



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS DOCTOR EN BIOLOGÍA**

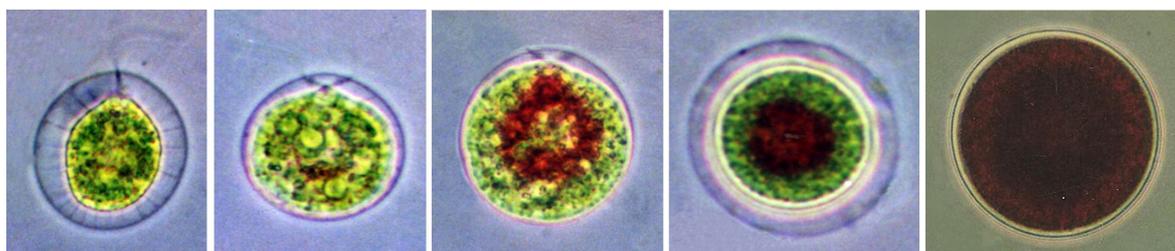
***HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* (CHLOROPHYTA): BIOLOGÍA,  
ULTRAESTRUCTURA Y EVALUACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO  
PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL**

**DAMIANI MARÍA CECILIA**

**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2010**





**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS DOCTOR EN BIOLOGÍA**

***HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* (CHLOROPHYTA): BIOLOGÍA,  
ULTRAESTRUCTURA Y EVALUACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO  
PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL**

**DAMIANI MARÍA CECILIA**

**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2010**

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 17/12/2004 y el 05/11/2010, bajo la dirección de la Doctora Patricia I. Leonardi, Profesora Adjunta de Biología de Algas y Hongos e Investigadora Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y del Doctor Eduardo J. Cáceres, Profesor Titular de Biología de Algas y Hongos.

05 de noviembre de 2010

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ..../..../..... , mereciendo la calificación de.....(.....)

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Patricia Leonardi y Eduardo Cáceres, por abrirme las puertas del laboratorio y por el apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia y a sus directores durante el período de duración de este trabajo.

Al Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS) y a su director Dr. Néstor Curvetto.

Al Dr. Alberto Cerezo y colaboradores (UBA) y a los Dres Olga Pieroni (UNS) y José Estévez (UBA) por la colaboración en los estudios químicos de las paredes celulares.

A las Dras Susana Bottini, Selva Pereda y en especial a Diana Constenla (PLAPIQUI) por la colaboración en la diagramación y desarrollo de los métodos de extracción lipídica.

A los Dres Daniel Borio, Marisa Pedernera, Pablo Hegel y Guillermo Mabe (PLAPIQUI) por su colaboración en el desarrollo de los procesos de obtención de biodiesel.

A mis compañeras de laboratorio Patricia Leonardi, Virginia Bianchinotti, Nora Ferrer, Karina Michetti, Alicia Miravalles, Cecilia Popovich, Romina Sánchez, Lucas Martín, Amelia Vouilloud y Virginia Sánchez Puerta por la amistad, el apoyo y estímulo constante durante la realización de esta tesis.

A mis compañeros de Farmacobotánica e Histología y Biología Celular, por alentarme en todo momento.

A mis padres y hermanos por confiar en mí y entenderme en aquellos momentos de ausencia.

A Fabián, Valentín y Santiago por apoyarme y acompañarme siempre hasta en aquellos momentos difíciles.

A todos mis amigos, los que de una manera u otra, supieron alentarme en este desafío.

## RESUMEN

En esta tesis se estudió la biología y la ultraestructura del género *Haematococcus* *pluvialis* y se evaluó el contenido lipídico de las células para la obtención de biodiesel.

La ultraestructura general de las células vegetativas es común a muchas Chlorophyceae, sin embargo, la cubierta celular y la configuración absoluta del aparato flagelar presentaron características particulares del género. En este estudio, se propone una nueva interpretación de la cubierta celular, formada por un estrato externo delgado y fibrilar y un estrato interno constituido por vesículas muy próximas entre sí. Además se describe el proceso de formación, en el cual interviene el sistema de endomenbranas.

Bajo condiciones de cultivo adversas las células vegetativas formaron cistos. Durante el proceso de enquistamiento las células perdieron movilidad, aumentaron de tamaño, sintetizaron una pared gruesa y acumularon un pigmento llamado astaxantina. La pared celular estuvo compuesta por una capa externa trilaminar de algaenano, un componente medio formado por material electrónicamente denso y un componente más interno, formado por distintos estratos de morfología variada.

Se describe por primera vez el proceso de germinación de los cistos en *H. pluvialis*, con particular atención al comportamiento de los distintos componentes de la pared durante este proceso y la liberación de los zooides. Las capas trilaminar y media se rompieron con el incremento de tamaño del cisto, sin embargo, el componente interno acompañó la expansión del mismo durante la germinación. El diferente proceso de formación de cada uno de los componentes de la pared explicaría el comportamiento distinto de estos, durante el proceso de germinación.

Se evaluó el contenido lipídico de *H. pluvialis* y su posible aplicación en la obtención de biodiesel. Se logaron optimizar las condiciones específicas de cultivo para un crecimiento óptimo y para la síntesis de lípidos bajo condiciones de estrés, duplicando

el contenido lipídico en cultivos estresados (35 g de lípidos en 100 g de biomasa) con respecto a los cultivos control.

Se evaluaron distintos métodos de extracción lipídica y se realizó la caracterización de los ácidos grasos, siendo la fracción neutra la mayoritaria en cultivos control y estresados. El perfil de los ácidos grasos en ambas condiciones de cultivo fue similar y los principales ácidos grasos fueron el palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolelaídico y linolénico.

Se obtuvo biodiesel por los métodos convencional de transesterificación y de metanol supercrítico. El rendimiento de la reacción de transesterificación por catálisis ácida fue del 70%. Este valor puede considerarse aceptable considerando que la materia prima utilizada, no sólo contenía triglicéridos sino además otros lípidos y pigmentos.

A través del método supercrítico fue factible la extracción lipídica utilizando metanol a alta temperatura y presión, como también se efectivizó la transesterificación de los triglicéridos.

La calidad lipídica de *H. pluvialis* indica el potencial que posee esta microalga como materia prima para la obtención de biodiesel. Este estudio provee información de base útil para futuras investigaciones tendientes a buscar las condiciones más adecuadas para mejorar el rendimiento lipídico, la extracción de lípidos y el proceso de obtención de biodiesel.

## ABSTRACT

In this thesis the biology and ultrastructure of the genus *Haematococcus pluvialis* were studied. The evaluation of lipid content for biodiesel production was also performed.

The general ultrastructure of vegetative cells is common to many Chlorophyceae; however, the cell coat and the absolute configuration of the flagellar apparatus showed particular generic characteristics.

In this study a new interpretation of the cell coat was proposed. The cell coat consisted of a fibrillar-thin outer layer and an inner one composed of vesicles close together. In addition, its formation process that involved endomembrane system was described.

Under adverse growing conditions, vegetative cells formed cysts. During cyst formation, the cells lost mobility, increased in size, synthesized a thick wall and accumulated a pigment called astaxanthin. The cell wall was composed of a trilaminar outer layer of algaenan, a middle component that was made of electronically dense material and an innermost component, consisting of various layers of varied morphology. The cyst germination process in *H. pluvialis* was described for the first time. During germination the trilaminar layer broke down, carrying the adjacent secondary component, and the extensible tertiary component accompanied the cyst in its size increase and its shape change.

Lipid content and its possible application for biodiesel production were evaluated. The optimization of specific culture conditions for optimum growth and lipid synthesis under stress conditions were achieved. The lipid content in stressed cultures doubled (35 g lipid in 100 g biomass) compared with control cultures. Different lipid extraction methods were evaluated and characterization of fatty acids was performed, being major the neutral fraction in both control and stressed cultures. The fatty acid profile in both culture

conditions was similar and the main fatty acids were palmitic, stearic, oleic, linoleic, linolenic and linolelaidic acids.

Biodiesel by conventional transesterification and supercritical methanol methods was obtained. The yield of the transesterification reaction by acid catalysis was 70%. This value can be regarded as acceptable considering that the feedstock contained not only triglycerides but also other lipids and pigments.

*H. pluvialis* lipid quality showed the potential of this microalga as a promising feedstock for biodiesel production. This study provides baseline information useful for future researches tending to find more suitable conditions in order to improve lipid yield, lipid extraction and the biodiesel production process.

# ÍNDICE

<b>PREFACIO</b>	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	ii
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>INDICE</b>	viii
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	3
Colección	3
Medio de Cultivo	3
Aislamiento	4
Condiciones de cultivo	5
Formación de cistos	5
Germinación de esporocistos	5
Germinación de gametocistos	6
Germinación de aplanocistos	6
Síntesis de astaxantina	6
Síntesis de lípidos	6
Cultivos en volúmenes mayores (35 litros)	7
Determinación de la velocidad de crecimiento	8
Microscopía óptica	8
Microscopía de fluorescencia	9
Microscopía electrónica de transmisión convencional (METC)	9
Localización de fosfatasas ácidas con MET	15
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	17

Caracterización química de la cubierta celular de las células flageladas	18
Caracterización química de la pared del cisto	18
Acetólisis	18
Análisis espectroscópico del material acetorresistente	19
Tratamiento enzimático	19
Otros tratamientos	20
Determinación de azúcares componentes	20
Extracción de pigmentos a partir de cistos	24
Clorofila	24
Astaxantina	24
Extracción de lípidos a partir de cistos	25
Método I	25
Método II	25
Método III	26
Fraccionamiento lipídico	26
Análisis del perfil de ácidos grasos en cada fracción lipídica	27
Obtención de biodiesel	29
Método convencional por catálisis ácida	29
Método de metanol supercrítico	34
<b>BIOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	44
<b>RESULTADOS</b>	47
<b>Células vegetativas</b>	47
Ultraestructura general	47
Configuración absoluta del aparato flagelar	48
Ultraestructura de la cubierta celular	49
División celular	50

Formación de la cubierta celular	50
Caracterización química de la cubierta celular	51
<b>Cistos</b>	52
Ultraestructura general	52
Formación	52
Carotenogénesis	54
Caracterización química de la pared celular	55
Germinación	59
<b>Ciclo de vida</b>	61
<b>DISCUSIÓN</b>	101
<b>Células vegetativas</b>	101
Ultraestructura general	101
Configuración absoluta del aparato flagelar	102
Ultraestructura de la cubierta celular	104
Formación y caracterización química de la cubierta celular	105
<b>Cistos</b>	107
Ultraestructura general y formación	107
Carotenogénesis	110
Caracterización química de la pared celular	112
Germinación	116
<b>Ciclo de vida</b>	118
<b>EVALUACIÓN DEL CONTENIDO LIPÍDICO PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	124
<b>RESULTADOS</b>	128
<b>Mediciones del crecimiento de <i>Haematococcus pluvialis</i></b>	128

<b>Caracterización de glóbulos lipídicos</b>	128
<b>Cultivo de <i>H. pluvialis</i> en volúmenes mayores (35 litros)</b>	129
<b>Extracción de lípidos</b>	129
I- A partir de volúmenes pequeños	130
Composición lipídica	131
II- A partir de volúmenes mayores	137
<b>Obtención de Biodiesel y evaluación de rendimientos</b>	137
Método convencional por catálisis ácida	138
Método de metanol supercrítico	140
<b>DISCUSIÓN</b>	167
<b>Síntesis de Lípidos</b>	167
<b>Caracterización de glóbulos lipídicos</b>	167
<b>Extracción y composición lipídica</b>	168
<b>Cultivo de <i>H. pluvialis</i> a mayor escala (35 litros)</b>	173
<b>Característica de la materia prima obtenida</b>	173
<b>Obtención de biodiesel y evaluación del rendimiento</b>	175
Método convencional por catálisis ácida	175
Método de metanol supercrítico	176
<b>Consideraciones finales</b>	178
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	180

## INTRODUCCIÓN GENERAL

*Haematococcus pluvialis* Flotow es una microalga verde dulceacuícola, monadoide de vida libre, perteneciente a la clase Chlorophyceae y al orden Chlamydomonadales según Mattox y Stewart (1984).

Durante el ciclo de vida, las células de *H. pluvialis* sufren cambios morfológicos desde estadios flagelados a cistos inmóviles. Este proceso es acompañado por grandes modificaciones celulares y de la pared, es por ello que numerosos estudios fueron realizados para dilucidar la ultraestructura general y especialmente la estructura fina y naturaleza química de la pared celular de las células móviles y de los cistos, presentándose en algunos casos resultados contradictorios (Smith 1950, Bowen 1967, Santos y Mesquita 1984, Montsant et al. 2001, Hagen et al. 2002, Damiani et al. 2006).

El género ha recibido considerable atención debido a su capacidad de acumular astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta'$ -caroteno-4,4'dione), un pigmento rojo, perteneciente al grupo de las xantofilas y de alto valor comercial (Borowitzka et al. 1991, Boussiba y Vonshak 1991, Kakizono et al. 1992, Kobashashi et al. 1993, Harker et al. 1996, Boussiba 2000, Lorenz et al. 2000, Cifuentes et al. 2003, Kang et al. 2007).

El interés de esta especie en el campo biotecnológico, se debe fundamentalmente a la posibilidad de utilizarla como fuente de antioxidantes y de ácidos grasos en acuicultura, en nutrición humana y recientemente en la producción de biodiesel.

La capacidad que posee *H. pluvialis* y otras microalgas de crecer o sobrevivir a un amplio rango de condiciones ambientales, sumado a la posibilidad de modificar eficientemente su metabolismo lipídico en respuesta a diferentes condiciones de estrés (Roessler 1990, Guschina y Harwood 2006, Chisti 2007, Hu et al. 2008, Damiani et al. 2010), las ha convertido en interesantes organismos para explorar la síntesis de lípidos neutros, los cuales son el mejor sustrato para la producción de biodiesel de segunda

generación (Xu et al. 2006, Chisti 2007, Hu et al. 2008, Schenk et al. 2008, Vasudevan y Briggs 2008, Rodolfi et al. 2009).

*H. pluvialis* crece en nuestro país, sin embargo no se conocían hasta el momento estudios referentes a su biología, ultraestructura y a las condiciones de cultivo necesarias para su crecimiento óptimo y la síntesis de lípidos. Los resultados que se presentan en esta tesis constituyen el primer aporte realizado en una cepa sudamericana.

El primer capítulo de esta tesis incluye el estudio de: a) la biología y la ultraestructura de las células vegetativas y de los cistos, b) el proceso de formación de las paredes celulares y su naturaleza química y c) el ciclo de vida. El segundo capítulo se refiere al estudio de: a) la optimización de las condiciones de cultivo para el crecimiento y la síntesis de lípidos, b) los métodos de extracción lipídica y caracterización de ácidos grasos, y c) los procesos de obtención de biodiesel.

# MATERIALES y MÉTODOS

## Colección

La especie en estudio se coleccionó en el estadio de cisto, de un reservorio de sección piramidal ubicado en la ciudad de Bahía Blanca (38°50' S, 63°30' W), cuya única fuente de alimentación fue el agua de lluvia.

## Medio de cultivo

Medio Basal de Bold (Stein 1973)

Para el mantenimiento de células vegetativas se utilizó Medio Basal de Bold (MBB). Se prepararon las soluciones madre de macronutrientes de acuerdo al siguiente esquema:

10 g de  $\text{NaNO}_3$  en 400 ml de agua destilada.

1 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  en 400 ml de agua destilada.

3 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  en 400 ml de agua destilada.

3 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en 400 ml de agua destilada.

7 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 400 ml de agua destilada.

1 g de  $\text{NaCl}$  en 400 ml de agua destilada.

Se preparó la solución madre de micronutrientes de acuerdo al siguiente esquema:

8,82 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  en 1000 ml de agua destilada.

1,44 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  en 1000 ml de agua destilada.

0,71 g de  $\text{MoO}_3$  en 1000 ml de agua destilada.

1,57 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  en 1000 ml de agua destilada.

0,49 g de  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  en 1000 ml de agua destilada.

En 940 ml de agua destilada se añadieron 10 ml de cada una de las soluciones madre de macronutrientes, 1 ml de la solución de micronutrientes y 1 ml de cada una de las siguientes soluciones:

50 g de EDTA y 31 g de KOH disueltos en 1000 ml de agua destilada.

4,98 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  y 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  disueltos en 1000 ml de agua destilada.

11,42 g de  $\text{BO}_3\text{H}_3$  disueltos en 1000 ml de agua destilada.

Se homogeneizó la solución mediante un agitador magnético. Se ajustó el pH a 7 con NaOH 1 N. Se distribuyó en erlenmeyers de 125 ml de capacidad hasta 75 ml. Se colocaron tapones de algodón y caperuzas de papel y se esterilizó en autoclave durante 15 min a 1 atm de sobrepresión. Se dejó reposar al menos 24 horas antes de su utilización para su enfriamiento.

## **Aislamiento**

El aislamiento de los cistos se realizó bajo un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 utilizando pipetas tipo Pasteur de acuerdo al siguiente procedimiento: se colocó una gota del material recolectado en un extremo de un portaobjetos y 3 ó 4 gotas de medio de cultivo estéril separadas unas de otras, adyacentes a la primera gota. Se prepararon pipetas capilares por calentamiento de pipetas tipo Pasteur en un mechero, con el objeto de afinarlas a su máxima expresión. En el microscopio invertido se localizaron las unidades algales (cistos) y se las tomó simplemente sumergiendo levemente la pipeta en la gota, de modo que por capilaridad el líquido con el material fluya hacia la misma. Luego se pasó a la primera gota de medio de cultivo expulsando el contenido de la pipeta. Se repitió el procedimiento con las restantes gotas hasta tener la certeza de que en una gota solo hubiera un cisto, el que se transfirió a un tubo de 5 ml con medio de cultivo. Cuando el crecimiento en los tubos fue evidente (en aproximadamente 6 días), las células vegetativas se repicaron a erlenmeyers de 250 ml.

## **Condiciones de cultivo**

Los cultivos se mantuvieron en recipientes de 1 L de capacidad conteniendo 500 ml de MBB, en cámara de cultivo a temperatura 18–20 °C y fotoperíodo de 12/12 (luz/oscuridad).

Se realizaron estimaciones visuales del crecimiento de cada cultivo y controles periódicos por observación al microscopio óptico. De esta manera se estableció oportunamente la frecuencia de los repiques a realizar, que se efectuaron transfiriendo las células a medio fresco.

Si bien no se trabajó con cultivos axénicos, en ocasiones se aplicaron antibióticos para controlar o reducir la proliferación bacteriana. A tal fin se disolvieron 250 mg de cloramfenicol y 250 mg de ampicilina en 50 ml de agua destilada. La solución se filtró con un filtro Milipore 0,45 µm y se agregaron 0,2 ml en 500 ml de medio de cultivo estéril.

Todos los procedimientos de laboratorio, incluyendo aislamientos y repiques se realizaron aplicando la técnica de manipulación aséptica empleada en microbiología, ya sea en mesada o flujo laminar (Harrigan y McCance 1966).

## **Formación de cistos**

La formación de cistos fue inducida manteniendo las células vegetativas durante aproximadamente 20 días, sin renovación del medio de cultivo.

## **Germinación de los esporocistos**

La germinación de los esporocistos fue llevada a cabo colocando los cistos en cajas de Petri en estufa a 40 °C durante 2 días y luego transfiriéndolos a medio de cultivo fresco por 4 días.

## **Germinación de los gametocistos**

La germinación de los gametocistos fue inducida transfiriendo los cistos a agua destilada por 3 días y luego incubándolos en medio de cultivo fresco durante 7 días.

## **Germinación de los aplanocistos**

La germinación de los aplanocistos fue inducida transfiriendo los cistos a medio de cultivo con el agregado de NaCl 0,8 % a 4 °C durante 5 días y luego transferidos a medio fresco durante aproximadamente 3 días.

## **Síntesis de astaxantina**

Para inducir la síntesis de astaxantina se ensayaron distintas concentraciones de acetato de sodio. Los cultivos crecieron en MBB con el agregado de 4, 8 y 12 mM de acetato de sodio y sin adición de acetato (cultivo control), durante 13 días a temperatura de 25 °C, sin agitación, con fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad y con intensidad de luz de 40  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Los cultivos crecieron a partir de una densidad celular inicial de 1000 células/ml (inoculando aproximadamente 1 ml de un cultivo de 11 días de edad en erlenmeyers de 125 ml con 75 ml de MBB). El pH de las distintas concentraciones de acetato de sodio y del control fue ajustado a un valor de 7.0 cada tres días, siendo este el pH óptimo para esta cepa. La experiencia fue realizada por duplicado. La densidad celular fue determinada por conteo de células en cámara de Neubauer, discriminando entre células flageladas y cistos.

## **Síntesis de lípidos**

Los cultivos con células flageladas se mantuvieron en erlenmeyers con 1000 ml de MBB, con un sistema de aireación burbujeando aire 500-700  $\text{cm}^3/\text{min}$ , en una cámara de cultivo bajo las condiciones mencionadas anteriormente. El pH se ajustó a un valor de

7, con NaOH 1 N después del autoclavado del medio. Los cultivos se monitorearon diariamente para determinar la velocidad de crecimiento. Las experiencias se realizaron por triplicado.

Para inducir la síntesis de lípidos potencialmente útiles para la producción de biodiesel, un inóculo de  $45 \times 10^3$  células vegetativas/ml fue expuesto durante 15 días, a distintas condiciones de estrés:

- Experiencia A: con alta intensidad lumínica ( $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), sin aireación y con medio de cultivo completo.
- Experiencia B: con alta intensidad lumínica ( $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), luz continua, sin aireación y con Medio Basal de Bold sin nitrógeno (sin  $\text{NaNO}_3$ ).

Paralelamente se realizó un ensayo control donde el cultivo no fue estresado.

Luego los cultivos fueron cosechados por centrifugación a 3000 rpm.

### **Cultivos en volúmenes mayores (35 litros)**

Conocidas las condiciones necesarias para lograr el estrés y la biosíntesis de lípidos, se cultivó *H. pluvialis* a mayores volúmenes para la obtención de mayor biomasa algal. Se trabajó con inóculos de 5 litros con una densidad inicial de  $6,1 \times 10^7$  células/L, los que se agregaron a bolsas de cultivo de polietileno conteniendo 30 litros de medio Basal de Bold. Los cultivos se mantuvieron durante 10 días con aireación constante y suplementados con 1,5 % de  $\text{CO}_2$  durante 30 minutos diariamente. La iluminación fue provista por tubos fluorescentes luz/día, con un fotoperíodo de 12/12 hs, con una intensidad de luz de  $90 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y una temperatura de 24-25 °C. Posteriormente el cultivo fue estresado con luz continua, alta intensidad de luz ( $300 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y sin aireación ni  $\text{CO}_2$ , durante 15 días.

Para la cosecha de la biomasa algal una vez que las células sedimentaron, se extrajo el medio de cultivo de la parte superior de las bolsas haciendo vacío y

posteriormente los cistos se recuperaron por centrifugación (Fig.1 A-D). Luego la biomasa obtenida fue liofilizada.

### **Determinación de la velocidad de crecimiento**

La velocidad de crecimiento se determinó siguiendo secuencialmente el aumento en el número de células. Los recuentos celulares se realizaron por triplicado con una cámara tipo Sedgwick-Rafter y a partir de alícuotas tomadas de tres cultivos paralelos.

Para los cálculos de la velocidad de crecimiento se siguió la técnica gráfica de recuentos sucesivos propuesta por Guillard (1973). En ésta las densidades celulares (N= número de células/ml) son volcadas en un gráfico con escala semilogarítmica, en donde se eligen los valores correspondientes a la fase de crecimiento exponencial. Estas densidades transformadas logarítmicamente ( $Y = \log N$ ) se tratan por el método de mínimos cuadrados para hallar la regresión de Y en función del tiempo (t), siendo la pendiente de la recta la constante de crecimiento ( $K_{10}$ ). Con este valor fue posible calcular los siguientes parámetros:

Velocidad de crecimiento (K): Este parámetro indica el número de divisiones celulares por día y se calculó según Guillard (1973):

$$K \text{ (divisiones/día)} = 3,322 \times K_{10}.$$

En donde el valor 3,322 representa el factor de conversión de  $\log_{10}$  a  $\log_2$ .

El tiempo de duplicación se calculó como TD:  $\ln 2/k$ .

### **Microscopía óptica**

Las observaciones a campo claro se hicieron en un microscopio LEITZ SM LUX y las de contraste de fases en un microscopio CARL ZEISS AXIOLAB. Las observaciones se documentaron con fotomicrografías tomadas con un equipo WILD SEMIPHOTOMAT

MPS. Las mediciones se hicieron con micrómetros oculares de 10X y 15X. Se usaron filtros de color para mejorar la observación y la toma de fotomicrografías.

Para observar y fotografiar células flageladas se usó lugol acético o una solución de glicerina en agua para reducir su movilidad.

Las células también se tiñeron con un colorante específico para lípidos Sudán IV 70 % en etanol, según O'Brien y McCully (1981).

## **Microscopía de fluorescencia**

Con el objeto de identificar lípidos neutros potencialmente útiles para la producción de biodiesel y previo a la extracción de lípidos, las células cultivadas bajo estrés se tiñeron con el fluoróculo Rojo Nilo (Sigma). Para posibilitar una adecuada penetración del fluoróculo, los cistos se congelaron a -40 °C y se machacaron en mortero con 3 ml de acetona durante 10 minutos, de acuerdo al protocolo indicado por Wiltshire et al. (2000). Una solución de 5 µl de Rojo Nilo (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one, Sigma), en acetona (1 mg/l) se agregó a 5 ml de la suspensión algal (Elsay et al. 2007). La mezcla se agitó vigorosamente en un vortex. La fluorescencia se detectó 5 minutos después de iniciada la tinción, usando un microscopio confocal Leica DMIRE2 TCS SP2 SE con un filtro de excitación en la banda 475 nm y un filtro de emisión en la banda 580 nm.

## **Microscopía electrónica de transmisión convencional (METC)**

Para el estudio de las células con MET, se ajustó un protocolo a partir de las técnicas convencionales utilizadas en algas (Cáceres 1995) y de trabajos previos realizados en el género (Santos y Mesquita 1984).

### 1- Fijación primaria

La fijación primaria de las células vegetativas se realizó a 5 °C, durante una hora con glutaraldehído 2%. El vehículo de fijación fue el buffer cacodilato de sodio 0,05 M.

Los cistos fueron fijados a 5 °C, durante 24 horas en: a) glutaraldehído 3% y paraformaldehído 1,5% en buffer cacodilato de sodio 0,05 M (pH 7,4) ó b) glutaraldehído 3% y acroleína 1,5% en buffer cacodilato de sodio 0,05 M (pH 7,4).

### 2- Lavados

Se hicieron cuatro lavados de 10 minutos cada uno en el vehículo de fijación.

### 3- Fijación secundaria

Las células vegetativas se postfijaron con tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% y los cistos al 2%, preparados con el vehículo de fijación y en oscuridad. En ambos casos la fijación se realizó a 5 °C y durante dos horas.

### 4- Deshidratación

Se deshidrató el material por inmersión en una serie de acetonas de concentraciones crecientes (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%), 10 minutos en cada una, seguida de tres pasajes en acetona 100% durante 15 minutos. La deshidratación hasta acetona 70% se realizó a 5 °C.

En cada etapa de fijación las muestras se concentraron por centrifugación en viales plásticos en una centrífuga eppendorf durante 4 minutos a 3000 rpm. De esta manera se redujo la probabilidad de pérdida de material. Luego se resuspendió el material para asegurar el contacto de toda la muestra con cada reactivo.

### 5- Imbibición

El material se imbibió por goteo en una serie de concentraciones crecientes de resina Spurr de baja viscosidad (Spurr 1969).

5.1- Preparación de la resina, según los siguientes elementos:

10 g de VCD (dióxido vinil ciclohexano).

15 g de DER (éter de diglicidil polipropilenglicol).

39 g de NSA (anhídrido nonenil succínico).

41 g de S1 (dimetil amino etanol).

5.2- La imbibición se realizó por goteo. Se gotearon sobre el material las soluciones acetona-resina Spurr en concentraciones crecientes (25%-100%):

Spurr 25 %: 1 gota cada 5 minutos durante 1 hora y media; 2 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 4 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 8 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media.

Spurr 50 %: 2 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 4 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 8 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media.

Spurr 75 %: 2 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 4 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 8 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media.

Spurr 100 %: 2 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 4 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media; 8 gotas cada 5 minutos durante 1 hora y media.

Se dejó el material toda la noche en Spurr 100 %, destapado para que se evapore totalmente la acetona. A la mañana siguiente se renovó el Spurr 100 % y se lo dejó 2 horas.

## 6- Inclusión

6.1- Inclusión plana (Reymond y Pickett-Heaps 1983)

Se prepararon portaobjetos teflonados para montar las muestras, para lo cual, se escogieron portaobjetos nuevos, se los lavó, secó y se los pasó por la llama de un mechero para eliminar totalmente la humedad. Se los rocío con teflón en aerosol y se les

pasó un papel satinado hasta que estuvieron brillantes, indicativo de que solo había quedado una capa delgada de teflón sobre el vidrio.

Se ubicó el material sobre las caras teflonadas de los portaobjetos. Inmediatamente después se agregó resina a lo largo del portaobjetos, se colocaron pequeñas hebras de hilo en los extremos para dar espesor y se colocó otro portaobjetos teflonado por encima, dejando parte de cada uno de los extremos sin superponer. Este tipo de inclusión se realizó para elegir cuidadosamente el tipo de célula a cortar mediante observación microscópica.

#### 6.2- Inclusión en cápsulas Beem

Se colocó el material en el fondo de una cápsula Beem y se completó su volumen con resina. La polimerización de la resina se llevó a cabo a 70 °C durante 9 horas. Este tipo de inclusión se realizó para el estudio del aparato flagelar, es decir, para cortar diversas células vegetativas simultáneamente y en distintos planos.

#### 7- Armado de bloques y tallado

Se separaron los cubreobjetos y se localizó el material a estudiar bajo el microscopio óptico.

Con un instrumento cortante se separó un rectángulo de 1 por 0,5 mm aproximadamente, que contuvo el material a estudiar. Se despegó esta porción de resina y se emparejó el espesor de la resina con papel esmeril. Bajo lupa binocular se pegó esta porción sobre el extremo de la pirámide truncada de la cápsula Beem usando un sellador instantáneo. Se dejó secar durante una hora a 30-40 °C o a temperatura ambiente.

Bajo la lupa se redujo el área original del taco, manualmente para circundar con precisión la zona de interés y transformarla en un trapecio con los lados superior e inferior

paralelos. Este procedimiento se realizó en forma gradual, eliminando secciones delgadas de resina con una hoja de afeitar.

## 8- Acondicionamiento de grillas con Formvar

### 8.1- Grillas

Se lavaron las grillas de cobre sucesivamente con cloroformo – etanol – agua bidestilada – etanol – cloroformo, agitando enérgicamente en cada etapa y luego se dejaron secar sobre papel de filtro en cajas de Petri.

### 8.2- Preparación de la película de Formvar (0,5 %)

Se lavó y secó minuciosamente un portaobjetos.

Se pasó el portaobjetos a través de una columna de Formvar. Cuanto más rápido se hizo pasar la solución y cuanto menor fue el tiempo de inmersión, el espesor de la película fue mayor.

Se dejó secar con calor moderado, en posición horizontal.

Se marcó con una aguja histológica un rectángulo sobre la película formada abarcando la mayor parte del portaobjetos.

Se colocó el portaobjetos lentamente y en posición diagonal en un recipiente con agua bidestilada hasta que se desprendió una delgada película de Formvar. Una vez liberada quedó flotando y sobre ella se colocaron, una a una, las grillas de cobre con su cara brillante hacia arriba.

Se recogió la película con las grillas en su superficie posando un portaobjetos de aluminio. Se dejó secar a temperatura ambiente y en posición inclinada.

## 9- Ultramicrotomía

### 9.1- Confección de cuchillas de cristal

Se realizó a partir de barras de cristal de 25 mm de ancho, mediante un Knife-Maker LKB según un procedimiento convencional (Robinson et al. 1987).

### 9.2- Obtención de cortes ultradelgados

Se cortó el material en un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut UM2 con cuchilla de cristal o de diamante Diatom 45°. Se recogieron los cortes color oro, correspondientes a un espesor de 90 nm (Reid 1975) mediante grillas de cobre recubiertas con Formvar.

## 10- Contraste

Se ubicaron las grillas en una placa especial de plástico flexible ubicado en un soporte que la mantiene curvada permitiendo que sus ranuras se abran lo suficiente para situar las grillas. Se retiró la placa del soporte y se enderezó sujetando así las grillas.

Se llenó una pequeña pileta plástica del mismo tamaño que el soporte y de 0,5 cm de altura con una solución al 1 % o sobresaturada de acetato de uranilo (0,05 g en 5 ml de agua bidestilada) previamente filtrada con un filtro Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  y se sumergió la placa con las grillas hacia abajo durante 40 minutos. La solución de acetato de uranilo se mantuvo en oscuridad hasta su uso.

Se lavó la placa con las grillas pasándola rápidamente por cuatro vasos de precipitado con agua bidestilada y se secó minuciosamente con papel de filtro.

Se tiñó con citrato de plomo preparado de la siguiente manera: en un tubo de hemólisis se agregaron 2,1 ml de nitrato de plomo y luego 2,1 ml de citrato de sodio y se agitó para que precipite el citrato de plomo, con lo cual la solución se volvió

lechosa. Se agregaron 0,8 ml de NaOH 1N (libre de CO<sub>2</sub>) y se agitó hasta que la solución se volvió transparente y estuvo lista para usar. Se colocó la solución de citrato de plomo en la pequeña pileta plástica (limpia y seca) sumergiendo luego la placa con las grillas durante 40 segundos.

La solución madre de nitrato de plomo se obtuvo a partir de 31,25 g en 500 ml de agua bidestilada y filtrada a la cual se le agregaron 10 g de ácido nítrico para prevenir la hidrólisis.

La solución madre de citrato de sodio se obtuvo a partir de 41,5 g en 500 ml de agua bidestilada filtrada y 5 gotas de nitrato de plomo como preservante.

Se lavó la placa con las grillas pasándola rápidamente por cuatro vasos de precipitado con agua bidestilada. En el primer lavado se agregó una pipeta Pasteur de la solución madre de NaOH 1 N. Se secó minuciosamente la placa con papel de filtro.

Cuando fue necesario se aumentó el tiempo de contraste, por ejemplo, los cistos se contrastaron durante 50 minutos con la solución de acetato de uranilo y 50 segundos con la solución de citrato de plomo.

#### 11- Observación

El material se observó y fotografió en un microscopio electrónico JEOL 100 CX-II en el Centro Científico Tecnológico de Bahía Blanca (CCT - Ba Bca).

## **Localización de fosfatasas ácidas con MET**

Para la detección de fosfatasas ácidas se empleó la técnica de localización con cerio (Robinson y Karnovsky 1983).

#### 1- Fijación primaria

Se fijaron las células en glutaraldehído al 2% en buffer cacodilato 0,1 M durante 1 hora a 4 °C. Se hicieron cuatro lavados de 10 minutos cada uno, con buffer cacodilato de sodio 0,1 M a 4 °C.

## 2- Reacción histoquímica

### 2.1- Preparación del medio citoquímico

Buffer acetato 0,1 M (pH 5).

B- glicerofosfato 1 mM.

CeCl<sub>3</sub> 2 mM y tritón X-100 0,0001 %.

El medio se preparó al momento de utilizarlo y se pasó a través de un filtro Millipore de 0,45 µm.

La solución control fue el medio citoquímico sin sustrato (B- glicerofosfato).

### 2.2- Incubación

Se incubó en el medio citoquímico a 37 °C durante 60 minutos. Se realizó un reemplazo de medio al cabo de 30 minutos. Se lavó el material con buffer acetato 0,1 M.

## 3- Postfijación

Se postfijó con glutaraldehído 3% en buffer cacodilato de sodio 0,1 M durante 1 hora a 4 °C.

Se hicieron cuatro lavados con buffer acetato 0,1 M a temperatura ambiente y dos con buffer cacodilato de sodio 0,1 M a 4 °C.

Se postfijó con OsO<sub>4</sub> al 2 % en buffer cacodilato de sodio 0,1 M durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se hicieron cuatro lavados con buffer cacodilato de sodio 0,1 M a temperatura ambiente.

#### 4- Deshidratación

Se deshidrató en una serie de concentración creciente de etanol a temperatura ambiente, de acuerdo al siguiente esquema: 50 %, 70 %, un cambio de 10 minutos cada uno; 90 %, 96 %, tres cambios de 10 minutos cada uno y 100 %, tres cambios de 15 minutos cada uno. Los procedimientos de imbibición, inclusión, armado de bloques y tallado, acondicionamiento de grillas con formvar y ultramicrotomía fueron los mismos que los descritos en el protocolo para MET convencional. Las secciones se observaron sin contrastar, para facilitar el reconocimiento del producto de reacción, en un microscopio electrónico JEOL 100 CX-II en el CCT - Ba Bca

### **Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Las células flageladas y los cistos se fijaron en glutaraldehído 2 % en buffer cacodilato de sodio 0,05 M a 5 °C. Se dejó que las células se depositaran en un cubreobjetos cubierto con poly-D-lisina al 5 %. La segunda fijación se hizo con tetróxido de osmio al 0,01 %. Las muestras se deshidrataron en una serie creciente de acetona, de acuerdo al protocolo descrito para METC. Se realizó punto crítico. Los cubreobjetos se dispusieron con la muestra sobre tacos de bronce y se cubrieron con oro-paladio en un "sputter".

El material se observó y fotografió en un microscopio electrónico de barrido JEOL SM-35 CF en el CCT - Ba Bca.

## **Caracterización química de la cubierta celular de las células flageladas**

Se testeó la presencia de glicoproteínas (GPs) en la cubierta celular de *Haematococcus pluvialis*, incluyendo epítomos para extensinas y polisacáridos neutros (SP). Un extracto de la cubierta celular soluble en detergente fue analizado por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) y *Western Blot* utilizando dos anticuerpos monoclonales contra extensina (JIM-11 y JIM-12) (Smallwood et al. 1994).

El espectro infrarrojo del extracto de la cubierta celular fue obtenido en un Espectrómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) Nicolet-Nexus 510P, con detector Nichrome y divisor de haz de KBr. El registro se realizó mediante un accesorio Avatar de Reflectancia Difusa, contra KBr como background y con un total de 64 escaneos de barrido dentro del rango de número de ondas correspondiente al infrarrojo medio (4.000-250  $\text{cm}^{-1}$ ).

La caracterización química fue realizada por el Dr. José Estevez, en el Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de la Universidad de Buenos Aires.

## **Caracterización química de la pared del cisto**

### **Acetólisis**

Para determinar la posible presencia de esporopolenina en la pared de los cistos de *Haematococcus pluvialis*, las células inmóviles maduras fueron sometidas a acetólisis. Las células se concentraron por centrifugación, luego se extrajo el sobrenadante y al pellet se le agregó una mezcla de anhídrido acético/ácido sulfúrico concentrado (9:1  $\text{v/v}$ ). El pellet fue resuspendido y la mezcla se mantuvo en un tubo inmerso en baño de agua a 95 °C, por un período de 15-20 minutos. Luego se centrifugó y se realizaron 5 lavados

con agua destilada. El material producto de la acetólisis se observó con microscopio óptico y con microscopio electrónico de transmisión y además, se realizó el análisis espectroscópico.

### **Análisis espectroscópico del material acetoresistente**

El espectro infrarrojo fue obtenido en un Espectrómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) Nicolet-Nexus 470, con detector Nichrome y divisor de haz de KBr. La muestra se preparó como dispersión sólido en sólido (1,5 mg de material seco en 150 mg de KBr anhidro), utilizando una micro copa de 1 cm de diámetro.

El registro se realizó mediante un accesorio Avatar de Reflectancia Difusa, contra KBr como background y con un total de 64 escanes de barrido dentro del rango de número de ondas correspondiente al infrarrojo medio (4.000-400  $\text{cm}^{-1}$ ).

### **Tratamiento enzimático**

La pared de los cistos maduros fue debilitada a través de ultrasonificación repetida, a una frecuencia máxima de 20 KHz, en un baño de hielo; para luego continuar con la digestión enzimática. La ruptura celular fue monitoreada a través de la observación microscópica, determinando una eficiencia del 70 % de lisis celular. Las enzimas ensayadas fueron: celulasa EC 3.2.14 (Sigma, C-8546), 5,8 u.e. en 0,5 ml de 0,05 M buffer citrato pH 4,8 y  $\beta$ -mannosidasa EC 3.2.25 (Sigma M-9400), 0,046 u.e. en 0,5 ml de 0,05 M buffer citrato pH 4,8. En todos los casos, la incubación fue llevada a cabo en agitación constante, a 45 °C durante 2 días. Los residuos de los cistos enzimáticamente digeridos fueron enjuagados repetidamente con agua por centrifugación, luego teñidos con una solución acuosa de Calcofluor White 0,01 % durante treinta segundos. El material fue nuevamente enjuagado con agua y observado en un microscopio Zeiss Axiolab equipado con epifluorescencia.

## Otros tratamientos

Los cistos se incubaron en:

- I) Acido crómico a temperatura ambiente durante 5 horas (Puel et al. 1987).
- II) 10% KOH a 100 °C durante 45 minutos (Delwiche et al. 1987).
- III) 2-aminoetanol a 95 °C durante 1 hora (Southworth 1974).
- IV) Floroglucinol (2% en 95% etanol) luego gotas de 50% HCl (Puel et al. 1987).

## Determinación de los azúcares componentes

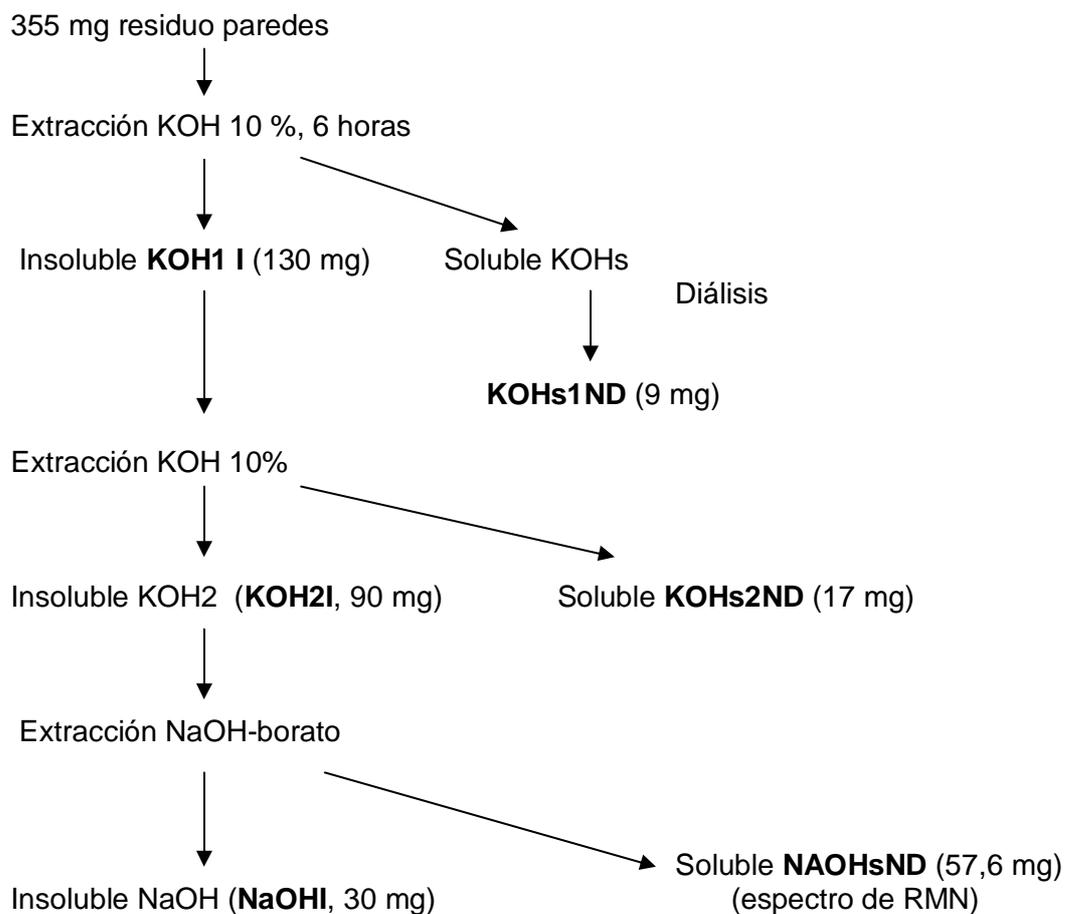
### 1- Ruptura de los cistos

Previo a la extracción de los polisacáridos de pared, se procedió a remover el contenido citoplasmático, para lo cual los cistos se sometieron a una ultrasonificación exhaustiva. El material (1,13 g de cistos) se resuspendió en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2 % en agua destilada, luego se sonicó a intervalos sucesivos hasta llegar a un tiempo total de 6 horas, verificando la ruptura al microscopio óptico (70 % de ruptura). Se centrifugó a 10000 xg durante 15 minutos a 10 °C y luego se realizaron lavados con agua destilada. Finalmente el pellet se liofilizó, obteniendo una masa de 355 mg.

