ± 1.02	19.41 <sup>cd</sup> ± 1.85	28.08 <sup>b</sup> ± 1.19	12.77 <sup>cd</sup> ± 1.47
Tratamiento Si/8	26.97 <sup>c</sup> ± 0.70	16.08 <sup>d</sup> ± 1.37	31.38 <sup>b</sup> ± 1.58	19.04 <sup>b</sup> ± 1.57
Tratamiento Si/16	26.55 <sup>c</sup> ± 0.73	16.12 <sup>d</sup> ± 6.69	30.50 <sup>b</sup> ± 1.41	15.48 <sup>c</sup> ± 0.65

<sup>a</sup>CHO = carbohidratos

Diferentes concentraciones de nitrógeno (N/4, 0.44 mol/L; N/8, 0.22 mol/L; y N/16 0.11 mol/L) o silicato (Si/4, 0.08 mol/L; Si/8, 0.04 mol/L; y Si/16 0.02 mol/L) en medio F/2 expresadas como porcentaje de peso seco (media ± desviación estándar, n = 6; letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas: p < 0.05).

## Contenido de carbohidratos

El mayor porcentaje de carbohidratos se obtuvo en ambas limitaciones de nutrientes en comparación con el control. El contenido de carbohidratos se observa en la tabla 3. Las concentraciones más altas se presentaron en los tratamientos N/16 ( $23.31\% \pm 2.12$ ) y Si/8 ( $19.04\% \pm 1.57$ ); revelando que la exposición a un medio con una limitación de nitrógeno o silicato promueve la síntesis de carbohidratos. A pesar de la baja producción de biomasa en tratamientos limitados en silicatos se observa una alta producción de carbohidratos, presentando un aumento 6 veces mayor al medio control. Fimbres-Olivarria *et al.* (2015) reportaron porcentajes muy similares obtenidos en el medio control (3.09% a 4.013%) para *Navicula* sp. con diferentes tratamientos de longitud e intensidad de luz. Se ha observado que las limitantes de nutrientes como nitratos, fosfatos y/o silicatos (Fimbres-Olivarria *et al.*; 2015, Huang *et al.*; 2013, Jiang *et al.*; 2015, López-Elías *et al.*, 2015) conllevan a una mayor producción de carbohidratos en comparación con el tipo y concentración de luz recibida. Esto puede deberse a que las limitaciones de nutrientes modifican varios ciclos y rutas metabólicas del organismo (Kim *et al.*, 2014), induciendo una baja producción de proteínas, ocasionando que el exceso de energía absorbida se almacene como carbohidratos o lípidos, pero resultando en algunos casos en una reducción en la cantidad de biomasa.

## Contenido de Lípidos

Las limitaciones de nitrógeno y silicatos modificaron la concentración de lípidos en comparación con el medio F/2 de Guillard y Ryther. En el caso de las limitaciones de nitrógeno, la concentración de lípidos aumentó, con el tratamiento N/8 exhibiendo la concentración más alta ( $27.09\% \pm 1.75$ ), mientras que los tratamientos limitantes de silicato disminuyeron la concentración de lípidos, encontrándose la concentración más baja en el tratamiento Si/8 ( $16.08\% \pm 1.37$ ). Los valores más bajos de lípidos en los tratamientos limitantes de nitrógeno y de silicato fueron los N/16 con  $21.15\% \pm 1.80$  y S/8 con  $16.08\% \pm 1.37$ , mostrando sólo el tratamiento S/8 diferencias significativas con el medio control. El



contenido de lípidos mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos N/8, Si/8 y Si/16.

Al analizar el perfil lipídico, se encontraron diferencias debido a los tratamientos (Tabla 4). En general, se observó una tendencia de aumento de los ácidos grasos mono y poliinsaturados en las condiciones limitantes para ambos nutrientes. Se encontraron en mayores concentraciones el ácido palmítico (16:0), tricosanoico (23:0), palmitoleico (16:1) y el ecosanopentanoico (20:5 n-3). No se observaron diferencias estadísticas entre el control y los tratamientos limitantes en nitratos y silicatos en el contenido de ácido palmitoleico, sin embargo, sí en la concentración final de monoinsaturados. La concentración de poliinsaturados varió en concentraciones de 16.53% a 20.34% mostrando diferencias estadísticas entre el control y los tratamientos.

Se ha informado que las limitaciones de nitrógeno y silicatos afectan la composición y producción de los AGI y aumentan la cantidad de EPA y DHA (Chen *et al.*, 2013; Vitovà *et al.*, 2015; Mortensen & Gislerød, 2016; Xia *et al.*, 2016). Para el caso de *Navicula incerta*, se observó un aumento tanto del EPA como del ácido linolénico. La concentración de lípidos en la limitación de silicato se puede explicar en las células de diatomeas mediante la aclimatación metabólica y puede llevar a la acumulación de triacilgliceroles insaturados en la pared celular bajo la privación de algunos nutrientes (Yongmanitchai y Ward, 1992; Jiang *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2015;). Otros autores informan que además de la disminución de nutrientes como el nitrógeno, la fase de cultivo, el tiempo del cultivo y el agotamiento de nutrientes también influyen en la concentración de ácidos grasos en las microalgas (Alonso *et al.*, 2000; Giordano *et al.*, 2001).

Varios autores han reportado que la limitación de silicatos en diatomeas conduce a la acumulación de lípidos como en *Chaetoceros gracilis* y *Nitzschia* spp. (Taguchi *et al.*, 1987; Jiang *et al.*, 2015); sin embargo, en nuestro estudio con *Navicula incerta*, la cantidad de lípidos disminuyó. Por otro lado, se han reportado concentraciones de lípidos para *Navicula*

**Tabla 4.** Perfil de ácidos grasos de *Navicula incerta* a diferentes concentraciones de nitratos (N) y silicatos (Si) en el medio F/2 de Guillard y Rhyter.

Ac. Graso	Control	N/4	N/8	N/16	Si/4	Si/8	Si/16
14:0	3.86 <sup>b</sup> ± 0.7	4.73 <sup>ab</sup> ± 0.7	5.08 <sup>a</sup> ± 0.3	5.36 <sup>a</sup> ± 1.4	5.24 <sup>a</sup> ± 0.3	5.1 <sup>a</sup> ± 0.4	4.90 <sup>a</sup> ± 0.4
16:0	16.42 <sup>c</sup> ± 0.6	17.98 <sup>ab</sup> ± 0.7	18.02 <sup>ab</sup> ± 0.8	18.80 <sup>a</sup> ± 2.1	16.66 <sup>bc</sup> ± 1.1	16.87 <sup>bc</sup> ± 0.9	16.60 <sup>bc</sup> ± 0.8
18:0	6.30 <sup>a</sup> ± 1.6	4.35 <sup>ab</sup> ± 1.2	4.93 <sup>ab</sup> ± 1.3	4.62 <sup>ab</sup> ± 0.6	3.80 <sup>ab</sup> ± 0.7	4.98 <sup>b</sup> ± 1.6	4.29 <sup>ab</sup> ± 0.7
23:0	29.13 <sup>a</sup> ± 2.9	18.37 <sup>bc</sup> ± 3.3	21.50 <sup>b</sup> ± 2.8	15.02 <sup>c</sup> ± 3.3	20.37 <sup>bc</sup> ± 2.4	18.59 <sup>b</sup> ± 0.6	19.34 <sup>b</sup> ± 2.3
AGS	55.44 <sup>a</sup> ± 4.2	43.72 <sup>c</sup> ± 2.4	49.53 <sup>b</sup> ± 1.5	44.01 <sup>c</sup> ± 1.5	45.50 <sup>c</sup> ± 2.1	45.73 <sup>c</sup> ± 2.0	42.42 <sup>c</sup> ± 3.7
16:1	20.18 <sup>b</sup> ± 3.8	26.19 <sup>a</sup> ± 5.1	24.10 <sup>ab</sup> ± 1.5	28.7 <sup>a</sup> ± 4.8	27.85 <sup>a</sup> ± 2.5	25.64 <sup>a</sup> ± 3.0	26.87 <sup>a</sup> ± 1.8
18:1 n-9t	3.75 <sup>a</sup> ± 0.7	1.33 <sup>b</sup> ± 0.8	NP	NP	1.12 <sup>b</sup> ± 0.3	1.31 <sup>b</sup> ± 0.5	0.92 <sup>b</sup> ± 0.2
18:1 n-9c	4.12 <sup>a</sup> ± 1.1	3.93 <sup>a</sup> ± 0.5	3.51 <sup>a</sup> ± 1.3	1.64 <sup>b</sup> ± 0.6	3.57 <sup>a</sup> ± 0.6	3.40 <sup>a</sup> ± 0.5	3.95 <sup>a</sup> ± 0.8
17:1	NP	4.7 <sup>a</sup> ± 1.4	4.95 <sup>a</sup> ± 1.2	5.11 <sup>a</sup> ± 1.6	5.94 <sup>a</sup> ± 0.5	5.39 <sup>a</sup> ± 0.6	5.77 <sup>a</sup> ± 0.7
AGMI	28.05 <sup>e</sup> ± 2.9	35.04 <sup>bc</sup> ± 1.8	32.57 <sup>cd</sup> ± 1.3	36.58 <sup>ab</sup> ± 3.4	38.89 <sup>a</sup> ± 1.7	31.56 <sup>d</sup> ± 3.4	37.86 <sup>ab</sup> ± 2.2
18:2 n-6	0.39 <sup>c</sup> ± 0.1	NP	0.80 <sup>b</sup> ± 0.3	0.58 <sup>bc</sup> ± 0.1	NP	1.33 <sup>a</sup> ± 0.3	0.69 <sup>b</sup> ± 0.1
20:5 n-3	16.14 <sup>bc</sup> ± 1.5	18.69 <sup>ab</sup> ± 1.5	17.09 <sup>abc</sup> ± 1.1	19.30 <sup>a</sup> ± 3.9	15.59 <sup>bc</sup> ± 0.6	16.19 <sup>c</sup> ± 1.1	18.65 <sup>ab</sup> ± 2.4
AGPI	16.53 <sup>c</sup> ± 1.6	18.69 <sup>a</sup> ± 0.2	17.90 <sup>abc</sup> ± 1.3	19.24 <sup>ab</sup> ± 3.8	15.59 <sup>bc</sup> ± 0.9	17.41 <sup>c</sup> ± 1.3	19.42 <sup>ab</sup> ± 2.3

Diferentes concentraciones de nitrógeno (N/4, 0.44 mol/L; N/8, 0.22 mol/L; y N/16 0.11 mol/L) o silicato (Si/4, 0.08 mol/L; Si/8, 0.04 mol/L; y Si/16 0.02 mol/L) en medio F/2 expresadas como porcentaje de peso seco (media ± desviación estándar, n = 3; letras diferentes indican diferencias significativas entre las filas: p < 0.05).