### 2- Extracción de los polisacáridos

El residuo de las paredes de los cistos se sometió a extracción acuosa en medio alcalino según la marcha esquematizada en la Figura 2.

Las extracciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con agitación continua. Luego de cada paso de extracción se separaron la fracción soluble y la insoluble mediante centrifugación a 10000 xg. Las fracciones solubles se dializaron (PM de corte 3500) 48 hs contra agua corriente, seguidas de 24 hs en agua destilada. Tanto las fracciones solubles como insolubles se liofilizaron.



**Fig. 2:** Extracción en medio alcalino de las paredes de los cistos de *H. pluvialis*

### 3- Identificación de los monosacáridos componentes

Los productos KOH1sND, KOH2sND y NaOHsND se hidrolizaron con trifluoroacético (TFA) 2 N durante 90 minutos a 120 °C. El producto NaOHI se hidrolizó según el protocolo de Morrison (1988). Se obtuvieron los alditos acetilados a partir de los productos hidrolizados.

#### **Métodos de hidrólisis**

-Hidrólisis ácida según Albersheim et al. (1967)

Se disolvieron 2 mg de las muestras en solución de trifluoroacético (TFA) 2 N en viales con tapa de teflón y se llevaron a estufa a 120 °C durante 90 minutos. Luego los

productos hidrolizados se llevaron a sequedad con agregados sucesivos de agua destilada bajo corriente de aire hasta la eliminación total del ácido.

-Hidrólisis para material insoluble, según Morrison (1988)

Se agregaron 0,2 ml de TFA puro a 2 mg de muestra en vial con tapa de teflón. Se mantuvo durante 1 h a 37 °C. Se agregaron 25 µL de agua destilada y se calentó a 100 °C durante 1 hora. Se llevó la concentración de TFA a 2 M con el agregado de 1,054 ml de agua. Se volvió a llevar a estufa a 121 °C durante 90 minutos. Luego los productos hidrolizados se llevaron a sequedad con agregados sucesivos de agua destilada bajo corriente de aire hasta la eliminación total del ácido.

#### 4- Obtención de derivados para cromatografía gaseosa:

Se prepararon los alditoles peracetilados a partir del producto de hidrólisis ácida (Albersheim et al. 1967). El producto hidrolizado se redujo con borohidruro de sodio durante una noche a temperatura ambiente. Al cabo de la reducción, se destruyó el exceso de borohidruro con ácido acético glacial, agregado gota a gota hasta el cese de la efervescencia. Se descationizó mediante el agregado de resina Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>). La muestra se filtró y se llevó a seco bajo corriente de aire. Se eliminó el ácido bórico como borato de metilo mediante 5 agregados sucesivos de metanol, llevando a seco cada vez. Las muestras se mantuvieron en desecador de vacío durante una noche. La acetilación procedió con el agregado de anhídrido acético: piridina (1:1) en vial con tapa de teflón llevado a estufa a 100 °C durante 45 minutos. El producto peracetilado se extrajo con cloroformo: agua (2:1), lavando el extracto clorofórmico 3 veces con solución saturada de bicarbonato de sodio y 2 veces con agua destilada. Por último se secó la muestra mediante el agregado de sulfato de sodio anhidro, se evaporó el cloroformo y se

almacenó en freezer a -20 °C para evitar su degradación hasta el momento de su inyección en el cromatógrafo.

#### 5- Cromatografía gaseosa

Las cromatografías gas-líquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard HP5890 A equipado con detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador (flujo aproximadamente 1 ml/min), con una relación de split de aproximadamente 90:1. Para el análisis de los alditos peracetilados de productos de hidrólisis ácida se empleó una columna capilar SP-2330 (Supelco), de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de espesor de la fase líquida. Las corridas fueron isotérmicas (temperatura del horno 220 °C); el inyector y el detector se mantuvieron a 240 °C.

#### 6- Espectroscopía RMN <sup>13</sup>C

Para el espectro de RMN <sup>13</sup>C con desacoplamiento protónico 20 mg de muestra se disolvieron en 0,5 ml de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d) utilizando tubos de 5 mm. Los espectros se realizaron en un equipo Bruker Avance DRX 400 a 70 °C, utilizando un ángulo de pulso de 90°, un tiempo de relajación de 0,10 segundos, un tiempo de adquisición de 0,59 segundos y un ancho espectral de 31,0 kHz, totalizando entre 60000-80000 pulsos. Los desplazamientos químicos se midieron en relación al DMSO (refiriendo el grupo metilo del DMSO al tetrametilsilano y calibrándolo en 39,6 ppm).

## **Extracción de pigmentos a partir de cistos**

### **Clorofila**

La extracción de clorofila se realizó con metanol 90 % según el método propuesto por Azov (1982). Se tomaron alícuotas de 2 ml del cultivo, previo homogenización manual de cada una de las concentraciones de acetato de sodio ensayadas y del control, y luego se centrifugó. El sobrenadante se descartó y se adicionó al pellet metanol al 90 %. Luego se colocó en un baño de agua a 60 °C por 10 minutos. Se guardó en el refrigerador a 4 °C durante 24 horas y nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones. Durante el proceso de extracción los tubos se mantuvieron en oscuridad. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro a 665 nm y 750 nm.

$$\text{Clorofila "a" (mg/l): } 13,9 (A_{665 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) v/V$$

donde:

A: absorbancia

v: volumen de metanol

V: volumen de la muestra

### **Astaxantina**

La extracción de astaxantina se realizó con dimetilsulfóxido (DMSO). Se tomaron 10 ml de cultivo, previo homogenización manual de cada una de las concentraciones de acetato de sodio ensayadas y del control y luego se centrifugó. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en una solución de KOH 5 % (p/v) en metanol al 30 % (v/v). Se colocó en un baño de agua a 70 °C por 5 minutos, se centrifugó y el sobrenadante se descartó. La última parte de la extracción se realizó con 3 gotas de ácido acético y 3 ml de DMSO. Durante el proceso de extracción los tubos se

mantuvieron en oscuridad. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro a 492 nm y la cantidad de pigmento fue calculada de acuerdo a Davies (1976).

Astaxantina ( $\mu\text{g/g}$ ):  $\text{Absorción} \times \text{volumen (ml)} \times 10^6 / A^{1\%} \times 100 \times \text{peso muestra (g)}$

donde:

$A^{1\%}$ : coeficiente de extinción para DMSO 2220

## **Extracción de lípidos a partir de cistos**

Una vez realizada la cosecha de los cistos, el material fue liofilizado y se ensayaron distintos métodos de extracción de lípidos para evaluar la eficiencia de cada uno de ellos:

En el **Método I** los lípidos se extrajeron siguiendo el método utilizado por Folch (1957). El mismo combinó una etapa de ultrasonido, para romper la pared celular y una partición con solventes, utilizando cloroformo: metanol.

Aproximadamente 20 mg de material, se trataron con 5 ml de cloroformo:metanol 2:1 vol/vol. Esta mezcla fue colocada en un baño ultrasónico durante 10 minutos a temperatura ambiente, dejándola luego en reposo para que decante el material celular y para recuperar el solvente conteniendo los lípidos y pigmentos. Este procedimiento se repitió tres veces. Los extractos combinados, aproximadamente 80 ml, se filtraron y colocaron en una ampolla de decantación a la que se le adicionaron 16 ml de una solución al 0,9 % de NaCl, para crear un sistema bifásico, del cual se recuperó la fase orgánica (inferior), procedimiento que se repitió dos veces. El solvente de la fase orgánica se evaporó bajo corriente de nitrógeno. Se registró el peso de lípidos obtenidos, los que se retomaron con cloroformo, en una concentración adecuada para su posterior análisis.

El **Método II**, fue utilizado anteriormente por Zhekisheva et al. (2002) para la misma especie. El proceso de extracción se realizó por duplicado y consistió en disolver

50 mg de biomasa liofilizada en dimetilsulfóxido (DMSO) en un baño termostático a 70 °C durante 5 minutos. Luego se realizó la extracción con metanol a 4 °C por 1 hora. La mezcla fue centrifugada, el sobrenadante colectado y el pellet reextraído con metanol (Fig. 3). Al extracto metanólico se le agregó dietiléter libre de peróxido, hexano y agua en una relación final de 1:1:1:1 (v/v/v/v) (Fig. 3). La mezcla fue agitada en una ampolla de decantación de 100 ml y la fase superior colectada. La fase inferior fue acidificada con ácido acético a pH 3,5 y reextraída con la mezcla dietiléter:hexano (1:1 v/v) (Fig. 3). Las fases superiores combinadas fueron evaporadas a sequedad con nitrógeno en un pequeño volumen de cloroformo.

El **Método III** consistió en el empleo de n-hexano (Shen et al. 2009), uno de los solventes más utilizados para la extracción de lípidos en la industria de alimentos, debido a su baja toxicidad e inflamabilidad. A partir del 40 mg y 7,2 gramos de biomasa liofilizada, provenientes de volúmenes pequeños de cultivos y mayores volúmenes, respectivamente, se realizó el proceso de extracción por duplicado (Fig. 4). Para romper la estructura celular se agregó DMSO y se machacó el material en un mortero. Luego se introdujo en un baño termostático a 70 °C durante 5 minutos. El proceso de ruptura celular fue monitoreado en un microscopio óptico. Finalizado este proceso, se procedió a la extracción con n-hexano en una relación 4:1, a temperatura ambiente, repitiendo el procedimiento tres veces. En cada extracción, se pusieron en contacto las dos fases líquidas, con agitación vigorosa durante 10 minutos, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. De los extractos combinados, se eliminó el solvente evaporando bajo vacío y se recuperó el material lipídico.

## **Fraccionamiento lipídico**

Se procedió al fraccionamiento de los lípidos en tres grupos: lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos de acuerdo a su polaridad. El fraccionamiento se realizó

utilizando un cartucho Sep Pack de sílica de 1000 mg, de acuerdo al método utilizado por Berger et al. (1995) como se describe a continuación: se activó el cartucho con 30 ml de cloroformo, se sembraron la muestras conteniendo aproximadamente 20 mg de material y se eluyeron con 15 ml de cloroformo:ácido acético (9:1), recogiendo la primera fracción que contiene los lípidos neutros y algunos pigmentos (Fig. 5). A continuación se eluyeron los glicolípidos con 20 ml de acetona: metanol (9:1) y por último los fosfolípidos con 20 ml de metanol.

Cada fracción se recuperó y se secó bajo corriente de nitrógeno, retomando con la cantidad adecuada de cloroformo para luego analizar la composición de ácidos grasos.

Para verificar la eficiencia de la separación de las diferentes fracciones, se sembraron en una placa de TLC (silicagel G 60 70-230 mesh, Merck), la preparación de la placa se realizó con cloroformo: metanol (50:50) y la elusión con cloroformo: metanol (2:1). La concentración de las soluciones sembradas fue de 10 mg/ml.

## **Análisis del perfil de ácidos grasos en cada fracción lipídica**

Para el perfil de ácidos grasos se procedió a la transmetilación de los lípidos utilizando el método de Morrison y Smith (1964). La transmetilación con trifluoruro de boro, al resguardo del oxígeno, garantiza la conservación de los ácidos grasos poliinsaturados que puedan estar presentes en los lípidos analizados. El método se describe a continuación: se pesaron entre 25 y 35 mg de lípidos a los cuales se le agregaron 2 ml de solución de KOH al 10 % en metanol, agitando vigorosamente. El recipiente se cerró herméticamente con atmósfera de N<sub>2</sub> y se introdujo durante 45 minutos en un baño termostático a 80 °C, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. El material insaponificable se extrajo con éter de petróleo. La fase etérea se desechó y la fase inferior (que contiene los jabones potásicos de los ácidos grasos) se trató con HCl concentrado, el cual produjo la liberación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos

liberados se extrajeron con éter de petróleo. El extracto etéreo se evaporó a sequedad en atmósfera de N<sub>2</sub>. Luego se agregaron 1,5 ml de solución de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) al 10 % en metanol, se calentó 30 minutos a 80 °C y finalmente se extrajeron los ésteres metílicos con éter de petróleo, pasándolos a un vial donde se evaporó a sequedad en atmósfera de N<sub>2</sub>. Posteriormente se retomaron con el solvente apropiado para realizar el análisis cromatográfico.

La determinación de ácidos grasos se realizó por cromatografía gaseosa, previo a la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, con las condiciones cromatográficas y el equipamiento que se detallan en la Tabla 1. El análisis cromatográfico se realizó por duplicado. El límite de detección del método cromatográfico se estableció en 0,01 %, los compuestos que se encuentran en proporciones entre 0,01 y 0,095 % se informan como trazas y los inferiores a 0,01 % como no detectables (nd).

Cromatógrafo	Agilent 4890D
Columna	Capilar Supelco SP256 (100 x 0,25 mm x 0,2 µm)
Gas carrier	hidrógeno
Inyección	split (relación de split 1/100)
Detector	FID
Temperatura del inyector	175°C
Temperatura del detector	260°C
Programa de temperatura	5 min a 140 °C, 140-240 °C a 4 °C/min, 15 min a 240°C
Velocidad de flujo	21 cm/s

**Tabla 1.** Condiciones cromatográficas empleadas

## **Índice de yodo**

El índice de yodo del aceite fue calculado según los métodos oficiales de la American Oil Chemists' Society (AOCS), práctica recomendada *Cd 1c-85*. Este método estima los gramos de yodo absorbidos por 100 g de aceite (% de yodo absorbido).

## **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los diferentes métodos de extracción de lípidos se realizó utilizando un ANOVA simple. La composición de ácidos grasos de las diferentes fracciones (lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos) se analizó por medio de un ANOVA doble (3 x 3).

En ambos casos, para encontrar las diferencias significativas entre las muestras se utilizó el test de Fischer  $p < \alpha$  a un nivel de significación  $\alpha=0,05$ .

## **Obtención de biodiesel**

Se emplearon dos métodos para la obtención de biodiesel a partir de *H. pluvialis*.

### **Método convencional por catálisis ácida**

#### 1- Condiciones de la reacción

La reacción de esterificación del aceite proveniente de *H. pluvialis* se realizó utilizando metanol como reactivo y ácido sulfúrico como catalizador, en un reactor batch bajo agitación continua. Se eligió la opción de catálisis ácida para evitar la posible formación de jabones, que podría ocurrir cuando se utiliza un catalizador básico, si existieran ácidos grasos libres en la muestra. Como el proceso de catálisis ácida es más lento que la básica, se optó por un tiempo de reacción prolongado para asegurar una conversión alta de triglicéridos. Se utilizó alcohol en exceso para desplazar el equilibrio

de la reacción hacia los productos. Las condiciones de la reacción se resumen en la Tabla 2.

Volumen total de mezcla reactiva	$V_T = 2 \text{ ml}$
Temperatura de reacción	$T = 55 \text{ }^\circ\text{C}$
Tiempo de reacción	$t = 92 \text{ h}$
Relación inicial alcohol/aceite	$N = 40 \text{ mol CH}_3\text{OH/mol aceite}$
Relación inicial catalizador/aceite	$S = 0,05 \text{ g H}_2\text{SO}_4/\text{g aceite}$

**Tabla 2.** Condiciones operativas de la reacción de transesterificación

Después de finalizada la reacción, la muestra fue lavada con agua destilada y centrifugada con el fin de separar las fases acuosa y oleosa, determinando de esta manera, la masa de la fase oleosa ( $m_{FO}$ ).

## 2- Análisis cromatográfico

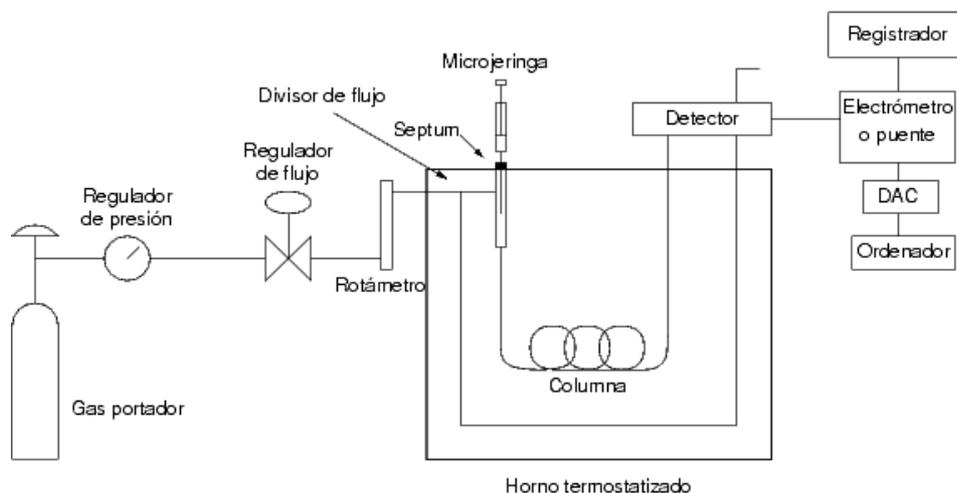
La determinación de la composición de los productos de la reacción se realizó por cromatografía gaseosa, siguiendo el procedimiento descrito en los métodos oficiales de la American Oil Chemists' Society (AOCS), práctica recomendada *Cd 11-b-91*. A partir de la misma muestra de productos (fase oleosa) se realizaron una serie de inyecciones a modo de réplicas.

## 3- Descripción de la técnica cromatográfica

El seguimiento de la reacción de transesterificación se realizó determinando la composición de la muestra por cromatografía gaseosa. Para ello se empleó un cromatógrafo Varian model 3700 con inyección split/splitless y acoplado a un HP 3396 serie II integrador. Se empleó una columna de Agilent Technologies J&W Scientific de 15 metros de longitud, diámetro interno de 0,32 milímetros con espesor del film de 0,1 micrómetros.

Un esquema del cromatógrafo empleado se muestra en la Figura 6. El equipo presenta un detector de llama (F.I.D.) que opera a una temperatura de 370 °C. Se inyecta 1 µl de muestra mediante una microjeringa. El inyector se encuentra a 320 °C.

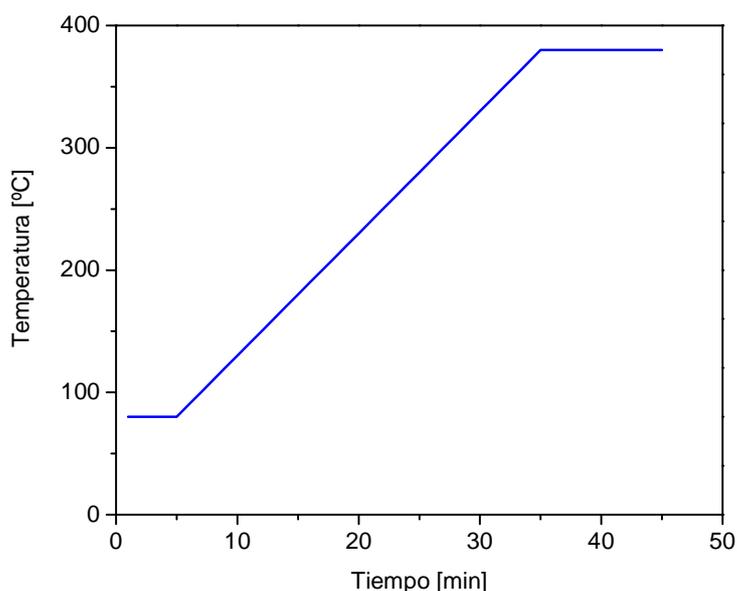
El método adoptado para la cuantificación de la muestra (*AOCS oficial method Cd 11b-91*) establece un pretratamiento antes de que la muestra sea inyectada al cromatógrafo. Se extrajo una pequeña muestra de la mezcla de reacción (alrededor de 50 mg) y se la disolvió en 5 ml de piridina. Paralelamente se preparó una solución de tetradecano en piridina. El tetradecano es utilizado como estándar interno. Se separaron 100 µl de cada solución y se mezclaron. Se agregaron luego 100 µl de trimetilclorosilano (TMCS) y 200 µl de N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSFTA), empleados como sililantes. La sililación facilitó la separación de los monoglicéridos y de los diglicéridos, permitiendo una mejor detección. La solución obtenida se calentó a 70 °C durante 20 minutos y luego se enfrió hasta temperatura ambiente. En estas condiciones la muestra estuvo lista para ser inyectada en el cromatógrafo.



**Fig. 6.** Esquema del cromatógrafo utilizado

Para una mejor detección en el equipo adquisidor de datos se utilizó el procedimiento “split/splitless” con una relación de 10:1 aproximadamente, el cual consiste en poner el split en “off” durante un minuto. Esto permitió que una cantidad más grande de muestra circule por la columna y de esta manera se favorece la detección de los compuestos.

Para el horno se impuso la rampa de temperatura que se muestra en la Figura 7.



**Fig. 7.** Rampa de temperatura empleada en el horno del cromatógrafo

Para el tratamiento de los datos y la cuantificación de los porcentajes de los diferentes compuestos involucrados se requirió la determinación de los factores de respuesta de cada uno de los componentes a analizar, basados en un determinado estándar interno (tetradecano en este caso). Mediante la aplicación de estos factores fue posible comparar los registros cromatográficos correspondientes a diferentes inyecciones.

Los factores de respuesta ( $f_{r_j}$ ) para cada componente se obtuvieron a partir de las áreas provistas en el registrador cuando se analizó un compuesto patrón, empleando la siguiente ecuación:

$$f_{r_j} = \frac{m_{is}}{m_j} \frac{A_j}{A_{is}}$$

Donde:

$m_j$  = masa o concentración del compuesto patrón

$m_{is}$  = masa o concentración del estándar interno

$A_j$  = área registrada del compuesto patrón

$A_{is}$  = área registrada del estándar interno

Con estos factores de respuesta, se calcularon los porcentajes en peso de cada compuesto en una muestra de composición desconocida:

$$Pr_x = \frac{m_{is}}{m} \frac{A_x}{A_{is}} \frac{1}{f_{r_x}} * 100$$

Donde:

$Pr_x$  = porcentaje en peso del compuesto x en la muestra

$m$  = masa o concentración de la muestra

$m_{is}$  = masa o concentración del estándar interno

$A_x$  = área del pico para el compuesto x en la muestra

$A_{is}$  = área registrada del estándar interno

$f_{r_x}$  = factor de respuesta del compuesto x.

Una vez obtenidos los porcentajes en peso de cada componente, y con el volumen de muestra extraída del reactor, se obtuvieron las concentraciones de cada compuesto en la mezcla reactiva a diversos tiempos de reacción.

#### 4- Cálculo de rendimientos

##### Rendimiento de la extracción

Este rendimiento puede calcularse como el cociente entre la masa de lípidos obtenida ( $m_L$ ) y la masa inicial de la biomasa seca ( $m_{BS}$ ):

$$\eta_E = \frac{\text{gr lípidos}}{\text{gr de biomasa seca}} = \frac{m_L}{m_{BS}}$$

##### Rendimiento de la reacción

Partiendo de la masa inicial de lípidos totales ( $m_L$ ), el rendimiento de la reacción de biodiesel puede calcularse de la siguiente forma:

$$\eta_R = \frac{\text{gr de biodiesel}}{\text{gr de lípidos}} = \frac{(\% \text{ peso biodiesel} / 100) * m_{FO}}{m_L}$$

##### Rendimiento global

El rendimiento global puede calcularse como el producto de los dos anteriores:

$$\eta_G = \frac{\text{gr de biodiesel}}{\text{gr de muestra liofilizada}} = \eta_E \eta_R$$

$$\eta_G = \frac{(\% \text{ peso biodiesel} / 100) * m_{FO}}{m_{BS}}$$

## **Método de metanol supercrítico**

### 1- Equipo Experimental

Las reacciones de transesterificación se realizaron en un reactor de volumen fijo de acero inoxidable (Fig 8). El reactor es un dispositivo cilíndrico de acero inoxidable (316SS) de 40 cm<sup>3</sup> de capacidad (15 mm diámetro interno, 22,6 mm de longitud y un

espesor de pared de 4 mm). Una vez efectuada la carga de los reactivos, el reactor se selló por medio de dos tapas roscadas de retención de bronce, que disponen de arandelas de teflón con carga de bronce. El reactor posee a su vez una camisa de aluminio, que actúa como baño calefactor a través de dos resistencias eléctricas calefactoras de 450 W de potencia que se encuentran conectadas a un controlador de temperatura. La temperatura se mide en la camisa de aluminio por medio de una resistencia de platino (Pt 100  $\Omega$ ), y es controlada a  $\pm 2$  K de la temperatura deseada.

La presión dentro del reactor se lee en un manómetro tipo Bourdon ( $\pm 5$  bar), previamente calibrado. El reactor también dispone de conexiones laterales para efectuar la carga de co-solventes. Además, el sistema está aislado térmicamente con lana mineral para evitar gradientes dentro del reactor y mantener el control de la temperatura.

## 2- Carga de reactivos

La Tabla 3 muestra la masa de sustrato y alcohol que se alimentó al reactor. Estimando un peso molecular promedio para el aceite de 840 g/molg, se tiene una relación molar inicial moles de alcohol / moles de aceite de 180.

	Metanol - algas	
Volumen	cm <sup>3</sup>	40,000
Densidad MeOH	g/cm <sup>3</sup>	0,788
Masa MeOH	g	14,900
Masa sustrato	g	9,200
Aceite, % masa	-	23,6
Masa de aceite	g	2,171
Densidad global	g/cm <sup>3</sup>	0,603
Moles MeOH		0,4656
Moles aceite		0,0026
Relación Molar inicial	180	

**Tabla 3.** Carga de reactivos y relación molar inicial de metanol – aceite estimada

### 3- Operación

El procedimiento experimental consistió en la carga de los reactivos (biomasa + metanol líquido), en la relación molar especificada en la Tabla 3, inertizando el reactor con nitrógeno. Posteriormente se colocó el reactor en la caja de aislamiento, y se conectó el sistema eléctrico de calentamiento.

Una vez ensamblado el sistema de reacción se comenzó a elevar la temperatura. Inicialmente se reguló el incremento de temperatura en 10 °C/min hasta los 150°C y luego a 20 °C/min hasta llegar a la temperatura deseada de 298°C. Una vez alcanzada la temperatura final, se mantuvo la mezcla reactiva bajo esas condiciones durante 75 minutos.

Transcurrido el tiempo de reacción, se procedió a disminuir la temperatura del sistema a fin de detener la reacción y evaluar los resultados. Esta tarea se realizó utilizando una corriente de aire comprimido a temperatura ambiente. Una vez abierta la celda se colocó el producto de reacción en un vaso de vidrio de 80 ml. Luego se evaporó el metanol remanente en un horno de vacío a 40 °C, y se guardó la muestra en frío para ser analizada.

### 4- Análisis de las muestras de reacción

Las muestras se analizaron por medio de cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo Varian Star 3400 CX. Se utilizó una columna capilar (J & W Scientific DB-5HT) de 15 metros de longitud, con un diámetro interior de 0,32 mm y un film de 0,1 µm. La columna es de poliamida cubierta en sílica fundida ([5% Phenyl]-methylpolysiloxane), con un límite de temperatura de 400 °C. Se utilizó un detector de ionización de llama (FID). Las temperaturas del inyector y el detector se regularon en 320 °C y 370 °C, respectivamente. Como gas carrier se utilizó hidrógeno, con un caudal de 2 ml/min medido a 50 °C. Para reducir el volumen de muestra inyectada a la columna, se utilizó un inyector-seccionador en el que se fijó una relación de caudal de venteo/caudal de

columna de 50:1. Se utilizó una guarnición de vidrio con un reductor anular en su extremo, para dividir la inyección en dos corrientes: una que se dirige a la columna y otra a venteo.

La técnica empleada para realizar los análisis ha sido utilizada por varios autores (Freedman et al. 1986, Bondioli 2004), siguiendo el método oficial de la AOCS (cd- 11b-91). Al análisis de los ácidos grasos libres (FFAs) y ésteres de ácidos grasos (FAMEs) es posible realizarlo utilizando cromatografía gaseosa directamente. Sin embargo, para compuestos ligados al glicerol (glicerina, monoglicéridos, diglicéridos) es necesario realizar una sililación, cuya función es adicionar un grupo trimetilsilil a todos los grupos oxhidrilos presentes en el combustible. El compuesto utilizado para sililar fue (BSTFA) N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida.

La adición de este grupo incrementó la volatilidad de los compuestos que contienen el grupo oxhidrilo (o carbonilo en el caso de los ácidos). Los ésteres y los triglicéridos no son afectados. Los compuestos sililados son más volátiles, menos polares y térmicamente más estables. Esto permitió un análisis por cromatografía gaseosa satisfactorio desde el punto de vista de la separación de los componentes.

El trimetilclorosilano es un catalizador de la reacción de sililación. Se mezcla con el BSTFA para incrementar su reactividad en la derivatización. Este compuesto es un donador más débil de grupos Silil ( $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ) e incrementa el poder de donación del BSTFA.

Como estándar interno se utilizó tetradecano. Para evaluar el contenido de ésteres se utilizó una curva de calibración obtenida para metil-heptadecano (C17) respecto del estándar interno utilizado.

La disolución de las muestras se realizó por medio de piridina porque su carácter polar favorece la reacción de sililación, y a su vez porque actúa como receptor de grupo HCl (subproducto de la reacción). Se preparó una solución de estándar interno con la piridina (50mg/ml) y se alistaron las muestras diluyendo 500 mg del producto de reacción

en 5 ml de piridina. Se utilizó un tubo vial con septum de teflón para colocar la mezcla reactiva con la siguiente relación de componentes:

- (1) 0,1 ml de la muestra (piridina + biodiesel)
- (2) 0,4 ml de BSTFA + TMCS (2:1)
- (3) 0,1 ml de solución de estándar interno

Se calentó la mezcla reactiva a 70 °C por 20 minutos y se inyectaron 4 µl al cromatógrafo. Se realizaron dos inyecciones por reacción, y a su vez se preparó dos veces la reacción por muestra de biodiesel analizada.

Se varió la temperatura del horno cromatográfico de la siguiente manera: partiendo de 50 °C (mantenidos durante 5 minutos), se aplicó una rampa de 15 °C/min hasta alcanzar los 180 °C; luego una rampa de 7 °C/min hasta los 230 °C y una rampa de 10 °C/min hasta los 370 °C, manteniendo esta temperatura final durante 45 minutos para limpiar la columna.

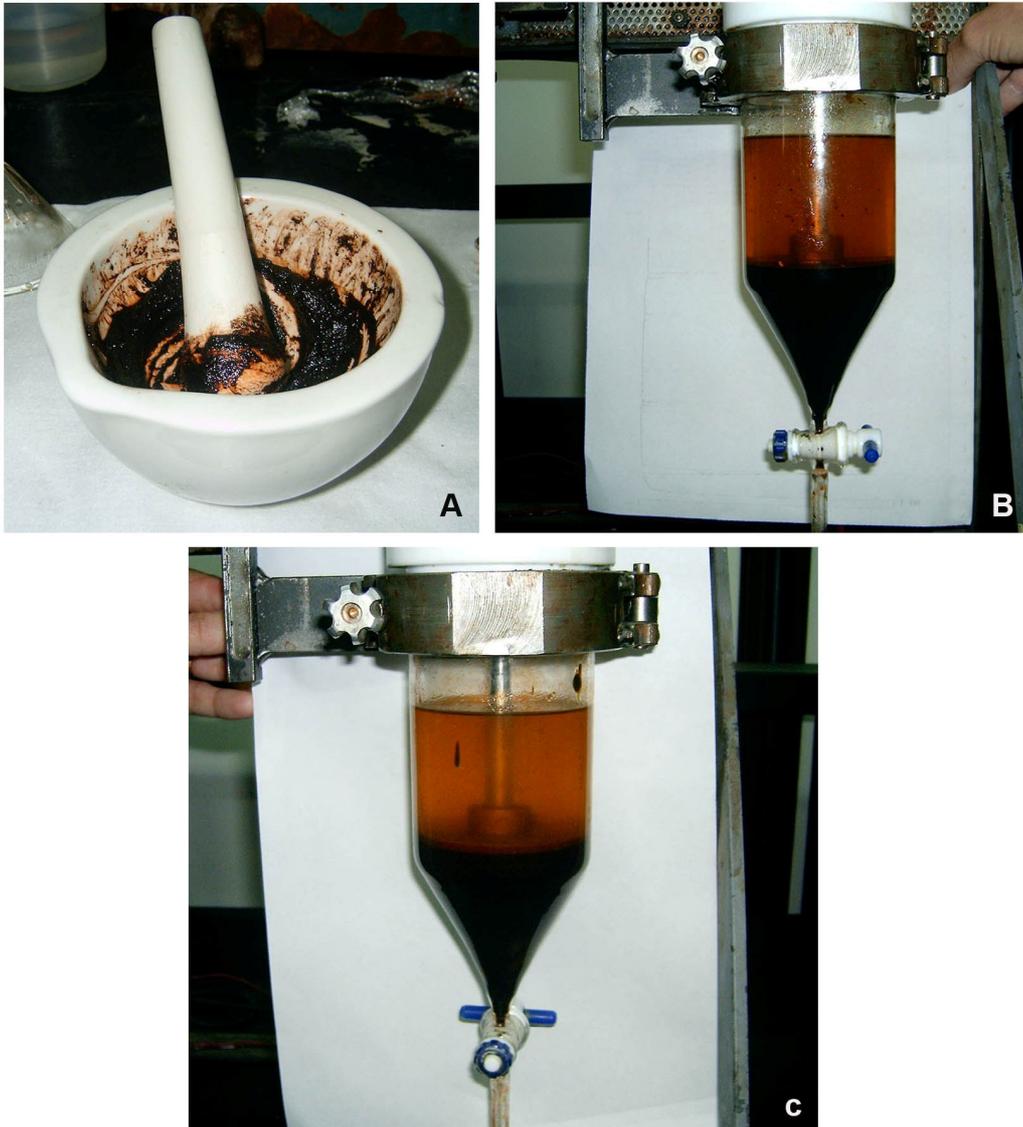
Se efectuó también un ensayo sin sililación y estándar interno, para determinar en forma efectiva la presencia de ésteres, ya que estos compuestos no requieren de agentes sililantes. Sin embargo, la inyección del compuesto sin sililar ensució la columna capilar utilizada, y empleó mucho tiempo de limpieza a alta temperatura (370 °C) para eliminar los compuestos más pesados. Por esta razón se recomienda la sililación de la muestra.



**Figura 1.** Proceso de cosecha de *Haematococcus pluvialis*. **A:** concentración de células por sedimentación. **B:** eliminación del medio de cultivo remanente. **C:** resultado de la sedimentación pasiva. **D:** biomasa centrifugada.



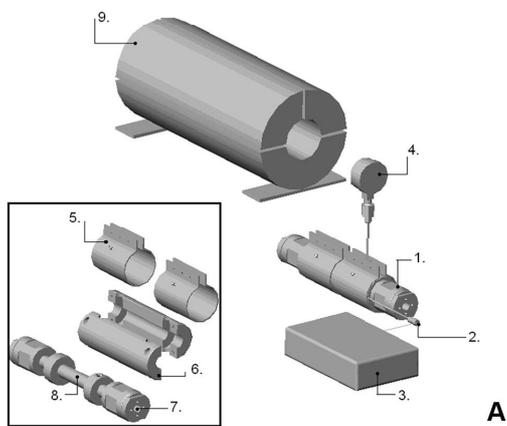
**Figura 3.** Extracción de lípidos en *Haematococcus pluvialis* con el método Zhekisheva et al. 2002. **A:** baño termostatzado con la primera extracción con metanol. **B:** primera y segunda extracción con metanol. **C:** sistema bifásico resultado de la mezcla del extracto metanólico con dietil eter, hexano y agua. **D:** sistema bifásico resultado de la mezcla de la fase inferior de la decantación anterior con dietil eter:hexano.



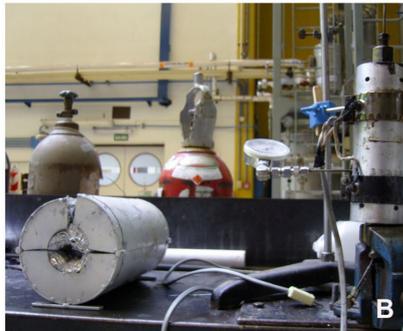
**Figura 4.** Extracción de lípidos en *Haematococcus pluvialis* con el método n-hexano. **A:** ruptura celular con mortero y DMSO. **B-C:** extracción con n-hexano en un reactor discontinuo. **B:** primera extracción. **C:** segunda extracción.



**Figura 5.** Fraccionamiento lipídico en *Haematococcus pluvialis*. Elusión de lípidos neutros con distintos solventes; notar la coloración rojiza del pigmento astaxantina.



**A**



**B**



**C**

**Figura 8.** Reactor de alta presión y temperatura utilizado en la producción de biodiesel. **A:** Esquema. 1- reactor, 2- Pt-100, 3- controlador, 4- sensor de presión, 5- camisas eléctricas de calefacción, 6- camisas de aluminio, 7- tapas de bronce, 8- tubo de acero inoxidable. **B-C:** vista general del reactor.

## INTRODUCCION

La ultraestructura general de las células vegetativas de *Haematococcus pluvialis* es común a muchas Chlorophyceae (Santos y Mesquita 1984), no obstante, la cubierta celular y la configuración absoluta del aparato flagelar presentan características diagnósticas del género. La cubierta celular de *H. pluvialis* sufre modificaciones significativas en su ultraestructura y en su composición química durante el ciclo celular y en respuesta a estímulos externos (Hagen et al. 2002). La estructura de la cubierta celular de las células vegetativas fue interpretada de distinta manera por diversos autores. Smith (1950) la describió como una delicada pared celular conectada con el protoplasto por finas y numerosas conexiones citoplasmáticas. Bowen (1967) observó que la pared estaba formada por un estrato capsular periférico, una estructura membranosa y una matriz gelatinosa. Hagen et al. (2002) la definieron como una matriz extracelular formada por una capa transparente de espesor variable, compuesta por una red laxa de fibras y estructuras granulares, seguida por una capa cristalina tripartita media rodeada por un estrato fibroso externo.

En general, la cubierta celular de las algas verdes está compuesta por una matriz compleja de carbohidratos, proteínas y otros componentes. En el caso de las algas verdes como *Chlamydomonas* y *Volvox* la pared de las células vegetativas y las paredes cigóticas están constituidas principalmente por glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) (Adair y Appel 1989, Rubenstein et al. 1995, Sumper y Hallmann 1998). Algunos estudios en los que se refieren a la naturaleza química de la envoltura externa de *Haematococcus* revelaron la presencia de glicoproteínas (GPs) y celulosa (Hagen et al. 2002). Recientemente, Wang et al. (2004) identificaron 81 proteínas estructurales de pared en *Haematococcus pluvialis*.

La estructura y función del sistema de endomembranas y su rol en la secreción de la pared celular se encuentran bien estudiadas en sistemas celulares de plantas superiores (Robinson 1985, Staehlin y Chapman 1987, Robinson y Kristen 1982, Picton y Steer 1983) como así también en algunas especies de algas verdes (Roberts 1982, Domozych 1988, 1989, 1992; Grief and Shaw 1987). Sin embargo, no existen hasta el momento, estudios acerca de las vías de síntesis de la compleja cubierta celular en *Haematococcus pluvialis*. En este estudio, por medio de observaciones con microscopía electrónica de transmisión, se propone un posible mecanismo de formación de la cubierta celular, con la intervención del sistema de endomembranas, como fue postulado previamente para las algas verdes *Gloeomonas kupfferi* (Domozych 1989, 1992) y *Chlamydomonas sp.* (Domozych 1992).

Como muchas otras especies de microalgas, *Haematococcus pluvialis* forma células de resistencia inmóviles cuando es sometida a condiciones extremas tales como deficiencia de nutrientes o alta intensidad lumínica (Hagen et al. 2002). Este proceso es acompañado por cambios en la morfología, entre los que se destacan la formación de una gruesa pared celular y la acumulación de astaxantina (Lang 1968, Santos y Mesquita 1984, Boussiba 2000). Muchos estudios de las condiciones de cultivo responsables de la formación de este pigmento en *H. pluvialis* han sido llevados a cabo en células móviles (Hagen et al. 2000, 2001, Wang et al. 2003) e inmóviles (Harker et al. 1996). También se han contemplado aspectos funcionales (Hagen et al. 1994).

La típica pared multiestratificada del cisto ha sido un problema al momento de seleccionar el método más apropiado para la extracción de astaxantina. Sin embargo, Mendes-Pinto et al. (2001) propusieron tratamientos mecánicos y de autoclave para la ruptura celular.

Estudios químicos y ultraestructurales de la pared celular de *H. pluvialis* han sido llevados a cabo por Montsant et al. (2001) en cistos de poblaciones dinamarquesas, indicando la presencia de un biopolímero no-hidrolizable. Posteriormente Hagen et al.

(2002) describieron los cambios en la ultraestructura y la naturaleza química de la pared celular en cepas alemanas de *H. pluvialis* durante la transformación de las células flageladas a cistos, sugiriendo la presencia de un material similar a la esporopolenina en la pared de las células inmóviles. Biopolímeros similares a esporopolenina (algaenanos), han sido encontrados en las paredes de varias algas verdes (Atkinson et al. 1972, Hanagata et al. 1999, VanWinkle-Swift y Rickoll 1997) y en especies parásitas (Puel et al. 1987). Análisis químicos de algaenanos aislados de algunas microalgas revelaron que tales biopolímeros consisten de cadenas hidrocarbonadas (C<sub>23</sub>-C<sub>30</sub>) de alto peso molecular y estructuras fuertemente alifáticas (Allard y Templier 2000).

Diversos investigadores han descrito el ciclo de vida del género *Haematococcus*, pero aún existe mucha incertidumbre acerca de su reproducción (Flotow 1844, Braun 1849, Hazen 1899, Peebles 1909, Elliot 1934, Droop 1956, Pocock 1959). El ciclo de vida es complejo, involucrando varios estadios flagelados móviles y estadios inmóviles (Elliot 1934). Recientemente Kobayashi et al. (1997) postularon un modelo de ciclo asexual consistente de cuatro etapas celulares: crecimiento de la célula vegetativa, enquistamiento, maduración del cisto y germinación del cisto maduro. La reproducción sexual fue observada por Triki et al. (1997), pero esta fue considerada como un evento inusual.

En base a lo expuesto, en este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Estudiar la ultraestructura general de las células vegetativas de *H. pluvialis*, con especial atención en la cubierta celular, su proceso de formación y su composición química.
- b) Realizar la configuración absoluta del aparato flagelar de las células móviles.
- c) Estudiar la ultraestructura general de los cistos, con especial énfasis en el proceso de síntesis de astaxantina y en la morfología y caracterización química de la pared celular.
- d) Estudiar el comportamiento de la pared celular de los cistos durante la germinación.
- e) Describir el ciclo de vida de *H. pluvialis*.

## RESULTADOS

### Células vegetativas

*Haematococcus pluvialis* presentó células vegetativas biflageladas, elipsoidales a ovoides (Fig. 9 A-C), con un tamaño celular promedio de 17,5-20  $\mu\text{m}$  de largo por 10-15  $\mu\text{m}$  de ancho, con un único cloroplasto parietal que poseía numerosos pirenoides (Fig. 9 B). La cubierta celular, refringente y con un espesor variable de 5-8  $\mu\text{m}$ , estaba atravesada por finas hebras radiales (Fig. 9 A y B). Los flagelos se localizaban en una papila apical, emergían formando entre sí un ángulo de 70-110° y su longitud superaba en aproximadamente 1/3 a la longitud de la célula (Fig. 9 B-C).

### Ultraestructura general

Los dos flagelos emergían de la célula a través de orificios de la cubierta celular (Fig. 10 A y B). Una gran mitocondria reticulada se localizaba debajo del aparato flagelar (Fig. 17 A) y numerosos perfiles mitocondriales, elípticos o circulares, se observaban principalmente en el espacio citoplasmático adyacente al plasmalema (Fig. 10 D y E). El núcleo se observó en posición anterior, poseía un nucléolo conspicuo y estaba rodeado por numerosos dictiosomas (Fig. 10 A y C). La cara *cis* de cada dictiosoma se encontraba en estrecha asociación con el retículo endoplasmático rugoso, a partir del cual se originaban numerosas vesículas de transición. La cara *trans*, por su parte, estaba casi invariablemente orientada hacia la carioteca (Fig. 10 D).