spp. del 22.73% (Leal *et al.*, 2013) al 25.4% (Fimbres-Olivarria *et al.*, 2015). Los autores atribuyeron este comportamiento a los factores de estrés que se emplearon en estos estudios, como la salinidad, las intensidades de luz y las longitudes de onda. Con respecto a la producción de lípidos, se informó que las limitaciones de nutrientes como los nitratos y silicatos afectan la composición y producción de AGP e incrementan la cantidad de EPA y DHA en algunos casos (Chen *et al.*, 2013; Vitova *et al.*, 2015; Mortensen & Gislerød 2016; Xia *et al.*, 2016). La baja concentración de lípidos en las células de diatomeas por la limitación de nutrientes se puede explicar debido a la aclimatación metabólica y la cinética de crecimiento (concentración celular y número de divisiones por día) que logran afectar características como el tamaño y composición bioquímica (Núñez *et al.*, 2015).

El aumento en la concentración de ácidos grasos poliinsaturados como el EPA muestra el potencial de la microalga *Navicula incerta* en cultivos limitantes de nitratos y silicatos. Este aumento no sólo es benéfico en la alimentación de organismos acuáticos (Spolaore *et al.*, 2006), sino también para la salud humana. En el caso de los organismos de la acuicultura, ya se ha documentado que usar alimentos ricos en AGMI y AGP aumenta su calidad, haciéndolos de interés económico (Spolaore *et al.*, 2006), como el 16:1 que involucra el almacenaje y uso de energía en larvas de peces (Thompson *et al.*, 1992). Algunos de los efectos benéficos que poseen los AGP para la salud del ser humano, son su capacidad de actuar como antiinflamatorios, antitrombóticos, hipoglucémicos y cuidados contra enfermedades del corazón y piel (González-Aguilar *et al.*, 2014). Siendo importante la ingesta de alimentos ricos en AGMI y AGP como el EPA.

### **Propiedades calculadas del biodiésel a partir de los perfiles de ácidos grasos de *Navicula incerta***

Las propiedades del biodiésel, estimadas a partir del perfil de los ácidos grasos de *Navicula incerta* cultivadas en diferentes concentraciones en medio F/2 Guillard y Ryther fueron afectadas por los diferentes tratamientos. Los resultados de los cálculos de estas propiedades

se observan en la Tabla 5. Se obtuvieron diferencias estadísticas en el índice de cetano (IC), el índice de yodo (IY) y el índice de saponificación (IS). En todos los tratamientos se obtuvieron valores mayores a los establecidos en los estándares de la norma americana y europea para el IC, sin embargo, estos se encuentran en el rango óptimo (41-56). El valor máximo de IC calculado fue para el tratamiento control ( $59.22 \pm 1.67$ ), mostrando diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) con todos los tratamientos limitantes de nutrientes (N/4  $53.53 \pm 0.82$ , N/8  $53.61 \pm 1.66$ , N/16  $53.61 \pm 1.65$ , Si/4  $56.18 \pm 0.54$ , Si/8  $55.79 \pm 0.69$  y Si/16  $54.07 \pm 2.05$ ). Los valores mínimos fueron en los tratamientos limitantes en nitrógeno N/4  $53.53 \pm 0.82$  y N/8  $53.61 \pm 1.66$ . Los valores calculados de IY de todos los tratamientos fueron menores al límite que establecen los estándares ( $< 120 \text{ g I}_2 / 100 \text{ g}$ ). Las limitaciones de nitrógeno (N/16  $85.58 \pm 5.37 \text{ g I}_2 / 100 \text{ g}$  y N/8  $85.17 \pm 5.37 \text{ g I}_2 / 100 \text{ g}$ ) y el tratamiento Si/16 ( $84.84 \pm 6.81 \text{ g I}_2 / 100 \text{ g}$ ) mostraron valores máximos de IY en comparación con las limitaciones de silicato (Si/4  $76.92 \text{ g I}_2 / 100 \text{ g}$ , Si/8  $79.04 \text{ g I}_2 / 100 \text{ g}$ ), tratamiento limitante en nitrógeno N/4 ( $83.87 \text{ g I}_2 / 100 \text{ g}$ ) y el control ( $68.22 \text{ g I}_2 / 100 \text{ g}$ ) mostrando diferencias significativas. El mismo comportamiento que se observó en el IC se presenta en las propiedades de FSCL y POFF °C, donde el tratamiento control presentó los valores máximos con  $4.79$  y  $-1.46 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2.17$ , respectivamente. El punto de obstrucción del filtro frío (POFF °C) calculado fue inferior a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , donde los valores más bajos fueron para el tratamiento con Si / 4 con  $-5.44 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.41$ . Se encontraron diferencias estadísticas entre el control y los demás tratamientos excepto con el tratamiento Si/8 ( $-2.71 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1.69$ ).

Como era de esperarse, las limitaciones de nitratos y silicatos en los cultivos de *Navicula incerta* afectaron el perfil de ácidos grasos en las microalgas, y por lo tanto las propiedades teóricas del biodiésel. Se ha documentado que los AGS, AGM y AGPI presentes en el perfil lipídico juegan un papel importante en las propiedades del biodiésel. En el caso del IC, un aceite con altas cantidades de AGS aumenta el valor de IC (Islam *et al.*, 2013). El valor más alto de IC corresponde al tratamiento control (59.22), lo cual nos indica que la combustión del biodiésel del cultivo control se llevará a cabo antes que en los otros tratamientos. Los valores calculados de todos los tratamientos están dentro de los descritos por los estándares para biodiésel (41- 56 y no más de 65), por lo que en cualquiera de los casos pueden ser una

**Tabla 5.** Efecto de la concentración limitante de nitratos (N/4, 0.44 mol/L; N/, 0.22 mol/L; N/16 0.11 mol/L) o silicatos (Si/4, 0.08 mol/L; Si/8, 0.04 mol/L; Si/16 0.02 mol/L) en medio F/2 de Guillard y Rhyter en las propiedades del biodiésel del perfil de ácidos grasos de *Navicula incerta*.

Tratamiento	GI	FSCL	POFF (°C)	Índice de Saponificación (mg KOH/g)	Índice de Yodo (g I <sub>2</sub> /100g)	Índice de Cetano (IC)
Control	61.11	4.79	-1.46 ± 2.17 <sup>c</sup>	193.08 ± 2.38 <sup>d</sup>	68.22 ± 6.37 <sup>c</sup>	59.22 ± 1.67 <sup>a</sup>
N/4	75.74	3.98	-4.29 ± 1.60 <sup>ab</sup>	209.15 ± 1.70 <sup>a</sup>	83.87 ± 4.18 <sup>bc</sup>	53.53 ± 0.82 <sup>cd</sup>
N/8	68.37	4.37	-3.47 ± 1.12 <sup>ab</sup>	206.25 ± 3.85 <sup>ab</sup>	85.17 ± 5.37 <sup>a</sup>	53.61 ± 1.66 <sup>d</sup>
N/16	75.06	4.19	-3.11 ± 0.46 <sup>ab</sup>	202.15 ± 4.02 <sup>bc</sup>	85.58 ± 6.49 <sup>a</sup>	54.06 ± 1.65 <sup>d</sup>
Si/4	70.07	3.56	-5.44 ± 0.41 <sup>a</sup>	200.75 ± 1.08 <sup>c</sup>	76.92 ± 2.09 <sup>b</sup>	56.18 ± 0.54 <sup>b</sup>
Si/8	66.38	4.18	-2.71 ± 1.69 <sup>bc</sup>	200.17 ± 2.62 <sup>c</sup>	79.04 ± 1.97 <sup>ab</sup>	55.79 ± 0.69 <sup>bc</sup>
Si/16	76.70	3.81	-5.05 ± 0.72 <sup>a</sup>	203.5 ± 4.47 <sup>bc</sup>	84.84 ± 6.81 <sup>a</sup>	54.07 ± 2.05 <sup>cd</sup>

Grado de instauración (GI), Factor de saturación de cadena larga (FSCL), Punto de obstrucción de filtro en frío (POFF °C), Número de cetano (NC). Diferentes letras indican diferencias significativas entre cada columna  $p < 0.05$  (promedio ± desviación estándar, n = 3)

opción para la elaboración del biocombustible sin que estos puedan presentar los problemas debido a valores altos en el IC como una combustión incompleta o el aumento de la cantidad de humo de escape (Băţaga *et al.*, 2003). En el caso del tratamiento control se recomendaría su uso como aditivo o en una mezcla con otro biodiésel para obtener un valor dentro del rango de IC (41 --56).

El índice de yodo (IY) es una escala utilizada para definir el grado de insaturación de un compuesto orgánico. Los valores de índice de yodo calculados en todos los tratamientos están dentro de este rango ( $IY < 120 \text{ g I}_2/100 \text{ g}$ ). Estos valores nos indican que no presentarían problemas como la tendencia de polimerización o de formar depósitos en las boquillas de los pistones. Al mismo tiempo, nos indican su posible uso en conjunto con otros biodiésels para poder reducir este problema sin afectar los valores de IC y mejorar su calidad y vida de anaquel. El IS nos indica la probabilidad de que un el aceite de la microalga se transforme en jabón mientras se lleva a cabo la transformación del biodisel por medio de la transesterificación alcalina. Entre más alto el IS mayor la probabilidad de presencia de jabón en el producto final. El IS no debe exceder ciertos límites, debido a que puede dificultar los procesos de recuperación y purificación del biodiésel; además de promover reacciones indeseadas al momento de llevar a cabo la transformación del aceite a biodiésel (Tacias-Pascacio *et al.*; 2016) como la saponificación durante la transesterificación alcalina. Sin embargo, ninguna norma se especifica los valores que deben presentar los aceites o grasas a utilizar para la formación de biodiésel. En el presente estudio todos los tratamientos presentaron valores de IS menores al control.

Los ácidos grasos que presentan la mayor proporción son 16: 0, 16: 1, 20: 5 y 23:0 en el perfil lipídico, confiriéndole diferencias en las propiedades como en POFF °C, la cual está relacionada con problemas operativos en climas fríos y su funcionamiento. Finalmente, los valores de POFF °C calculado en todos los tratamientos nos indica su posible uso en lugares de temperatura cercana a los 0 °C, sin afectar características como la densidad o la formación de cristales, los cuales pueden producir cambios en las propiedades del biodiésel o del funcionamiento del motor. Las diferencias estadísticas en esta característica (POFF °C) nos

indican que un biodiésel elaborado con el tratamiento Si/16 ( $-5.05 \pm 0.72$  °C) es el que menos se afectaría en regiones con temperaturas bajas o cercanas a los 0 °C. Por lo tanto, la saturación como la insaturación de los ácidos grasos debe tener un equilibrio para obtener un biodiésel con las cualidades requeridas. Por lo que el próximo paso es la extracción y elaboración del biocombustible a partir de estos aceites para comprobar experimentalmente los valores, propiedades descritas y la viabilidad de este producto.