El cloroplasto parietal y lobulado, ocupaba gran parte de la célula (Fig. 10 A). El estroma cloroplástico presentaba lamelas formadas por 2-6 tilacoides y numerosos gránulos de almidón elípticos en sección (Figs 10 C-E y 11 A). La matriz de los pirenoides estaba penetrada por tilacoides individuales dilatados y rodeada por casquetes de

almidón de variado tamaño (Fig. 11 A y B). El estigma intraplastidial estaba formado por una sola hilera de glóbulos lipídicos localizados debajo de la membrana cloroplástica (Fig. 11 B, punta de flecha).

Se observaron vacuolas con disposición perinuclear (Fig. 10 C) y en la periferia del citoplasma (Fig. 11 C-D y F). Estas contenían material de aspecto granular (Fig. 11 D y F) y corpúsculos esfero-ovoidales electrónicamente densos (Figs 10 C, 11 C-F) asociados con estructuras membranosas y lomasomas (Fig. 11 C, E y F) que en algunos casos, estos últimos se observaron en contacto con el tonoplasto (Fig. 11 C y F, punta de flecha).

Cuatro vacuolas contráctiles con una posición equidistante se presentaban adyacentes al plasmalema (Fig. 12 A, flechas y B-E).

### **Configuración absoluta del aparato flagelar**

En la figura 13 se muestra la reconstrucción tridimensional del aparato flagelar de *Haematococcus pluvialis* realizada sobre la base de numerosos cortes seriados. En vista apical el aparato flagelar presentaba simetría rotacional de 180°, con una orientación 1/7 de sus cuerpos basales. Una fibra distal estriada (FD) conectaba los cuerpos basales en su parte superior (Figs 14 A-C y 15 A-C, punta de flecha). El sistema de raicillas microtubulares estaba formado por dos microtúbulos en las raicillas "d" y 5 microtúbulos, con una disposición (4:1), en las raicillas "s" (Fig. 15 D); correspondiendo al modelo cruciforme 2: 4/1: 2: 4/1 (Fig. 13). Cada raicilla "s" estaba acompañada en toda su trayectoria por una fibra no estriada (Figs 15 A-C y 16 A y B). Un cuerpo denso (CD) de material electrónicamente opaco ocluía el extremo proximal de cada cuerpo basal (Fig. 15 A-C). Una fibra estriada (Fe) conectaba a este material electrónicamente denso con el nacimiento de cada raicilla microtubular "s" (Fig. 15 A-C).

La parte basal del aparato flagelar estaba asociada, por medio de membranas, con lobulaciones digitiformes de una gran mitocondria (Fig. 17 B y C). En cortes transversales seriados por el extremo anterior de la célula se pudieron observar los perfiles mitocondriales y las 4 raicillas microtubulares (Fig. 18 A-D, flechas).

Dos cuerpos basales suplementarios, no axonémicos se presentaron unidos al aparato flagelar y a la mitocondria por medio de membranas (Fig. 19 A, punta de flecha y B, flechas), como así también por medio de la fibra estriada y el cuerpo denso (Fig. 19 C, punta de flecha y D, flecha).

Numerosos microtúbulos citoesqueletales corrían adyacentes al plasmalema (Fig. 20, puntas de flecha).

### **Ultraestructura de la cubierta celular**

La figura 21 muestra una representación diagramática de la cubierta celular de las células adultas de *H. pluvialis*, formada por un estrato externo de contorno regularmente ondulado y de aspecto fibrilar (Fig. 22 A-C) y un estrato interno en el que se dispusieron numerosas vesículas aproximadamente rectangulares en sección longitudinal, con distinta altura dependiendo de su desarrollo y de las condiciones del medio (Fig. 22 B y C). El contenido de las mismas se observaba siempre electrónicamente translúcido. Las membranas de las vesículas contiguas, anticlinales con respecto a la superficie celular, se disponían normalmente muy próximas unas de otras (Fig. 22 D, flechas), aunque esporádicamente éstas se encontraban separadas por evaginaciones citoplasmáticas (Fig. 22 E). La cubierta celular de las células de *H. pluvialis*, observada con microscopio electrónico de barrido, exhibió una superficie rugoso-granular formada por pequeñas crestas (Fig. 22 F).

## **División celular**

Inmediatamente antes de la división celular, las grandes vesículas del estrato interno de la cubierta celular de las células vegetativas adultas de *H. pluvialis* se desorganizaban. Las células se redondeaban y aumentaban de tamaño, aproximándose el plasmalema al estrato fibrilar externo de la cubierta celular, el cual perdía su estructura ondulada característica (Fig. 23 A). Durante la citocinesis el surco de clivaje crecía desde el extremo anterior de la célula (Fig. 23 A y B, flecha) hacia el posterior (Figs. 23 C, punta de flecha, 23 D), paralelamente numerosos dictiosomas y cisternas del retículo endoplasmático se ubicaban próximos al surco de clivaje (Fig. 24 A y B).

## **Formación de la cubierta celular**

En las células jóvenes de *H. pluvialis* se producía una dinámica de formación de la cubierta celular, donde inicialmente, el espacio dejado por las dos células hijas se observó ocupado por abundante material fibrilar (Fig. 24 B) y posteriormente, vesículas de forma y tamaños variados se dispusieron en hileras; iniciándose la formación de las cubiertas celulares de ambas células hijas (Fig. 24 C y D, puntas de flecha).

Luego se observaron numerosas vesículas de transición localizadas entre el retículo endoplasmático y la cara *cis* de los dictiosomas perinucleares (Fig. 25 A y B, punta de flecha). Además, se observaban otras vesículas de considerable tamaño, con un contenido translúcido y forma variada, que se originaban de la porción media de la cara *trans* de las cisternas dictiosómicas (Fig. 25 B, flechas). Estas se fusionaban entre sí formando vesículas de mayor tamaño (Fig. 25 C y D) y luego se ponían en contacto con las vacuolas contráctiles (Fig. 26 A, flecha), a las que volcaban su contenido (Fig. 26 B). A su vez las vacuolas contráctiles presentaron en su interior vesículas con un contenido homogéneo con escasa densidad electrónica y material fibrilar (Figs 12 B-E y 26 B), las que eran paulatinamente expulsadas al espacio periplasmático, es decir, el espacio ubicado entre el estrato externo de la cubierta celular y el plasmalema (Fig. 26 B y C),

para formar parte del estrato interno de la cubierta celular (Fig. 26 F). Gradualmente estas vesículas, con un contenido translúcido, aumentaban de tamaño hasta alcanzar el volumen final en células adultas (Fig. 26 D y E).

### **Caracterización química de la cubierta celular**

La presencia de glicoproteínas en la cubierta celular de *Haematococcus pluvialis* fue demostrada en este estudio. Una banda con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, correspondía a extensina y era detectada con ambos anticuerpos usados (JIM-11 y JIM-12) (Figura 27 A). Una segunda banda fue detectada a aproximadamente 100 kDa, correspondiéndose posiblemente a uniones cruzadas de dímeros de extensina.

Una fuerte reacción TBO a pH: 1 en el gel SDS permitió detectar la presencia de polímeros sulfatados, sin embargo, esta banda de TBO no se superpuso con el epítipo para extensina, sugiriendo de esta manera que las extensinas no están sulfatadas. La naturaleza proteica de la cubierta celular también fue indicada por el análisis FTIR (Fig. 27 B), en el cual estuvieron presentes bandas a 1650 y 1550  $\text{cm}^{-1}$  (común a grupos amidas I y II) (Pelton y McLean 2000).

También fueron detectados carbohidratos en una proporción de 30  $\mu\text{g}$  por mg de peso seco de estrato externo de la cubierta celular. Los principales azúcares hallados fueron: galactosa (54 mol %), arabinosa (18 mol %), pequeñas cantidades de xilosa (9,7 mol %), manosa (8,4 mol %), fucosa (6,7 mol %) y ácidos urónicos. La arabinosa fue uno de los azúcares mayoritarios y probablemente origine el tipo O-glicosilación de las extensinas.

La presencia de grupos sulfatos en los polisacáridos neutros fueron también detectados por el análisis FTIR (Fig. 27 B), donde bandas a 1384  $\text{cm}^{-1}$  (común a todos los ésteres sulfatados) y a 1250-1230  $\text{cm}^{-1}$  (tensión asimétrica de O=S=O) estuvieron presentes (Prado Fernández et al. 2003).

## Cistos

Las células vegetativas de *H. pluvialis*, bajo condiciones adversas de cultivo, se transformaron en células de resistencia denominadas cistos. Los cistos carecían de movilidad, presentaban forma circular, diámetro celular que varió entre 22  $\mu\text{m}$  y 60  $\mu\text{m}$  (Fig. 28 A-C) y coloración rojiza característica, debido a la síntesis de un pigmento carotenoide, perteneciente al grupo de las xantofilas llamado astaxantina (Fig. 28 A).

## Ultraestructura general

El núcleo siempre se observaba en posición central (Fig. 29 A), con un nucléolo que presentaba un corpúsculo paranuclear esférico adyacente y de menor densidad electrónica que éste (Fig. 29 B punta de flecha y D). El cloroplasto era parietal, con lamelas 2-6 tilacoidales y 2-4 pirenoides rodeados por casquetes de almidón y penetrados por tilacoides individuales dilatados (Fig. 29 A y C). En cistos maduros de 4-6 semanas de edad, la pared celular estaba formada por: 1) una capa externa trilaminar (CT) compuesta por un estrato translúcido entre dos estratos electrónicamente opacos, 2) un componente medio o pared secundaria, formado por material electrónicamente denso y 3) un componente más interno o pared terciaria, formado por distintos estratos de morfología variada (Fig. 29 A y E, puntas de flecha). En cistos de más de 6 semanas, la pared terciaria presentaba el mismo aspecto homogéneo que la pared secundaria (Figs 29 F y 33 D).

## Formación

Las células vegetativas de *Haematococcus pluvialis* mantenidas en condiciones de estrés durante tres semanas se redondearon, perdieron movilidad y aumentaron de tamaño diferenciándose en cistos (Fig. 30). Ultraestructuralmente este proceso comenzaba, con la síntesis de una nueva pared primaria homogénea de mediana

densidad electrónica, por dentro de la cubierta celular de las células vegetativas (Figs 30 D y 31 A). Por debajo de la pared primaria se diferenciaba la capa trilaminar (Fig. 31 B) y contigua a esta, se sintetizaba la pared secundaria (Fig. 31 A-F).

Durante la síntesis de la pared secundaria, material electrónicamente denso y con forma de glóbulos aproximadamente circulares en sección, localizados en el espacio periplasmático, se fueron aplanando conforme se incorporaban a la pared en formación (Fig. 31 A-C). La pared secundaria alcanzaba un espesor de 0,5-1  $\mu\text{m}$  y presentaba un aspecto homogéneo (Fig. 31 E y F). El espacio periplasmático, que presentaba un espesor de 0,5-0,7  $\mu\text{m}$ , era posteriormente ocupado por material de aspecto esponjoso (Fig. 31 D, puntas de flecha). Posteriormente tenía lugar la paulatina rotura y desintegración de la pared primaria (Fig. 32 A-C), quedando al descubierto la capa trilaminar, la que presentaba una superficie irregularmente ondulada (Fig. 32 D).

En cistos de 4-6 semanas de edad, se formaba la pared terciaria adyacente a la pared secundaria y localizada entre ésta y el material esponjoso que llenaba el espacio periplasmático (Fig. 33 A-C). La pared terciaria estaba formada por material electrónicamente denso organizado en hebras que se fue depositando en estratos de morfología variada (Fig. 33 A y B, puntas de flecha). El primer estrato exhibió una textura esponjosa laxa (PT1) y el segundo apariencia fibrosa (PT2) (Fig. 33 B y C, flechas), alcanzando un espesor igual o mayor que la pared secundaria (Fig. 33 C). En cistos de más de 6 semanas estos estratos finalmente se compactaron y la pared terciaria adquiría el mismo aspecto homogéneo y compacto que la pared secundaria, siendo sólo distinguibles ambas por la presencia de una delgada capa electrónicamente translúcida entre ellas (Fig. 33 D, puntas de flecha). El espacio periplasmático se redujo finalmente a su mínima expresión.

Las paredes remanentes de las células vegetativas que rodeaban a los cistos maduros presentaron reacción positiva de fosfatasas ácidas (Fig. 34 A y B, flechas).

## Carotenogénesis

El agregado de acetato de sodio al medio de cultivo indujo la formación de cistos y el incremento de la síntesis de astaxantina. Este aumento fue de aproximadamente el doble ( $0,50 \mu\text{g cel}^{-1}$ ) en cultivos donde la concentración de acetato fue máxima, comparando con lo registrado en los cultivos controles ( $0,23 \mu\text{g cel}^{-1}$ ), sin adición de acetato (Tabla 4). Además el acetato de sodio afectó negativamente la cantidad de clorofila, es decir, los menores valores de clorofila ( $0,31 \text{ mg l}^{-1}$ ) fueron registrados con la máxima concentración de acetato empleada.

Con respecto al crecimiento celular, éste se vio retardado a medida que la concentración de acetato de sodio fue aumentando (Tabla 4).

	Cultivo control	Acetato de sodio 4.0 mM	Acetato de sodio 8.0 mM	Acetato de sodio 12.0 mM
pH inicial / pH final	7/ 7,5	7/ 8,5	7/ 9,5	7/ 9,5
Número de células/ml	$600 \times 10^3$	$552 \times 10^3$	$318 \times 10^3$	$295 \times 10^3$
% de cistos	13	34,28	75,48	83,5
$k$ (div día <sup>-1</sup> )	$0,72 \pm 0,11$	$0,66 \pm 0,08$	$0,35 \pm 0,15$	$0,33 \pm 0,20$
Astaxantina ( $\mu\text{g cel}^{-1}$ )	0,23	0,42	0,47	0,50
Clorofila ( $\text{mg l}^{-1}$ )	2,76	15	3,97	0,31

**Tabla 4.** Número de células, porcentaje de cistos, divisiones celulares, astaxantina y clorofila en cultivos control y con diferentes concentraciones de acetato de sodio de *Haematococcus pluvialis*.

La acumulación de astaxantina se evidenció a simple vista por el cambio de coloración en los cultivos de *H. pluvialis* (Fig. 35) y fue estudiada con microscopio óptico (Fig. 30 A-E) y electrónico de transmisión (Figs 36 y 37). La acumulación fue

extraplastidial, citosólica y se iniciaba alrededor del núcleo (Figs 36 A-B y 37 A). El citoplasma perinuclear se caracterizaba por la presencia de abundante retículo endoplasmático rugoso en estrecha asociación con glóbulos de astaxantina en formación (Fig. 37 A-D). Los glóbulos más pequeños de astaxantina fueron observados inicialmente adyacentes a la carioteca (Figs 36 B y 37 A), extendiéndose paulatinamente hacia la periferia celular (Fig. 36 C). No se observó una membrana circundante en los glóbulos de astaxantina (Fig. 37 B-D); sin embargo, un nítido contorno se presentaba en la mayoría de ellos (Fig. 37 B y C) y en algunos casos la proximidad entre dos o más glóbulos sugería una fusión parcial de los mismos (Fig. 37 C y D, flechas). Conjuntamente distintas organelas, como cloroplastos y vacuolas, sufrieron cambios en su forma debido a la acumulación masiva de astaxantina (Fig. 36 D). En algunos casos también se observó astaxantina en las células vegetativas flageladas, en las gametas y en las zoósporas aún no liberadas del esporangio (Fig. 37 E).

A medida que el proceso de síntesis de astaxantina fue avanzando, los depósitos de pigmento fueron adquiriendo formas variadas: desde circulares en sección al inicio de la síntesis (Fig. 37 A), hasta elipsoidales en sección o polimórficos (Fig. 37 C y F respectivamente, puntas de flecha).

### **Caracterización química de la pared celular**

La pared de los cistos de *Haematococcus pluvialis* fue extremadamente resistente a tratamientos no oxidativos tales como acetólisis, sin embargo, el citoplasma se desorganizaba completamente con estos tratamientos (Fig. 38 A, C y D). Observaciones con TEM revelaron que los residuos de pared acetoresistentes no perdieron la característica estructura trilaminar, es decir, un estrato electrónicamente translúcido entre dos estratos electrónicamente opacos. (Fig. 38 B)

En cistos relativamente pequeños de 25-30  $\mu\text{m}$  de diámetro, la pared acetolizada resistió y mantuvo la forma circular de la célula (Fig. 38 C), mientras que en cistos de mayor tamaño la pared colapsó (Fig. 38 D).

Los cistos tratados con KOH al 10% y con 2-aminoetanol no presentaban alteraciones visibles en su pared (Fig. 38 E y F respectivamente), comparados con los controles no tratados. Por el contrario, la incubación de cistos maduros con ácido crómico a temperatura ambiente, resultaba en la disolución de su pared al cabo de cinco horas de tratamiento (dato no mostrado). La reacción de tinción para caracterizar lignina fue negativa.

Los cistos maduros teñidos con Calcofluor White e irradiados con luz UV exhibieron una fluorescencia continua en sus paredes (Fig. 39 A). Cuando los mismos fueron previamente tratados con celulasa, la fluorescencia disminuía en la capa trilaminar, como así también en la pared secundaria. La pared terciaria se comportaba de manera distinta ya que presentaba fluorescencia discontinua (Fig. 39 B, flechas). El tratamiento de los cistos con la enzima  $\beta$ -manosidasa no afectaba la fluorescencia en la capa trilaminar, pero sí lo hizo en las paredes secundaria y terciaria. En la pared secundaria la fluorescencia disminuía y en la pared terciaria era discontinua (Fig. 39 C, flechas).

Para corroborar las observaciones de microscopía de fluorescencia se procedió a la extracción del material fibrilar de la pared de los cistos utilizando medios alcalinos fuertes (KOH al 10% y NaOH-borato). Los resultados del análisis de la composición de monosacáridos neutros por cromatografía gas-líquida se muestran en la Tabla 5. A medida que progresaba la extracción, la muestra soluble en álcali se fue enriqueciendo en manosa y empobreciendo en glucosa. La manosa, presumiblemente derivaba del manano fibrilar. Al mismo tiempo, al analizar el residuo insoluble en NaOH, la relación manosa/glucosa se invertía, aumentando la proporción de glucosa, sugiriendo de esta

manera la presencia de celulosa acompañando al manano en dicha fracción. Es decir, los principales monosacáridos detectados en la pared de los cistos fueron manosa y glucosa aunque también se observaba un 6% de galactosa, únicamente para el primer producto extraído con KOH.

Fracción	% molar		
	Manosa	galactosa	glucosa
KOH1-SND	44	6	50
KOH2-SND	86	-	14
NaOH-SND	98	-	2
NaOH-I	23	-	77

**Tabla 5.** Análisis de los monosacáridos componentes de la pared celular del cisto en *Haematococcus pluvialis* por cromatografía gas-líquida.

También se realizó el estudio estructural por espectroscopía de RMN <sup>13</sup>C. Los valores de los desplazamientos químicos de las señales más importantes del espectro RMN <sup>13</sup>C del producto soluble en NaOH fueron 100,9; 76,4; 75,4; 71,5; 70,4 y 61,4 ppm y se correspondieron con los informados por Cardoso et al. (2007) para  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$  y pudieron asignarse a los C-1, C-4, C-5, C-3, C-2 y C-6 de dicho polisacárido, respectivamente. Tres señales importantes a 77,9; 73,0 y 71,7 no pudieron ser asignadas. Un espectro similar se obtuvo para el manano fibrilar de *Schizolobium amazonicum* (Petkowicz et al. 2007), aunque en ese caso, las señales correspondientes a los C-3 y C-4 aparecen algo desplazadas a campos más bajos respecto de las observadas en *Haematococcus*.

El espectro infrarrojo del material resistente a la acetólisis revelaba **tres** regiones (Fig. 40):

La primera comprendida entre 4000 y 1800  $\text{cm}^{-1}$ , exhibió una ancha banda centrada en 3380  $\text{cm}^{-1}$  (**1**), que corresponde a la vibración del enlace oxígeno-hidrógeno, y dos bandas agudas localizadas en 2920 (**2**) y en 2850  $\text{cm}^{-1}$  (**3**), que resultaron de las vibraciones de tensión carbono-hidrógeno antisimétrica y simétrica, respectivamente, de los grupos metilo y metileno.

La segunda región, comprendida entre 1800 y 1500  $\text{cm}^{-1}$  puso en evidencia dobles enlaces carbono-carbono (C=C) y carbono-oxígeno (C=O). Así, la banda situada en 1740  $\text{cm}^{-1}$  (**4**) puede ser atribuida a la vibración de tensión del grupo carbonilo de aldehídos, cetonas, ácidos y/o derivados de ácidos carboxílicos (Pappas et al. 1999) y la banda en 1530  $\text{cm}^{-1}$  (**5**), a la vibración de tensión carbono-carbono doble enlace. El grupo carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) se advirtió por el ensanchamiento de la banda **4**, a 1675  $\text{cm}^{-1}$  (Sene et al. 1994).

La tercera región, entre 1500 y 800  $\text{cm}^{-1}$  estuvo asociada con las vibraciones esqueléticas de los grupos funcionales constituyentes. Se observaron en ella cinco bandas de absorción: La primera banda, en 1470  $\text{cm}^{-1}$  (**6**) pudo asignarse a las vibraciones de deformación carbono-hidrógeno en el plano, antisimétricas, de metilo y metileno (Pretsch et al. 1983). La segunda banda, situada en 1370  $\text{cm}^{-1}$  (**7**) se correlacionó (Nakanishi y Solomon 1977) con: **a**) las vibraciones de deformación carbono-hidrógeno en el plano, *simétricas*, de metilo y de metileno (aleteo y torsión), **b**) las vibraciones de deformación en el plano oxígeno-hidrógeno en el enlace C-O-H, **c**) las vibraciones de deformación en el plano carbono-oxígeno-oxígeno del grupo carboxilato. En 1235  $\text{cm}^{-1}$ , la tercera banda (**8**) correspondió al solapamiento de dos vibraciones: la de tensión antisimétrica carbono-oxígeno del grupo éster y la de deformación en el plano del enlace carbono-oxígeno en el enlace C-O-H (Kokot et al. 1997). La cuarta banda comprendió dos absorciones: una en 1160  $\text{cm}^{-1}$  (**9**) y otra en 1045  $\text{cm}^{-1}$  (**10**), que se asignaron a las vibraciones de tensión esqueléticas C-O-C y a las de tensión simétrica

del enlace carbono-oxígeno del grupo éster (Faust 1992). La quinta banda, en  $910\text{ cm}^{-1}$  (11) fue típica de una vibración de deformación fuera del plano carbono-hidrógeno ( $=\text{C-H}$ ) en dobles enlaces carbono-carbono *trans* (Burczyk 1987).

## Germinación

El proceso de germinación fue estudiado con microscopía óptica (Fig. 41) y microscopía electrónica de transmisión (Figs 42-44). Durante la germinación, el cisto cambiaba de forma, es decir, de inicialmente circular a piriforme (Figs 41 A y 42 A) debido a la presión ejercida por los zooides sobre la pared celular. Esta presión también ocasionaba un debilitamiento de la pared en la porción apical del cisto (Fig. 41 A), hasta que se produjo su ruptura (Fig. 41 B) y la posterior liberación de los zooides (Fig. 41 C). El cisto mantuvo su forma piriforme una vez liberados todos los zooides, evidenciando de esta manera la rigidez de la pared (Fig. 41 D).

El proceso de germinación de los esporocistos, gametocistos y aplanocistos era similar. Los esporocistos germinaban originando 8-16 zoósporas (Fig. 42 A y B), las que presentaron las mismas características morfológicas de las células vegetativas (Fig. 42 C y D), además de conservar su color rojizo, debido a la presencia de astaxantina (Fig. 42 B). De la misma manera que en los cistos, la acumulación del pigmento en las zoósporas comenzó rodeando el núcleo, para extenderse posteriormente hacia la periferia del citoplasma (Fig. 42 D y E).

Los gametocistos germinaban originando 16-32 isogametas (Fig. 43 A). Las isogametas fueron aproximadamente ovales y biflageladas (Fig. 43 B y D), más pequeñas que las células vegetativas:  $12\text{ }\mu\text{m}$  versus  $20\text{ }\mu\text{m}$ . Las gametas presentaban un núcleo de posición central, carecieron de cubierta celular (Fig. 43 B y C) y también se observaba en ellas la acumulación perinuclear y citoplasmática de astaxantina (Fig. 43 C y D). El

gametocisto presentaba una pared gruesa, multiestratificada con características similares a la del esporocisto (Fig. 43 C y D).

Los aplanocistos germinaban originando 4-8 aplanósporas (Fig. 44 A y B). Los aplanocistos presentaban pared celular delgada y su ruptura fue apical, con la consecuente liberación de las aplanósporas (Fig. 44 A-C). Estas últimas carecieron de flagelos, presentaban un núcleo de posición lateral, un cloroplasto parietal con abundantes gránulos de almidón y varios pirenoides (Fig. 44 A, C y D). La pared celular de las aplanósporas presentaba tres estratos: un estrato externo muy delgado electrónicamente denso, un estrato medio de aspecto fibrilar y un estrato interno compuesto por cortas hebras de disposición aproximadamente paralela (Fig. 44 E).

A diferencia de las zoósporas y las gametas, las aplanósporas siempre se observaron verdes en cultivo (Fig. 44 A, C, D y F). Una vez liberadas, el aplanocisto vacío presentaba forma de copa (Fig. 44 F).

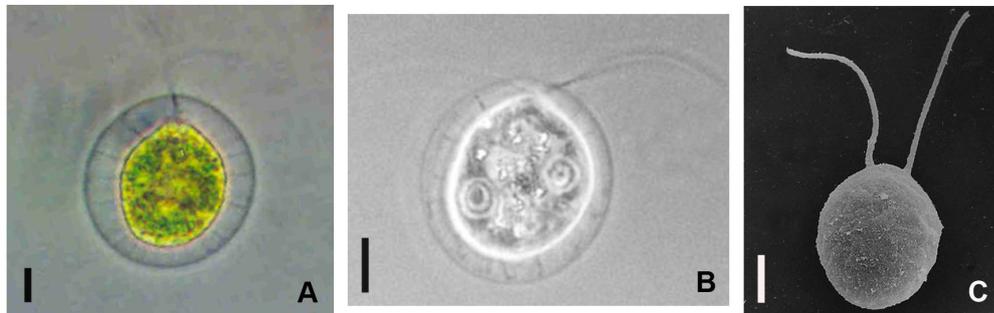
Durante la germinación y consecuente liberación de los zooides, los estratos que formaban la pared del cisto se comportaron de distinta manera (Fig. 45). Este comportamiento diferente estaba asociado tanto a diferencias químicas como morfológicas de los componentes de la pared del cisto. El componente más externo o capa trilaminar, rígido e incapaz de expandirse, se rompió y se retrajo, arrastrando consigo a la pared secundaria, íntimamente unida al estrato trilaminar (Fig. 45 A, puntas de flecha). Por el contrario, el tercer componente de pared acompañaba el incremento de tamaño y cambio de forma del cisto (Fig. 45 A). Se observaba además que durante el proceso de germinación el tercer componente de pared exhibía la misma organización ultraestructural que la de la pared de los cistos de 4-6 semanas (comparar Figs 33 y 45 B). La posterior liberación de los zooides ocurría por la ruptura apical de la pared terciaria, de aspecto fibrilar que se presentaba muy delgada en esa región (Fig. 45 C, punta de flecha y D).

## Ciclo de vida

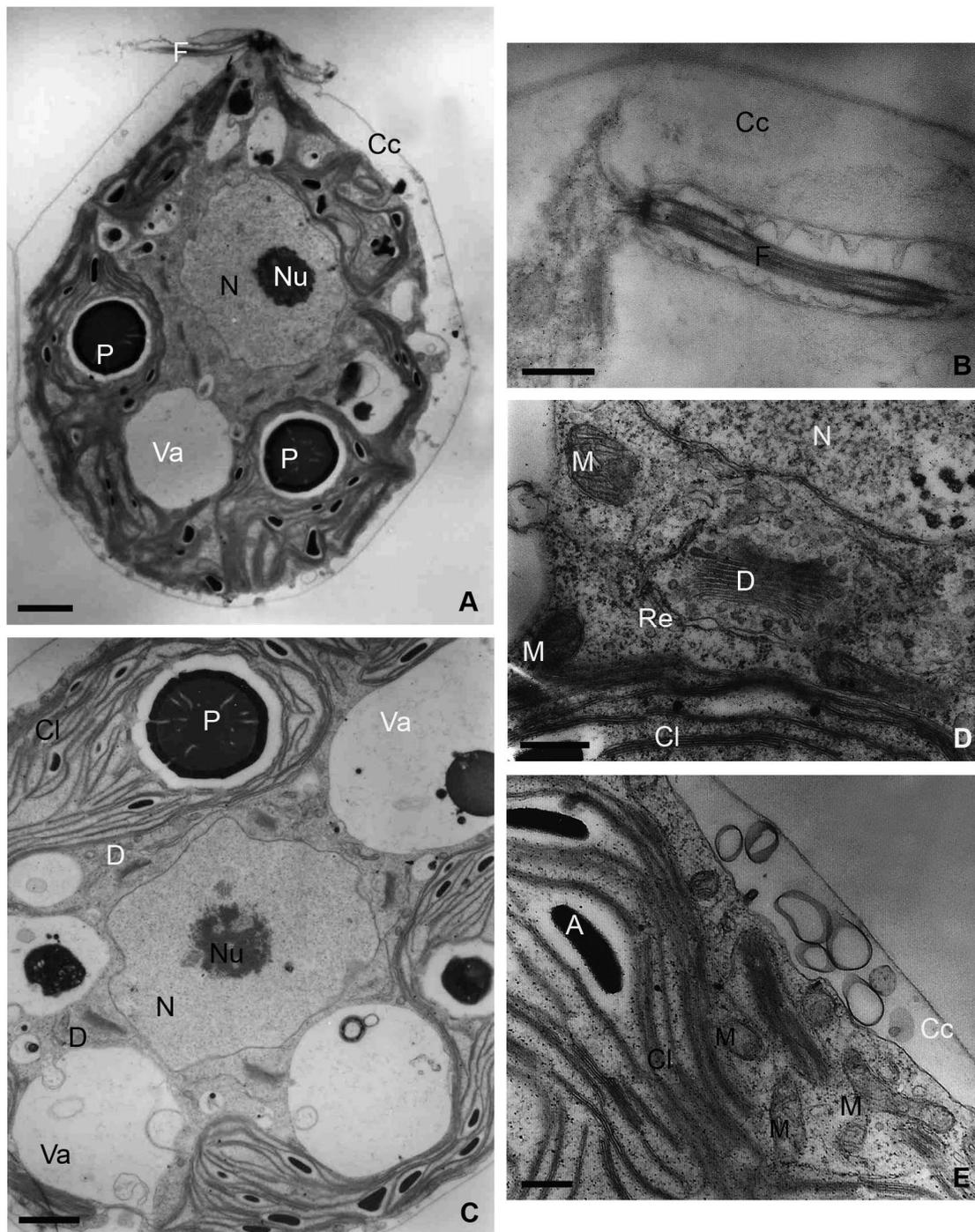
La representación diagramática de parte del ciclo de vida de *Haematococcus pluvialis* se presenta en la figura 46.

Durante la reproducción asexual las células vegetativas generalmente sufrían una división celular y originaron dos células hijas (Figs 46 A y 47 A). Algunas veces ocurrían dos divisiones celulares sucesivas, y se originaron 4 células hijas, también contenidas en la cubierta de la célula madre (Figs 46 A y 47 B - D). Durante las divisiones se mantenía, aunque reducido, el movimiento celular. La cubierta celular parenteral se expandía gradualmente y se rompía, con la consecuente liberación de las células hijas.

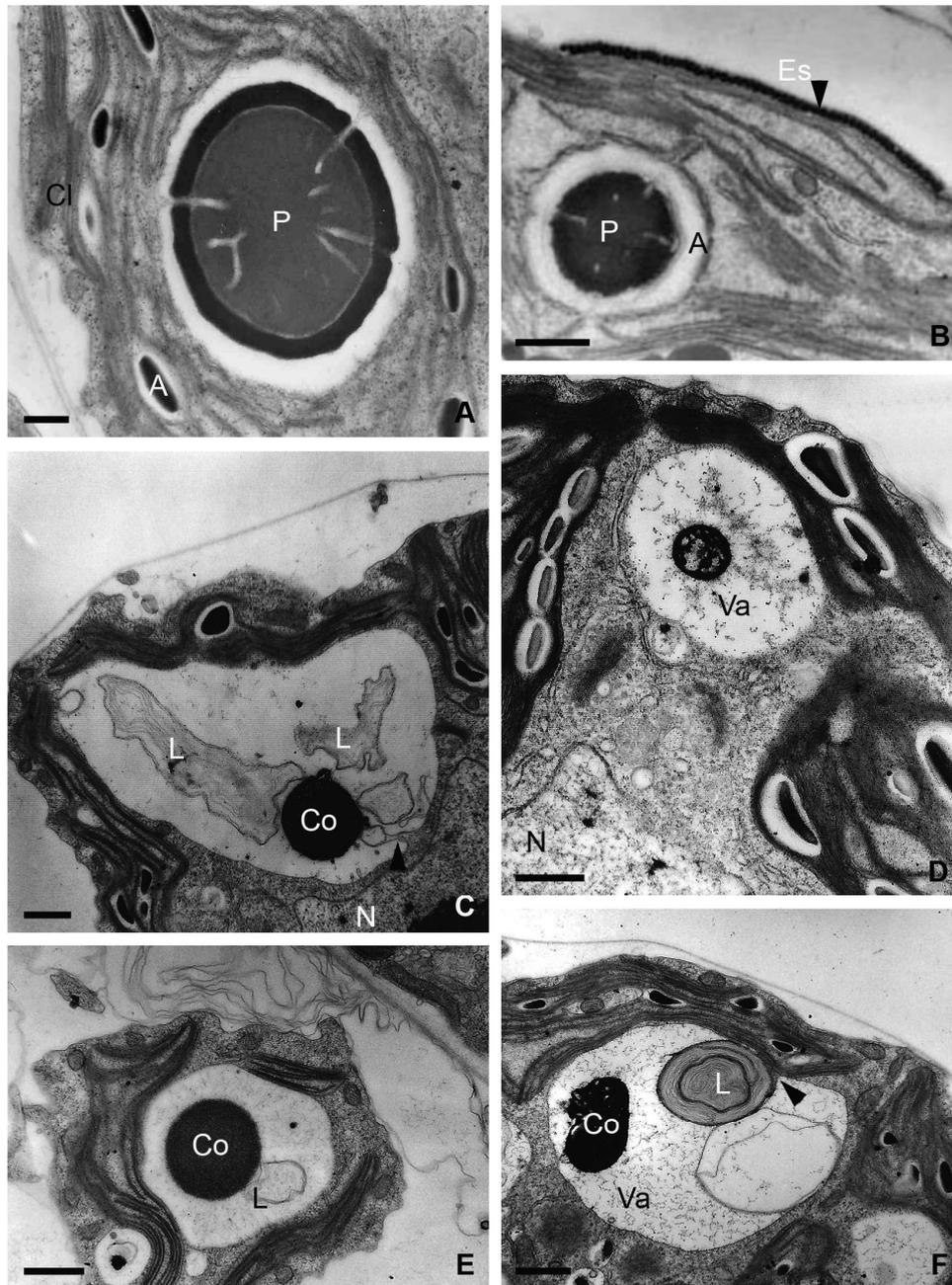
Las células biflageladas mantenidas bajo condiciones adversas se transformaban en cistos (Fig. 46 B). Los cistos germinaban originando zoósporas (Fig. 46 C), gametas (Fig. 46 D) o aplanósporas (Fig. 46 E), de acuerdo a las condiciones de cultivo descritas previamente. Reiteradas veces ocurría la liberación de gametas, sin embargo, nunca se observó conjugación de las mismas.



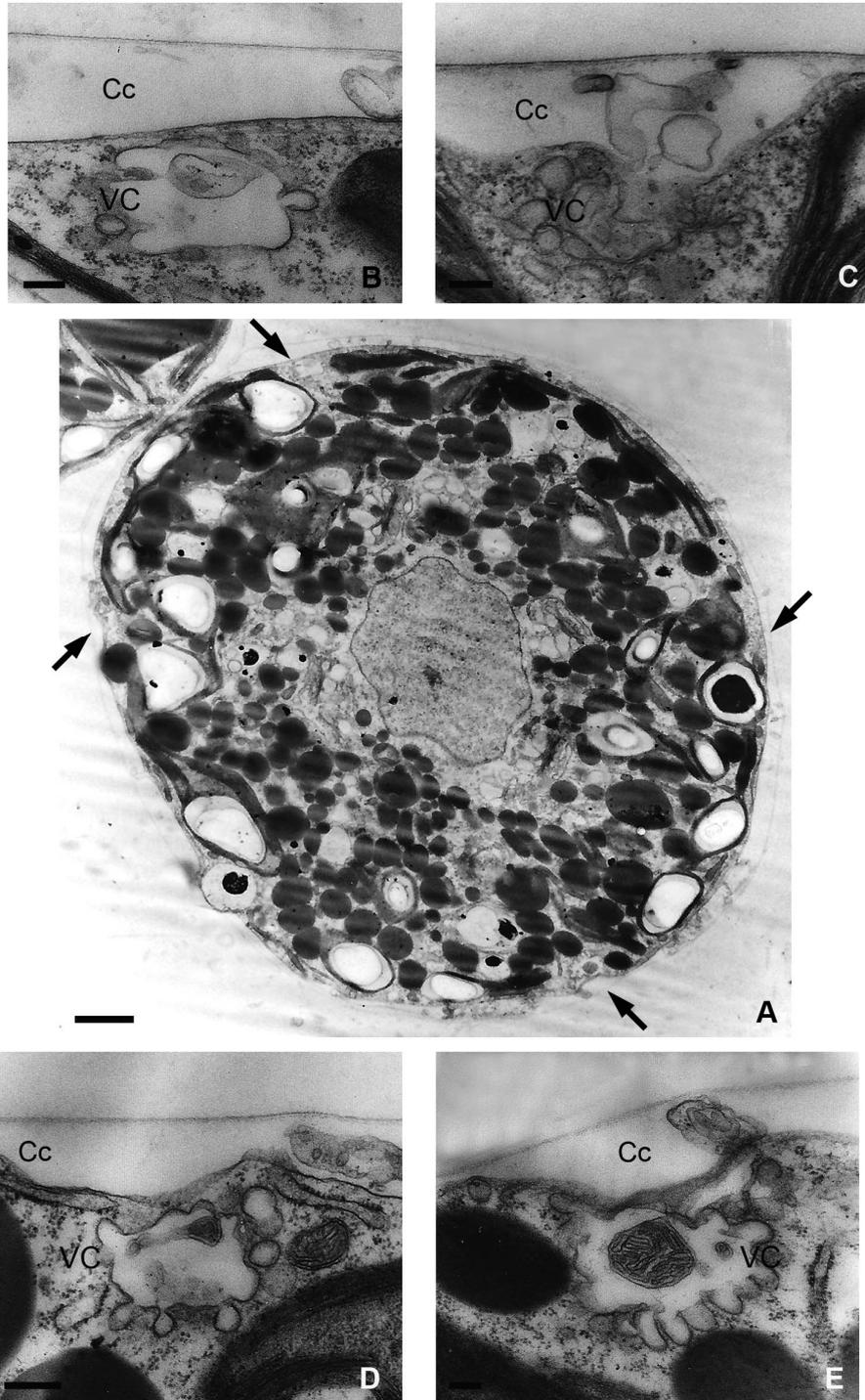
**Figura 9.** Células vegetativas de *Haematococcus pluvialis*. **A-B:** fotomicrografías ópticas. **A:** célula ovoide con dos flagelos apicales y cubierta celular refringente con finas hebras radiales. **B:** contraste de fases; notar el cloroplasto parietal con numerosos pirenoides. **C:** fotomicrografía electrónica de barrido. Vista general de una célula, los dos flagelos emergen de una papila apical y superan la longitud celular. Escala: 5  $\mu\text{m}$ .



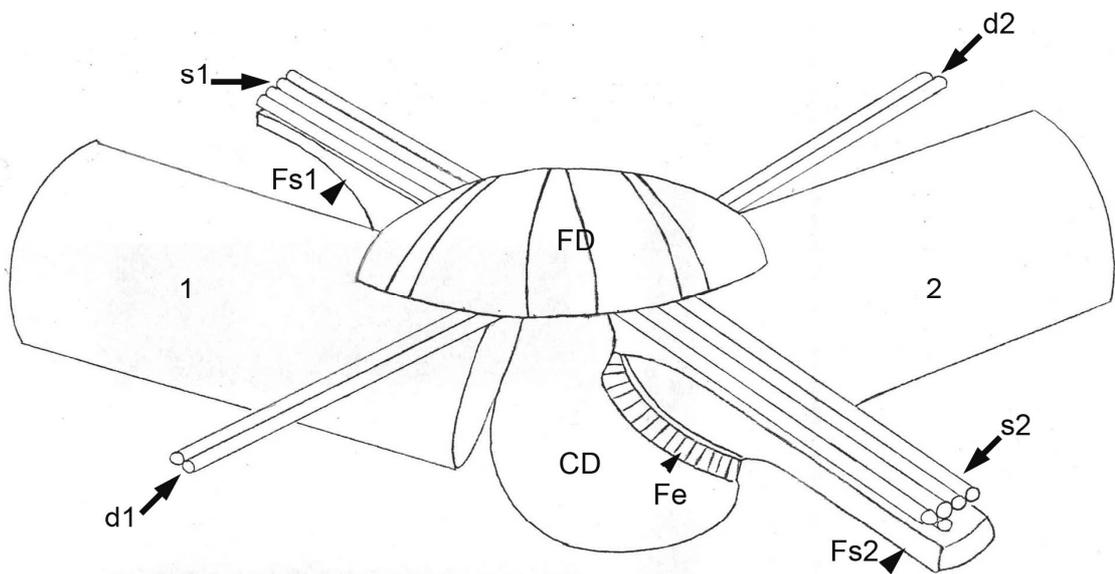
**Figura 10.** Ultraestructura de las células vegetativas de *Haematococcus pluvialis*. **A-E:** fotomicrografías electrónicas de transmisión. **A:** vista general de una célula; núcleo de posición anterior rodeado por numerosos dictiosomas y cloroplasto parietal con varios pirenoides. **B:** detalle de la inserción apical de un flagelo emergiendo a través de un orificio en la cubierta celular. **C:** detalle de una porción del citoplasma donde se observa el núcleo central, numerosas vacuolas rodeándolo y el estroma cloroplástico con lamelas formadas por 2-6 tilacoides, gránulos de almidón y un pirenoides. **D:** detalle de un dictiosoma; notar el retículo endoplasmático en asociación con la cara *cis* a través de vesículas de transición. **E:** detalle de una porción de citoplasma donde se observan numerosos perfiles mitocondriales adyacentes al plasmalema. Escalas: A,C= 2  $\mu$ m; B,D-E= 0,5  $\mu$ m. Abreviaturas. A: almidón, Cc: cubierta celular, Cl: cloroplasto. D: dictiosoma, F: flagelo, M: mitocondria, N: núcleo, Nu: nucléolo, P: pirenoides, Re: retículo endoplasmático, Va: vacuola.



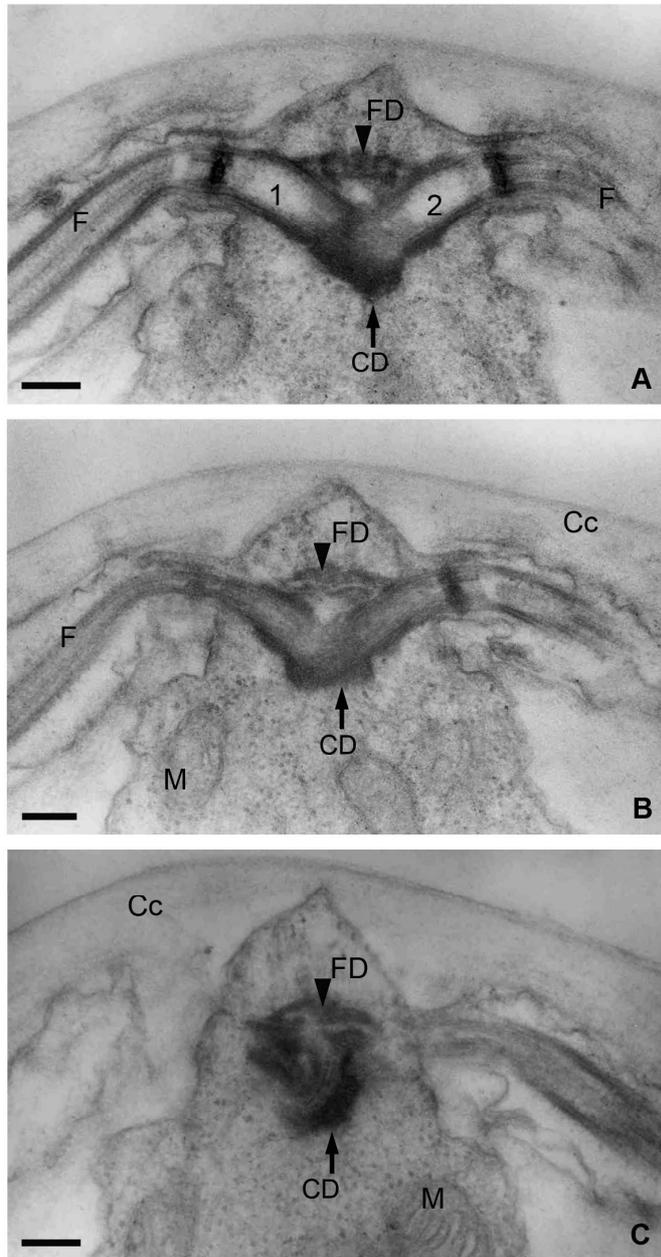
**Figura 11.** Ultraestructura de las células vegetativas de *Haematococcus pluvialis*. **A-F:** micrografías electrónicas de transmisión. **A:** detalle de un pirenoide mostrando la matriz penetrada por tilacoides dilatados y rodeada por casquetes de almidón de variado tamaño. **B:** detalle de un estigma intraplástico formado por una hilera de glóbulos lipídicos (punta de flecha). **C-F:** vacuolas con estructuras membranosas asociadas a los corpúsculos electrónicamente densos. La punta de flecha en la Fig. **C** indica una membrana en contacto con el tonoplasto. **D-F:** vacuolas con contenido de aspecto granular. La punta de flecha en la Fig. **F** indica un lomasoma en contacto con el tonoplasto. Escalas: A= 0,5  $\mu\text{m}$ ; B-F= 1  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas. A: almidón, Cl: cloroplasto, Co: corpúsculo electrónicamente denso, Es: estigma, L: lomasomas, N: núcleo, P: pirenoide, Va: vacuola.