## CONCLUSIÓN

La concentración de nutrientes de nitrato y silicato afecta la cinética de crecimiento y la composición proximal de la microalga *Navicula incerta*. En los medios limitados de nitrato, la producción de lípidos y carbohidratos aumenta, mientras que con los limitados de silicato, solo aumenta la producción de carbohidratos. Por lo que *Navicula incerta* puede ser una buena fuente para la producción de lípidos y carbohidratos en medios reducidos en nitrógeno y silicatos, lo que reduce el costo de producción y además se mantiene la densidad celular. Se logró identificar 10 ácidos grasos en *Navicula incerta*. Las limitaciones de nitratos y silicatos afectaron el perfil de ácidos grasos presentes en la microalga, con un aumento de ácidos grasos mono y poliinsaturados en ambas limitaciones de nutrientes (nitratos y silicatos) en el medio. En general hubo un aumento en los ácidos grasos de importancia a nivel nutricional y de salud para varios organismos, así como para la elaboración de biodiésel. Las propiedades calculadas para el biodiésel se vieron afectadas por los cambios en el perfil de ácidos grasos; sin embargo, los valores obtenidos como el número de cetano y el índice de acidez están dentro de las normas consultadas, lo que sugiere el potencial uso de la microalga *Navicula incerta* cultivada en limitante de nitratos y silicatos para la producción o como aditivo en la producción de biodiésel.



## RECOMENDACIONES

1. Optimizar las condiciones de cultivo para la producción de ácidos grasos y biomasa de la microalga *Navicula incerta* cultivada bajo condiciones de diferentes niveles en limitación de nitrógeno y silicato empleando luz a diferentes longitudes de onda.
2. Obtener y optimizar la extracción de ácidos grasos de *Navicula incerta*, para llevar a cabo estudios de fisiología alimentaria en organismos marinos y la elaboración de biodiésel a partir de esta microalga.
3. Comparar las características del biodiésel obtenido de los ácidos grasos de *Navicula incerta* con los calculados en este trabajo y poder proponer la mejor opción para la elaboración de biodiésel.
4. Llevar a cabo un análisis proteómico de *Navicula incerta* cultivada en diferentes medios para lograr una mejor comprensión de los cambios en el metabolismo de la microalga en respuesta a la limitación de nutrientes.

## REFERENCIAS

- Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Texeira, J. y Dragone, G. (2012). Mixotropic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology*, 118, 61-152.
- Affan, A., Karawita, R., Jeon, Y. J. y Lee, J. B. (2007). Growth characteristics and antioxidant properties of the benthic diatom *Navicula incerta* (Bacillariophyceae) from Jeju island, Korea. *Journal of Phycology*, 43(4), 823-832.
- American Society for Testing and Materials. (2005) Standard test method of cold filter plugging point of diesel and heating fuels. ASTM designation: D6371-05. Philadelphia.
- Apt, K. E. & Behrens, P. W. (1999). Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*, 35(2), 215–226.
- Arrazola, A. (1994). Biología de la membrana celular. *Nefrologia*, 14(4), 418-426.
- Barabás, I. & Todoruț, I. A. (2011). Biodiesel Quality, Standards and Properties, Biodiesel Quality, Emissions and By-Products Dr. Gisela Montero (Ed.), Available from: <http://www.intechopen.com/books/biodiesel-quality-emissions-and-by-products/biodiesel-qualitystandards-and-properties> ISBN: 978-953-307-784-0.
- Barceló-Coblijn, G., & Murphy, E. J. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n–3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n–3 fatty acid levels. *Progress in Lipid Research*, 48(6), 355–374.
- Bățaga, N., Burnete, N. y Barabás, I. (2003). Combustibili, lubrifianți, materiale speciale pentru autovehicule. Economicitate și poluare. Alma Mater, ISBN 973-9471-20-X, Cluj-Napoca, Romania.
- Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell, Oxford. 312– 351.
- Birch, E. E., Garfield, S., Castañeda, Y., Hughbanks-Wheaton, D., Uauy, R. y Hoffman, D. (2007). Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. *Early Human Development*, 83(5), 279-284.
- Bourre, J. M. (2007) Dietary Omega-3 fatty acids for woman. *Biomedicine y Pharmacotherapy*. 6(2-3), 105-112.

- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialization. *Journal Applied Phycology*, 25, 743–756.
- Brennan, L. & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Review*, 14(2), 557-577.
- Cantrill, R. C., Huang, Y. S., Ells, G. W. y Horrobin, D. F. (1993). Comparison of the metabolism of  $\alpha$ -linolenic acid and its  $\Delta 6$  desaturation product, stearidonic acid, in cultured NIH-3T3 cells. *Lipids*, 28(3), 163–166.
- Chae, S. R., Hwang, E. J. y Shin, H. S. (2006). Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photobioreactor. *Bioresource Technology*, 97(2), 322-329.
- Chini-Zittelli, G.; Lavista, F.; Bastianini, A.; Rodolfi, L.; Vincenzini, M. y Tredici, M. R. (1999). Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, 70(1-3), 299–312.
- Connor, W.E. (1994) Fatty acids and heart diseases. In *Nutrition and disease update: heart disease*; Kritchevsky, D.; Carroll, K.K.; Eds.; AOCS: Champaign, IL 7–42.
- Demirbas, A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50(1), 14-34.
- Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., Machat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachkeder, V. y Vitova, M. (2009). Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 179-185.
- Fan, J., Cui, Y., Wan, M., Wang, W. y Li, Y. (2014). Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnology Biofuels*, 7(1), 1–14.
- Feng, D., Chen, Z., Xue, S. y Zhang, W. (2011). Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresour Technology*, 102(12), 6710–6716.
- Ferguson, R. E., Hochstrasser, D. F. y Banks, R. E. (2007). Impact of preanalytical variables on the analysis of biological fluids in proteomic studies. *Proteomics Clinical Applications*, 1(8), 739–746.
- Fimbres-Olivarría, D., López-Elías, J. A., Martínez-Córdova, L. R., Carvajal-Millán, E., Enríquez-Ocaña, F., Valdéz-Holguín, E. y Miranda-Baeza A. (2015). Growth and

- biochemical composition of *Navicula* sp. cultivated at two light intensities and three wavelengths. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 67, 1–7.
- Garrido, S. M. (2010). Tecnología, territorio y sociedad. Producción de biodiesel a partir de aceites usados. *Revista de Ciencias Sociales*, 37, 75-86.
- Gellenbeck, K. W. (2012). Review: Utilization of algal materials for nutraceutical and cosmeceutical applications—what do manufacturers need to know? *Journal Applied Phycology*, 24, 309–313.
- Geng, S., Zhou, Ch., Chen, W., Yu, S., Huang, W., Huan, T., Xu, J. y Yan, X. (2016). Fatty acid and sterol composition reveal food selectivity of juvenile ark shell *Tegillarca granosa* Linnaeus after feeding with mixed microalgae. *Aquaculture*, 455, 109–117.
- González-Aguilar, G. A., González-Córdova, A. F., Vallejo-Córdoba, B., Álvarez-Parrilla E. y García H. S. (2014) LOS ALIMENTOS FUNCIONALES. Un nuevo reto para la industria de alimentos. Publicado por: CIAD y AGT Editor (ISBN: 978-607-7551-37-9).
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talón, M. Dopazo, J. y Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36(10), 3420-3435.
- Graves, P. R., & Haystead, T. A. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 39-63.
- Griinari J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V. y Bauman D. E. (2000) Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by  $\Delta^9$ -Desaturase. *The Journal of Nutrition*, 130 (9), 2285–2291.
- Guichardant, M., Traitler, H., Spielmann, D., Sprecher, H. y Finot, P. A. (1993) Stearidonic acid, an inhibitor of the 5-lipoxygenase pathway. A comparison with timnodonic and dihomogammalinolenic acid. *Lipids* 28(4), 321–324.
- Guil-Guerrero, J. L. (2007). Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(12), 1226–1236.
- Guillard, R.R.L. & Ryther J. H. (1962). Studies of marine plank- tonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 229-239.
- Hansen, H. S. & Jensen, B. (1985) Essential function of linoleic acid esterified in

- acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier: Evidence from feeding studies with oleate, lileate, arachidonate, columbinate and alpha-linolenate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 834(3), 357-363.
- Henrard, A. A., de Morais, M. G. y Costa, J. A. (2011). Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp. *Bioresource Technology*, 102(7): 4897-4900.
- Horrobin, D. F. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research*, 31(2), 163–194. -7.
- Hu, Q. (2004). Environmental effects on cell composition. Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing: 83-96.
- Huang, X., Huang, Z., Wen, W. y Yan, J. (2013). Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*). *Journal Applied Phycology*, 25(1), 129–137.
- Islam, M., Magnusson, M., Brown, R., Ayoko, G., Nabi, M., y Heimann, K. (2013) Microalgal Species Selection for Biodiesel Production Based on Fuel Properties Derived from Fatty Acid Profiles. *Energies*, 6(11), 5676–5702.
- Jiang, Y., Nunez, M., Starks Laverty, K. y Quigg A. (2015). Coupled effect of silicate and nickel on the growth and lipid production in the diatom *Nitzschia perspicua*. *Journal Applied Phycology*, 27(3), 1137-1148.
- Kaur, G., Cameron-Smith, D., Garg, M., y Sinclair, A. J. (2011). Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 28–34.
- Kim, G., Bae, J. & Lee, K. (2016). Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, 205, 274–279.
- Kim, K. H., Choi, I. S., Kim, H. M., Wi, S. G. y Bae H. J. (2014). Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 153, 47–54.
- Knothe, G. & Gerpen J. V. (2005). The Biodiesel Handbook. AOCS Press, Champaign, Il.
- Krisnangkura, K. A (1986) Simple method for estimation of cetane index of vegetable oil methyl esters. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 63, 552–553.
- Lands, W. E. (2005). Dietary fat and health: the evidence and the politics of prevention: careful use of dietary fats can improve life and prevent disease. *Annals of the New York*

*Academy of Sciences*, 1055(1), 179–192.