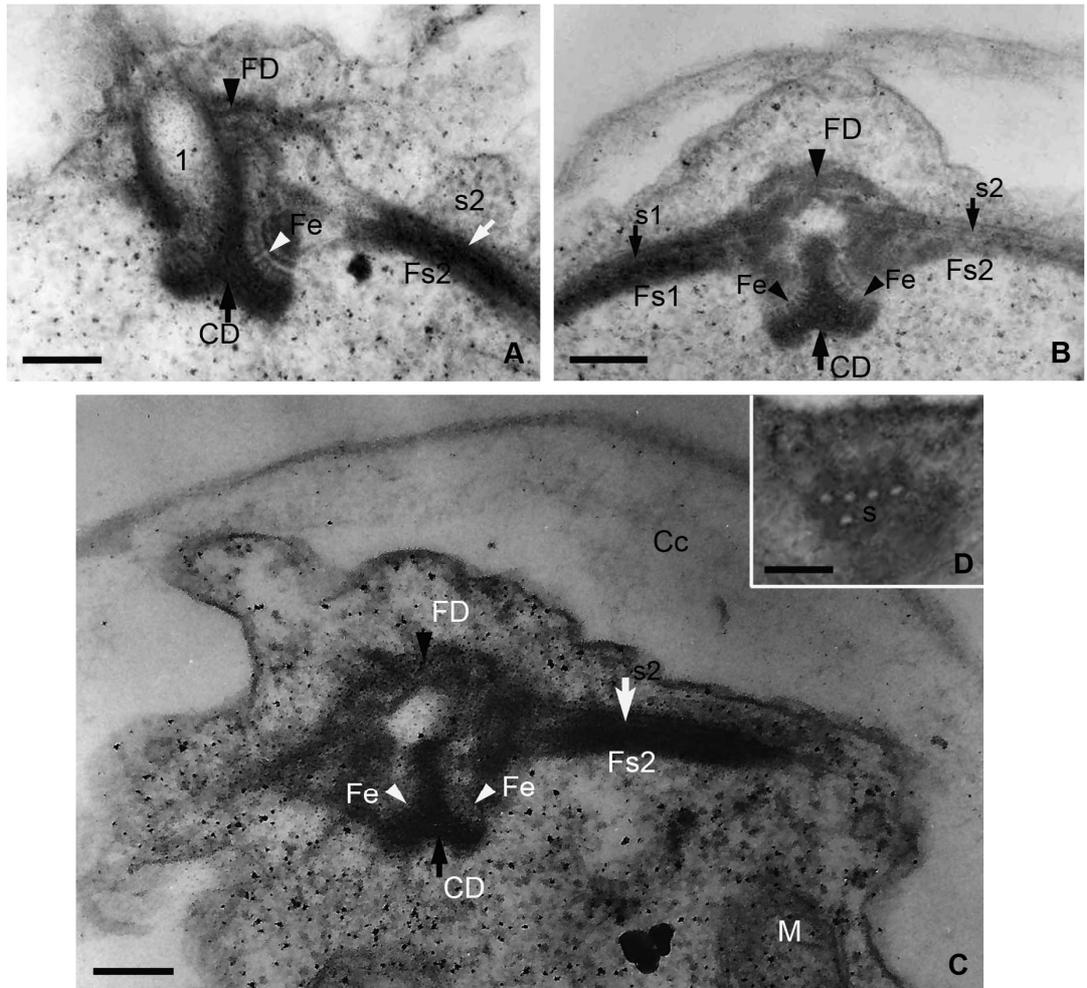
**Figura 12.** Ultraestructura de las vacuolas contráctiles de *Haematococcus pluvialis*. **A-E:** micrografías electrónicas de transmisión. **A:** vista general de una célula vegetativa, las flechas indican las cuatro vacuolas contráctiles. **B-E:** detalle de las vacuolas contráctiles. Escalas: A= 2  $\mu$ m; B-E= 0,2  $\mu$ m. Abreviaturas. Cc: cubierta celular, VC: vacuola contráctil.



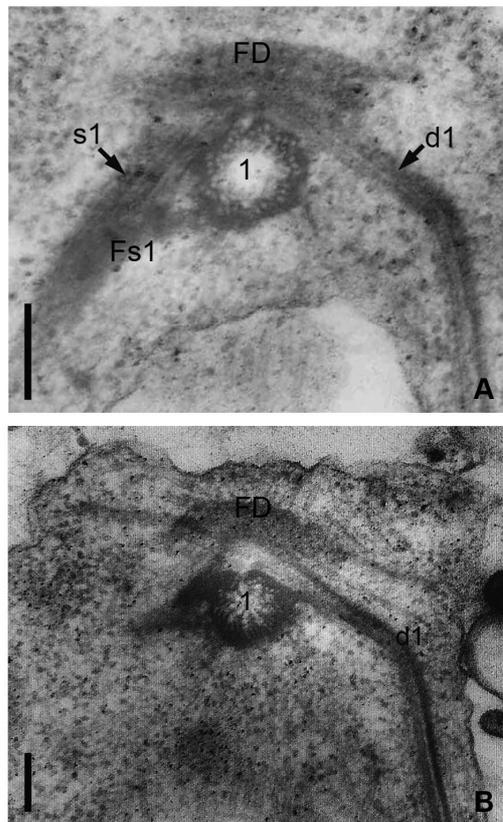
**Figura 13.** Reconstrucción tridimensional del aparato flagelar de *Haematococcus pluvialis*. Se omitieron los cuerpos basales no axonémicos.  
 Abreviaturas. CD: cuerpo denso, d: raicilla microtubular de 2 microtúbulos, FD: fibra distal, Fe: fibra estriada, Fs: fibra no estriada, s: raicilla microtubular de 5 microtúbulos, 1 y 2: cuerpos basales axonémicos o principales.



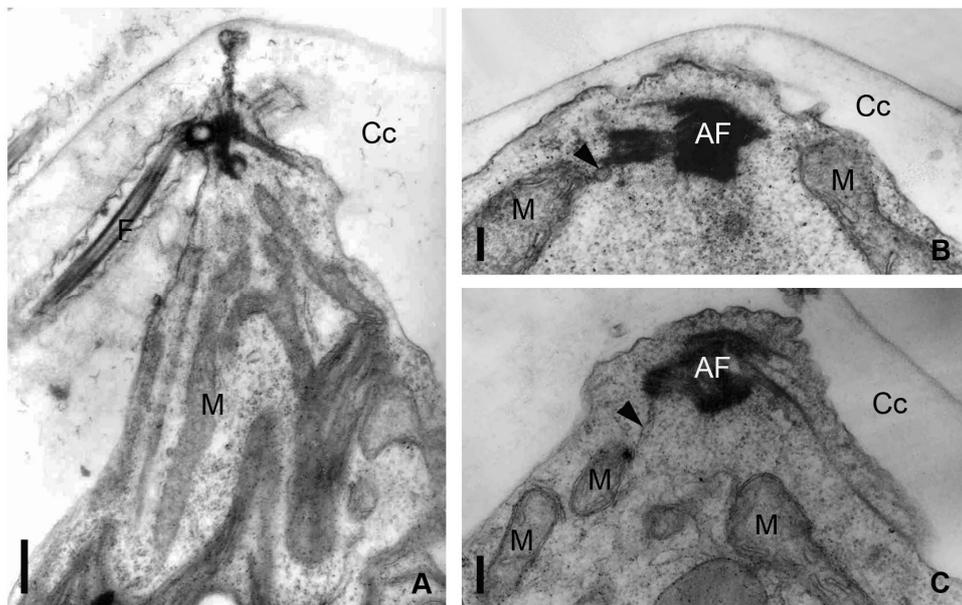
**Figura 14.** Aparato flagelar de una célula vegetativa de *Haematococcus pluvialis*. **A-C:** micrografías electrónicas de secciones seriadas longitudinales frontales contiguas. Los flagelos emergen a partir de una papila apical y una fibra distal estriada conecta los cuerpos basales principales en su parte superior. Escala: 0,2  $\mu$ m. Abreviaturas. Cc: cubierta celular, CD: cuerpo denso, FD: fibra distal, F: flagelo, M: mitocondria. 1,2: cuerpos basales axonémicos o principales.



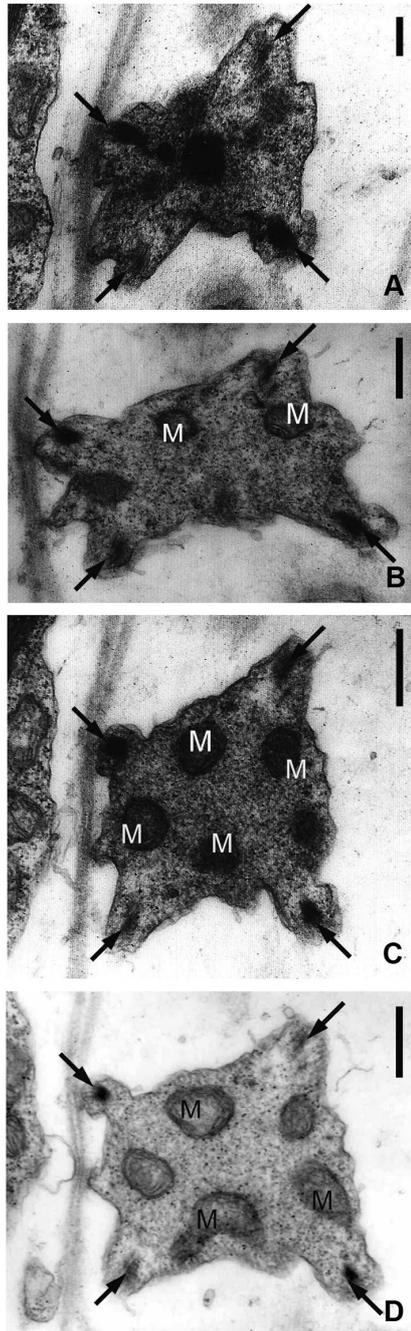
**Figura 15.** Aparato flagelar de *Haematococcus pluvialis*. **A-C:** micrografías electrónicas de secciones longitudinales frontales. Notar en la Fig. **A** el cuerpo denso ocluyendo el extremo proximal del cuerpo basal 1. Una fibra estriada conecta el cuerpo denso con el nacimiento de la raicilla microtubular s. **B-C:** dos fibras estriadas en conexión con el cuerpo denso y cada raicilla microtubular s; notar cada raicilla s acompañada en toda su trayectoria por una fibra no estriada. **D:** corte transversal a nivel de la raicilla microtubular s, formada por 5 microtúbulos, con una disposición (4:1). Escalas: A-B= 0,2  $\mu\text{m}$ ; C= 2  $\mu\text{m}$ ; D= 0,1  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas. Cc: cubierta celular, CD: cuerpo denso, FD: fibra distal, Fe: fibra estriada, Fs1: fibra no estriada de s1, Fs2: fibra no estriada de s2, M: mitocondria, s1: raicilla microtubular 1, s2: raicilla microtubular 2, 1: cuerpo basal axonémico.



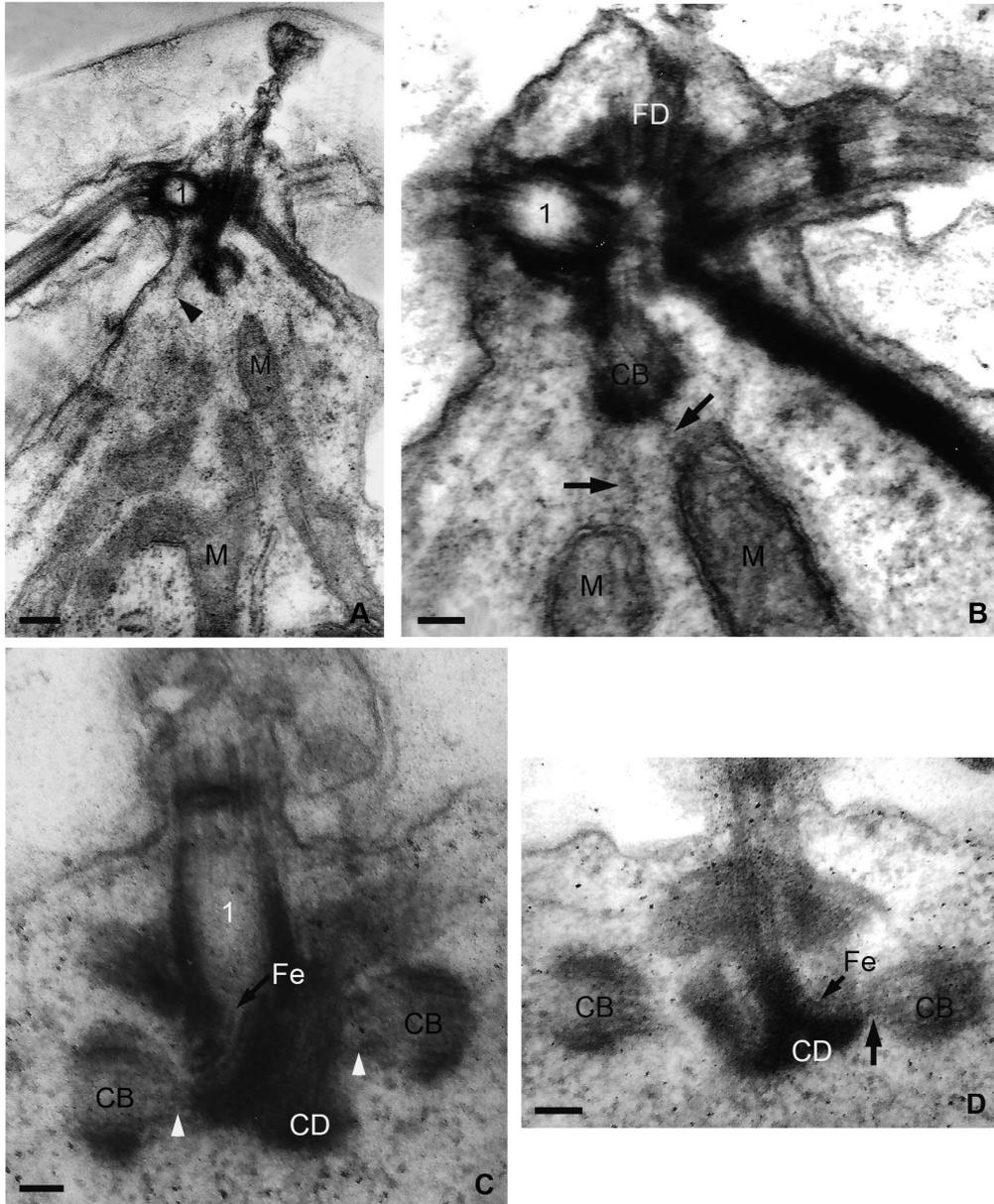
**Figura 16.** Aparato flagelar de *Haematococcus pluvialis*. **A-B:** micrografías electrónicas de secciones transversales al cuerpo basal 1; notar que las raicillas s y d nacen por debajo de la fibra distal. Escala: 0,2  $\mu$ m.  
 Abreviaturas. d: raicilla microtubular de dos microtúbulos, FD: fibra distal, Fs: fibra no estriada, s: raicilla microtubular de cinco microtúbulos. 1: cuerpo basal axonémico.



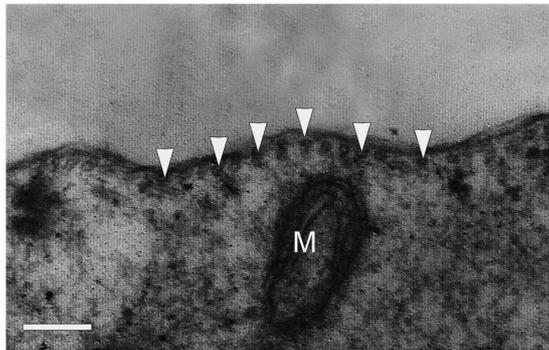
**Figura 17.** Conexión del aparato flagelar de *Haematococcus pluvialis* con lobulaciones digitiformes de la mitocondria. **A-C:** micrografías electrónicas. **A:** vista general del extremo anterior de una célula. **B-C:** detalles de la unión del aparato flagelar con la mitocondria a través de membranas (punta de flecha). Escalas: A= 0,5  $\mu\text{m}$ ; B-C= 0,2  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas. AF: aparato flagelar, Cc: cubierta celular, F: flagelo, M: mitocondria.



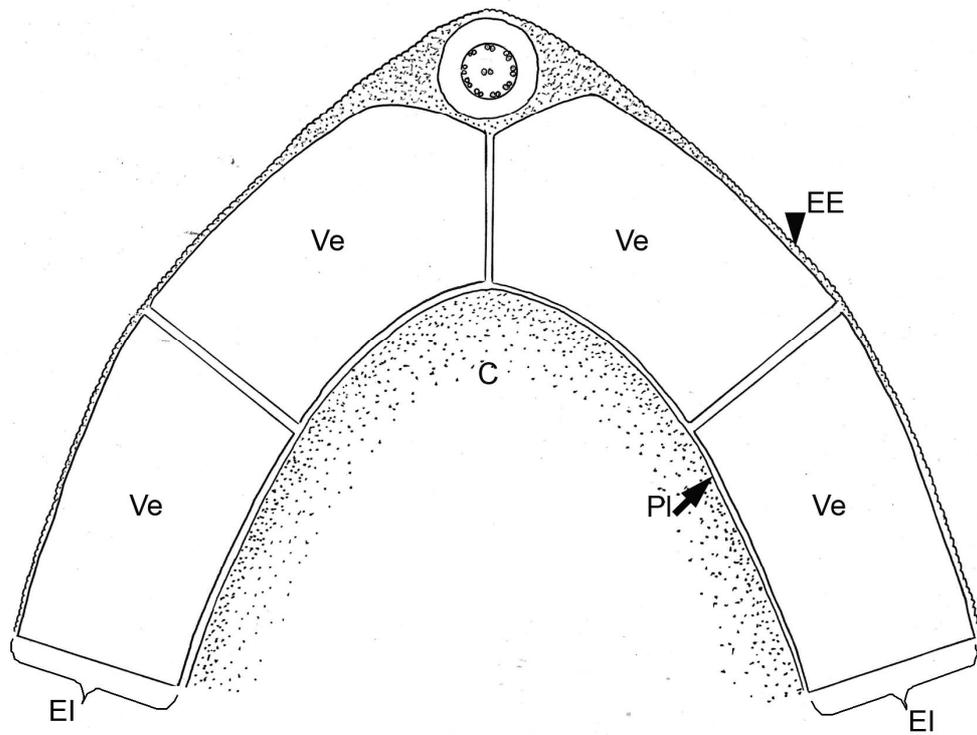
**Figura 18.** Perfiles mitocondriales y las cuatro raicillas microtubulares en *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** micrografías electrónicas de secciones seriadas transversales por el extremo anterior de una célula. Las flechas indican las raicillas microtubulares. Escalas: A= 0,2  $\mu\text{m}$ ; B-D= 0,5  $\mu\text{m}$ . Abreviatura. M: mitocondria.



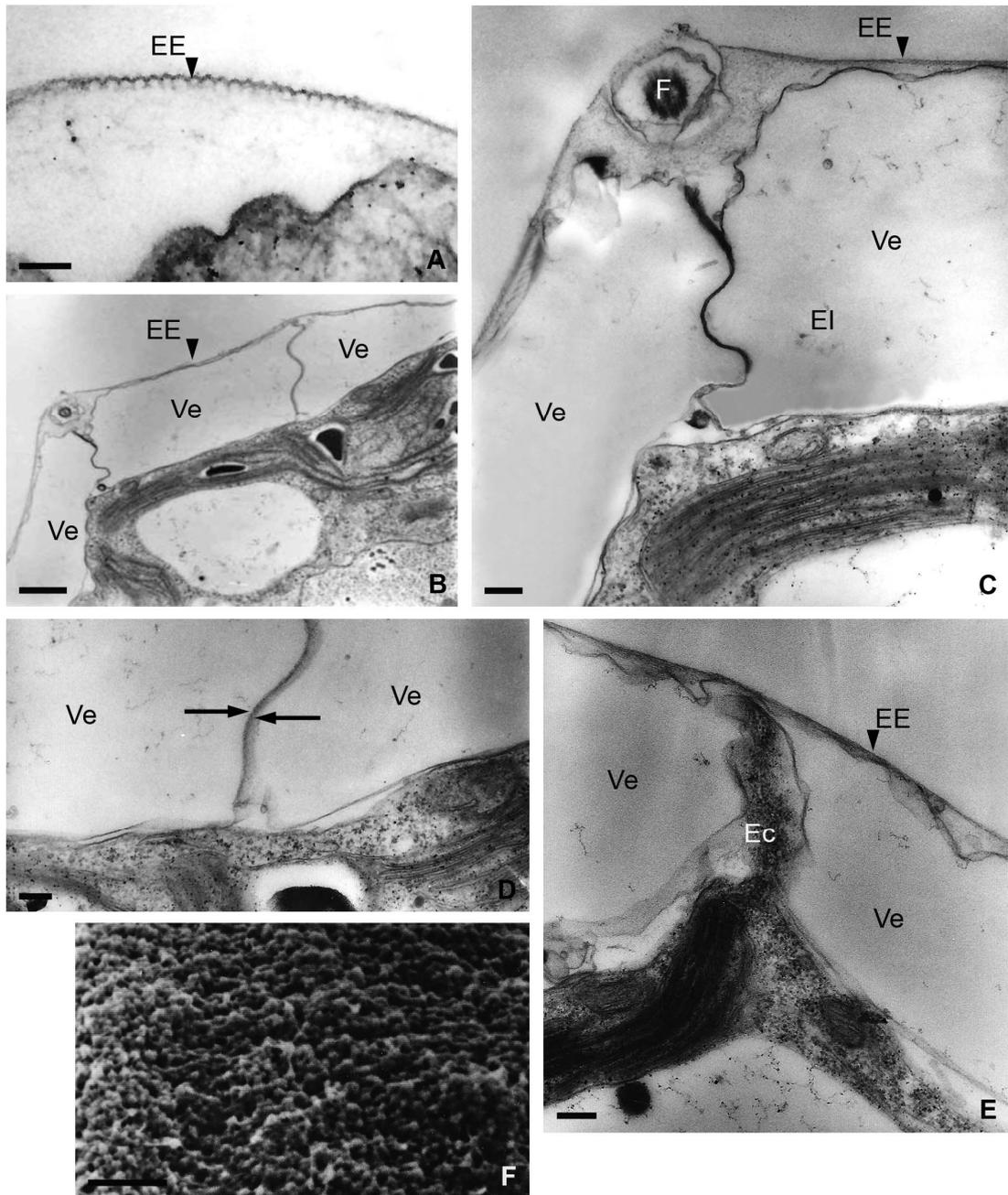
**Figura 19.** Aparato flagelar de *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** micrografías electrónicas. **A:** vista general del extremo anterior de una célula donde se observa la unión de un cuerpo basal no axonémico con el aparato flagelar y la mitocondria (punta de flecha). **B:** detalle de la unión del cuerpo basal no axonémico con el aparato flagelar y dos lobulaciones de la mitocondria (flechas). **C:** detalle de la unión de los dos cuerpos basales no axonémicos con el aparato flagelar (puntas de flecha). **D:** la flecha indica la unión de un cuerpo basal no axonémico con el aparato flagelar, a través del cuerpo denso y la fibra estriada. Escalas: A= 0,2  $\mu\text{m}$ ; B-D= 0,1  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas. CB: cuerpo basal no axonémico, CD: cuerpo denso, FD: fibra distal, Fe: fibra estriada, M: mitocondria, 1: cuerpo basal axonémico.



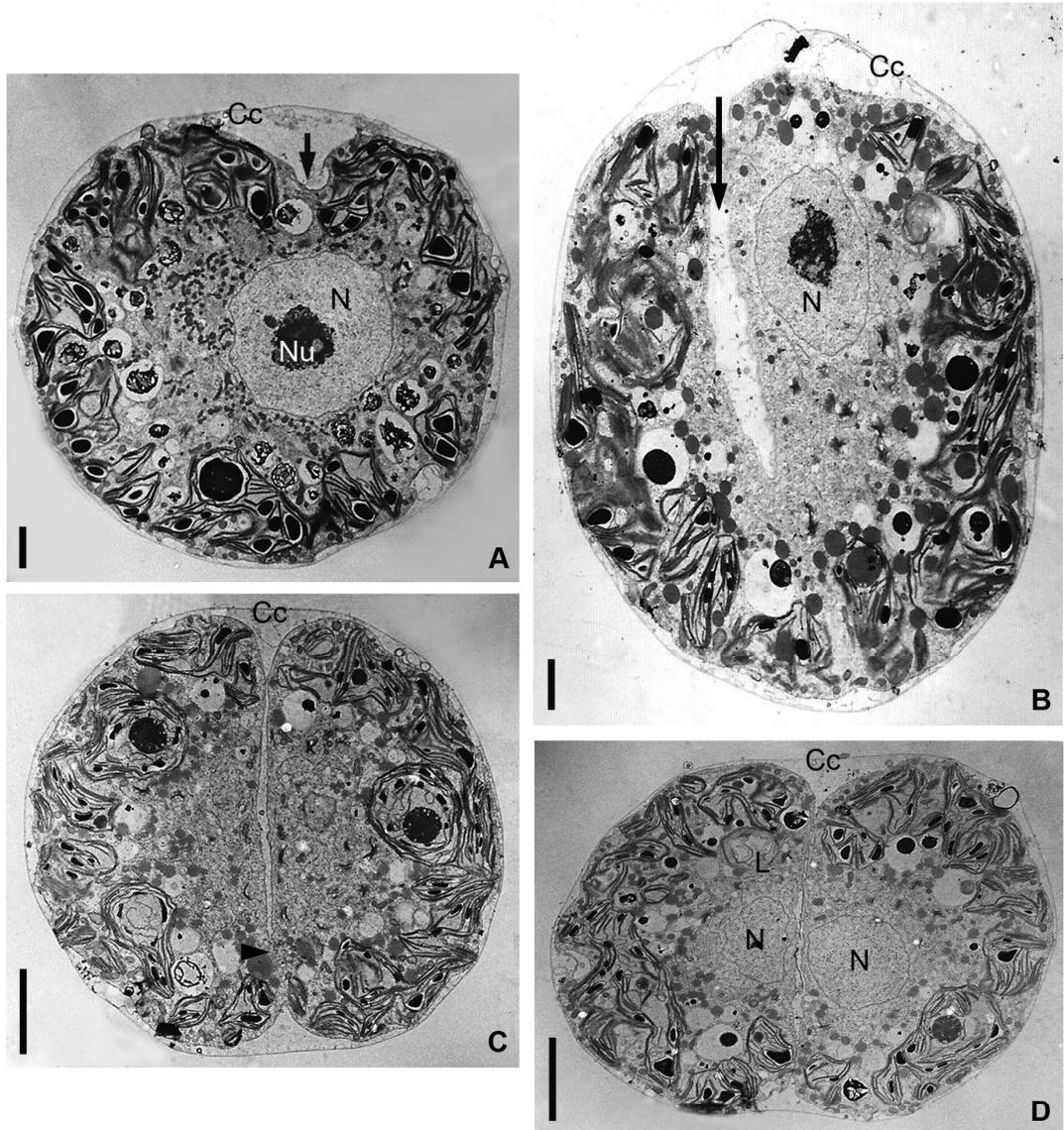
**Figura 20.** Microtúbulos citoesqueletales adyacentes al plasmalema en *Haematococcus pluvialis* (puntas de flecha). Micrografía electrónica. Escala: 0,2  $\mu\text{m}$ .  
Abreviatura. M: mitocondria



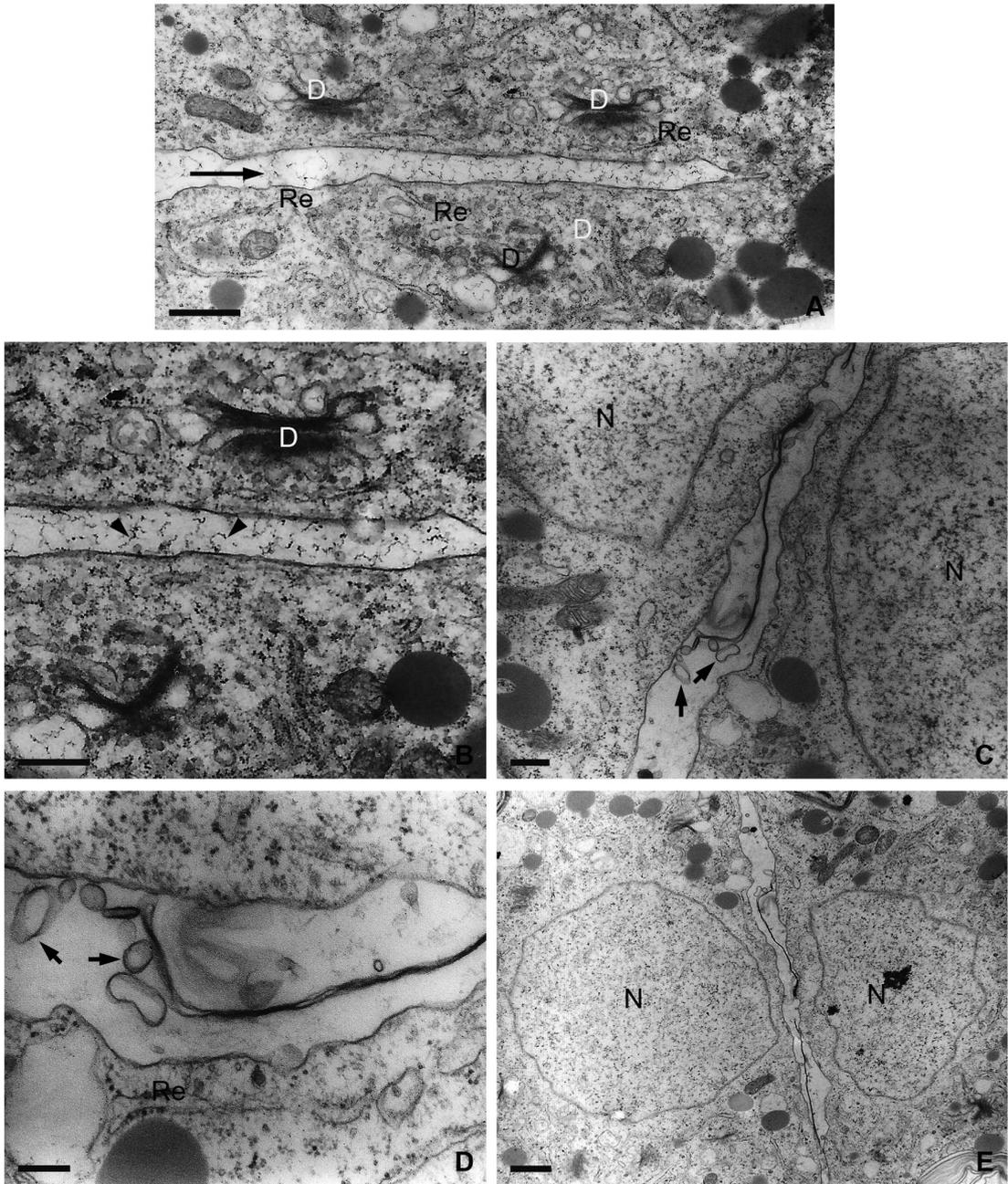
**Figura 21.** Representación esquemática de la cubierta celular de la porción apical de una célula de *Haematococcus pluvialis*.  
Abreviaturas. C: citoplasma, EE: estrato externo, EI: estrato interno, Pl: plasmalema, Ve: vesícula.



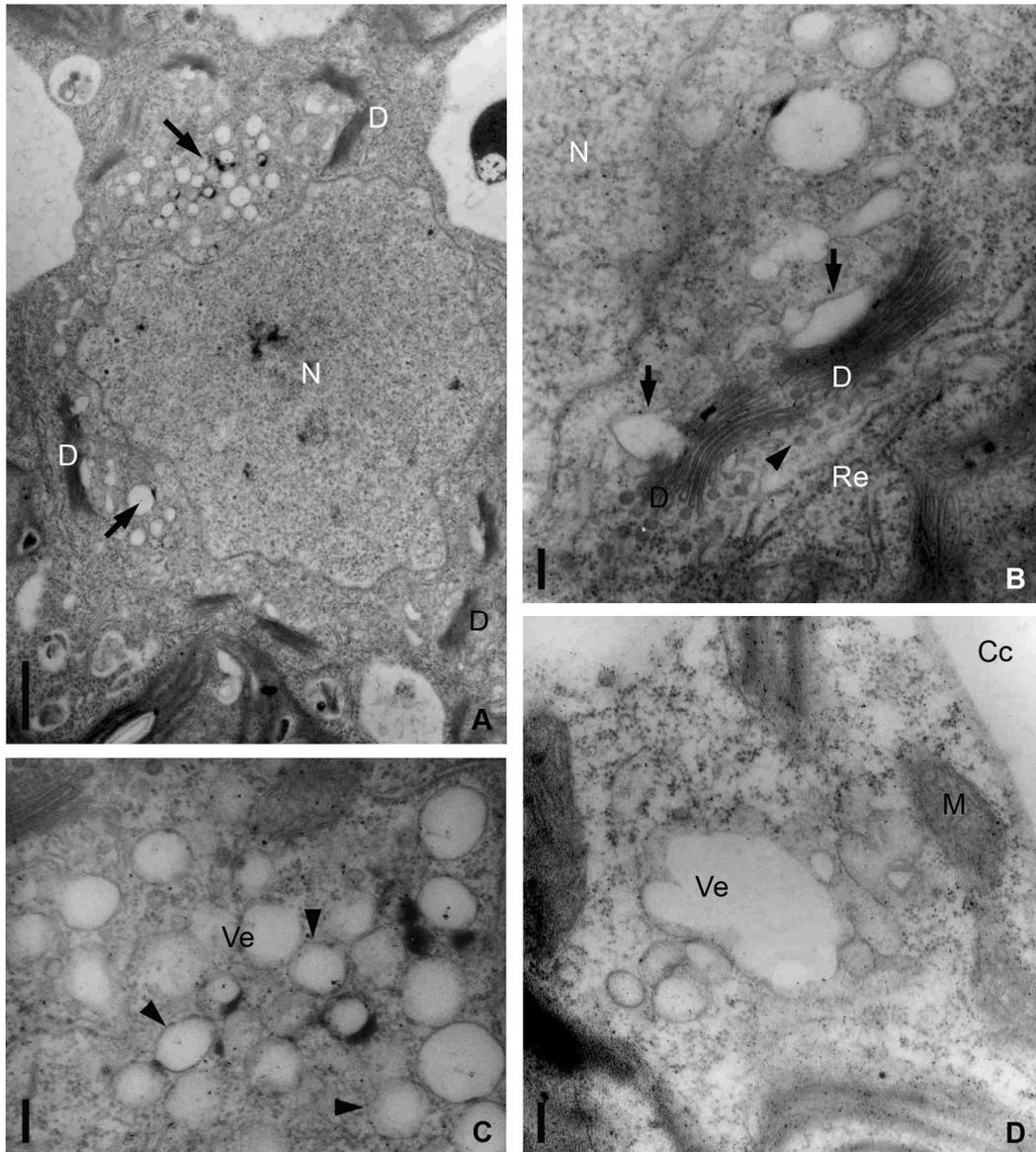
**Figura 22.** Estructura fina de la cubierta celular de *Haematococcus pluvialis*. **A-E:** micrografías electrónicas de transmisión. **A:** detalle del estrato externo; notar el contorno ondulado y de aspecto fibrilar. **B:** porción anterior de la célula donde se observa la cubierta celular formada por un estrato externo y un estrato interno con vesículas. **C:** detalle de **B**; notar el contenido electrónicamente translúcido de las vesículas del estrato interno. **D:** detalle de las membranas de vesículas contiguas muy próximas entre sí (flechas). **E:** evaginación citoplasmática tubular entre dos vesículas. **F:** micrografía electrónica de barrido de la cubierta celular; notar la superficie irregular constituida por pequeñas crestas. Escalas: A= 0,1  $\mu$ m; B, F= 1  $\mu$ m; C-E= 0,2  $\mu$ m. Abreviaturas. Ec: evaginación citoplasmática, EE: estrato externo, EI: estrato interno, F: flagelo, Ve: vesícula.



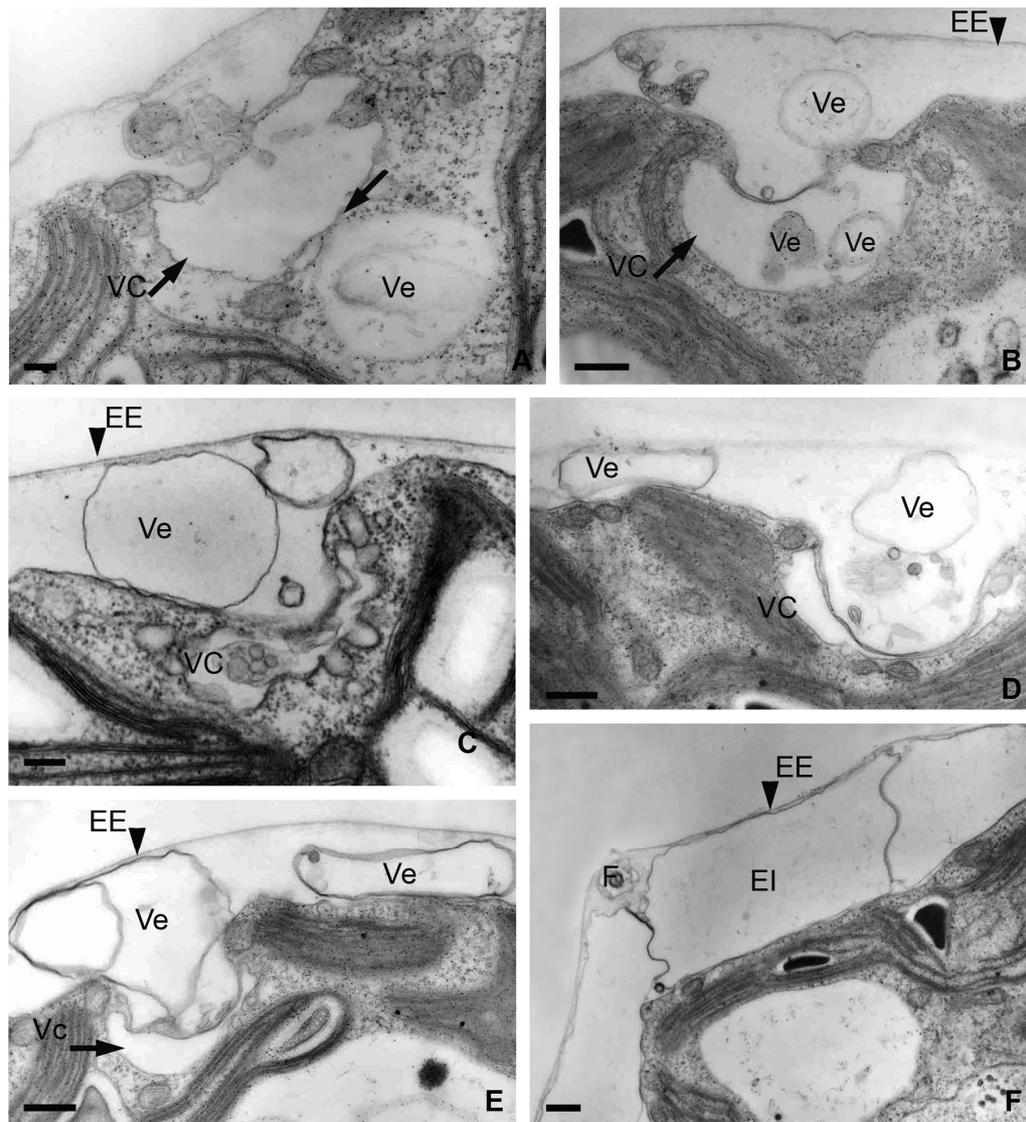
**Figura 23.** División celular en *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** micrografías electrónicas. **A:** vista general de una célula de mayor tamaño y redondeada; notar el inicio del surco de clivaje desde el extremo apical de la célula (flecha). **B:** vista general de una célula en un estado más avanzado de la división celular, la flecha indica el progreso del surco de clivaje. **C:** vista general de dos células hijas unidas por una pequeña porción de citoplasma (punta de flecha). **D:** ambas células hijas totalmente divididas, aún por dentro de la pared de la célula madre. Escalas: A-B= 2  $\mu$ m; C-D= 5  $\mu$ m. Abreviaturas: Cc: cubierta celular de la célula madre, L: lomasomas, N: núcleo, Nu: nucléolo.



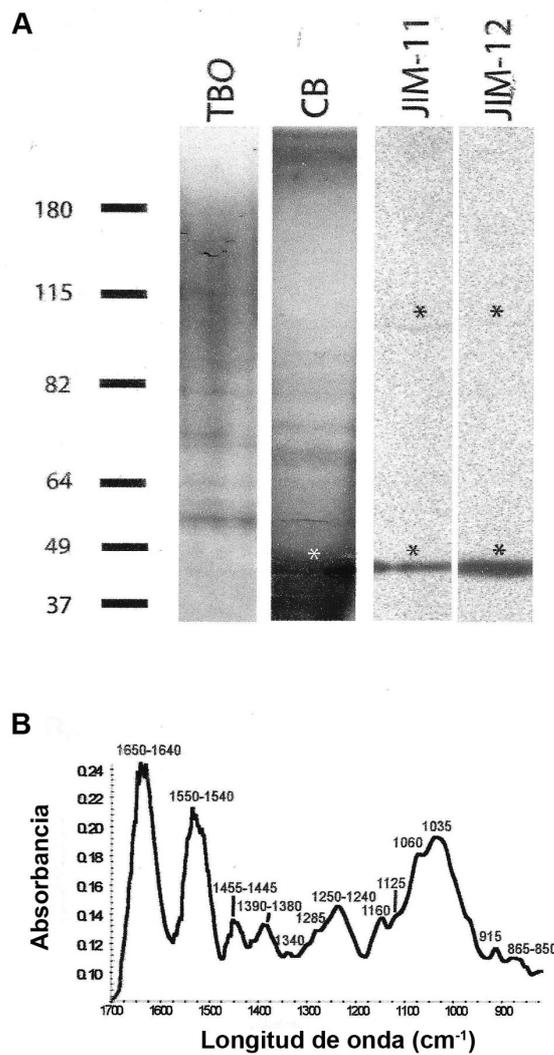
**Figura 24.** División celular y formación de la cubierta celular en *Haematococcus pluvialis*. **A-E:** micrografías electrónicas. **A:** varios dictiosomas y retículo endoplasmático próximos al surco de clivaje (flecha). **B:** detalle de **A**; material fibrilar entre las dos células hijas (punta de flecha). **C-D:** vesículas dispuestas en hilera (flechas), entre las dos células hijas. **D:** detalle de **C**. **E:** detalle de una célula finalizada la división nuclear. Escalas: A, E= 1  $\mu$ m; B-C= 0,5  $\mu$ m; D= 0,2  $\mu$ m. Abreviaturas. D: dictiosoma, N: núcleo, Re: retículo endoplasmático.