- Lari1, Z., Moradi-kheibari, N., Ahmadzadeh, H., Abrishamchi1, P., Moheimani, N. R. y Murry M. A. (2016). Bioprocess engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient management. *Journal Applied Phycology*, 28(6), 3235–3250.
- Leal S., Medina M. A., Guerrero M. A., Piña P., Nieves M. y Curbelo, R. (2013). Concentración y composiciones orgánicas y proximales de dos especies de diatomeas bentónicas a diferentes salinidades. *Universidad y Ciencias*. 29(1), 45-2.
- Liang, S., Xueming, L., Chen, F. y Chen, Z. (2004). Current microalgal health food R&D activities in China. *Hydrobiologia*, 512(1-3), 45–48.
- Longworth, J., Wu, D., Huete-Ortega, M., Wright, P. C. y Vaidyanathan S. (2016). Proteome response of *Phaeodactylum tricornutum*, during lipid accumulation induced by nitrogen depletion. *Algal Research*, 18, 213-224.
- Lomeli-Ortega, C. & Martínez-Díaz S. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, 434, 208-211.
- López-Elías, J. A., Báez-Dueñas, M. D. C. y Huerta-Aldáz N. (1995). Manual de Técnicas Analíticas Aplicada al Cultivo de Microalgas. Serie Ciencias Marinas, Publicaciones Académicas CICTUS, México. 5, 1-47.
- López-Elías J. A., González-Vega, R. I., Márquez-Ríos, E. y Torres-Arreola, W. (2015). Effect of nitrogen source and concentration to produce proteins in mass cultures of the microalgae *Chaetoceros muelleri*. *International Journal of Experimental Botany Phyton*, 84(2), 331-337.
- Makareviciene, V. S. & Andruleviciute V. (2013). Biodiesel fuel from microalgae promising alternative fuel for the future: a review. Reviews in *Environmental Science and Biotechnology*, 12, 119–130.
- Masojídek, J., Koblížek, M. y Torzillo G. (2004). Photosynthesis in microalgae. Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing: 20-39.
- Mitra, D., Van Leeuwen, J. y Lamsal B. (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 1(1):40-48.
- Mock, T., Samanta, M. P., Iverson, V., Berthiaume, C., Robison, M., Holtermann, K., Durkin, C., BonDurant, S. S., Richmond, K., Rodesch, M., Kallas, T., Huttlin, E. L,

- Cerrina, F., Sussman, M. R. y Armbrust, E. V. (2008) Whole-genome expression profiling of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* identifies genes involved in silicon bioprocesses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5), 1579–1584.
- Msanne, J., Xu, D., Konda, A. R., Casas-Mollano, J. A., Awada, T., Cahoon, E. B. y Cerutti, H. (2012). Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C- 169. *Phytochemistry*, 75, 50–59.
- Muhseen, Z. T., Xiong, Q., Chen, Z., y Ge, F. (2015) Proteomics studies on stress responses in diatoms. *Proteomics*, 15(23-24), 3943–3953.
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal Applied Phycology*, 12, 527-534.
- Narayan, B., Miyashita, K. y Hosakawa, M. (2006). Physiological Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA)—A Review. *Food Reviews International*, 22(3), 291–307.
- Nuño, K. Villarruel, A. Puebla-Pérez, A. M. Romero-Velarde, E. Puebla-Mora, A. G., y Ascencio, F. (2013). Effects of the marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* in diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 106–115.
- Patel, S. & Goyal, A. (2013). Current and prospective insights on food and pharmaceutical applications of spirulina. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 7(2), 681-695.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E. y Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Resource*, 45(1), 11–36.
- Peet, M. (2004). Nutrition and schizophrenia: beyond omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70(4), 417–422.
- Piloto-Rodriguez, R. (2010) Determination of Biodiesel Influence on the Performance of Diesel Engines. Tesis de doctorado. Universidad Ghent. Ghent. Bélgica
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V. y Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal Applied of Phycology*, 26, 1359–1377.
- Rangel-Yagui, C. O., Godoy-Danesi, E. D., Carvalho, J. C. M. y Sato, S. (2004). Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process.

- Bioresource Technology*, 92(2), 133–141.
- Ras, M., Steyer, J. P. y Bernard O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Review Environ Science Biotechnology*. 12, 153-164.
- Renaud, S. M., Parry, D. L. y Think L. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture I: Gross chemical and fatty acid composition of twelve species of microalgae from the Northern Territory, Australia. *Journal Applied Phycology*, 6, 337-345.
- Renaud, S. M., Think, L. V. y Parry D. L. (1999). The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture*, 170(2), 147–159.
- Richardson, A. J., Easton, T. y Puri, B. K. (2000). Red cell and plasma fatty acid changes accompanying symptom remission in a patient with schizophrenia treated with eicosapentaenoic acid. *European Neuropsychopharmacology*, 10(3), 189–193.
- Richmond A. (2004). Handbook of microalgal culture. Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Blackwell Publishing.
- Roessler P. G. (1988). Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267(2), 521–528.
- Round, F. E., Crawford, M. R. y Mann, D. G. (1990) Diatoms- biology and morphology of the genera. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Ryckebosh, E., Muylaert, K. y Foubert I. (2012). Optimization of an analytical procedure for extraction of lipid from microalgae. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 89(2), 189-198.
- Sánchez-Borroto, Y., Piloto-Rodríguez, R., Goyos-Pérez, L., y Ferrer-Frontela, N., (2012). Cetane number estimation of biofuels from their fatty acid composition. *Ingeniería Mecánica*, 15(2). 147-157.
- Siaut, M., Cuine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., Li-Beisson, Y. y Peltier G. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BioMedCentral Biotechnology*, 11, 7.
- Skjånes, K., Rebours C. y Lindblad P. (2013). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical*