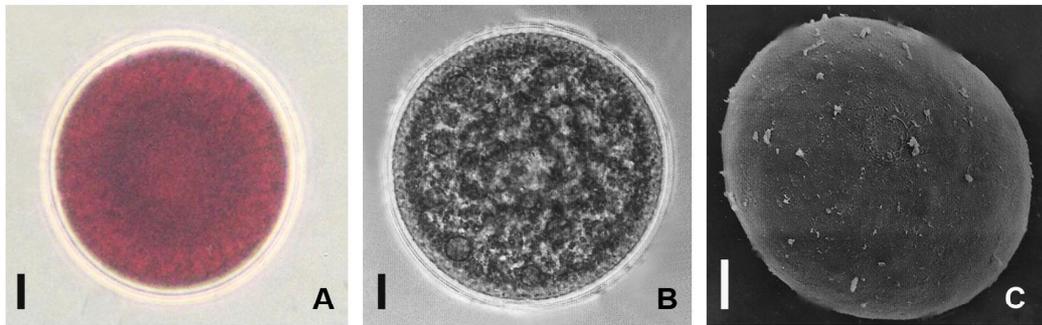
**Figura 25.** Formación de la cubierta celular en *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** micrografías electrónicas. **A:** vista general del núcleo rodeado por dictiosomas y vesículas asociadas (flechas). **B:** detalle de **A**; notar las vesículas de transición entre el retículo endoplasmático y la cara *cis* de los dictiosomas (punta de flecha) y vesículas de mayor tamaño en la cara *trans* (flechas). **C:** detalle de las vesículas electrónicamente translúcidas (puntas de flecha). **D:** fusión de las vesículas. Escalas: A= 1  $\mu$ m; B-D= 0,2  $\mu$ m. Abreviaturas. Cc: cubierta celular, D: dictiosoma, M: mitocondria, N: núcleo, Re: retículo endoplásmico, Ve: vesícula.



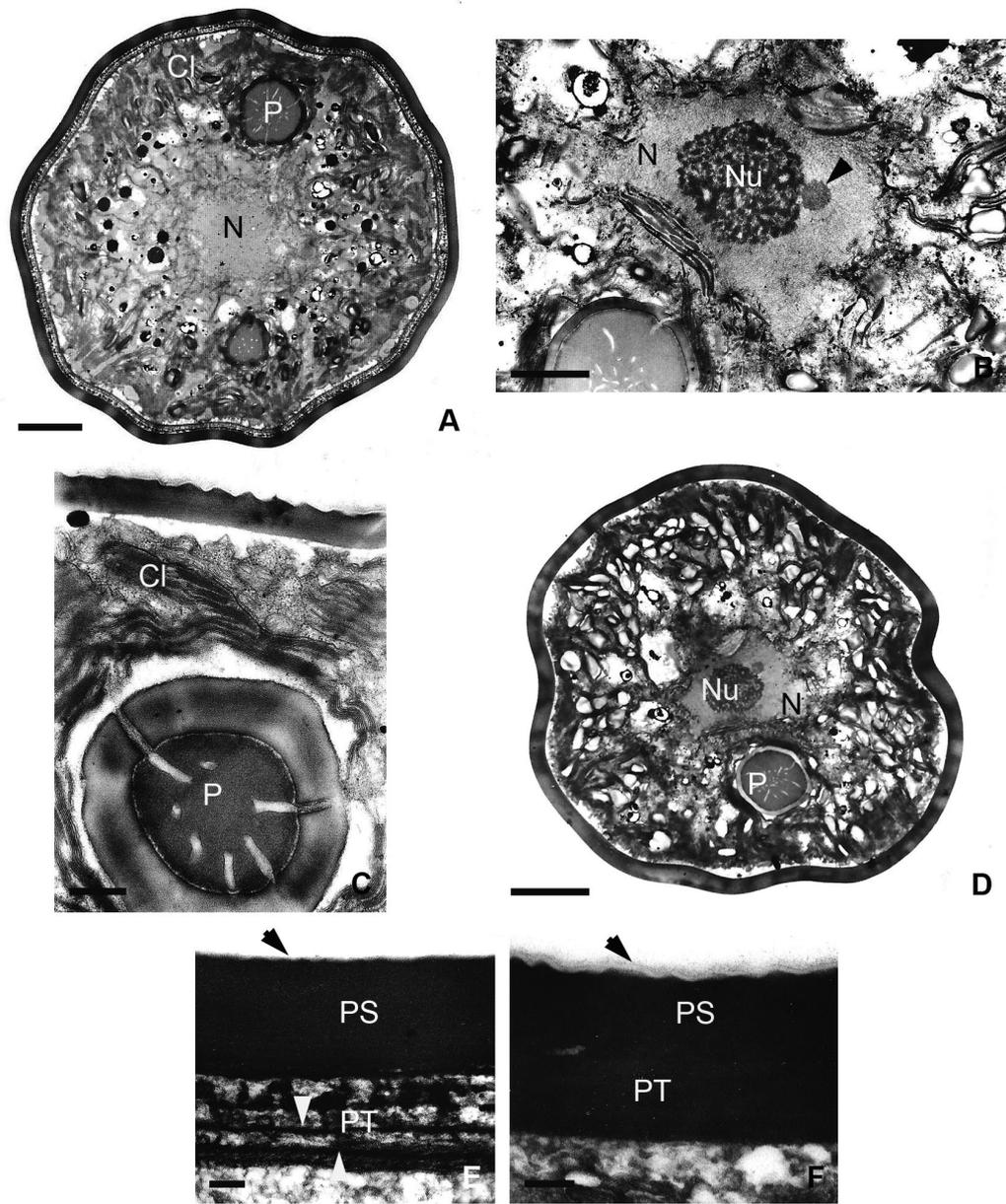
**Figura 26.** Formación de la cubierta celular en *Haematococcus pluvialis*. **A-F:** micrografías electrónicas. **A:** detalle de una vesícula en íntimo contacto con una vacuola contráctil expandida (flecha). **B:** vacuola contráctil conteniendo en su interior vesículas de variada densidad electrónica. **C-E:** vacuolas contráctiles contraídas y vesículas electrónicamente translúcidas ocupando el espacio periplasmático. **F:** cubierta celular completamente formada por el estrato interno y el estrato externo. Escalas: A y C= 0,2  $\mu\text{m}$ ; B, D-F= 0,5  $\mu\text{m}$ .  
 Abreviaturas. EE: estrato externo, EI: estrato interno, F: flagelo, VC: vacuola contráctil, Ve: vesícula.



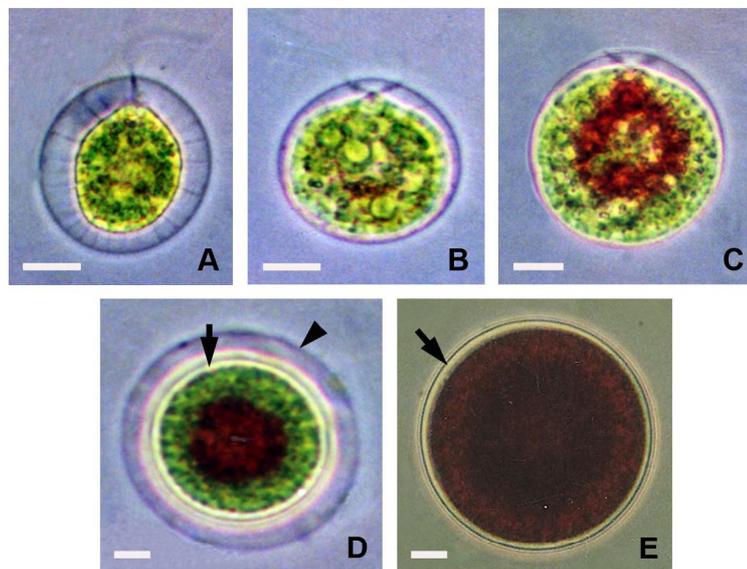
**Figura 27.** Caracterización química de la cubierta celular de *Haematococcus pluvialis*. **A:** ensayo Western Blot; se observa la presencia de dos bandas: a 50 kDa, correspondiente a extensina y a 100 kDa, correspondiente a uniones cruzadas de dímeros de extensina. **B:** espectro infrarrojo; notar las bandas a 1650 y 1550  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos amidas I y II.



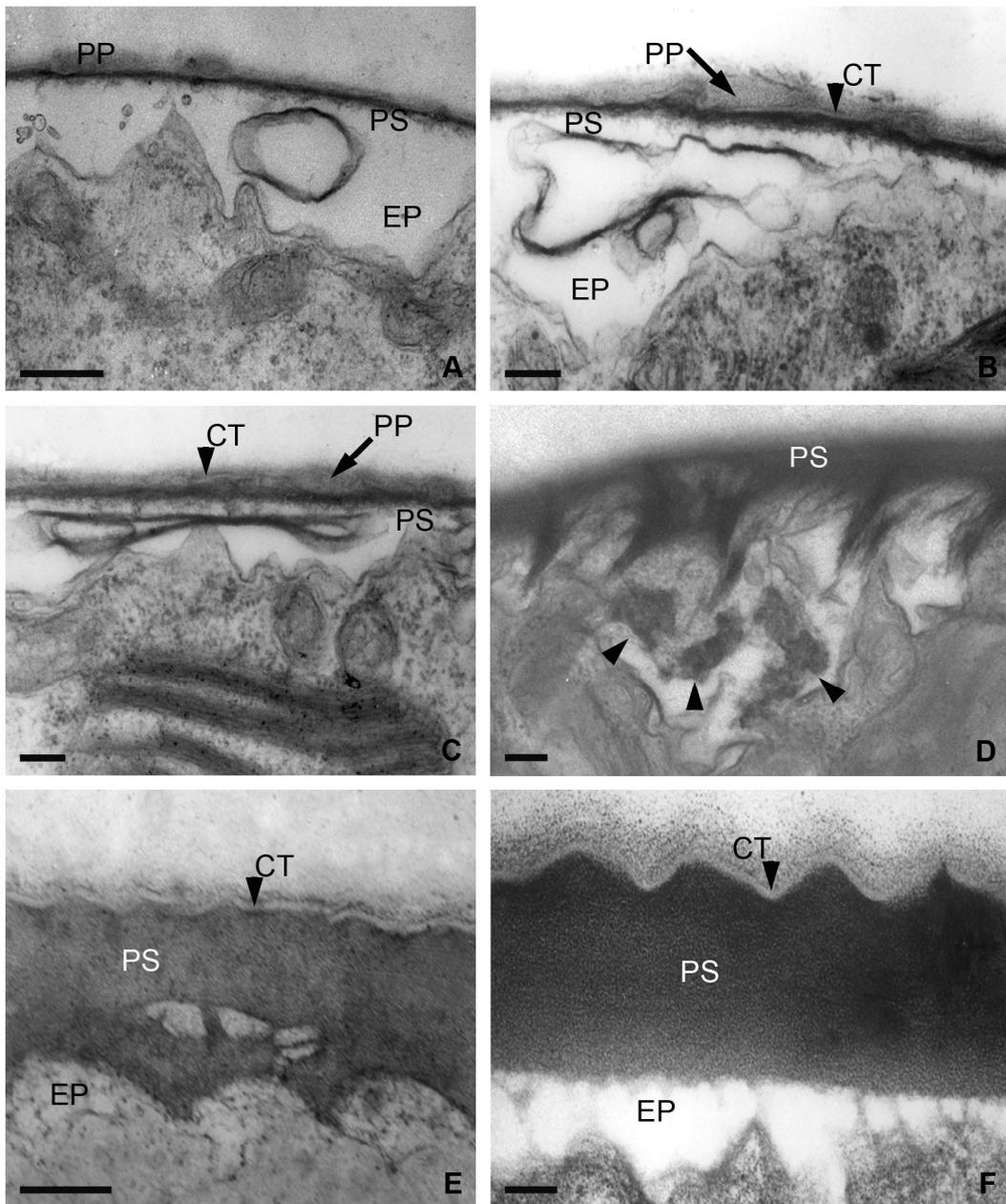
**Figura 28.** Cistos de *Haematococcus pluvialis*. **A-B:** micrografías ópticas; notar en **A** la coloración rojiza debido a la presencia de astaxantina. **C:** micrografía electrónica de barrido. Escala: 5  $\mu\text{m}$ .



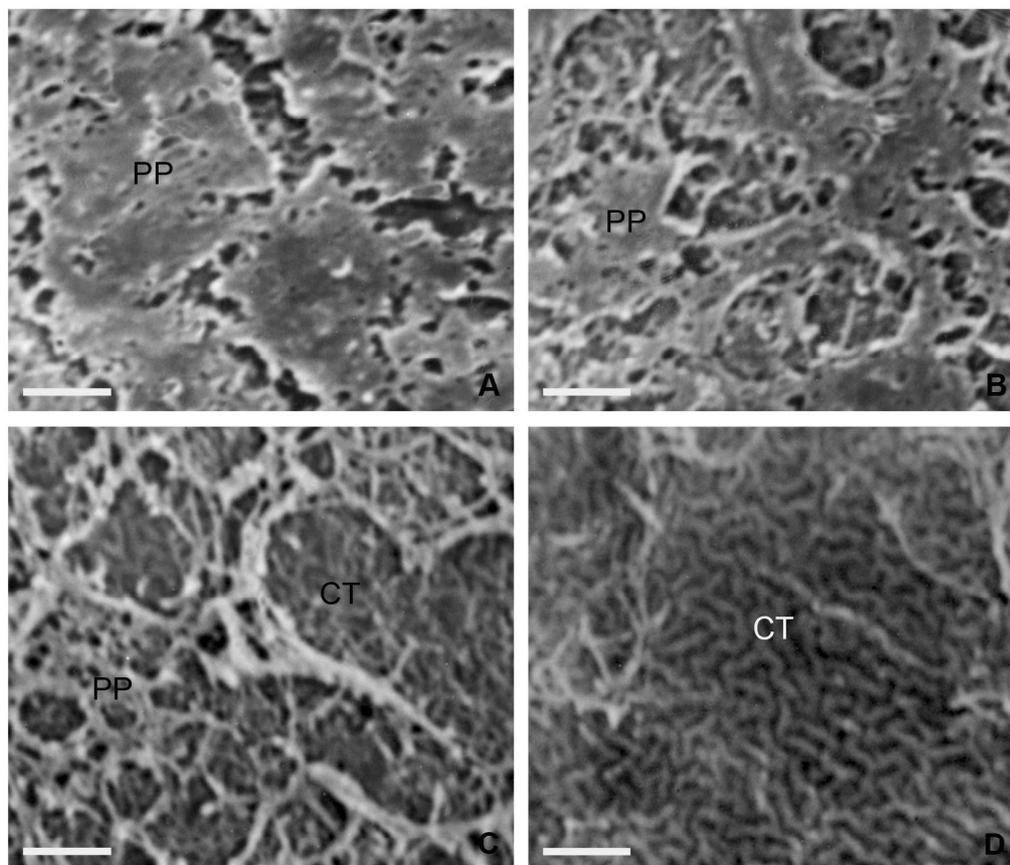
**Figura 29.** Ultraestructura de los cistos de *Haematococcus pluvialis*. **A-F:** fotomicrografías electrónicas de transmisión. **A:** vista general de un cisto de 4 semanas; notar el núcleo de posición central. **B:** detalle del núcleo en el que se observa un corpúsculo paranuclear adyacente al nucléolo (punta de flecha). **C:** detalle de una porción del cloroplasto parietal y del pirenoide. **D:** vista general de un cisto en un estadio más avanzado. **E:** detalle de la pared formada por tres componentes: capa trilaminar (flecha), pared secundaria y pared terciaria; notar los estratos de la pared terciaria (puntas de flecha). **F:** detalle de la pared formada por tres componentes; notar el aspecto homogéneo y compacto de la pared terciaria. Escalas: A, D= 5  $\mu$ m; B= 2  $\mu$ m; C= 0,5  $\mu$ m; E-F= 0,2  $\mu$ m. Abreviaturas. Cl: cloroplasto, N: núcleo, Nu: nucléolo, P: pirenoide, PS: pared secundaria, PT: pared terciaria.



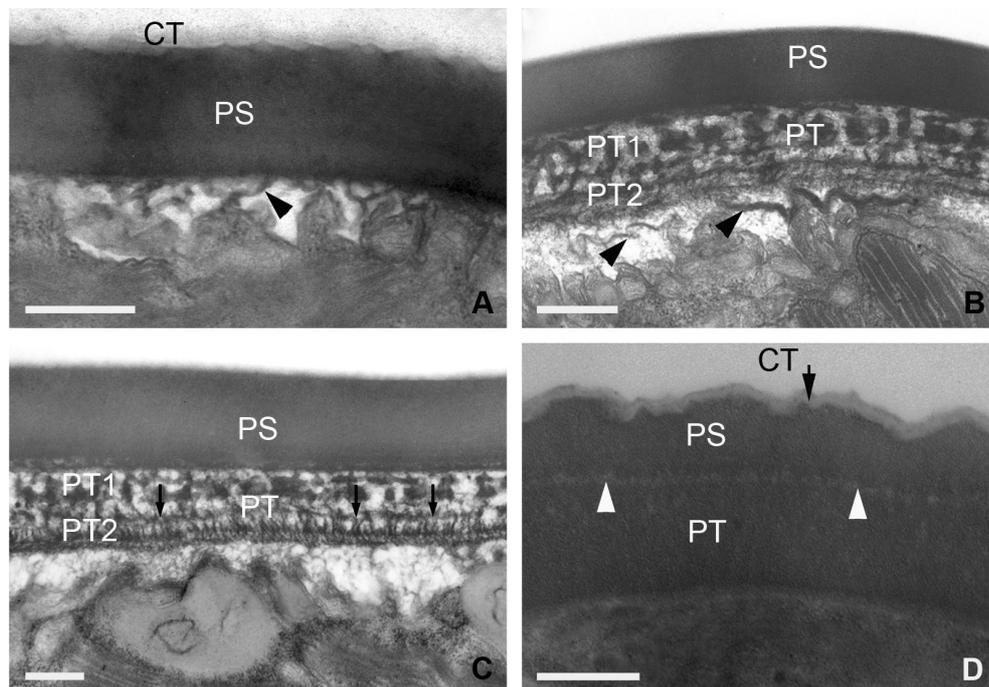
**Figura 30.** Formación de cistos en *Haematococcus pluvialis*. **A-E:** fotomicrografías ópticas. **A:** célula vegetativa. **B-C:** célula vegetativa donde se observa el cambio de forma, el aumento de tamaño y el inicio de la acumulación de astaxantina en la porción central. **D:** cisto inmaduro; notar la pared del cisto (flecha) por dentro de la pared de la célula vegetativa (punta de flecha) y la acumulación de astaxantina en el centro de la célula. **E:** cisto maduro; notar su coloración rojiza y la ausencia de la pared de la célula vegetativa. La flecha indica la pared del cisto. Escala: 5  $\mu\text{m}$



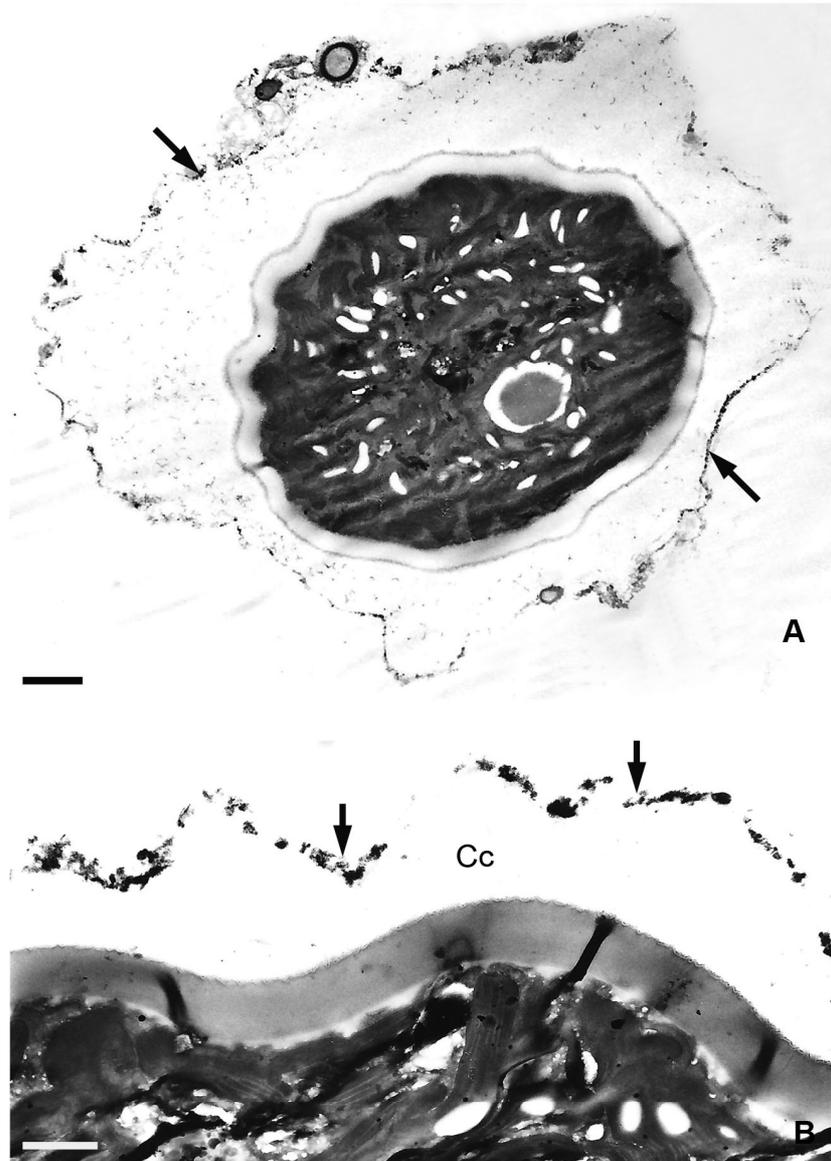
**Figura 31.** Formación de la pared secundaria del cisto de *Haematococcus pluvialis*. **A-F:** micrografías electrónicas. **A-C:** material electrónicamente denso de forma circular incorporándose a la pared en formación; notar la presencia de la pared primaria y la capa trilaminar. **D:** las puntas de flecha muestran la incorporación de material esponjoso a la pared. **E-F:** aspecto homogéneo de la pared secundaria totalmente formada. Escalas: A= 0,5  $\mu\text{m}$ ; B-F= 0,2  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas. CT: capa trilaminar, EP: espacio periplasmal, PP: pared primaria, PS: pared secundaria.



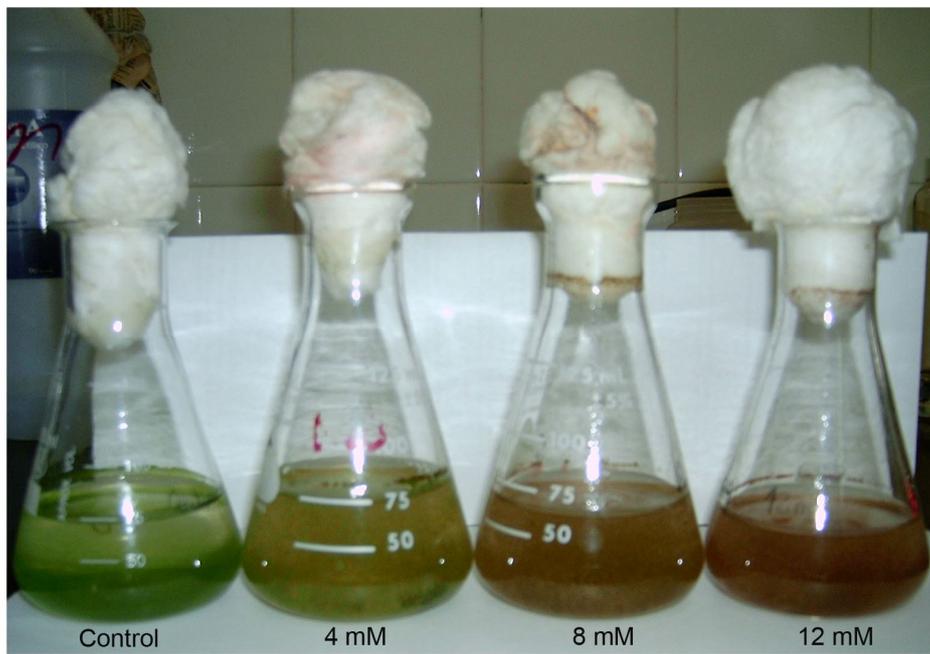
**Figura 32.** Pared celular de *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** fotomicrografías electrónicas de barrido. **A-C:** detalle de la desintegración gradual de la pared primaria dejando al descubierto la capa trilaminar. **D:** capa trilaminar superficial. Escala: 1  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas. CT: capa trilaminar, PP: pared primaria.



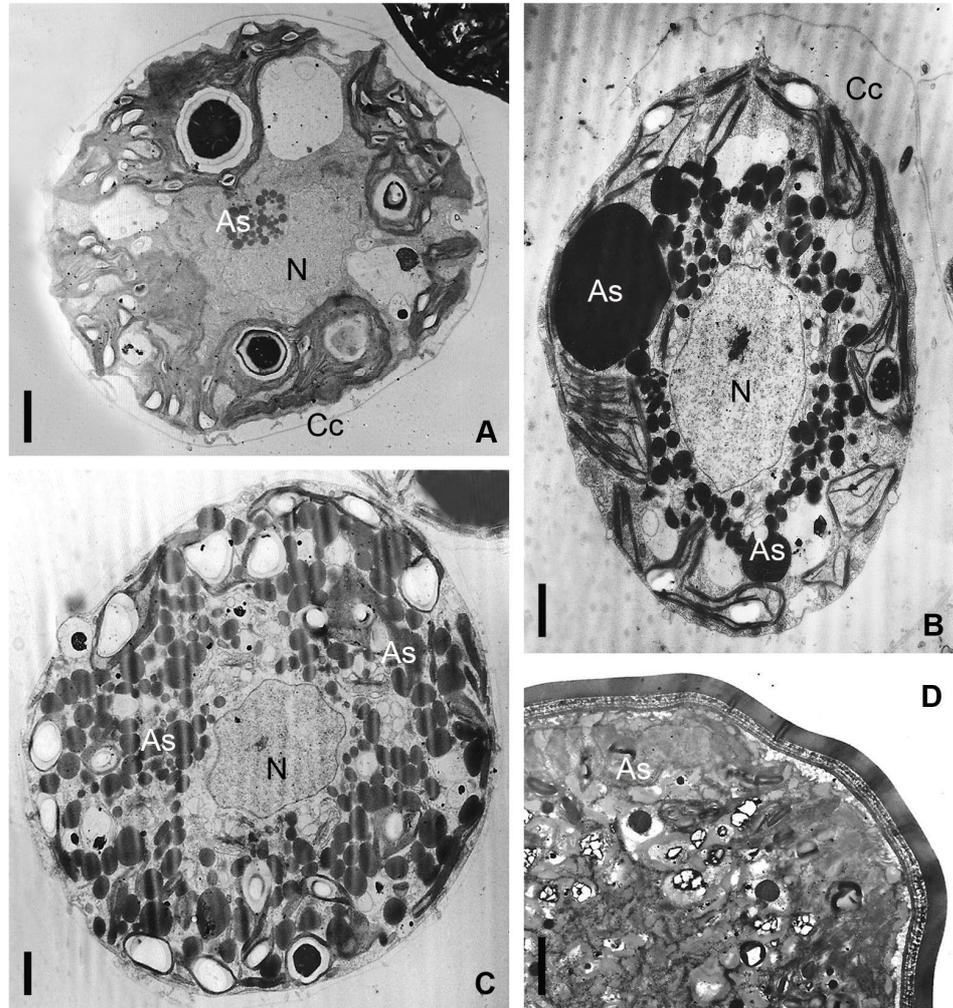
**Figura 33.** Formación de la pared terciaria del cisto en *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** micrografías electrónicas. **A-B:** material electrónicamente denso organizado en hebras (puntas de flecha) depositándose en distintos estratos PT1 y PT2. **C:** pared terciaria en cistos de 4-6 semanas; notar los dos estratos de la pared. Las flechas indican el límite entre ambos estratos. **D:** cisto de más de 6 semanas; notar la pared terciaria con aspecto homogéneo y compacto. Las puntas de flecha indican una delgada capa electrónicamente translúcida entre la pared secundaria y la pared terciaria. Escala: 0,5  $\mu\text{m}$ .  
 Abreviaturas. CT: capa trilaminar, PP: pared primaria, PS: pared secundaria, PT: pared terciaria, PT1: estrato 1 de pared terciaria, PT2: estrato 2 de pared terciaria.



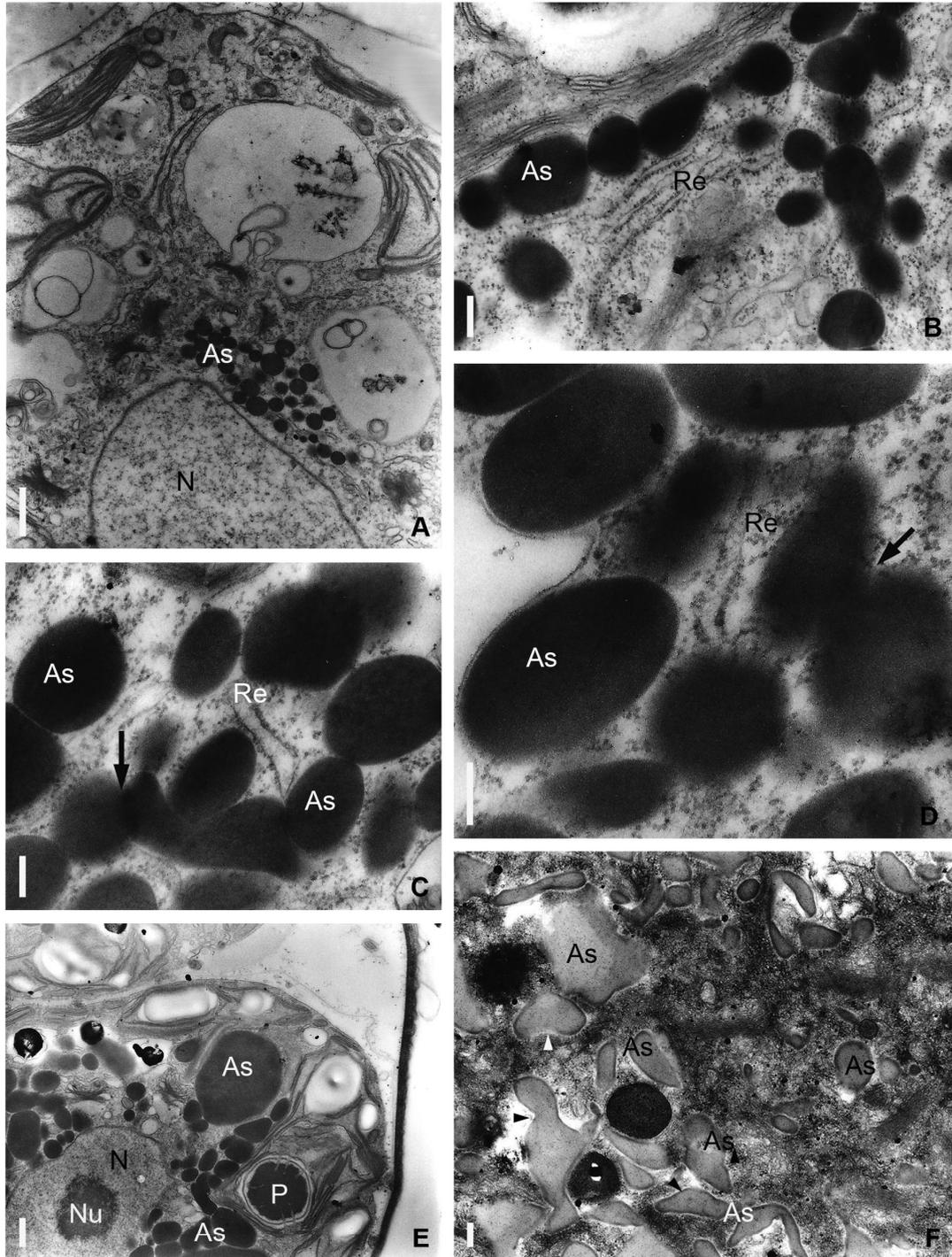
**Figura 34.** Cisto de *Haematococcus pluvialis* rodeado por la pared remanente de la célula vegetativa que le dio origen; notar la reacción positiva de fosfatasa ácida (flechas). **A-B:** micrografías electrónicas. **A:** vista general de la célula. **B:** detalle de una porción del cisto. Escalas: A= 0,2  $\mu\text{m}$ ; B= 1  $\mu\text{m}$ . Abreviatura. Cc: cubierta celular.



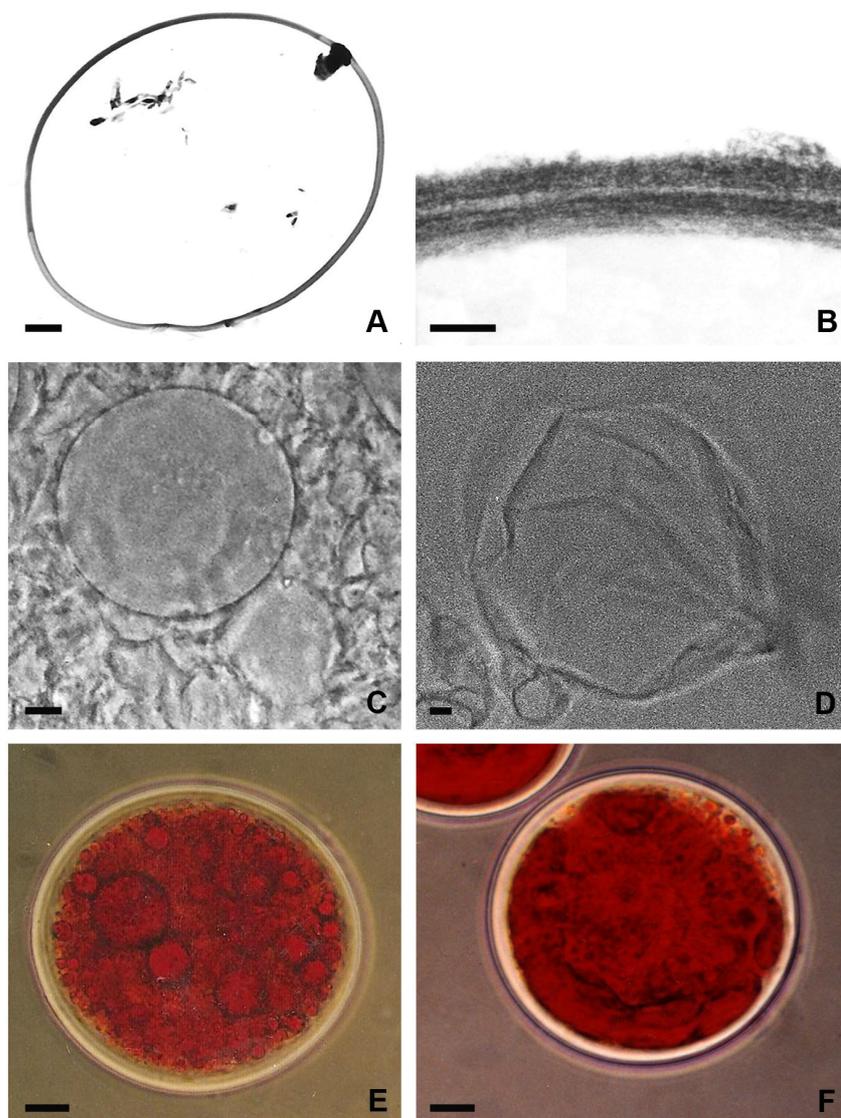
**Figura 35.** Acumulación de astaxantina en cultivos de *Haematococcus pluvialis* en respuesta a distintas concentraciones de acetato de sodio (4 mM, 8 mM, 12 mM); notar el cambio de coloración del medio.



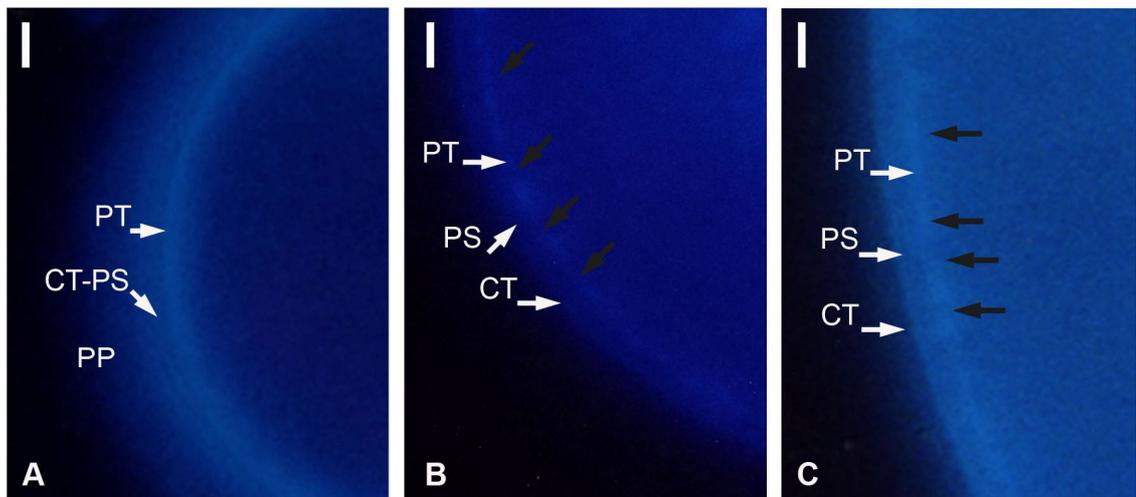
**Figura 36.** Carotenogénesis en *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** fotomicrografías electrónicas. **A-B:** estadios iniciales de la acumulación citoplasmática y perinuclear de astaxantina en células vegetativas. **C:** glóbulos de astaxantina ocupando todo el citoplasma. **D:** parte de un cisto con glóbulos de astaxantina. Escala: 2  $\mu$ m. Abreviaturas. As: astaxantina, Cc: cubierta celular, N: núcleo.



**Figura 37.** Carotenogénesis en *Haematococcus pluvialis*. **A-F:** micrografías electrónicas. **A:** inicio de la acumulación de astaxantina; notar los glóbulos de pigmento pequeños y próximos a la carioteca. **B-D:** retículo endoplasmático rugoso en estrecha asociación con los glóbulos de pigmento en formación. **C-D:** depósitos de astaxantina sin membrana circundante; las flechas indican la fusión parcial de los glóbulos de pigmento. **E:** acumulación de astaxantina perinuclear en zoósporas aún no liberadas del esporangio. **F:** estadio avanzado en la acumulación del pigmento, los glóbulos presentan formas variadas (puntas de flecha). Escalas: A, E= 1  $\mu\text{m}$ ; B-D y F= 0,2  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas. As: astaxantina, N: núcleo, Nu: nucléolo, P: pirenoide, Re: retículo endoplasmático.

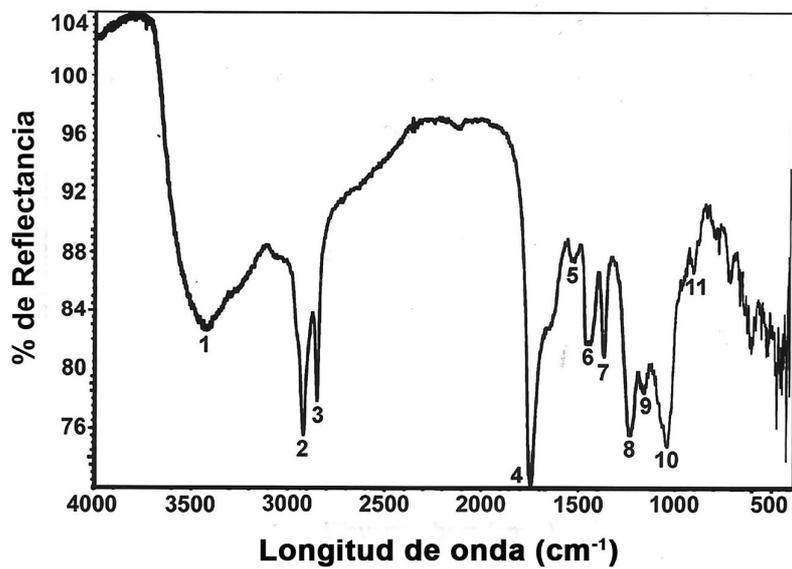


**Figura 38.** Caracterización química de la pared del cisto de *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** material de pared acetoresistente. **A-B:** micrografías electrónicas de transmisión. **A:** vista general de un cisto acetolizado. **B:** detalle de la capa trilaminar resistente. **C-D:** micrografías ópticas con contraste de fases. **C:** cisto pequeño que mantuvo su forma. **D:** cisto de mayor tamaño con pared colapsada. **E-F:** micrografías ópticas. **E:** tratamiento con KOH 10%; notar que la pared del cisto permaneció inalterada. **F:** tratamiento con 2- aminoetanol; notar que la pared del cisto permaneció inalterada. Escalas: B= 0,2  $\mu\text{m}$ ; A y C-F= 5  $\mu\text{m}$ .

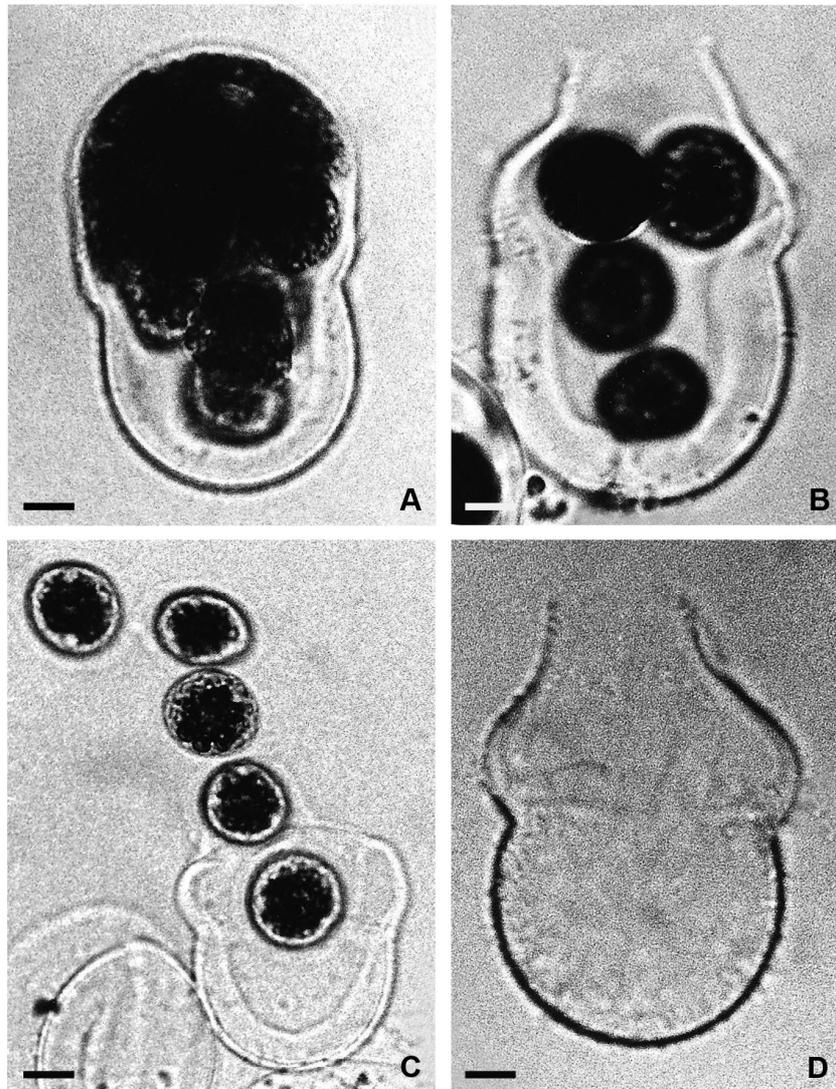


**Figura 39.** Tratamiento químico de la pared del cisto de *Haematococcus pluvialis*. **A-C:** fotografías ópticas de fluorescencia de la pared de un cisto teñido con Calcofluor White. **A:** pared sin tratamiento enzimático; notar el patrón de fluorescencia continuo. **B:** cisto tratado con celulasa; notar la disminución de la fluorescencia en la capa trilaminar y en la pared secundaria, como así también la fluorescencia discontinua en la pared terciaria (flechas negras). **C:** cisto tratado con beta-manosidasa; notar que la fluorescencia en la capa trilaminar permaneció constante, disminuyó en la pared secundaria y se observó discontinua en la pared terciaria (flechas negras). Escala: 20  $\mu\text{m}$ .

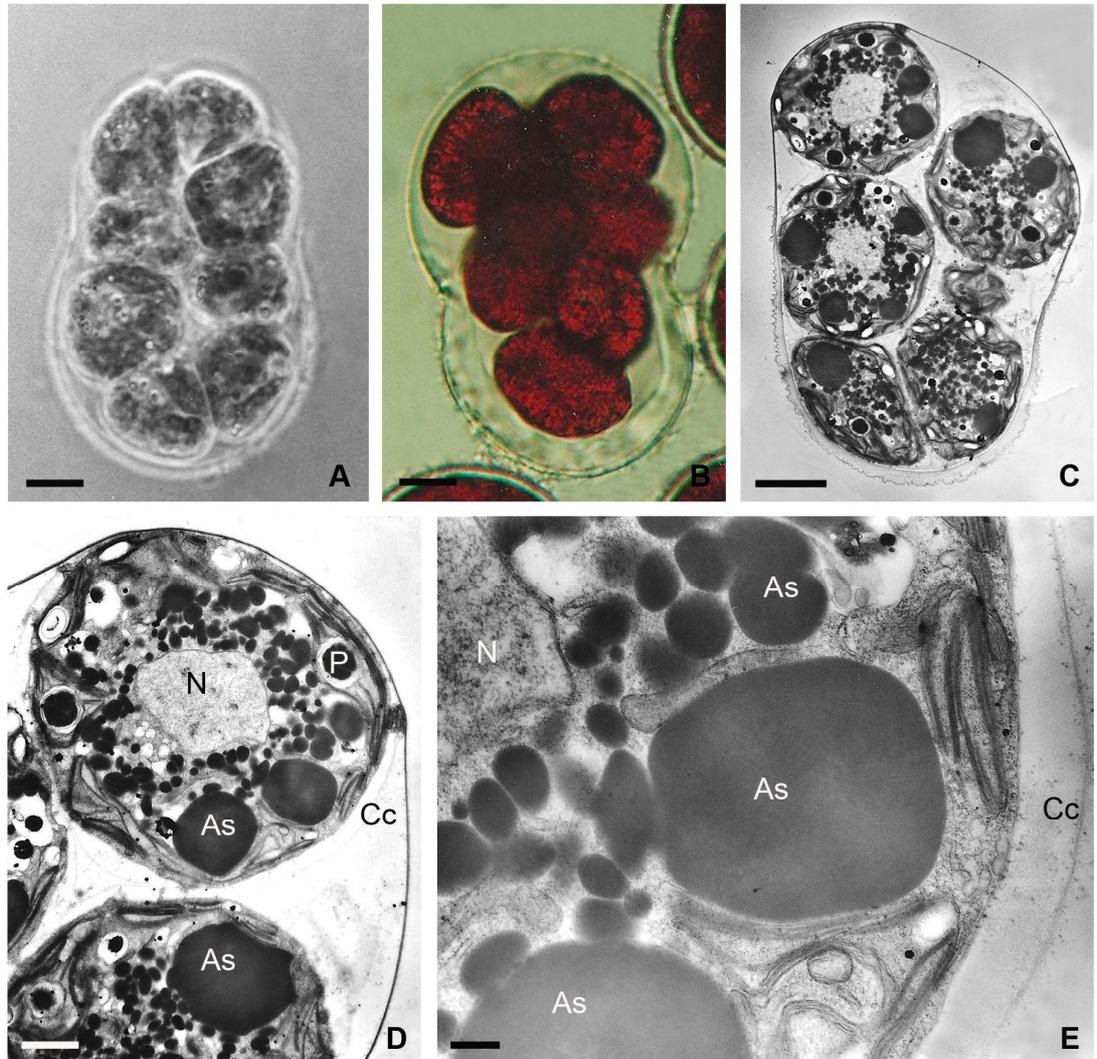
Abreviaturas. CT-PS: capa trilaminar-pared secundaria, PP: pared primaria, PS: pared secundaria, PT: pared terciaria.



**Figura 40.** Espectro infrarrojo del material acetoresistente de los cistos en *Haematococcus pluvialis*. Los números indican las bandas de absorción principales.

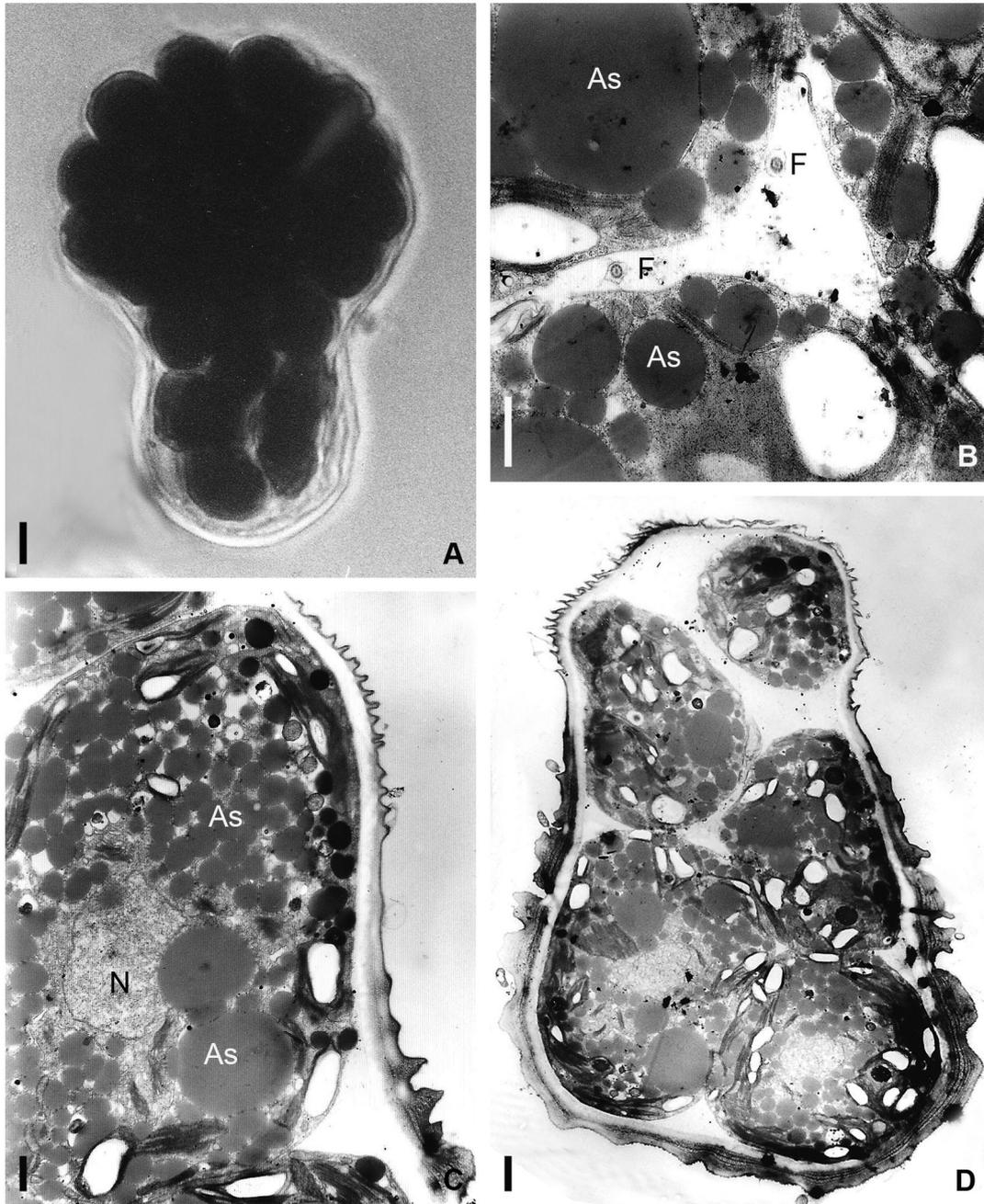


**Figura 41.** Germinación de los cistos de *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** micrografías ópticas. **A:** cisto con zooides en su interior. **B:** ruptura de la porción apical del cisto. **C:** liberación de los zooides. **D:** cisto vacío de forma piriforme. Escala: 5  $\mu$ m.



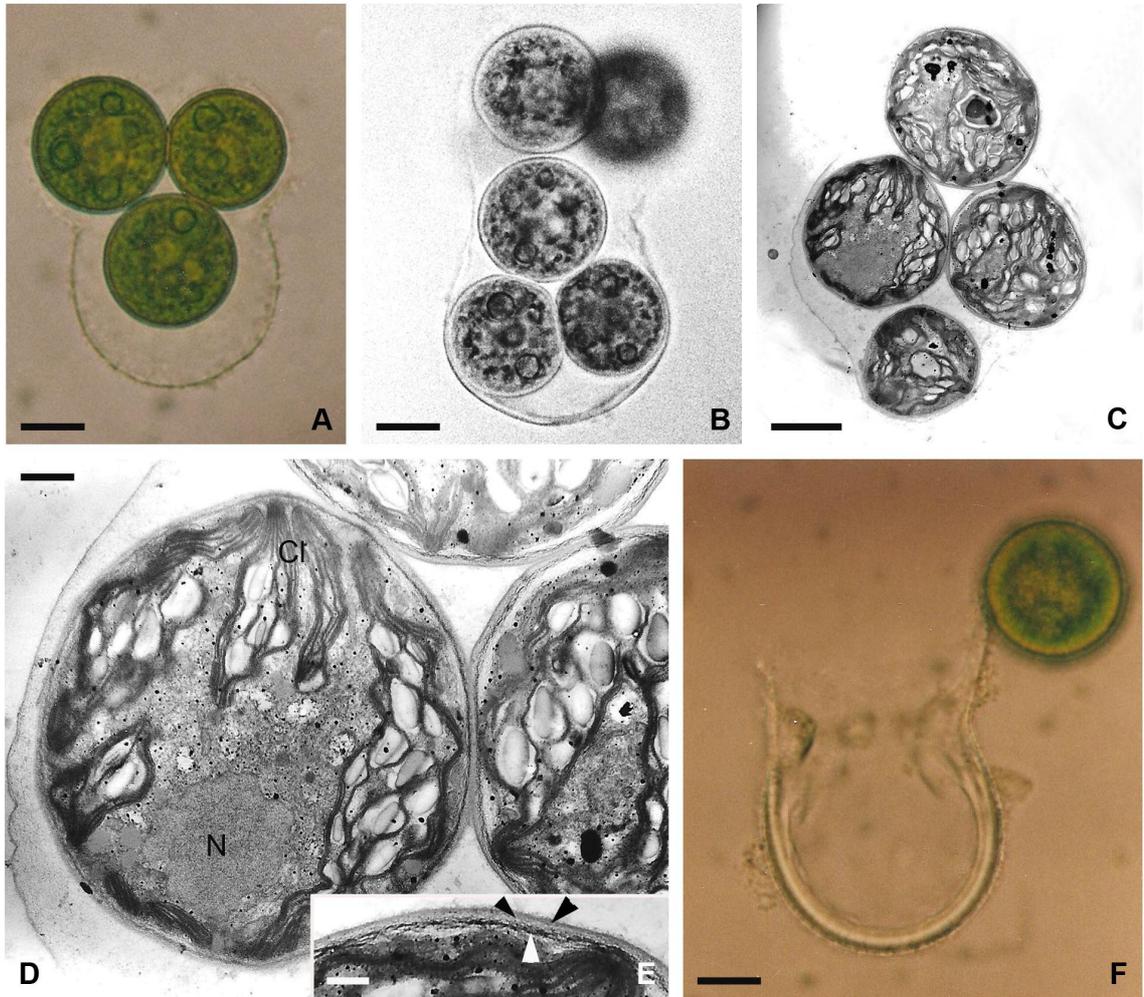
**Figura 42.** Germinación de esporocistos de *Haematococcus pluvialis*. **A-B:** micrografías ópticas. **A-B:** esporocistos conteniendo 8 zoósporas; notar en **B** la coloración rojiza y el debilitamiento apical de la pared del esporocisto. **C-E:** micrografías electrónicas de transmisión. **C:** vista general de un esporocisto. **D:** detalle de las zoósporas con astaxantina perinuclear. **E:** detalle de una porción de una zoóspora; notar los glóbulos de astaxantina de distinto tamaño y la cubierta celular. Escalas: A-C= 5  $\mu$ m; D= 2  $\mu$ m; E= 0,5  $\mu$ m.

Abreviaturas. As: astaxantina, Cc: cubierta celular, N: núcleo, P: pirenoide.

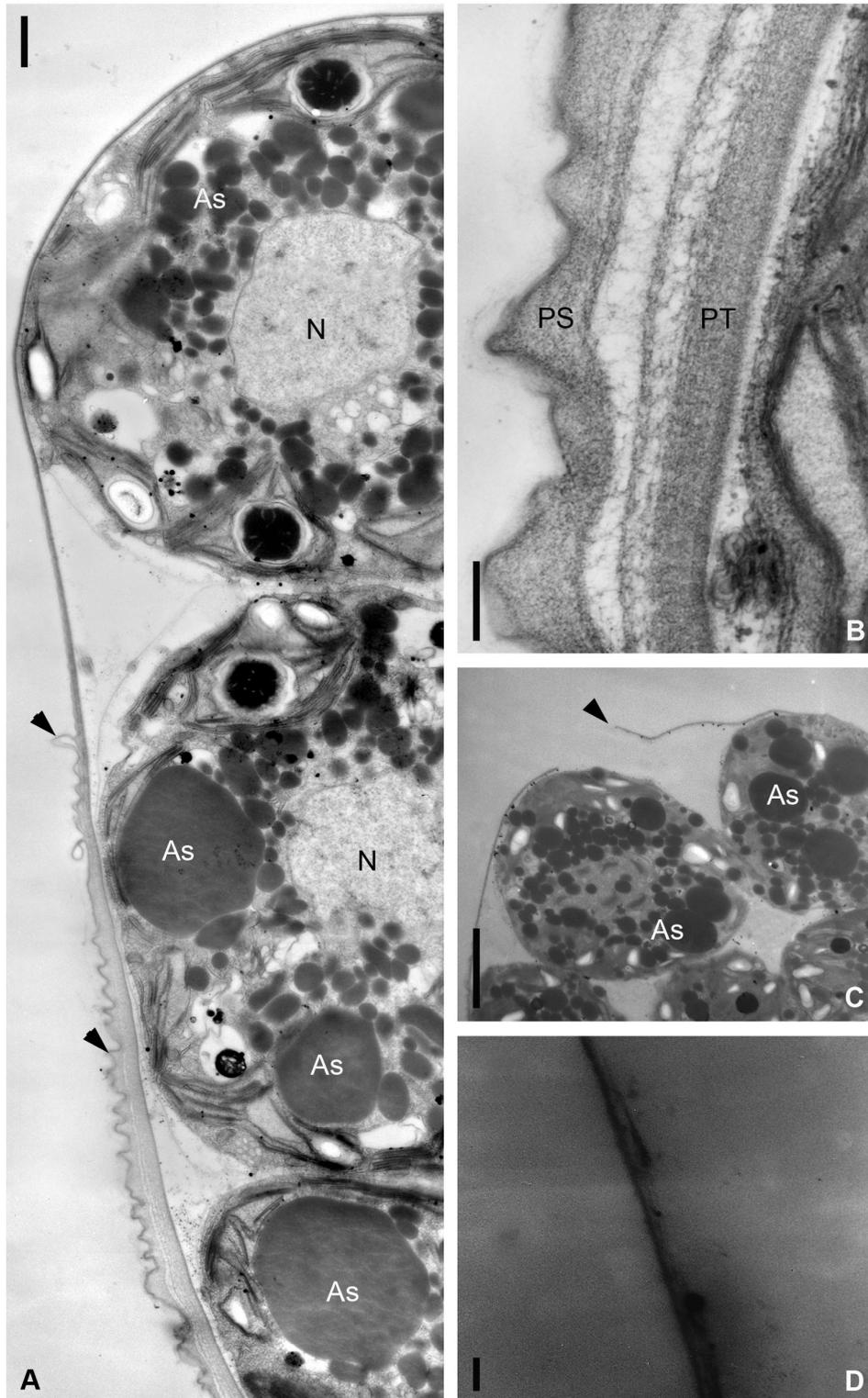


**Figura 43.** Germinación de gametocistos de *Haematococcus pluvialis*. **A:** micrografía óptica de un gametocisto conteniendo 32 isogametas. **B-D:** micrografías electrónicas. **B:** detalle de una porción de las gametas; notar la ausencia de cubierta celular y los flagelos cortados transversalmente. **C:** detalle de una gameta dentro de un gametocisto, donde se observa el núcleo de posición central y glóbulos de astaxantina ocupando la mayor parte del citoplasma. **D:** vista general de un gametocisto; notar la pared celular multiestratificada. Escalas: A= 5  $\mu$ m; B y C= 1  $\mu$ m; D= 2  $\mu$ m.

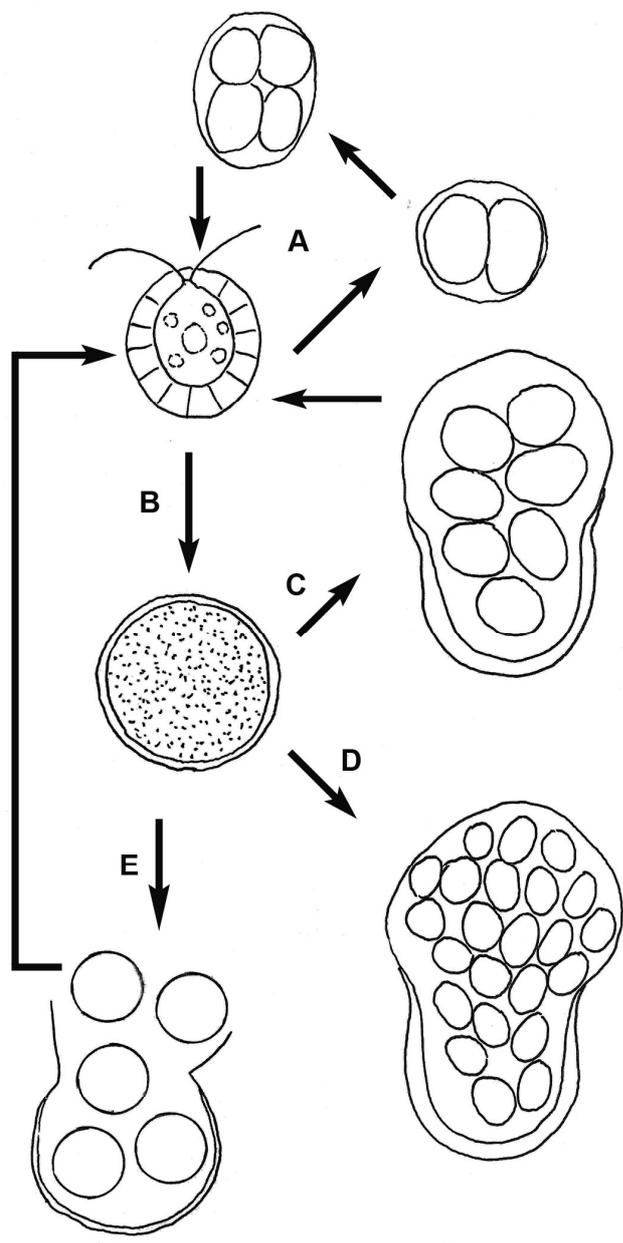
Abreviaturas. As: astaxantina, F: flagelo, N: núcleo.



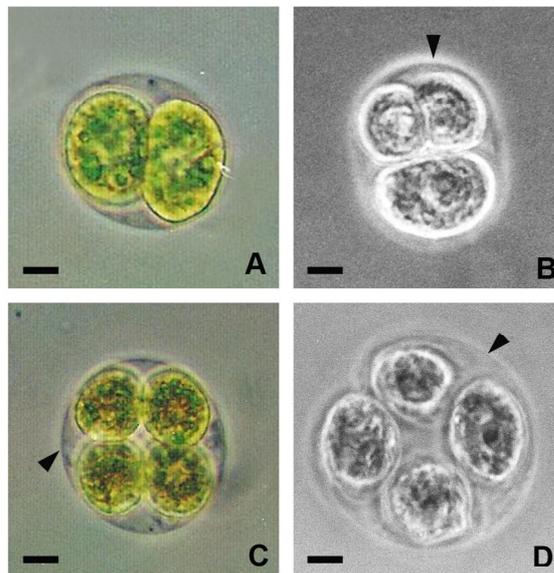
**Figura 44.** Germinación de aplanocistos de *Haematococcus pluvialis*. **A-B:** micrografías ópticas de dos aplanocistos liberando 4 y 8 aplanósporas respectivamente. **C-E:** micrografías electrónicas de transmisión. **C:** vista general de un aplanocisto. **D:** detalle de una aplanóspora con un cloroplasto parietal y núcleo de posición lateral. **E:** detalle de la pared celular de una aplanóspora formada por tres estratos: externo y medio (puntas de flecha negras) e interno (punta de flecha blanca). **F:** aplanocisto vacío con forma de copa. Escalas: A-C y F= 5  $\mu\text{m}$ ; D= 1  $\mu\text{m}$ ; E= 0,2  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas. Cl: cloroplasto, N: núcleo.



**Figura 45.** Comportamiento de la pared del cisto durante la germinación en *Haematococcus pluvialis*. **A-D:** micrografías electrónicas de transmisión. **A:** sección longitudinal de un esporocisto mostrando la ruptura de la capa trilaminar y la pared secundaria adyacente (puntas de flecha). **B:** detalle de una porción de la pared del cisto; notar la apariencia fibrosa de la pared terciaria. **C:** liberación de los zooides por ruptura apical del tercer componente de pared (punta de flecha). **D:** detalle del extremo apical de la pared del esporocisto; notar la apariencia fibrilar. Escalas: A= 1  $\mu\text{m}$ ; B= 0,5  $\mu\text{m}$ ; C= 5  $\mu\text{m}$ ; D= 0,2  $\mu\text{m}$ . Abreviaturas. As: astaxantina, N: núcleo, PS: pared secundaria, PT: pared terciaria.



**Figura 46.** Representación esquemática del ciclo de vida de *Haematococcus pluvialis*. **A:** reproducción asexual. **B:** formación de cistos. **C:** germinación de esporocistos. **D:** germinación de gametocistos. **E:** germinación de aplanocisto.



**Figura 47.** Reproducción asexual de *Haematococcus pluvialis*. Micrografías ópticas. **A:** dos células hijas recientemente divididas. **B:** tres células hijas rodeadas por la cubierta celular parental (punta de flecha), notar que una de ellas aún no se ha dividido. **C-D:** cuatro células hijas, en **C** recientemente divididas, la punta de flecha indica la cubierta celular parental. Escala: 5  $\mu\text{m}$ .

# DISCUSIÓN

## Células vegetativas

### Ultraestructura general

Las células vegetativas del género *Haematococcus* fueron descritas por primera vez a nivel óptico por Smith (1950). Posteriormente Bowen (1967) y Santos y Mesquita (1984) realizaron los primeros estudios ultraestructurales. Si bien la ultraestructura de este género presenta similitudes con la ultraestructura del resto de las especies pertenecientes al orden Chlamydomonadales (Ringo 1967), existen diferencias dignas de notar. La cubierta celular descrita en *Haematococcus pluvialis* constituye una característica exclusiva del género, excepcional para la clase Chlorophyceae en particular y para la división Chlorophyta en general. Otra diferencia es el número y posición de las vacuolas contráctiles, dado que *H. pluvialis* presenta cuatro vacuolas contráctiles en una posición aproximadamente equidistante, mientras que las especies de Chlamydomonadales, como *Chlamydomonas* ssp., *Carteria* ssp., *Gloeomonas kupfferi* se caracterizan por poseer dos vacuolas contráctiles en posición apical (Grief y Shaw 1987, Santos y Mesquita 1984, Domozych 1989, Domozych y Nimmons 1992, Domozych y Dairman 1993, Nozaki et al. 1994).

En *H. pluvialis* el cloroplasto posee forma estrellada y presenta varios pirenoides penetrados por tilacoides individuales, mientras que en la mayoría de las especies del orden Chlamydomonadales poseen un cloroplasto parietal con forma de copa y un pirenoide (Ringo 1967, van den Hoek et al. 1995). Además el prominente estigma en *H. pluvialis* está compuesto por una única hilera de glóbulos lipídicos, como en *Chlamydomonas eugametos* (Walne y Arnott 1967), mientras que en el resto de las especies del género *Chlamydomonas* los estigmas están formados por dos o más hileras de glóbulos lipídicos (Ringo 1967, Dodge 1975, Kreimer 1994).

Hasta el momento, en ninguno de los estudios ultraestructurales previos realizados en el género, se había mencionado la presencia de lomasomas en las células vegetativas (Bowen 1967, Santos y Mesquita 1984). En este estudio en *Haematococcus pluvialis* los lomasomas se observaron principalmente en células recientemente divididas, aún dentro de la pared celular madre y en células en activo crecimiento por el contrario, estuvieron ausentes en los cistos. Estructuras membranosas similares fueron indicadas en *Dunaliella bioculata* (Marano-Le Baron 1972), *Asteromonas gacilis* (Swanson y Floyd 1979), en el alga verde filamentosa *Stigeoclonium tenue* (Ag.) Kütz (Michetti 2003, tesis doctoral) y en las células anteridiales estériles y gametas masculinas de la Charophyta *Chara contraria* (Vouilloud 2008, tesis doctoral). Estas estructuras membranosas se originarían a partir de los cuerpos electrónicamente densos presentes en el interior de las vacuolas. Son consideradas sitios de reciclado de membranas para su posterior utilización en diversas funciones celulares (Robinson 1985).

### **Configuración absoluta del aparato flagelar**

El aparato flagelar de *H. pluvialis* presentó características comunes a las encontradas en especies del orden Chlamydomonadales y en numerosos miembros de la clase Chlorophyceae, dado que se observó simetría rotacional de 180°, con una orientación de sus componentes en el sentido de las agujas del reloj en vista apical, con la consecuente disposición 1/7 de los cuerpos basales y raicillas microtubulares cruciformes. Sin embargo, el aparato flagelar de la especie en estudio también presentó diferencias dignas de notar. Los 5 microtúbulos en la raicilla microtubular “s” hallados en *H. pluvialis* difirieron de los 4 presentes en otros géneros del orden Chlamydomonadales, como por ejemplo *Chlamydomonas* spp. y *Dunaliella* spp. (Ringo 1967, Gould 1975, Salisbury et al. 1988, Leonardi y Cáceres 1994).

Otra diferencia observada en el aparato flagelar de *H. pluvialis* fue que la fibra que corre a lo largo y por debajo de las raicillas microtubulares se observó no estriada y electrónicamente densa, mientras que en los demás representantes del orden esta fibra es estriada y recibe el nombre de componente estriado asociado a raicillas microtubulares o "SMAC" (Holmes y Dutcher 1989, Leonardi y Cáceres 1994).

La presencia de un cuerpo denso ocluyendo el extremo proximal de cada cuerpo basal axonémico y de una fibra estriada conectando este cuerpo con el nacimiento de la raicilla microtubular "s" en *H. pluvialis*, se describen por primera vez para el orden Chlamydomonadales. Estas dos características pueden considerarse típicas del género *Haematococcus*. Sólo en el extremo proximal de los cuerpos basales de *Dunaliella salina* se presenta un cuerpo terminal cilíndrico electrónicamente denso (Leonardi y Cáceres 1994), el cual posee distinta forma y menor tamaño que el descrito para *H. pluvialis*.

Los cuerpos basales no axonémicos observados en *H. pluvialis* aparecen también en los aparatos flagelares de las Chlamydomonadales, Tetrasporales y Chlorococcales (Gould 1975, Marano et al. 1985, Watanabe y Floyd 1989, Leonardi y Cáceres 1994, Leonardi et al. 2000). En *Chlamydomonas* estos cuerpos basales no axonémicos fueron denominados cuerpos probasales interfásicos por Gould (1975) y cuerpos basales en dormición por Andersen et al. (1991). Los mismos tienen la capacidad de originar nuevos flagelos en células en división (Holmes y Dutcher 1989, Lokhorst et al. 1989, Seegar y Gerritsen 1989, Kouwets y van der Schaaf 1993).

Las fibras proximales, las fibras proximales medias no estriadas y los rizoplastos característicos de *Chlamydomonas reinhardtii* (Ringo 1967) y *Dunaliella salina* (Leonardi y Cáceres 1994) estuvieron ausentes en *H. pluvialis*.

La parte basal del aparato flagelar estuvo asociada, por medio de membranas, con lobulaciones digitiformes de una gran mitocondria, localizada en el extremo anterior de la célula. Esta asociación también fue descrita en *Asterococcus superbus*, sin embargo en esta última especie la unión ocurre a través de un rizoplasto (Leonardi et al. 2000).

## Ultraestructura de la cubierta celular

Las características de la cubierta celular de las células vegetativas en *Haematococcus pluvialis* son exclusivas del género. La delicada estructura del estrato interno dificulta enormemente su fijación, lo que ha ocasionado en muchos casos interpretaciones erróneas o incompletas de su estructura. Smith (1950), por medio de observaciones con microscopio óptico, la describió como una delicada pared celular conectada con el protoplasto por finas y numerosas conexiones citoplasmáticas. Además indicó la presencia de una sustancia gelatinosa acuosa entre la pared y el protoplasto. Luego Bowen (1967) indicó que la cubierta celular de *H. pluvialis* estaba formada por “una estructura semejante a una membrana compuesta por dos estratos electrónicamente densos” y que el espacio entre ésta y el plasmalema estaba ocupado por una matriz gelatinosa que no fue considerada por este autor como parte integral de la cubierta. Posteriormente Santos y Mesquita (1984) consideraron que la cubierta celular de *H. lacustris* estaba formada por una fina pared separada del plasmalema por un gran espacio atravesado por hebras citoplasmáticas. Más tarde Hagen et al. (2002) indicaron que la cubierta celular en *H. pluvialis* estaba formada por dos estratos fibrilares - el interno y el externo - y una capa transparente media de espesor variable. En este estudio se describió detalladamente la ultraestructura de la cubierta celular, obteniendo información que permite de esta manera, dar una nueva interpretación de la misma. El estrato externo presentó un aspecto fibrilar, como también había sido indicado por Hagen et al (2002) para una cepa alemana; sin embargo, difirió de la estructura membranosa descrita por Bowen (1967) para una cepa norteamericana. Además, a diferencia de lo indicado por Bowen (1967) y Hagen et al. (2002), en la cepa argentina el estrato interno estuvo formado por grandes vesículas aproximadamente rectangulares en sección. No se hallaron inclusiones vesiculares e inclusiones con una apariencia similar a la de las mitocondrias, como las descritas por Bowen (1967). Las inclusiones membranosas descritas por Bowen muy probablemente

correspondan a artefactos originados durante la fijación, provenientes de la ruptura y autosellado de vesículas similares a las observadas en la cepa argentina. Bowen (1967) también indicó la presencia de grandes elementos tubulares citoplasmáticos dentro de la matriz gelatinosa, de la misma manera que se describieron evaginaciones citoplasmáticas tubulares en *Haematococcus pluvialis* en este estudio.

El relieve en forma de pequeñas crestas de la superficie externa de la cubierta celular de *H. pluvialis* observado con el microscopio electrónico de barrido, presentó gran similitud con la morfología observada en réplicas de criofractura obtenidas por Hagen et al. (2002) del estrato externo de pared.

### **Formación y caracterización química de la cubierta celular**

El sistema de endomembranas involucrado en la formación de la cubierta celular en las células vegetativas de *H. pluvialis* se observó bien desarrollado y complejo. Estuvo representado por vesículas y vacuolas contráctiles, las que también formaron parte de un sistema de endomembranas complejo en *Gloeomonas kupfferi* (Domozych 1981a, b; Domozych 1989) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Grief y Shaw 1987). El retículo endoplasmático estuvo directamente asociado con la cara *cis* del dictiosoma adyacente. Esta asociación también fue observada en *Chlamydomonas reinhardtii* (Grief y Shaw 1987), *Scherffelia dubia* (McFadden y Melkonian 1986) y *Gloeomonas kupfferi* (Domozych 1989).

En este estudio, durante la formación del estrato interno de la cubierta celular se observó: a) una fluida migración de vesículas de transición desde el retículo endoplasmático hacia la cara *cis* de los dictiosomas y b) vesículas, presumiblemente con precursores de la cubierta celular, provenientes de la cara *trans* de los dictiosomas, fusionándose con las vacuolas contráctiles. Estos últimos orgánulos constituyeron el último depósito intracelular de los precursores de la cubierta, antes de ser liberados a la superficie de la célula. Este proceso fue similar al descrito en la formación de la pared celular en *Chlamydomonas*

*reinhardii* (Grief y Shaw 1987), y del estrato interno de pared en *Gloemonas kupfferi* (Domozych y Nimmons 1992, Domozych y Dairman 1993). Si bien a nivel ultraestructural las paredes celulares de *C. reinhardii* y *G. kupfferi* difieren considerablemente de la cubierta celular de *Haematococcus pluvialis*, en los tres géneros las glicoproteínas forman parte de la misma (Goodenough y Heuser 1985, Goodenough et al. 1986, Woessner y Goodenough 1989, Adair y Snell 1990, Domozych y Dairman 1993, Hagen et al. 2002). En *Chlamydomonas reinhardii* y *Gloemonas kupfferi* se ha podido demostrar que el retículo endoplasmático, los dictiosomas y las vacuolas contráctiles están involucrados en la síntesis de la pared celular (Grief y Shaw 1987, Domozych 1989, Domozych y Nimmons 1992, Domozych y Dairman 1993). Además, en ambos géneros se corroboró a nivel ultraestructural y mediante el uso de anticuerpos la participación del retículo endoplasmático y los dictiosomas en la síntesis de las glicoproteínas de pared (Roberts et al. 1982, Grief y Shaw 1987, Domozych y Nimmons 1992, Domozych y Dairman 1993). La presencia de glicoproteínas en la cubierta celular de las células vegetativas de *H. pluvialis* y una dinámica de endomembranas similar a la descrita en *C. reinhardii* y *G. kupfferi*, permiten inferir la misma vía de síntesis para esta cubierta celular. Las glicoproteínas se presentan en *H. pluvialis* en la forma de extensinas no sulfadas, al igual que en las paredes celulares de *Chlamydomonas* y *Volvox* (Miller et al. 1974, Goodenough et al. 1986, Cannon et al. 2008).

Las extensinas son una familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (GPRHs) encontradas en una gran variedad de algas y en las paredes celulares de las plantas superiores (Miller et al. 1974, Showalter 1993). Se le atribuyen numerosas funciones estructurales, tales como tracción y defensa formando “redes interconectadas” en la pared (Brady et al. 1998, Held et al. 2004, Cannon et al. 2008). Dado que la cubierta celular de *Haematococcus pluvialis* carece de celulosa, es posible que las extensinas provean la fuerza mecánica para estabilizar los cambios osmóticos desde el medio externo y la presión de turgencia desde el citoplasma.

La fracción de polisacáridos neutros que acompaña a las glicoproteínas en la cubierta celular de *H. pluvialis* presenta similitudes con lo observado en la pared celular de las células vegetativas de *Chlamydomonas gymnogama*, donde la arabinosa y galactosa fueron los azúcares principales (Miller et al. 1974).

La presencia de arabinosa, como uno de los azúcares mayoritarios en *H. pluvialis*, probablemente origine el tipo O-glicosilación de las extensinas, como fue propuesto para *Chlamydomonas gymnogama* (Miller et al. 1974).

Si bien la cubierta celular de *H. pluvialis*, como fue indicado anteriormente, es ultraestructuralmente muy diferente de la pared de las células vegetativas de *Chlamydomonas*, en ambos casos se componen de glicoproteínas, carecen de celulosa y comparten patrones de polisacáridos muy similares (Rubinstein et al. 1995, Sumper y Hallmann 1998, Canno 2008).

## **Cistos**

### **Ultraestructura general y formación**

El proceso de formación de cistos en algunas especies de microalgas involucra numerosos cambios estructurales y biosintéticos en las células vegetativas y conduce a la formación de un nuevo tipo celular (Brown et al. 1976). Durante la formación de los cistos en *Haematococcus pluvialis* se produjo un cambio de forma y un aumento de tamaño de las células, como así también, el desarrollo de una pared celular resistente multiestratificada, la pérdida de los flagelos, el estigma y las vacuolas contráctiles. Un comportamiento similar fue descrito en *Haematococcus lacustris* por Santos y Mesquita (1984). En la Tabla 6 se detallan los cambios morfológicos y ultraestructurales que sufrieron las células vegetativas durante su transformación en cistos.

El cambio de forma celular, la formación de una nueva pared resistente y la pérdida de organelas también fueron observados durante el desarrollo de cistos en otras especies de microalgas flageladas como por ejemplo *Chlamydomonas monoica*, *Dunaliella salina*, *Polytomella agilis* y *Woloszynskia tyloa* (Brown et al. 1976, Bibby y Dodge 1972, Leonardi y Cáceres 1997, VanWinkle-Swift y Rickoll 1997).

Con respecto a la ultraestructura de la pared de los cistos, Hagen et al. (2002) estudiaron los cambios en la pared de *H. pluvialis* durante la formación de los cistos en una cepa alemana. En la Tabla 7 se comparan las características observadas en las cepas argentina y alemana. Si bien la mayoría de los componentes de pared coinciden en ambas cepas, el tercer estrato de pared descrito en las poblaciones argentinas no fue observado en la cepa alemana, aún cuando los estudios abarcaron un período de tiempo similar en ambos casos. Una posible razón de ello, podría deberse a un retraso en la formación del tercer estrato de pared en las cepas estudiadas por Hagen et al. (2002), y por consiguiente la observación de cistos no totalmente maduros a las 4-6 semanas de desarrollo. Otra diferencia observada, que apoyaría la idea de un desarrollo más rápido en las cepas argentinas, es la ausencia de la pared primaria en cistos de 3-4 semanas y su presencia en los cistos de la misma edad en la cepa alemana (Hagen et al. 2002).

En los cistos maduros de *Polytomella agilis* estudiados con la técnica de criofractura, Brown et al. (1976) también observaron una pared interna adicional, con una estructura similar a la de las paredes secundaria y terciaria de *H. pluvialis*.

La superficie ondulada de la capa trilaminar de los cistos de *H. pluvialis*, observada en imágenes de microscopía electrónica de barrido, recuerda a la pared de exina en los granos de polen de algunas Crassulaceae y Ulmaceae, descrita como ornamentación rugulada por Iversen y Troels-Smith (1950) y Hoen (2000), y a la ornamentación de la pared del mesósporo de cigosporas de *Spirogyra salmonispora* (Ferrer y Cáceres 1995).

La cubierta celular de las células vegetativas de *Haematococcus pluvialis* que continuaba rodeando a los cistos presentó reacción positiva a la actividad de las

fosfatasas ácidas no específicas. Cabe destacar que hasta el momento, este producto de reacción nunca se observó en la cubierta celular de las células flageladas en la especie en estudio.

Numerosos autores han demostrado que las fosfatasas ácidas pueden estar asociadas a estructuras de la superficie celular, a la propia pared celular, al espacio periplasmático y al plasmalema (Kuenzler 1965, Patni et al. 1974, Braten 1975, Törnqvist 1989, Lubián et al. 1992). Ha sido extensamente demostrado el papel regulador del ortofosfato en la inducción de la síntesis de las fosfatasas ácidas en algas, bacterias, hongos y plantas superiores (Price 1962, Knutsen 1968, Moraes 1991, Lubián et al. 1992, Duff et al. 1994, Ferreira et al. 2000), donde la inducción de la actividad de estas enzimas es una respuesta adaptativa a la privación de fósforo. Teniendo en cuenta que la formación de cistos en *H. pluvialis* ocurrió en medios de cultivo empobrecidos en nutrientes, la deprivación de fosfato en el medio, podría haber sido el disparador de la activación de las fosfatasas ácidas presentes en la cubierta celular remanente. Estos resultados, si bien son preliminares, pueden dar un indicio de que la actividad de estas enzimas está regulada por factores externos o que la ausencia del producto de la reacción probablemente solo estaría reflejando el estado metabólico del organismo (Cooper et al. 1974). En forma similar, en *Chlamydomonas reinhardi* la deprivación de fosfato en el medio indujo la detención de la división celular, un aumento en el tamaño celular y un incremento en la activación de las fosfatasas ácidas, observándose en este caso el producto de la reacción en su pared celular (Lien y Knutsen 1973, Matagne et al. 1976).

La localización de las fosfatasas ácidas también fue demostrada en otras Chlorophyceae unicelulares como *Asteromonas gracilis* y *Chlorella pyrenoidosa* (Knutsen 1968, Swanson y Floyd 1979).

## Carotenogénesis

La adición de acetato de sodio al medio de cultivo bajo las condiciones ensayadas en *H. pluvialis* indujo la síntesis de astaxantina. Como previamente fue indicado por Droop (1954), Borowitzka et al. (1991), Cifuentes et al. (2003), Domínguez-Bocanega et al. (2004) y Orosa et al. (2005), el acetato es una fuente importante de carbono, que activa la carotenogénesis.

Los cambios ultraestructurales que ocurren en las células durante la síntesis de astaxantina han sido motivo de numerosos estudios en distintas especies de *Haematococcus*, con gran controversia con respecto al sitio de acumulación del pigmento y a los organelos que intervienen en el proceso (Wygasch 1963, 1965; Bowen 1965, Lang 1968, Sprey 1970, Santos y Mesquita 1984). Los tres estudios más detallados en este tema y con resultados discordantes fueron llevados a cabo por: 1) Lang (1968) quien indicó que el pigmento era acumulado en el citoplasma en *H. lacustris*, 2) Sprey (1970) quien sugirió que los carotenoides secundarios aparecían inicialmente como plastoglóbulos en los cloroplastos, los que luego evolucionaban en cromoplastos a través de un proceso similar al descrito en flores y frutos de las plantas superiores (Mesquita et al. 1980 b) y 3) Santos y Mesquita (1984) quienes confirmaron la acumulación extraplasmática de astaxantina en *Haematococcus lacustris*. Ésta última forma de localización fue la observada en *H. pluvialis* en este estudio.

Con respecto al sitio de síntesis de astaxantina, Lang (1968) indicó que el pigmento se formaba en el citoplasma y descartó la intervención del retículo endoplasmático y los dictiosomas en la síntesis, a pesar de su proximidad con los glóbulos en formación. Posteriormente Santos y Mesquita (1984), debido a una sistemática asociación de los glóbulos de astaxantina con perfiles del retículo endoplasmático, sugirieron la intervención de este orgánulo en su síntesis; sin embargo,

destacaron que nunca observaron pigmentos en el lumen de las cisternas del retículo endoplasmático.

Las observaciones realizadas en *H. pluvialis* en este estudio durante la carotenogénesis coinciden con las descripciones efectuadas por Santos y Mesquita (1984) en *H. lacustris*. La ausencia de astaxantina en el lumen del retículo endoplasmático y la estrecha relación del pigmento con este orgánulo permiten inferir el origen de la astaxantina similar al descrito para los cuerpos lipídicos en semillas de plantas superiores (Robinson 1984, Staehelin 1997), en donde estos cuerpos se originan por acumulación de triglicéridos en el interior de la bicapa lipídica de la membrana del retículo endoplasmático (Wanner y Theimer 1978), quedando rodeados por una hemimembrana. La presencia de una hemimembrana alrededor de los corpúsculos de astaxantina podría explicar su fusión parcial, observada tanto en *H. pluvialis* en este estudio como en *H. lacustris* por Santos y Mesquita (1984).

La acumulación de astaxantina en este género no estuvo exclusivamente asociada a las células inmóviles esféricas. Las zoósporas y gametas de *H. pluvialis* recién formadas, aún cuando estaban dentro de los esporocistos y gametocistos respectivamente, también exhibieron una coloración rojiza debido a la presencia de astaxantina. Los zooides liberados también mantuvieron la coloración rojiza como resultado de la presencia de astaxantina. De acuerdo a Lang (1968) la acumulación del pigmento en estas células flageladas dependería de la cantidad de astaxantina que estaba presente en la célula madre que les dio origen. Lee y Ding (1992), Güneward y Hagen (2000), Hagen et al. (2001) y Wang et al. (2003) también observaron células flageladas con acumulación de astaxantina.

La acumulación de carotenoides secundarios como astaxantina, también ha sido indicada en otras algas verdes como *Scenedesmus komarekii* (Hanagata y Dubinsky 1999), *Chlorella zofingiensis* (Bar et al. 1995), *Chlorococcum* sp. (Zhang et al. 1997, Liu y Lee 1999, Gelin et al. 1996). Del mismo modo en el caso de *Chlamydomonas nivalis* en

respuesta a condiciones adversas o a ecosistemas naturales extremos (Bidigare et al. 1993, Remias et al. 2005).

En la Tabla 8 se compararan los patrones de acumulación de astaxantina en las especies mencionadas en la literatura con lo observado en este estudio. Del cuadro comparativo, surge que el patrón de acumulación de los glóbulos de astaxantina en la especie en estudio presentó algunas diferencias con el observado en otras algas verdes. Mientras que en *H. pluvialis* la acumulación del pigmento comenzó alrededor del núcleo y se extendió hacia la periferia celular, en *Scenedesmus komarekii* y en *Chlamydomonas nivalis* la síntesis comenzó en la periferia celular y se expandió hacia el núcleo, empujando al cloroplasto hacia el interior de la célula (Hanagata y Dubinsky 1999, Remias et al. 2005). En todos los casos mencionados, la acumulación de astaxantina se relacionó con cambios en la forma celular, que varió de elipsoidal a esférica, con un incremento en el diámetro celular (Liu y Lee 1999) y con la pérdida de movilidad.