- Reviews in Biotechnology*, 33(2), 172-215.
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J. C. M. y Converti, A. (2005). Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243, 217–224.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C. y Duran, E. (2006). Review: Commercial Applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87–97.
- Tacias-Pascacio, V.G., Rosales-Quintero, A. & Torrestiana-Sánchez, B. (2016). Evaluación y caracterización de grasas y aceites residuales de cocina para la producción de biodiésel: un caso de estudio. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 32(3), 303-313
- Taziki, M., Ahmadzadeh, H., Murry, M. A. y Lyon, S. R. (2015). Nitrate and nitrite removal from wastewater using algae. *Biotechnology*, 4(4), 1–15.
- Tisdale, M. J. (1999). Wasting in Cancer. *The Journal of Nutrition*, 129(1), 243S–246S.
- Todd Lorenz, R. & Cysewski G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends of biotechnology*, 18(4), 160–167.
- Tran, N., Padula, P. M., Evenhuis, C. R., Commault, A. S., Ralph, P. J. y Tamburic, B. (2016). Proteomic and biophysical analyses reveal a metabolic shift in nitrogen deprived *Nannochloropsis oculata*. *Algal Resources*, 19, 1–11.
- Tu gestor de Salud. (2017). Ácidos grasos omega 3 ¿Qué son? [Figura]. Recuperado de <https://tugestordesalud.com/que-son-los-acidos-grasos-omega-3>
- Tzovenis, I., De Pauw, N. y Sorgeloos, P. (2003). Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids: I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. *Aquaculture*, 216, 203–222.
- Van de Vijver, B., Zidarova, R., Sterken, M., Verleyen, E., Haan, M., Vyverman, W., Hinz, F. y Sabbe K. (2011) Revision of the genus *Navicula* ss (Bacillariophyceae) in inland waters of the Sub-Antartic and Antarctic with the description of five new species. *Phycologia*, 50(3), 281-297.
- Van Gerpen, J., Shanks, B., Pruszko, R., y Clements, D. (2004). Biodiesel Production Technology. Office of Scientific and Technical Information, Department of Energy. National Renewable Energy Laboratory.
- Vedtofte, M. S., Jakobsen, M. U., Lauritzen, L., y Heitmann, B. L. (2011). Dietary  $\alpha$ -linolenic acid, linoleic acid, and n–3 long-chain PUFA and risk of ischemic heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(4), 1097–103.

- Vítová, M., Bišová, K., Kawano, S. y Zachleder, V. (2015). Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1204–12184.
- Volkman, J. K. & Brown, M. R. (2005). Nutritional value of microalgae and applications. Algal cultures, analogues of blooms and applications. Vol 1. *Science Publishers Enfield, USA*, 407–457.
- Wen, Z. Y. & Chen, F. (2003). Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, 21(4), 273–294.
- Yao, S., Brandt, A., Egsgaard, H. y Gjermansen C. (2012). Neutral lipid accumulation at elevated temperature in conditional mutants of two microalgae species. *Plant Physiology Biochemical*, 61, 71–79.
- Yuan-Kun, L. & Hui, S. (2004). Basic culturing techniques. *Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology)*. Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing. 40-56.
- Ziboh, V. A., Miller, C. C. y Cho, Y. (2000). Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1), 361s–366s.
- Zurier, R. B., Rossetti, R. G., Jacobson, E. W., Demarco, D. M., Liu, N. Y., Temming, J. E., White, B. M. y Laposata, M. (1996). Gamma-linolenic acid treatment of rheumatoid arthritis. A randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism*, 39(11), 1808–1817.

## ANEXOS

### 1. Medio F/2 de Guillard

Nutriente	Fórmula	g / L
1 nutrientes mayores		
1.1 nitrato de sodio, granulado y refinado	NaNO <sub>3</sub>	75
1.2 fosfato de sodio monobásico	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5
1.3 Silicato de sodio metasoluble	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	30
2 Metales traza		
2.1.1. Sulfato cúprico	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.98
2.1.2 sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.2
2.1.3 Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1
2.1.4 Cloruro manganoso	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	18
2.1.5 Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.63
2.2 Solución secundaria		
2.2.1 Cloruro férrico	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3.15
2.2.2 EDTA disodico	Na <sub>2</sub> EDTA	4.36
2.2.3 Metales traza		1 mL de c/u de las soluciones 2.1.1 a 2.1.5
3 Vitaminas		
3.1.1 Biotina cristalizada		0.1
3.1.2 Cianocobalamina		1
3.2 Soluciones secundarias		cant en 100 mL de agua destilada
3.2.1 Biotina		1 mL de la solución 3.1.1
3.2.2 Cianocobalamina		1 mL de la solución 3.1.2
3.2.3 Tiamina clorhídrica		20 mg

## ANEXO

Debido a la contingencia de COVID-19, se cambiaron los objetivos relacionados con el trabajo de análisis proteómico, teniendo que cambiar el último objetivo “Identificar los cambios en la expresión de las proteínas asociados a la producción de lípidos en limitación de nutrientes” por “Calcular y evaluar las propiedades del biocombustible (biodiésel) a partir del perfil de ácidos grasos de *Navicula incerta* en condiciones limitantes de nitrógeno y silicio.”