### **Caracterización química de la pared celular**

De la misma manera que en *H. pluvialis*, en *Scenedesmus komarekii*, *Chlorococcum sp.*, *Chlamydomonas nivalis* y *Chlorella zofingiensis* la pared de estas células de resistencia presentó una capa externa formada por algaenano, un biopolímero altamente resistente semejante a la esporopolenina (Tabla 8). El perfil de absorbancia FT-IR de los productos acetoresistentes de los cistos de *H. pluvialis* fue semejante al espectro de los algaenanos aislados en otras algas Chlorococcales tales como *Chlorella fusca*, *Chlorella spp.* y *Scenedesmus spp.* (Atkinson et al. 1972, Allard y Templier 2000) y a los espectros de esporopolenina de granos de polen de diferentes plantas (Puel et al. 1987, Domínguez et al. 1999).

El perfil de absorbancia FT-IR de los cistos acetolizados de la cepa argentina de *H. pluvialis* fue similar al observado en el material acetoresistente de una cepa

dinamarquesa de *H. pluvialis* estudiada por Montsant et al. (2001). No obstante algunas diferencias dignas de notar observadas en este estudio fueron las siguientes:

- 1) El contenido de grupos hidroxilos fue relativamente menos importante que el de la estructura hidrocarbonada alifática o los grupos éter y éster.
- 2) La región de absorción correspondiente al grupo carbonilo no fue compleja, sino que mostró una banda fuerte y bien resuelta en  $1740\text{ cm}^{-1}$ .
- 3) La región entre  $1200$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  mostró tres bandas en lugar de las dos observadas en el espectro infrarrojo informado por Montsant et al. (2001).

En la cepa argentina de *H. pluvialis* se observó por un lado, bajo nivel de instauración debido a la ocurrencia de un pico de absorción alrededor de  $1500$  y  $900\text{ cm}^{-1}$ , y además un fuerte carácter alifático confirmado por la presencia de bandas agudas e intensas alrededor de  $2900\text{ cm}^{-1}$  y la correspondiente a un número de metilenos igual o mayor que cuatro, cercana a  $720\text{ cm}^{-1}$ , que evidenció cadenas polimetilénicas. El material acetorresistente también mostró un alto contenido de oxígeno debido a la esterificación de los grupos hidroxilos, debido a una acetilación parcial durante la acetólisis ( $-\text{O}-\text{CO}-\text{OCH}_3$ ; es decir bandas a  $1740$ ,  $1460$  y  $1370\text{ cm}^{-1}$  respectivamente).

Fueron localizadas cadenas polimetilénicas principalmente en las bandas electrónicamente opacas de la capa trilaminar y estuvieron entrecruzadas con polisacáridos fibrilares como celulosa (Rodríguez et al. 1999). La banda electrónicamente translúcida de la capa trilaminar estuvo compuesta principalmente de polisacáridos. No obstante estos componentes no fueron totalmente eliminados después de la acetólisis, dado que el algaenano mantuvo una envoltura hidrofóbica a las fibrillas. En el espectro infrarrojo, dentro de la región correspondiente a la huella dactilar de los polisacáridos ( $1160-970$ ), pudieron observarse dos bandas localizadas en  $1140$  y  $1050\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Por el contrario, en concordancia con los estudios de algaenanos realizados por Rodríguez y Cerezo (1996) y Rodríguez et al. (1999), nuestros resultados histoquímicos no mostraron bandas infrarrojas significativas correspondientes a restos

fenólicos. La reacción negativa con floroglucinol, descartaría la presencia de lignina en la pared de los cistos de *H. pluvialis*.

La resistencia de la pared de los cistos en *H. pluvialis* a la acetólisis, al KOH y a 2-aminoetanol y su degradación en presencia de ácido crómico, evidenciaron la presencia de algaenanos en la misma. La insolubilidad en 2-aminoetanol también fue observada en las paredes de *Phycopeltis* (Good y Chapman 1978), en zigósporas de *Chlamydomonas monoica* (Van Winkle-Swift y Rickoll 1997) y en otras algas (Berkaloff et al. 1983). Esporas de briófitos y pteridófitos exhibieron el mismo comportamiento (Southworth 1974), que contrasta sin embargo, con el comportamiento variado que presentaron los granos de polen.

Observaciones con microscopía electrónica de transmisión del material de pared-acetorresistente reveló su naturaleza trilaminar. Esta capa trilaminar fue muy similar a la observada en otras microalgas pertenecientes a la clase Chlorophyceae como es el caso de *Chlamydomonas monoica*, *Botryococcus braunii* y diversas especies *Chlorella* y *Scenedesmus* (Templier et al. 1992, Van WinkleSwift y Rickoll 1997, Allard y Templier 2000, Allard et al. 2002). La presencia de una estructura trilaminar en la pared externa es una característica común de los organismos productores de algaenanos. Sin embargo, existen excepciones a esta regla, ya que en unos pocos casos, la presencia de material de pared altamente resistente no está asociada con una estructura trilaminar, como ocurre por ejemplo en la pared de los cistos de *Pyramimonas pseudoparkeae* (Aken y Pienaar 1985), de las esporas de *Spirogyra* (De Vries et al. 1983) y de las cigósporas maduras de *Coleochaete* (Delwiche et al.1989).

Con respecto al origen de los algaenanos, Burczyk (1987) indicó que los ceto-carotenos serían los posibles precursores en la mayoría de las Chlorophyceae. Sin embargo, otras observaciones indicarían que la síntesis de biopolímeros resistentes de la pared celular no requeriría la activación de la producción masiva de carotenos

secundarios, como fue demostrado por Puel et al. (1987) en el alga parásita *Prototheca wickerhamii*, perteneciente al orden Chlorococcales.

Los algaenanos fueron aislados de las paredes celulares de una gran variedad de algas de agua dulce como así también algunas especies marinas de distintos grupos taxonómicos (Tabla 9). Estudios recientes de la fisiología, función y distribución filogenética de algaenanos realizados por Kodner et al. (2009) determinaron que este biopolímero, fue hallado preferentemente en algas verdes y dentro de ellas, limitado a un grupo restringido filogenéticamente dominado por especies de agua dulce.

Según Gelin y colaboradores (1999) solo dos especies marinas de la clase Chlorophyceae presentaron algaenanos (Tabla 9). Con respecto a la clase Dinophyceae, presentaron algaenanos dos representantes marinos (Tabla 9), pero en estos casos en células vegetativas. Distintas especies de *Nannochloropsis* (Clase Eustigmatophyceae), también presentaron algaenanos en su pared celular (Santos y Leedale 1995, Karlson et al. 1996, Gelin et al. 1999).

La pared celular de los cistos de *H. pluvialis* es una estructura compleja en la cual diferentes macromoléculas coexisten. La pérdida de la fluorescencia detectada en la capa trilaminar de los cistos tratados con celulasa reveló la presencia de celulosa en la misma. También se detectó celulosa en la capa trilaminar de *Coelastrum sphaericum*, la cual consistió principalmente de algaenano y celulosa (Rodríguez et al. 1999). La fluorescencia detectada cuando se trató a los cistos con manosidasa y celulasa reveló la presencia de manosa y celulosa en las paredes secundaria y terciaria. La misma composición se observó en la pared celular de *Chlorella fusca* var. *vauolata* (Takeda 1991) y en la pared celular de *Coelastrum sphaericum* por medio del análisis espectroscópico y metilación de las fracciones solubilizadas-LiCl-DMSO (Rodríguez et al. 1999). Observaciones con TEM de cistos de *H. pluvialis* indicaron que la pared de los mismos está compuesta de un componente fibrilar celulósico inmerso en una matriz amorfa de manosa. Las fibrillas de

celulosa se observaron con una disposición homogénea en la pared secundaria y con un arreglo heterogéneo en la terciaria.

La identificación de manosa y glucosa como monosacáridos mayoritarios en los productos hidrolizados obtenidos a través de extracciones alcalinas fuertes (KOH y NaOH) y el posterior análisis estructural por espectroscopía de  $^{13}\text{C}$ -RMN permitieron confirmar la presencia de manano y celulosa como los polisacáridos de la matriz fibrilar en la pared de los cistos de la cepa argentina de *H. pluvialis*. Del mismo modo, Hagen et al. (2002) detectaron manano como el principal componente de la pared secundaria de los cistos maduros, en una cepa alemana de *H. pluvialis*.

En este estudio se detectaron además cantidades traza de galactosa, principalmente en la primera fracción de la extracción con KOH. Probablemente dicho monosacárido residual, derive de polisacáridos de la matriz amorfa que quedaron adheridos al material fibrilar de la pared y que no fue incluido en nuestro análisis. Al no realizar pasos previos de extracción en agua caliente o con agentes caotrópicos o quelantes no se detectaron monosacáridos que se asocien a la matriz amorfa tales como ramnosa, fucosa y galactosa como fueron informados para *Chlorella ellipsoidea*, *Coelastrum sphaericum* y otras especies relacionadas (Loos y Meindl 1982, Takeda 1991, Burczyk et al. 1995, Rodríguez et al. 1999).

## **Germinación**

Durante el proceso de geminación, los esporocistos y gametocistos de *H. pluvialis* cambiaron de forma, adquiriendo una apariencia piriforme, al igual que los cistos del dinoflagelado *Alexandrium ostenfeldii* (Ostergaard Jensen y Moestrup 1997). Asimismo, en este dinoflagelado el comportamiento de la capa interna de la pared es similar al observado en la pared terciaria de los cistos de *H. pluvialis*. La pared de los aplanocistos

de *H. pluvialis* presentó un comportamiento similar, sin embargo, al romperse adquirieron forma de copa.

Resulta novedoso para las algas verdes el particular comportamiento de la pared de los cistos de *H. pluvialis* durante la germinación y liberación de los zooides. La capa trilaminar y la pared secundaria se comportaron como si fueran una única estructura y se rompieron como consecuencia del incremento en tamaño del cisto, determinado por la formación de los zooides. Por el contrario, la pared terciaria más flexible, se adelgazó y acompañó la expansión del cisto durante todo el proceso de germinación. Al momento de la liberación de los zooides la pared terciaria se adelgazó aún más y se rompió en la porción apical del cisto. Si bien la apariencia de las paredes secundaria y terciaria fue similar en los cistos maduros, el arreglo de sus componentes durante el proceso de formación de las mismas fue diferente. Esto podría explicar el diferente comportamiento de estas paredes (secundaria y terciaria) durante el proceso de germinación. Los zooides liberados mantuvieron la coloración rojiza como resultado de la presencia de astaxantina.

El mecanismo de ruptura de la pared de los cistos en *Haematococcus pluvialis*, seguido por la liberación de los zooides, podría ser comparado con la dehiscencia y descarga de las ascósporas en los ascos bitunicados de Loculoascomycetes (Ascomycota). En estos organismos como en la especie en estudio, la pared externa se rompe y la pared interna, o parte de ella, primero se alarga y luego se rompe, seguida de la descarga de las ascósporas a través de un poro apical (Eriksson 1981, Sherwood 1981). Similarmente, ambas paredes de los ascos están compuestas de microfibrillas embebidas en una matriz amorfa y sólo difieren unas de otras en el arreglo de las microfibrillas (Reynolds 1971).

## Ciclo de vida

Bajo condiciones favorables de cultivo, las células vegetativas biflageladas de *Haematococcus pluvialis* se dividieron normalmente por fisión longitudinal. El mismo mecanismo de reproducción asexual, aunque con particulares variaciones en cada especie, ha sido descrito en otros organismos de organización monodoide de vida libre como *Chlamydomonas reinhardtii* (Johnson y Porter 1968, Ettl 1979), *Carteria crucifera* (Bold y Wynne 1985) y *Dunaliella salina* (Leonardi y Cáceres 1997). Una diferencia observada en *H. pluvialis* con respecto a *Chlamydomonas reinhardtii* es que en esta última las células pierden movilidad antes de dividirse (Johnson y Porter 1968), fenómeno que no ocurre en *H. pluvialis* ya que durante la división celular se mantiene, aunque reducido, el movimiento celular. Este comportamiento se asemejaría más al mencionado en *D. salina* donde las células vegetativas mantienen su movilidad durante la división celular (Leonardi y Cáceres 1997).

Cuando las condiciones de cultivo fueron desfavorables, las células vegetativas de *H. pluvialis* se redondearon, perdieron los flagelos, aumentaron de tamaño, sintetizaron una gruesa pared y formaron cistos. Cuando las condiciones favorables de cultivo se reestablecieron los cistos germinaron formando esporas, gametas o aplanósporas.

En este estudio, la formación de cistos siempre se observó al inicio de la fase estacionaria de crecimiento en medios de cultivos agotados y también en presencia de altas intensidades de luz (Damiani et al 2010), también indicadas por Zhang et al. (1999), Wang et al. (2003), Jeon et al. (2006) y Kang et al. (2007).

La limitación de nitrógeno en el medio de cultivo o el cultivo en agua destilada también indujeron la formación de cistos en esta especie (Borowistzka et al. 1991, Zlotnik et al. 1993, Harker et al. 1996, Fábregas et al. 1998). Asimismo, la formación de cistos en condiciones de altas temperaturas o en medios salinos también fue registrada (Tjahjono et al. 1994, Cordero et al. 1996, Kobayashi et al. 1997).

En la mayoría de las especies del género *Chlamydomonas* no fue reportada la presencia de cistos, excepto en *Chlamydomonas nivalis*, especie de ecosistemas naturales extremos (Remias 2005, 2010). La formación de cistos en presencia de medios de cultivo empobrecidos también ha sido mencionada en *D. salina* (Leonardi y Cáceres 1997). Brown et al. (1976) también observaron formación de cistos en *Polytomella agilis*, en este caso al final de la fase exponencial de crecimiento. En todos los casos indicados, la formación de cistos estuvo asociada a una estrategia de supervivencia o adaptación a distintas condiciones desfavorables.

En *H. pluvialis*, cuando las condiciones favorables de cultivo se reestablecieron los cistos germinaron, ya sea, en forma de esporas, gametas o aplanósporas. El particular comportamiento de los cistos durante la germinación y liberación de los zooides resulta novedoso entre las algas verdes.

En este estudio, la incubación de los cistos de *H. pluvialis* en agua destilada y luego a medio de cultivo nuevo, permitió inducir la reproducción sexual. Las gametas dentro del gametocisto presentaron menor tamaño que las células vegetativas y se diferenciaron de las zoósporas por la ausencia de cubierta celular. La ausencia de nutrientes o medios diluidos, son factores ampliamente conocidos en la inducción de la reproducción sexual en algas (Stewart et al. 1978, Cáceres y Robinson 1981), sin embargo, estos factores pueden variar dependiendo de las especies. Por ejemplo, las células vegetativas de *Chlamydomonas reinhardtii* y *C. monoica* se diferencian en gametas en presencia de medios de cultivo limitados en nitrógeno (Harris 1989, van den Ende y Van Winkle-Swift 1994). En *Dunaliella salina* los medios de cultivos diluidos o sin nutrientes inmediatamente inducen la reproducción sexual (Leonardi y Cáceres 1997).

La reproducción sexual con formación de gametocistos fue indicada previamente por Triki et al. (1997) en *H. pluvialis*, quienes si bien demostraron un método reproducible de inducción de gametogénesis, no observaron conjugación de gametas.

	<b>Células vegetativas</b>	<b>Cistos</b>
Tamaño celular	17,5-20 $\mu\text{m}$ de largo por 10-15 $\mu\text{m}$ de ancho	22 -50 $\mu\text{m}$ de diámetro
Forma celular	elipsoidal, ovoide	esférica
Pared celular	estrato externo delgado y fibrilar, estrato interno voluminoso formado por vesículas	capa trilaminar externa, pared 2 <sup>o</sup> y pared 3 <sup>o</sup> : aspecto compacto y homogéneo.
Papila	desarrollada	ausente
Núcleo	anterior	central, con corpúsculo paranuclear
Aparato flagelar	presente	ausente
Vacuola contráctil	4 equidistantes	ausentes
Estigma	presente	ausente
Lomasomas	presentes	ausentes
Acumulación de astaxantina	generalmente ausente, cuando está presente perinuclear y citosólica	perinuclear y citosólica

**Tabla 6.** Comparación de las características morfológicas y ultraestructurales de células vegetativas y cistos en *Haematococcus pluvialis*.

	<b>Cepa argentina</b>	<b>Cepa alemana</b>
Pared primaria (cistos de 2-3 semanas)	presente	presente
Capa trilaminar (cistos de 2-3 semanas)	presente	presente
Pared primaria (cistos de 3-4 semanas)	ausente	presente
Pared secundaria (cistos de 3-4 semanas)	completamente formada (de aspecto homogéneo)	completamente formada (de aspecto homogéneo)
Interespacio (cisto de 3-4 semanas)	presente, con material de aspecto esponjoso	presente, con material de aspecto granular
Pared terciaria (cistos de 4 a 6 semanas)	de aspecto estratificado	ausente
Pared secundaria (cistos de más de 6 semanas)	superficie interna lisa	superficie interna con protuberancias
Pared terciaria (cistos de más de 6 semanas)	con el mismo aspecto homogéneo que la pared secundaria	ausente
Interespacio (cistos de más de 6 semanas)	ausente	presente
Referencias	este estudio	Hagen et al. 2002

**Tabla 7.** Comparación de la ultraestructura de la pared celular de los cistos en cepas argentinas y alemanas de *Haematococcus pluvialis*.

	Sitio de acumulación	Dirección de acumulación	Astaxantina esterificada	Célula resistencia	Algaenan/ TLS
<i>Haematococcus pluvialis</i> <sup>(1)</sup>	extraplástidial	desde centro hacia la periferia celular	en mayor proporción	si	si
<i>Scenedesmus komarekii</i> <sup>(2)</sup>	extraplástidial	desde la periferia hacia el centro	en mayor proporción	si	si
<i>Chlorella zofingiensis</i> <sup>(3)</sup>	cloroplasto y citoplasma	desde cloroplasto hacia periferia celular	en mayor proporción	si	si
<i>Chlamydomonas nivalis</i> <sup>(4)</sup>	extraplástidial	desde la periferia hacia el centro	en mayor proporción	si	si
<i>Chlorococcum sp.</i> <sup>(5)</sup>	cloroplasto y citoplasma	desde cloroplasto hacia periferia celular	en mayor proporción	si	si

**Tabla 8.** Comparación de patrones de acumulación de astaxantina en distintas especies de algas pertenecientes a la clase Chlorophyceae.

1- Lang (1968), Orosa et al. 2001, este estudio. 2- Hanagata y Dubinsky (1999), Allard y Templier (2000), Orosa et al. 2001. 3- Bar et al. 1995, Allard y Templier (2000), Orosa et al. 2001. 4- Remias et al. (2005, 2010), Blokker et al. 1999. 5- Liu y Lee (1999), Zhang et al. (1997). Orosa et al (2001).

	Hábitat	Referencias
Chlorophyceae		
<i>Botryococcus braunii</i>	dulceacuícola	Templier et al. 1992, Kodner et al. 2009
<i>Scenedesmus obliquus</i>	dulceacuícola	Allard et al. 2002, Kodner et al. 2009
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	dulceacuícola	Kodner et al. 2009
<i>Scenedesmus deserticola</i>	dulceacuícola	Kodner et al. 2009
<i>Haematococcus pluvialis</i>	dulceacuícola	Montsant et al. 2001, este estudio
<i>Chlorella marina</i>	marino	Allard et al. 2002
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	salobre	Zelibor et al. 1988
<i>Nannochlorum eucaryotum</i>	marino	Derenne et al. 1992a
<i>Coelastrum sphaericum</i>	dulceacuícola	Rodríguez y Cerezo 1996
<i>Pediastrum boryanum</i>	dulceacuícola	Blokker et al. 1998,1999
<i>Tetraedron minimum</i>	dulceacuícola	Blokker et al. 1998,1999
Dinophyceae		
<i>Gymnodinium catenatum</i>	marino	Gelin et al. 1999
<i>Lingulodinium polyedrum</i>	marino	KoKinos et al. 1998
Eustigmatophyceae		
<i>Nannochloropsis granulata</i>	marino	Gelin et al. 1999
<i>Nannochloropsis oculata</i>	marino	Gelin et al. 1999
<i>Nannochloropsis salina</i>	marino	Gelin et al. 1996 a,b ; 1997b
<i>Nannochloropsis</i> sp.	marino	Gelin et al. 1996 a,b ; 1997b

**Tabla 9.** Especies algales con algaenanos en sus paredes celulares.

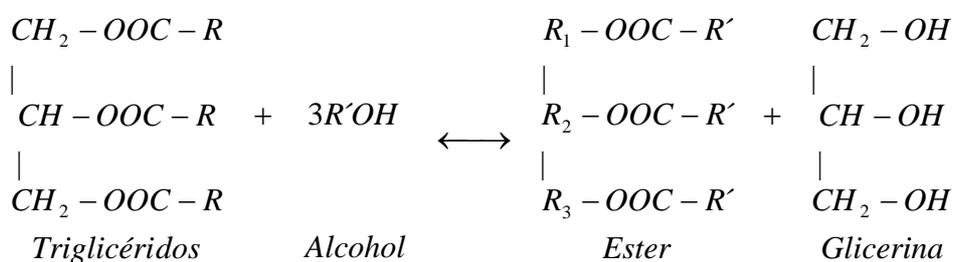
## INTRODUCCION

*Haematococcus pluvialis* ha sido y es objeto de numerosos estudios por su capacidad de sintetizar y acumular astaxantina, otros carotenoides y sus ésteres (Grung et al. 1992). En los últimos años esta especie ha sido considerada la fuente natural más importante de este pigmento, utilizado en la industria farmacéutica, alimenticia y como nutraceútico (Johnson y An 1991, Guerin et al. 2003). La astaxantina presenta potenciales aplicaciones clínicas debido a su actividad como antioxidante natural (Miki 1991, Lorenz y Cysewski 2000, Cerón et al. 2007).

Además, paralelamente con la acumulación de astaxantina *H. pluvialis* sintetiza ácidos grasos (Zhekisheva et al. 2002, 2005, Rosa et al. 2005, Cerón et al. 2007); sin embargo, este aspecto se encuentra mucho menos estudiado.

El interés por el contenido lipídico en las microalgas fue creciendo principalmente a partir de la década del 70. Los lípidos provenientes de diversas microalgas poseen potenciales aplicaciones comerciales en la salud humana (Hassan Belardi et al. 2000, Rosa et al. 2005), en acuicultura (Volkman et al. 1989, Parrish y Wangersky 1990, Brown et al. 1997) y también en los últimos años, en la producción de biodiesel (Xu et al. 2006, Vasudevan y Briggs 2008). El biodiesel es un biocombustible alternativo del diesel, derivado de fuentes biológicas renovables tales como aceites vegetales o grasas animales (Chisti 2007). Durante la reacción de transesterificación, los triglicéridos se convierten en ésteres en presencia de un alcohol, generalmente metanol. La reacción produce biodiesel como producto primario y glicerina como subproducto (Knothe 2005, Palligarnai et al. 2008) (Fig. 48). La proporción relativa de los ácidos grasos presentes en el materia prima se mantiene relativamente constante después de la reacción de transesterificación (Costa Neto et al. 2000). Por lo tanto, en general el perfil de los ésteres

obtenido por transesterificación es reflejo de la composición de los ácidos grasos en el material crudo empleado (Lang et al. 2001, Ferrari et al. 2005).



**Fig. 48.** Reacción de transesterificación

Muchas especies de microalgas, comúnmente denominadas oleaginosas, contienen altos contenidos de aceites, alcanzando valores de hasta 25-60% de su peso seco, lo cual constituye una potencial fuente alternativa y renovable para la producción de biodiesel (Chisti 2007, 2010). La capacidad intrínseca de producir grandes cantidades de lípidos es una característica de cada especie, más que de un género (Hu et al. 2006). El contenido lipídico en una determinada especie microalgal puede ser modificado, cuando las células son expuestas a condiciones de cultivo desfavorables, tales como alta salinidad (Ching-Piao y Liang-Ping 2001), deficiencia de nitrógeno (Yu et al. 1987, Illman et al. 2000, Zhekisheva et al. 2002, Gouveia y Oliveira 2009) y alta intensidad lumínica (Gordillo et al. 1998). No solo las condiciones ambientales pueden modificar el metabolismo lipídico en las microalgas, sino que también las diferentes fases de crecimiento (Fidalgo et al. 1998, Bajpai y Bajpai 1993) y la edad del cultivo (Siron et al. 1989) pueden influir considerablemente en la composición lipídica de ciertas especies.

*Haematococcus pluvialis* es una microalga fácil de cultivar y de rápido crecimiento. El crecimiento óptimo de sus células vegetativas es alcanzado con baja irradiación, es decir por debajo de 100  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fan et al. 1994, Harker et al. 1995) y en condiciones de saturación de nutrientes (Cifuentes et al. 2003). Por el contrario, la

acumulación de lípidos es inducida por factores de estrés como limitación de nutrientes o alta intensidad de luz (Zhekisheva et al. 2002, 2005).

Las microalgas son más eficientes fotosintéticamente que las plantas terrestres y también eficientes fijadoras de CO<sub>2</sub> (Brown y Zeiler 1993, Chisti 2007). Además, poseen una variedad de ventajas industriales sobre los cultivos vegetales clásicos, dado que ellas: a) no compiten por superficies terrestres o agua de riego con otras agriculturas, ya que no necesitan suelo y algunas crecen en agua de mar o salobre, b) su cultivo es de naturaleza hidráulica; esto permite inocular y cosechar el cultivo desde un solo punto de bombeo en extensas superficies, posibilitando también el continuo monitoreo y fertilización, y c) el cultivo algal no necesita herbicidas o pesticidas para su crecimiento (Rodolfi et al. 2009). Además, los cultivos de microalgas usados para la producción de biodiesel pueden servir también para otros propósitos: 1) remoción del CO<sub>2</sub> producido por combustión industrial por biofijación (Wang et al. 2008), 2) reducción del contenido de amonio, nitrato y fosfato en aguas residuales a través de la absorción de estos nutrientes para su crecimiento (Wang et al. 2008), 3) utilización del residuo algal para la obtención de fertilizantes orgánicos, alimento para el ganado o simplemente quemado para la cogeneración de energía (electricidad y calor) (Wang et al. 2008) y 4) dependiendo de las especies de microalgas también pueden extraerse otros compuestos con valiosas aplicaciones en diferentes sectores industriales, como ácidos grasos poliinsaturados, azúcares, pigmentos y antioxidantes (Li et al. 2008, Raja et al. 2008).

Si bien en la actualidad, la tecnología de producción y extracción de aceites a partir de microalgas sigue siendo cara y por consiguiente aún no redituable para la producción de biodiesel (Sheehan et al. 1998, Hu et al. 2006, Chisti 2007), el aumento de los precios de los combustibles, junto con el gradual agotamiento de las reservas fósiles y el incremento de las emisiones de carbono a la atmósfera siguen alentando el desarrollo de investigaciones a nivel mundial para lograr una tecnología económicamente viable (Kanel y Guelcher 1999, Yokochi et al. 2003, Bijl et al. 2004).

Por todo lo expuesto, en este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Optimizar las condiciones de cultivo de *H. pluvialis* para su crecimiento.
- b) Optimizar las condiciones de cultivo para la síntesis de lípidos.
- c) Comparar el contenido lipídico y la composición de ácidos grasos en cultivos control y estresados.
- d) Analizar la cantidad y calidad de lípidos extraídos con distintos métodos.
- e) Evaluar el uso potencial de la materia prima obtenida para la producción de biodiesel.
- f) Obtener biodiesel a través de los métodos convencional de transesterificación y de metanol supercrítico.

## RESULTADOS

### Mediciones del crecimiento de *Haematococcus pluvialis*

La concentración celular, expresada como número de células/ml, fue estimada en las tres condiciones de cultivo ensayadas. Durante condiciones de estrés, las células vegetativas de *Haematococcus pluvialis* cesaron de dividirse y alrededor del cuarto día de iniciado el cultivo se evidenciaron los primeros cistos. Los cultivos control y los cultivos estresados con alta intensidad de luz y medio completo (condición de estrés A) se comportaron de forma similar hasta el tercer día (Fig. 49 y Tabla 10). En cultivos control, el número máximo de células se observó a los 12 días de iniciado el cultivo, alcanzando una densidad de  $1,1 \times 10^6$  células/ml, 0,79 divisiones/día y un tiempo de duplicación de 21 horas. En cultivos estresados con alta intensidad lumínica, el número máximo de células se observó a los 10 días, alcanzando una densidad de  $5,2 \times 10^5$  células/ml, 0,56 divisiones/día y un tiempo de duplicación de 30 horas. Por otro lado, los cultivos estresados con alta intensidad de luz y medio sin nitrógeno (condición de estrés B) alcanzaron concentraciones celulares mucho menores que los cultivos estresados A, con un máximo de  $1,8 \times 10^5$  células/ml, 0,07 divisiones/día, un tiempo de duplicación de 246 horas y además no exhibieron fase de crecimiento exponencial. La tasa de división celular ( $K$ ), expresada como divisiones ocurridas por día, fue fuertemente afectada en ambas condiciones de estrés.

### Caracterización de glóbulos lipídicos con microscopios óptico y electrónico

A 24 horas de iniciadas las condiciones de estrés en los cultivos, las células teñidas con Sudán IV y observadas en vivo presentaron gotas lipídicas refringentes de color pardo (Fig. 50 A). Observaciones con microscopía electrónica de transmisión,

revelaron la presencia de corpúsculos esféricos electrónicamente densos y de disposición citoplasmática (Fig. 50 B, flechas). La presencia de lípidos neutros fue corroborada con el fluoróculo Rojo Nilo, por la observación de corpúsculos fluorescentes de coloración amarillo-dorado distribuidos en distintas partes del citoplasma, tanto en los cistos (Fig. 51), como en las zoósporas (Fig. 52). La fluorescencia en las células flageladas se observó finamente distribuída por todo el citoplasma.

### **Cultivo de *Haematococcus pluvialis* en volúmenes mayores (35 litros)**

Una vez que los cultivos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial y conocidas las condiciones adecuadas para lograr el estrés y la síntesis de lípidos, el principal desafío fue establecer nuevas condiciones de cultivo a mayores volúmenes. El escalado se inició a partir de cultivos de un litro, pasando luego a volúmenes de cinco litros, en ambos casos con aireación (Fig. 53). Luego, inóculos de 5 litros, con una densidad inicial de  $6,1 \times 10^7$  células/L (Fig. 54 A), se agregaron a bolsas de cultivo conteniendo 30 litros de medio Basal de Bold (Fig. 54 B), alcanzando una densidad celular de  $850 \times 10^7$  células/L en un volumen final de 35 litros (Fig. 54 D).

Posteriormente el cultivo fue estresado con alta intensidad de luz continua, como se indica en Materiales y Métodos, donde las células perdieron movilidad, se redondearon, se tornaron de color rojizo y sedimentaron (Fig. 54 E).

La cosecha de la biomasa obtenida, se realizó extrayendo el medio sobrenadante y centrifugando (para mayores detalles ver en Materiales y Métodos).

### **Extracción de lípidos**

La extracción de lípidos en la especie en estudio se realizó a partir de: I) cultivos en volúmenes pequeños (1litro) (Fig. 53), en las tres condiciones de cultivo ensayadas

(control, estrés A y B) y II) cultivos en volúmenes mayores (35 litros), estresados con alta intensidad de luz y medio completo (condición de estrés A) (Fig. 54).

### **I- A partir de volúmenes pequeños**

Se ensayaron tres procedimientos de extracción lipídica siguiendo las metodologías empleadas por Folch 1957, Zhekisheva et al. (2002) y utilizando *n*-hexano (Shen et al. 2009) (Detalles de cada método se describen en Materiales y Métodos).

La recuperación de los lípidos totales con el método de extracción convencional propuesto por Folch (1957) en cultivos estresados con alta intensidad de luz, fue de 7,2 % expresado como porcentaje de peso seco. En este método se emplearon tres períodos de ultrasonicación con el propósito de romper la pared celular de los cistos.

En el método de extracción de Zhekisheva et al. (2002), previo a la extracción lipídica, se procedió a la ruptura de la pared celular con dimetilsulfóxido (DMSO) proceso que fue monitoreado a través de observaciones con microscopio óptico (Fig. 55). Con este método de extracción, en ambas condiciones de estrés A y B la recuperación de los lípidos totales, expresado como porcentaje de peso seco, fue de 34,85% <sup>(c)</sup> y 32,99%<sup>(c)</sup> respectivamente, y en condiciones de cultivo control (15,61% <sup>(b)</sup>,  $\alpha=0,05$ ) (Tabla 10).

Cuando se utilizó *n*-hexano como único solvente de extracción, la recuperación de los lípidos totales en ambas condiciones de estrés A y B fue de 13,55% y 16,94% respectivamente (Tabla 11). Además, se observó la formación de una emulsión difícil de romper, formada al poner en contacto el hexano con el DMSO en los primeros pasos de la reacción, específicamente en el momento de la lisis celular (Fig. 56).

Con respecto a los lípidos totales, en cultivos control como en ambas condiciones de estrés ensayadas, el porcentaje de lípidos extraído con el método propuesto por Zhekisheva et al. (2002), fue significativamente mayor que con *n*-hexano ( $\alpha=0,05$ ). La

relación de extracción Zhekisheva:hexano fue aproximadamente 2:1, siendo la misma en las tres condiciones de cultivo ensayadas (Tabla 11 y Fig. 57).

## **Composición lipídica**

La caracterización lipídica fue realizada a partir de los lípidos extraídos con el método de Zhekisheva et al. (2002) y con el método de *n*-hexano (Shen et al. 2009).

### Caracterización de lípidos extraídos por el método de Zhekisheva et al. (2002)

En la Tabla 10 se observa la recuperación del material lipídico total y las cantidades de cada fracción recuperada: lípidos neutros, fosfolípidos y glicolípidos en *H. pluvialis* sometido a diferentes condiciones de cultivo: control, estrés A y estrés B.

La fracción de los lípidos neutros fue la mayoritaria en todas las condiciones de cultivo testeadas, sin embargo, el contenido de estos se incrementó significativamente en ambas condiciones de estrés A y B ( $19,80 \pm 0,14$  <sup>(2)</sup> y  $16,60 \pm 1,41$  <sup>(2)</sup> respectivamente), comparado con el cultivo control ( $9,20 \pm 0,67$  <sup>(1)</sup>). El contenido de fosfolípidos fue también mayor en cultivos estresados que en cultivos control. Con respecto al contenido relativo de glicolípidos, no existieron diferencias significativas entre cultivos control y estresados. De la misma manera, no se encontraron diferencias significativas entre glicolípidos y fosfolípidos entre ambas condiciones de estrés testeadas (Tabla 10).

El perfil de ácidos grasos en *H. pluvialis* del cultivo control y de ambas condiciones de estrés ensayadas fue similar, siendo los principales ácidos grasos saturados (AGSs) el palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0), monoinsaturados (AGMs) el ácido oleico (C18:1n9c) y poliinsaturados (AGPs) el ácido linoleico (C18:2n6c), ácido linolelaídico (C18:2n6t) y ácido linolénico (C18:3n3) (Tabla 12).

En la fracción de lípidos neutros, el porcentaje de ácidos grasos saturados fue significativamente mayor en cultivos con estrés A (30,36 %) y estrés B (29,62 %)

comparados con el control (27,81 %). No existieron diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ) entre cultivos estresados con respecto al contenido relativo de AGSs (Tabla 12 y Fig. 58). El contenido relativo del ácido palmítico (C16:0) disminuyó bajo condiciones de estrés, particularmente en la condición de estrés A (Fig. 59). Por el contrario, el contenido relativo del ácido esteárico (C18:0) incrementó en ambas condiciones de estrés (Fig. 59).

El contenido de ácidos grasos monoinsaturados presentes en la fracción de lípidos neutros, no mostró diferencias significativas entre cultivos control y estresados (estrés A); sin embargo, el porcentaje de AGMs en microalgas creciendo bajo condiciones de estrés B fue menor ( $\alpha=0,05$ ) (Tabla 12 y Fig. 58). El ácido graso mejor representado entre los AGMs fue el oleico. El contenido relativo del ácido oleico presentó una leve disminución en ambas condiciones de estrés comparado con el cultivo control (Fig. 59).

Con respecto a los ácidos grasos poliinsaturados, se observó un incremento significativo en las microalgas cultivadas bajo estrés B comparado con cultivos estrés A y control (Tabla 12 y Fig. 58). El incremento en los AGP, podría ser atribuido a mayores proporciones de los ácidos linoleico (C18:2n6cis), linoledaídico (C18:2n6trans) y linolénico (C18:3n3) (Fig. 59).

El índice de yodo calculado, de la fracción neutra del aceite extraído de *H. pluvialis* fue de 110,95 g I<sub>2</sub> /100 g, 99,64 g I<sub>2</sub> /100 g y 123,56 g I<sub>2</sub> /100 g para cultivos control y condiciones de estrés A y B, respectivamente.

En la fracción de glicolípidos, la composición de ácidos grasos no varió significativamente entre las distintas condiciones de cultivo ( $\alpha=0,05$ ). Aunque se observó mayor proporción de los ácidos esteárico, oleico y linoleico en ambas condiciones de estrés con respecto al control (Fig. 60). Por el contrario, los ácidos linoledaídico y linolénico se observaron en mayor proporción en el cultivo control, que en los cultivos estresados. Los AGS fueron igual de abundantes que los AGPs, observándose menor porcentaje de AGM (Tabla 12).

En la fracción de fosfolípidos, se observó un incremento significativo en el porcentaje de AGSs, en las microalgas cultivadas en condiciones de estrés A comparado con las cultivadas en condiciones de estrés B y control (Tabla 12), incremento que se debió principalmente a una mayor proporción de los ácidos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) (Fig. 61).

No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de AGMs entre las tres condiciones de cultivo ensayadas, en la fracción de fosfolípidos. Aunque el contenido relativo del ácido oleico (C18:1n9cis) fue mayor en ambas condiciones de estrés ensayadas comparado con el control (Fig. 61).

Con respecto a los ácidos grasos poliinsaturados, en la fracción de fosfolípidos, se observó un incremento significativo en las microalgas cultivadas bajo estrés B comparado con cultivos estrés A y control (Tabla 12). El incremento en los AGPs, sería atribuido principalmente a mayores proporciones del ácido linoleico (C18:2n6cis) (Fig. 61).

#### Comparación de los lípidos extraídos con los métodos de *n*-hexano (Shen et al. (2009) y de Zhekisheva et al. (2002)

En la extracción con *n*-hexano el contenido relativo de lípidos neutros fue significativamente mayor que en la extracción con el método propuesto por Zhekisheva et al. (2002) ( $P=0,95$ ) (Tabla 11 y Fig. 62). Esta proporción se mantuvo relativamente constante en las tres condiciones de cultivo ensayadas. Por el contrario en la extracción con el método de Zhekisheva et al. (2002) y en las tres condiciones de cultivo, el contenido de los lípidos polares (glicolípidos y fosfolípidos) fue significativamente mayor que en la extracción con *n*-hexano (Tabla 11). Es decir, el porcentaje de glicolípidos aumentó desde 6-13% extraídos con *n*-hexano a 17-24%, expresado como porcentaje del total de lípidos extraídos con el método Zhekisheva et al. (2002). De la misma manera, el porcentaje de fosfolípidos aumentó de 9-4 % extraídos con *n*-hexano a 21-23 % extraídos

con el método Zhekisheva et al. (2002), incremento que se observó en ambas condiciones de estrés (Fig. 62). Es decir, el método de extracción lipídica utilizado afectó el contenido relativo de las distintas fracciones, expresado como porcentaje de lípidos totales.

### Comparación de la composición de ácidos grasos en cultivos control en los dos métodos de extracción (Tabla 13)

#### *Fracción de lípidos neutros:*

Cuando los lípidos se extrajeron con hexano, la proporción de AGPs fue del 49% del total de lípidos, mientras que esta fue del 46% cuando se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002). Diferencia que podría ser atribuida al mayor contenido relativo de los ácidos linoleico y linolénico. En cambio, en el producto de la extracción con el método Zhekisheva et al. (2002), la proporción de AGSs fue del 28% del total de lípidos extraídos, mientras que esta fue del 24% cuando se extrajo con hexano. Diferencia que podría ser atribuida al mayor contenido relativo de los ácidos mirístico, palmítico y esteárico.

#### *Fracción de glicolípidos:*

Cuando los lípidos se extrajeron con hexano, la proporción de AGSs fue del 46% del total de lípidos, mientras que esta fue del 35% cuando se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002), diferencia que podría ser atribuida al contenido relativo de los ácidos palmítico y esteárico. En la extracción con el método Zhekisheva et al. (2002), la proporción de AGPs fue de 38%, mientras que con hexano 30%.

#### *Fracción de fosfolípidos*

Cuando los lípidos se extrajeron con hexano, la proporción de AGSs y AGPs fue del 46% y 36% del total de lípidos, mientras que fue del 37% y 25%, respectivamente cuando se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002).

No se observaron diferencias significativas entre ambos métodos de extracción con respecto a la proporción de AGMs en ninguna de las tres fracciones lipídicas.

### Comparación de la composición de ácidos grasos en la condición de estrés A en los dos métodos de extracción (Tabla 14)

#### *Fracción de lípidos neutros*

Cuando los lípidos se extrajeron con hexano, la proporción de AGMs fue del 24 % del total de lípidos, mientras que esta fue del 20% cuando se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002). En cambio, en el producto de la extracción con este último método, la proporción de AGSs fue del 30% del total de lípidos extraídos, mientras que esta fue de aproximadamente 26% cuando se extrajo con hexano. Diferencia que podría ser atribuida al mayor contenido relativo de los ácidos palmítico y esteárico (Fig. 63). No se observaron diferencias significativas entre ambos métodos de extracción con respecto a la proporción de AGPs (43% con metanol y 42% con hexano), sin embargo, el contenido relativo del ácido linolénico extraído con hexano, resultó ser menor que lo observado en las extracciones con el método Zhekisheva et al. (2002) (Fig. 63).

#### *Fracción de glicolípidos*

Cuando los lípidos se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002), la proporción de AGPs fue de 35% del total de lípidos, siendo tan solo del 23% cuando se extrajo con hexano, diferencia que podría ser atribuida al mayor contenido relativo de los ácidos linoleico, linolelaídico y linolénico (Fig. 63). No se observaron diferencias significativas entre ambos métodos de extracción en la proporción de AGSs y AGMs.

### *Fración de fosfolípidos*

Cuando los lípidos se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002), la proporción de AGSs fue de 47%, mientras que cuando se extrajo con hexano del 40%. No se observaron diferencias significativas entre ambos métodos de extracción en la proporción de AGMs y AGPs.

### Comparación de la composición de ácidos grasos en la condición de estrés B en los dos métodos de extracción (Tabla 15)

#### *Fración de lípidos neutros*

Cuando los lípidos se extrajeron con hexano, la proporción de AGSs fue del 32% del total de lípidos, mientras que esta fue del 30% cuando se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002). En cambio, en el producto de la extracción con el método Zhekisheva et al. (2002), la proporción de AGPs fue del 47% del total de lípidos extraídos, mientras que esta fue del 38% cuando se extrajo con hexano. Diferencia que podría ser atribuida principalmente, al mayor contenido relativo de los ácidos linoleico y linolénico (Fig. 64). No se observaron diferencias significativas entre ambos métodos de extracción con respecto a la proporción de AGMs.

#### *Fración de glicolípidos*

Cuando los lípidos se extrajeron con hexano, la proporción de AGSs y AGMs fue del 48% y 27% del total de lípidos respectivamente, mientras que esta fue del 40% y 18%, respectivamente cuando se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002). En la extracción con el método Zhekisheva et al. (2002) la proporción de AGPs fue de 36%, mientras que con hexano 17%.

#### *Fración de fosfolípidos*

Cuando los lípidos se extrajeron con hexano, la proporción de AGSs fue del 52% del total de los lípidos, mientras que fue del 30% cuando se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002). Cuando los lípidos se extrajeron con el método Zhekisheva et al. (2002), la proporción de AGMs y AGPs fue del 21% y 43% del total de lípidos respectivamente, mientras que esta fue del 12% y 25%, respectivamente cuando se extrajeron con hexano.

## **II- A partir de volúmenes mayores**

Como objetivo en esta etapa se propuso implementar una técnica de extracción de la fracción lipídica de *H. pluvialis* que fuera viable a mayor escala. Por tal motivo se testeó el empleo de *n*-hexano, dado que, si bien los rendimientos en la extracción de lípidos totales a pequeña escala fueron menores en comparación con el método propuesto por Zhekisheva et al. (2002), la metodología es más sencilla y la recuperación de la fracción neutra fue mayor (Fig. 62). Además el hexano es uno de los solventes más utilizados para la extracción de lípidos en la industria de alimentos, debido a su baja toxicidad e inflamabilidad (Materiales y Métodos, método III).

El proceso de extracción se realizó por duplicado en un reactor como se indica en Materiales y Métodos. Se obtuvieron 0,66 g de lípidos totales, partiendo de 3,7 g de biomasa liofilizada, lo que equivale a un rendimiento de 17,74 %, y 0,63 g de lípidos totales partiendo de 3,5 g de liofilizado, lo que equivale a un rendimiento de 18,1 %. Es decir, un promedio aproximado de 18 % de lípidos totales por gramo de biomasa liofilizada.

## **Obtención de biodiesel y evaluación de rendimientos**

Se emplearon dos métodos para la obtención de biodiesel a partir de la especie en estudio:

### A) Método convencional por catálisis ácida

Se partió de una cantidad inicial de 4,5 g de biomasa seca ( $m_{BS}$ ) y de una masa inicial de lípidos ( $m_L$ ) de 0,71 g.

Después de finalizada la reacción, la muestra fue lavada con agua destilada y centrifugada con el fin de separar las fases acuosa y oleosa. La fase oleosa contuvo el producto obtenido y eventualmente un pequeño porcentaje del alcohol excedente. Finalizada esta etapa, la masa de fase oleosa ( $m_{FO}$ ) alcanzó 0,5028 g.

Para el análisis cromatográfico (ver materiales y métodos), a partir de la misma muestra de productos (fase oleosa) se realizaron una serie de inyecciones a modo de réplicas, cuyos resultados se resumen en la Tabla A.

Componente	% en peso					
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Glicerina	0,01	0,01	0,01	0,13	0,04	0,09
<b>Ester Metílico (biodiesel)</b>	<b>98,05</b>	<b>93,75</b>	<b>94,58</b>	<b>99,03</b>	<b>95,84</b>	<b>99,32</b>
Monoglicérido	1,90	6,20	5,38	0,45	4,03	0,32
Diglicerido	0,01	0,01	0,01	0,11	0,03	0,08
Triglicerido	0,03	0,03	0,02	0,27	0,07	0,19

**Tabla A.** Resultados del análisis cromatográfico de los productos de reacción

Como se observa en la tabla, la conversión de triglicéridos es prácticamente total. El porcentaje promedio de biodiesel fue de **96,8** % con un coeficiente de variación de 2,44 % (desvío estándar/media). Asimismo, el porcentaje de monoglicéridos fue del orden del 5 % y el de diglicéridos inferior al 0,05 %.

#### **Cálculo de rendimientos**

En la Tabla B se resumen los rendimientos calculados considerando la media de las composiciones para las seis réplicas de la Tabla A (% en peso biodiesel = 96,8). Los cálculos de rendimiento según materiales y métodos.

$\eta_E$ (extracción)	$\eta_R$ (reacción)	$\eta_G$ (global)
0,16	0,69	0,11

**Tabla B.** Rendimientos promedio

Los factores de respuesta obtenidos para el ácido oleico, etil oleato, glicerina, tripalmitina, 1,3 dipalmitina y mono palmitoil, se muestran en la Tabla C, conjuntamente con el desvío estándar.

Compuesto	Factor de respuesta	Desvío estándar
Glicerol	2,1369	0,0101
Acido Oleico	1,0204	0,0207
Monopalmitoil	1,0889	0,0632
1,3 di palmitina	1,0655	0,0552
Tripalmitina	0,8099	0,0327
Etil oleato	0,8789	0,0616

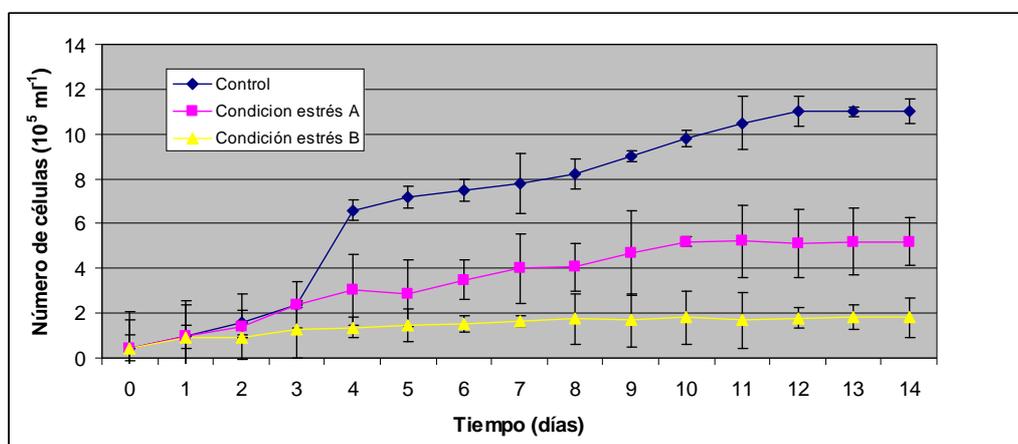
**Tabla C.** Resultados del análisis cromatográfico de los productos de reacción

El cromatograma obtenido con la muestra se observa en la Figura 65. El tiempo de retención de la glicerina fue de 5,58 min, el del tetradecano (estándar interno) de 7,75 min, para el éster fue de 16,9 min (flecha), para los ácidos grasos de 17,41 min. El monoglicérido apareció a los 20,6 min, el diglicérido fue detectado a los 28,99 min, mientras que el triglicérido salió a los 32,5 minutos.

## **B) Método de metanol supercrítico**

En la Figura 66 se puede observar el comportamiento de la presión del sistema utilizado con el incremento de la temperatura.

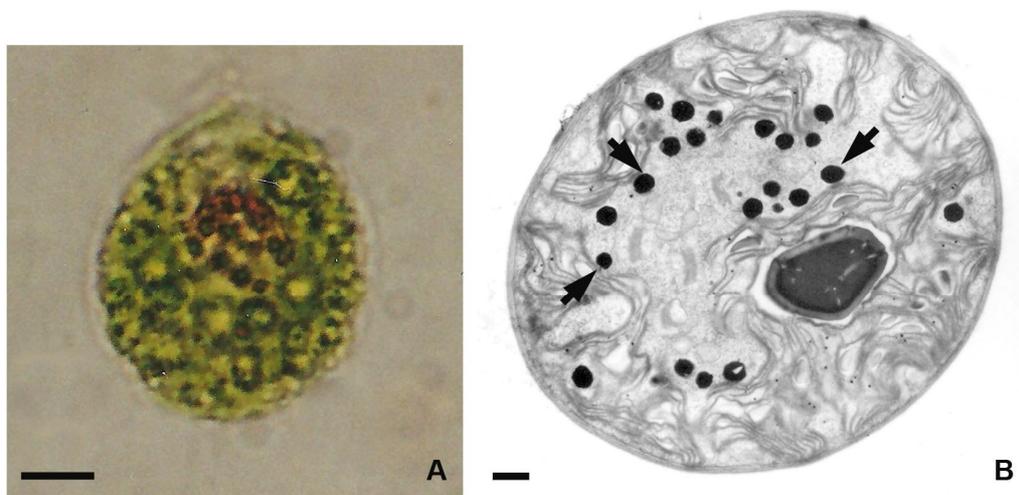
Los análisis de la muestra obtenida en la reacción indican que efectivamente se logró extraer el aceite a partir de *Haematococcus pluvialis* y se produjo su transesterificación. Bajo las condiciones de temperatura y presión del ensayo se obtuvo un 19,3 % en peso de ésteres. Por el tiempo de elución de los picos de ésteres, se trata de ésteres de carbono 16 y 18. Las Figuras 67 y 68 muestran los resultados obtenidos con las muestras con y sin sililante, respectivamente.



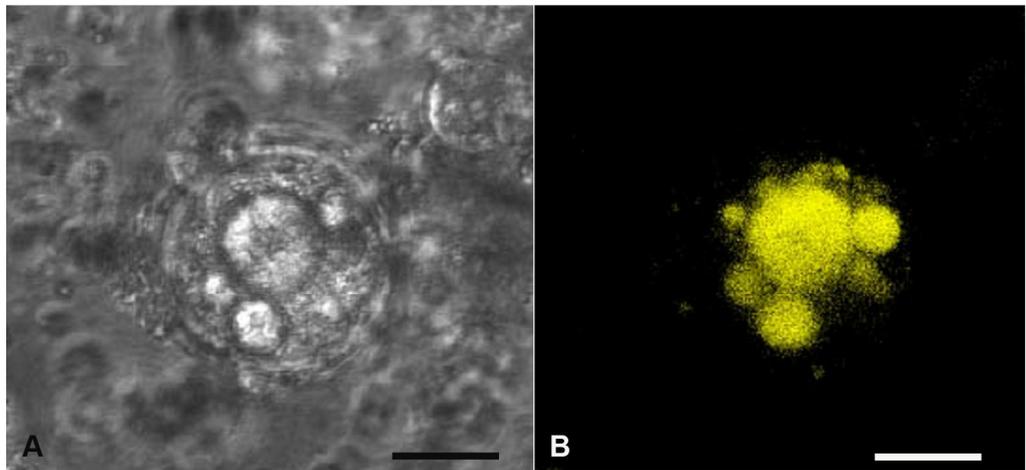
**Figura 49.** Curvas de crecimiento de *Haematococcus pluvialis* en cultivos control, condiciones de estrés A (alta intensidad de luz y medio completo) y condiciones de estrés B (alta intensidad de luz y sin nitrógeno). Las barras de error representan las desviaciones estándar entre tres réplicas.

<i>H. pluvialis</i>	Nº máx. células/ml	<i>k</i> (div/d)	Lípidos totales (% peso seco)	Lípidos neutros (% peso seco)	Glicolípidos (% peso seco)	Fosfolípidos (% peso seco)
<b>Control</b>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	0,79	15,61± 1,46 <sup>(b)</sup>	9,20± 0,67 <sup>(1)</sup>	3,70± 0,38 <sup>(3)</sup>	1,87± 0,05 <sup>(4)</sup>
<b>Condición Estrés A</b>	5,2 x 10 <sup>5</sup>	0,56	34,85± 0,78 <sup>(c)</sup>	19,80± 0,14 <sup>(2)</sup>	7,85± 1,77 <sup>(3)</sup>	9,50± 0,00 <sup>(3)</sup>
<b>Condición Estrés B</b>	1,8 x 10 <sup>5</sup>	0,07	32,99± 2,77 <sup>(c)</sup>	16,60± 1,41 <sup>(2)</sup>	6,67± 1,65 <sup>(3)</sup>	9,80± 1,84 <sup>(3)</sup>

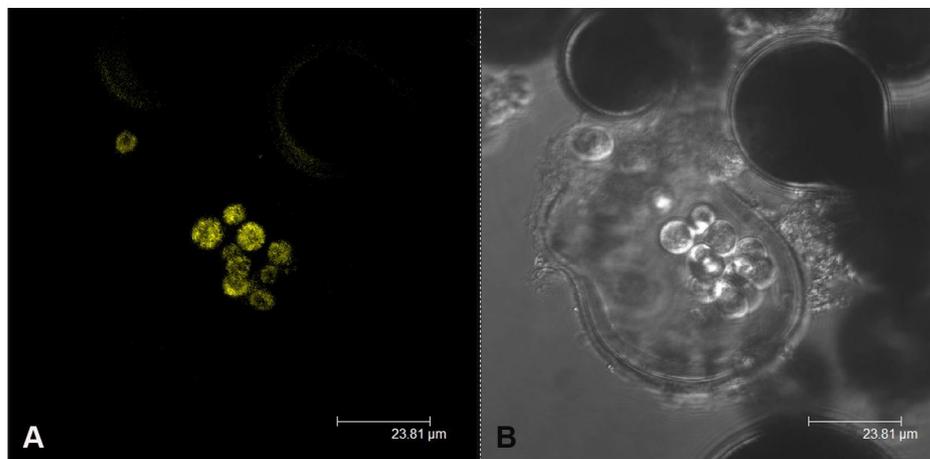
**Tabla 10.** Contenido de lípidos totales y de las distintas fracciones (neutros, glicolípidos y fosfolípidos) en diferentes condiciones de cultivo de *Haematococcus pluvialis*, extraídos con el método Zhekisheva et al. (2002). Los valores representan las medias ± desviaciones estándar de tres réplicas. Igual superíndice corresponde a diferencias no significativas ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura 50.** Células de *Haematococcus pluvialis* en cultivos bajo condiciones de estrés **A:** fotomicrografía óptica; notar las gotas refringentes pardas teñidas con Sudán IV a pocas horas de iniciado el cultivo. **B:** fotomicrografía electrónica de transmisión; las flechas indican los depósitos lipídicos citoplasmáticos electrónicamente densos, después de 48 horas de cultivo.  
Escala: 1  $\mu\text{m}$ .



**Figura 51.** Cisto de *Haematococcus pluvialis* bajo condiciones de estrés. **A:** fotomicrografía de contraste de fases. **B:** fotomicrografía de fluorescencia. Tinción con Rojo Nilo; notar los depósitos de lípidos neutros amarillo dorados. Escala: 20  $\mu$ m.



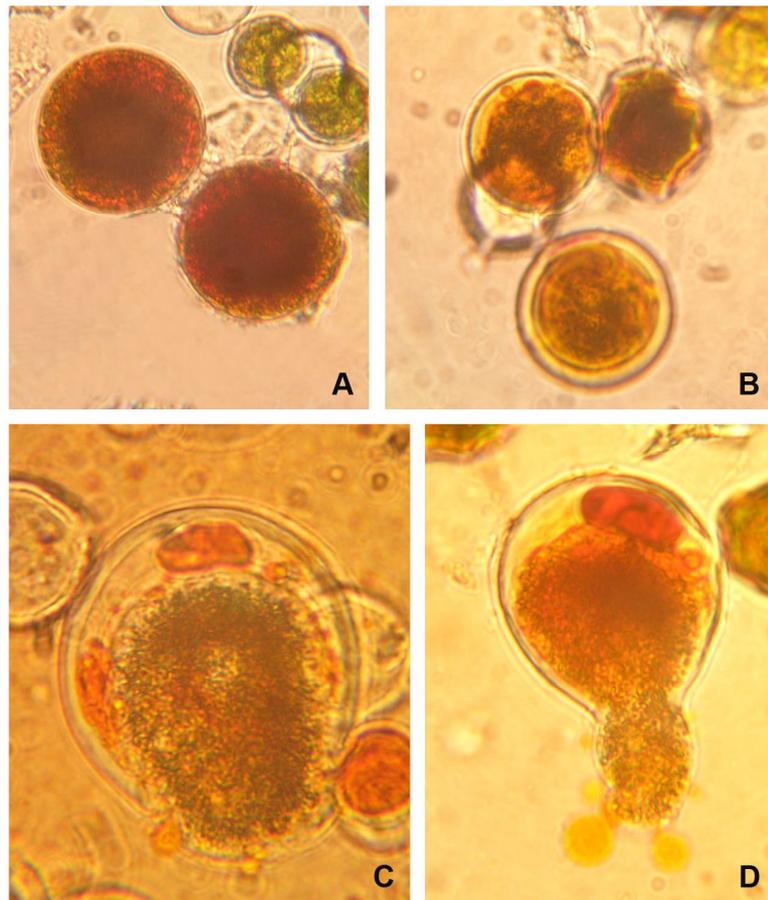
**Figura 52.** Esporocisto de *Haematococcus pluvialis*. **A:** fotomicrografía de fluorescencia. Tinción con Rojo Nilo; notar los depósitos de lípidos neutros finamente distribuidos por todo el citoplasma de las zoósporas. **B:** fotomicrografía de contraste de fases. Escala: 20 µm.



**Figura 53.** Cultivos de *Haematococcus pluvialis* en fase de crecimiento exponencial. **A:** un litro. **B:** un litro y medio. **C:** cinco litros; las flechas indican la aireación.



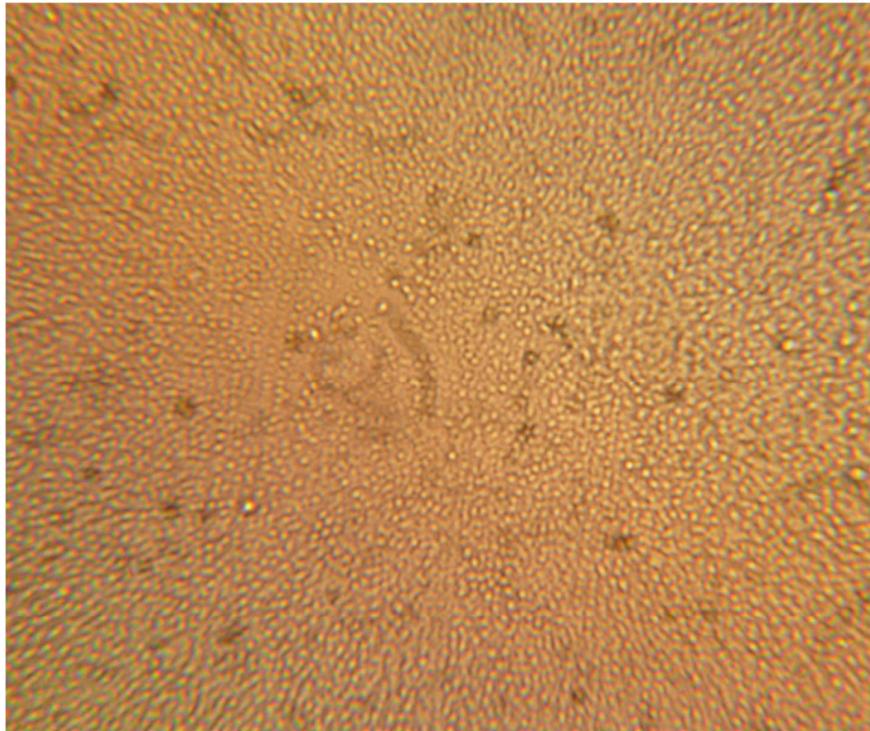
**Figura 54.** Escalado de cultivos de *Haematococcus pluvialis*. **A:** cinco litros. **B-E:** treinta y cinco litros. **B:** inicio del cultivo. **C:** cultivo de 10 días. **D:** cultivo de 15 días. **E:** cultivo estresado con alta intensidad de luz.



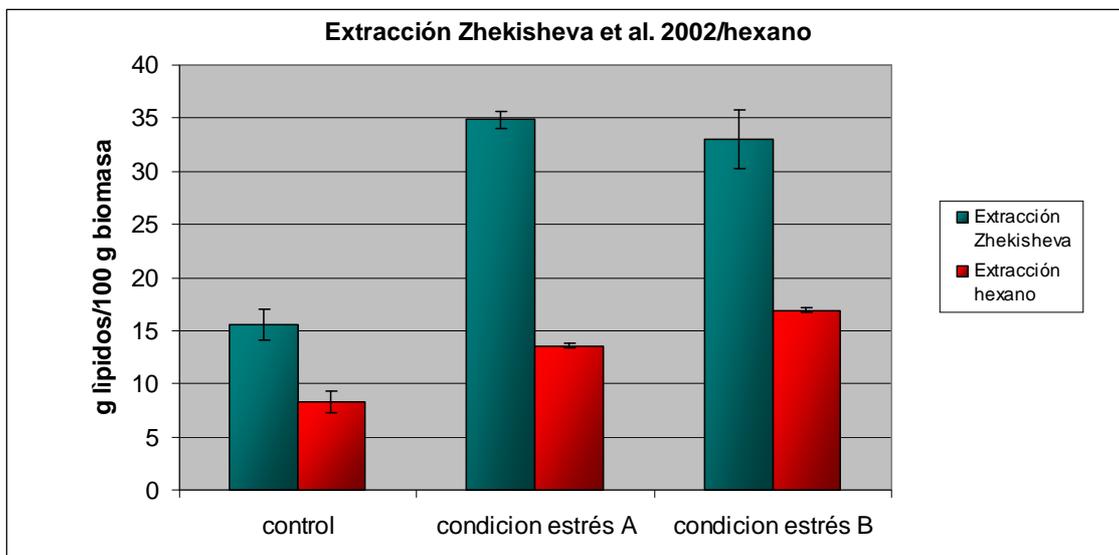
**Figura 55.** Monitoreo de la ruptura de la pared celular de *Haematococcus pluvialis* previo a la extracción de lípidos. **A-D:** micrografías ópticas. **A:** biomasa liofilizada. **B:** permeabilización de la pared con DMSO-calor. **C-D:** ruptura de la pared y liberación del contenido intracelular.

Cultivo de <i>Haematococcus</i>	Método de extracción utilizado	Lípidos totales (g/100 g biomasa seca)	Lípidos neutros (g/100 g lípidos totales)	Glicolípidos (g/100 g lípidos totales)	Fosfolípidos (g/100 g lípidos totales)
<b>Control</b>	Zhekisheva et al. (2002)	15,61 ± 1,46 <sup>(b)</sup>	59,25 ± 1,48 <sup>(1)</sup>	23,95 ± 3,61 <sup>(3)</sup>	5,70 ± 0,71 <sup>(5)</sup>
	hexano	8,31 ± 1,01 <sup>(a)</sup>	81,31 ± 0,01 <sup>(2)</sup>	13,51 ± 0,01 <sup>(4)</sup>	5,11 ± 0,01 <sup>(5)</sup>
<b>Estrés A</b>	Zhekisheva et al. (2002)	34,85 ± 0,78 <sup>(c)</sup>	56,55 ± 1,20 <sup>(1)</sup>	22,65 ± 5,59 <sup>(3)</sup>	20,85 ± 6,56 <sup>(3)</sup>
	hexano	13,55 ± 0,21 <sup>(b)</sup>	83,00 ± 5,09 <sup>(2)</sup>	7,20 ± 1,27 <sup>(5)</sup>	9,05 ± 1,34 <sup>(5)</sup>
<b>Estrés B</b>	Zhekisheva et al. (2002)	32,99 ± 2,77 <sup>(c)</sup>	56,20 ± 0,00 <sup>(1)</sup>	17,40 ± 0,00 <sup>(3)</sup>	23,10 ± 4,38 <sup>(3)</sup>
	hexano	16,94 ± 0,28 <sup>(b)</sup>	87,30 ± 2,33 <sup>(2)</sup>	6,45 ± 0,49 <sup>(5)</sup>	4,20 ± 0,71 <sup>(5)</sup>

**Tabla 11.** Recuperación del contenido lipídico total y de las cantidades de cada fracción recuperada (neutros, fosfolípidos y glicolípidos), comparando dos métodos de extracción: Zhekisheva et al. (2002) y *n*-hexano, en *Haematococcus pluvialis* sometido a diferentes condiciones de cultivo: control, estrés A y estrés B. Iguales superíndices indican diferencias no significativas entre los valores ( $\alpha=0,05$ ). Los valores representan las medias entre tres réplicas.



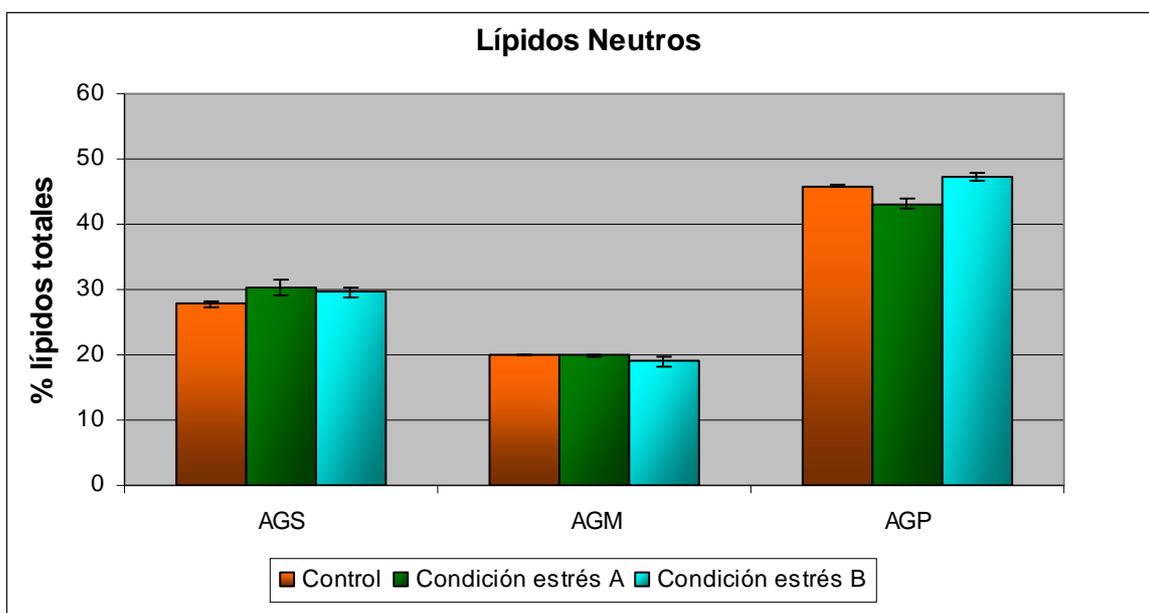
**Figura 56.** Emulsión formada durante la extracción de lípidos con n-hexano.



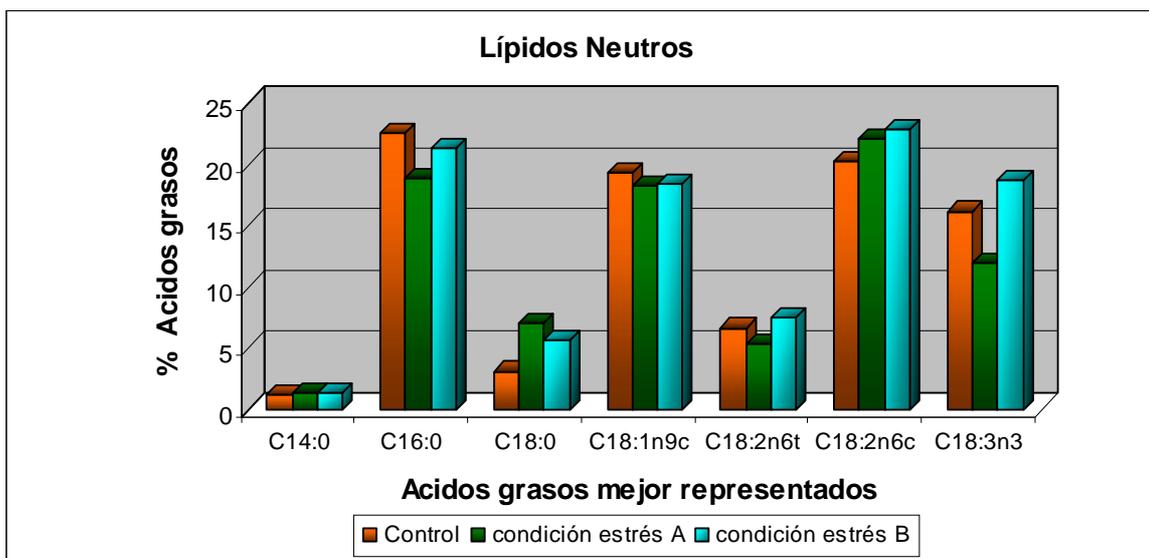
**Figura 57.** Comparación de lípidos totales entre los dos métodos de extracción en *Haematococcus pluvialis* sometido a diferentes condiciones de cultivo: control, estrés A y estrés B. Las barras de error representan las desviaciones estándar entre tres réplicas.

Ácidos Grasos	Lípidos Neutros			Glicolípidos			Fosfolípidos		
	Control	Estrés A	Estrés B	Control	Estrés A	Estrés B	Control	Estrés A	Estrés B
C6:0	nd	1,33	0,25	nd	3,99	2,65	tr	2,50	0,93
C8:0	nd	0,27	0,13	nd	0,40	0,35	tr	0,40	tr
C10:0	tr	0,23	tr	nd	0,35	0,28	nd	0,48	0,25
C12:0	0,21	0,30	0,44	nd	tr	0,36	nd	nd	tr
C13:0	nd	nd	0,16	nd	nd	0,25	nd	nd	tr
C14:0	1,25 ± 0,04	1,35 ± 0,29	1,35 ± 0,56	1,75 ± 0,02	1,81 ± 0,76	1,55 ± 1,24	2,01 ± 0,06	1,82 ± 0,07	2,22 ± 1,28
C14:1	tr	nd	nd	3,47	tr	tr	5,01	tr	tr
C15:0	0,19	0,27	0,44	3,86	0,79	0,47	5,54	0,79	0,44
C15:1	nd	nd	nd	5,19	tr	nd	7,27	nd	nd
C16:0	22,49 ± 0,28	18,87 ± 0,57	21,29 ± 0,86	25,12 ± 0,15	18,94 ± 0,28	20,32 ± 1,86	23,27 ± 2,3	25,67 ± 1,05	19,10 ± 0,78
C16:1	0,64	0,58	0,83	0,59	0,88	1,47	0,51	0,82	0,76
C17:0	0,19	0,32	0,32	tr	0,43	0,47	0,47	0,51	0,47
C18:0	3,15 ± 0,04	7,07 ± 1,05	5,69 ± 0,75	3,98 ± 0,21	9,62 ± 0,85	10,80 ± 0,28	4,38 ± 0,06	7,45 ± 1,35	5,68 ± 1,28
C18:1n9t	tr	0,67 ± 0,13	tr	tr	1,73	1,05	0,88	1,91	0,20
C18:1n9c	19,36 ± 0,26	18,25 ± 0,11	18,35 ± 0,36	8,09 ± 0,24	14,71 ± 1,25	16,11 ± 0,28	7,96 ± 2	21,56 ± 1,58	20,11 ± 0,68
C18:2n6t	6,67 ± 0,13	5,37 ± 0,85	7,57 ± 0,94	6,56 ± 0,04	4,72 ± 1,85	5,09 ± 0,15	3,50 ± 0,15	0,51 ± 0,22	0,41 ± 0,85
C18:2n6c	20,23 ± 0,16	22,06 ± 0,85	22,90 ± 0,33	9,65 ± 0,31	15,49 ± 0,75	14,06 ± 1,55	8,11 ± 0,76	19,16 ± 0,85	31,78 ± 0,03
C20:0	0,20	0,32	0,27	tr	0,33	0,49	0,40	0,36	0,52
C18:3n6	0,86	1,02	0,95	0,60	0,37	0,30	0,80	1,50	0,70
C20:1	0,13	0,23	0,17	tr	tr	tr	nd	0,20	0,16
C18:3n3	16,18 ± 0,12	12,01 ± 0,89	18,69 ± 0,44	20,51 ± 0,06	12,45 ± 0,26	11,80 ± 0,80	10,67 ± 0,21	6,01 ± 1,36	7,78 ± 0,86
C20:2	0,32	1,15	1,59	0,71	tr	tr	0,97	0,35	1,07
C22:0	0,18	0,31	0,25	tr	0,37	0,73	0,40	0,35	0,44
C22:1n9	tr	0,17	0,16	nd	nd	2,76	nd	nd	nd
C20:4n6	0,89	1,21	0,84	0,26	0,68	0,84	0,55	0,58	0,62
C24:0	tr	0,20	tr	tr	0,11	0,37	0,42	tr	0,13
C20:5n3	0,57	0,48	0,49	tr	0,38	0,18	0,21	0,39	0,81
C22:5n3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,15	0,19	0,31
% AGS	27,81 ± 0,42 <sup>(a)</sup>	30,36 ± 1,19 <sup>(b)</sup>	29,62 ± 0,73 <sup>(b)</sup>	34,71 ± 4,32 <sup>(d)</sup>	38,06 ± 5,97 <sup>(d)</sup>	40,23 ± 8,34 <sup>(d)</sup>	37,08 ± 1,38 <sup>(e)</sup>	46,91 ± 3,19 <sup>(f)</sup>	30,14 ± 9,31 <sup>(e,o)</sup>
% AGM	20,07 ± 0,06 <sup>(g)</sup>	19,91 ± 0,12 <sup>(g)</sup>	18,96 ± 0,65 <sup>(h)</sup>	17,34 ± 2,02 <sup>(i)</sup>	18,14 ± 6,09 <sup>(i)</sup>	17,78 ± 1,73 <sup>(i)</sup>	19,69 ± 3,01 <sup>(i)</sup>	24,49 ± 3,81 <sup>(i)</sup>	21,08 ± 0,73 <sup>(i)</sup>
% AGP	45,80 ± 0,18 <sup>(k)</sup>	43,15 ± 0,68 <sup>(l)</sup>	47,23 ± 0,56 <sup>(m)</sup>	38,28 ± 1,95 <sup>(d)</sup>	35,01 ± 2,63 <sup>(d)</sup>	36,35 ± 2,55 <sup>(d)</sup>	24,97 ± 4,38 <sup>(i)</sup>	29,51 ± 5,58 <sup>(i)</sup>	43,07 ± 14,06 <sup>(o)</sup>

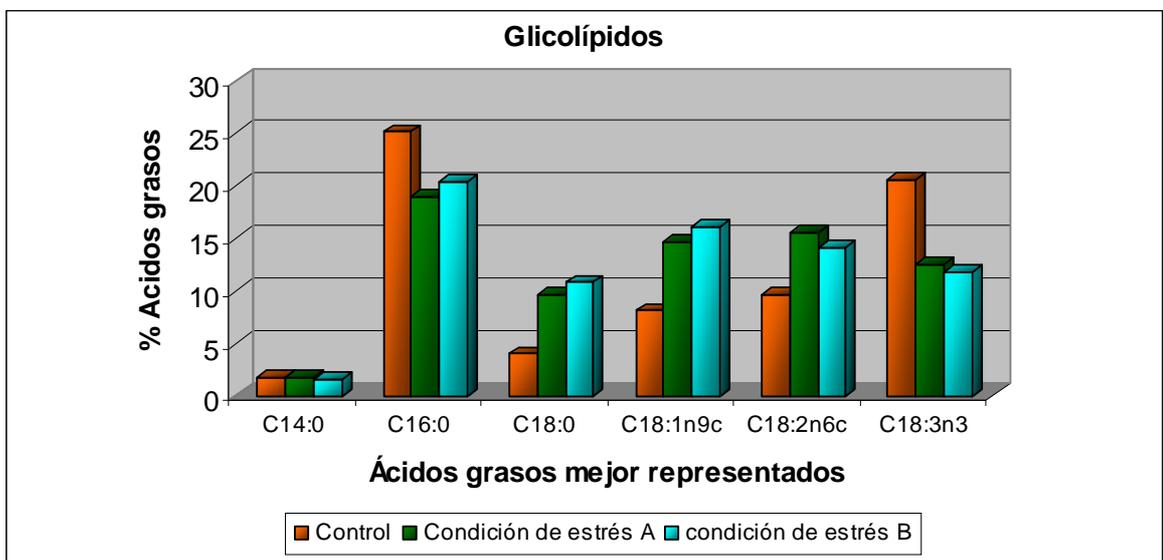
**Tabla 12.** Perfil de ácidos grasos (% de lípidos totales) en las fracciones de lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos de *H. pluvialis* extraídos con el método Zhekisheva (2002). Los valores representan las medias de cuatro réplicas. Superíndices iguales indican diferencias no significativas entre los valores medios. AGS: ácidos grasos saturados, AGM: ácidos grasos monoinsaturados, AGP: ácidos grasos poliinsaturados, nd: no detectado, tr: traza. En la tabla sólo se indican los desvíos estándar de los principales ácidos grasos.



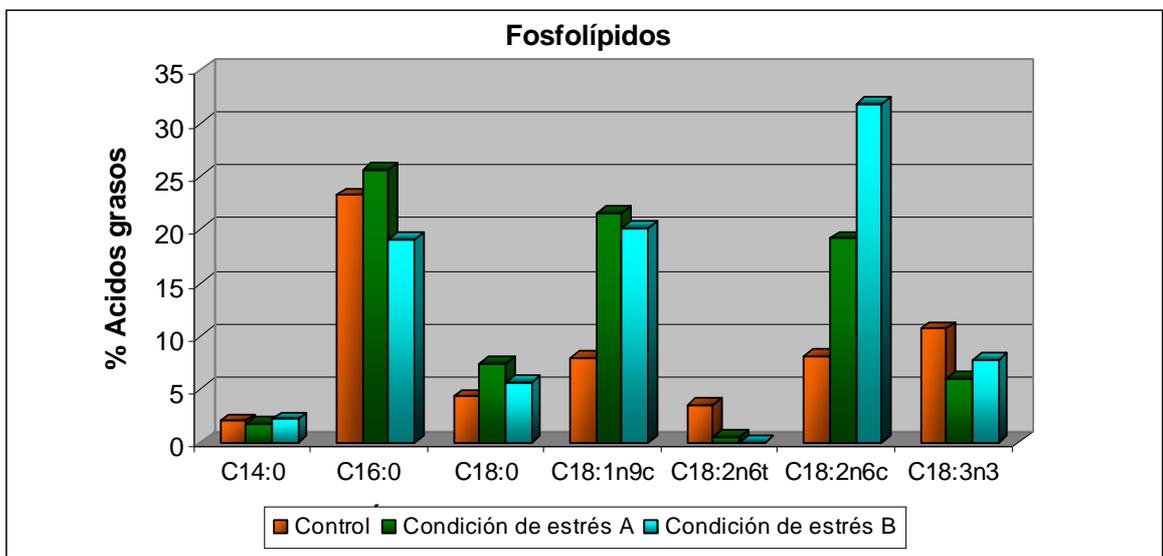
**Figura 58.** Proporción de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP) extraídos con el método Zhekisheva et al. (2002), en la fracción lípidos neutros de *Haematococcus pluvialis* sometido a distintas condiciones de cultivo. Las barras de error representan las desviaciones estándar entre tres réplicas.



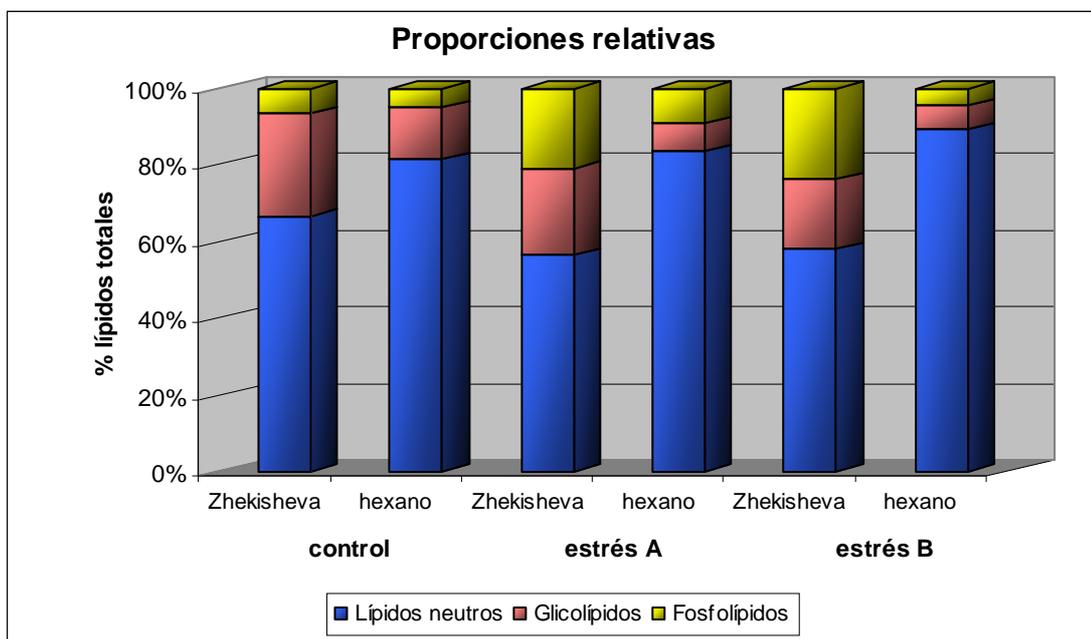
**Figura 59.** Contenido relativo de los principales ácidos grasos extraídos con el método Zhekisheva et al. (2002), en la fracción lípidos neutros en *Haematococcus pluvialis* sometido a diferentes condiciones de cultivo.



**Figura 60.** Contenido relativo de los principales ácidos grasos extraídos con el método Zhekisheva et al. (2002), en la fracción glicolípidos en *Haematococcus pluvialis* sometido a diferentes condiciones de cultivo.



**Figura 61.** Contenido relativo de los principales ácidos grasos extraídos con el método Zhekisheva et al. (2002), en la fracción fosfolípidos en *Haematococcus pluvialis* sometido a diferentes condiciones de cultivo.



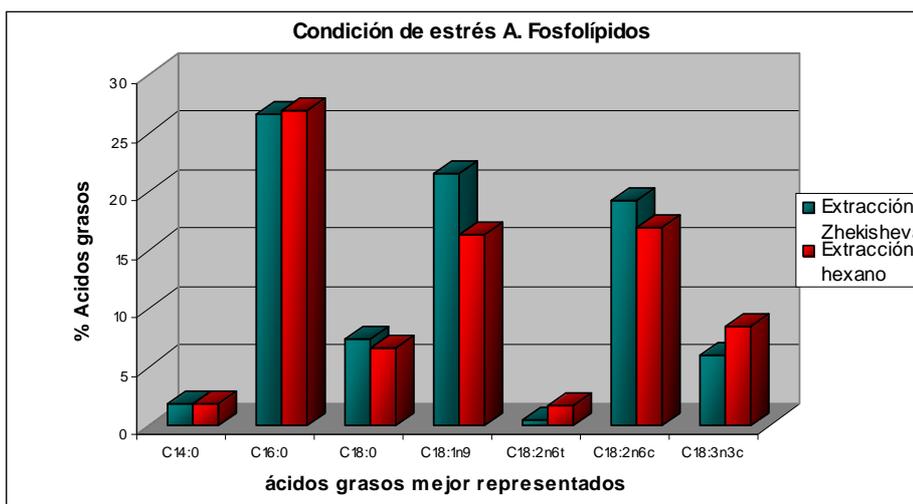
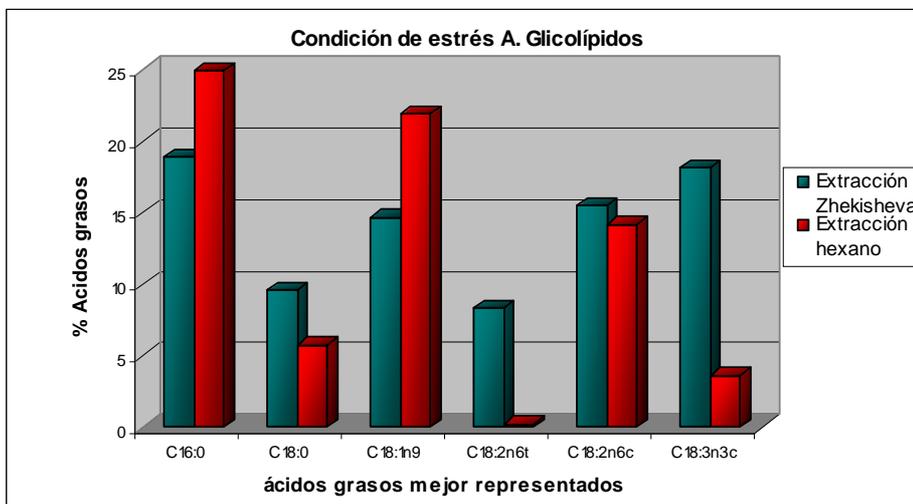
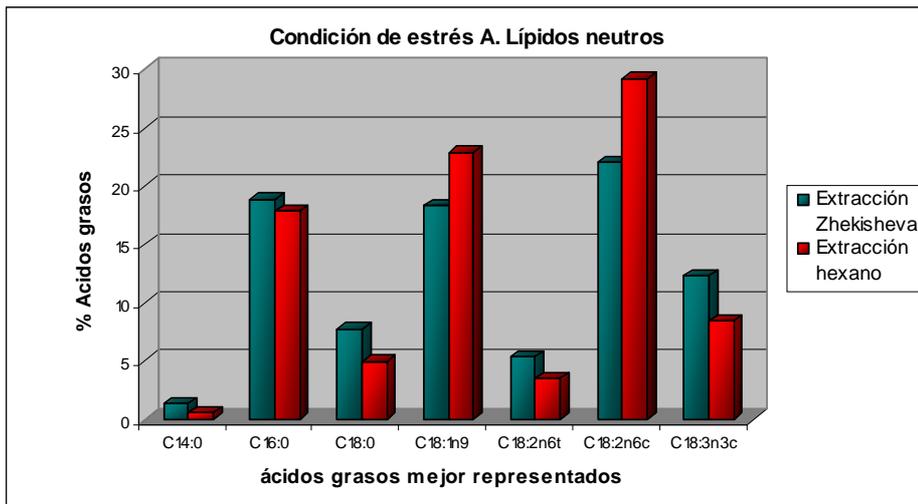
**Figura 62.** Proporciones relativas de las fracciones lipídicas en *Haematococcus pluvialis* cultivado bajo distintas condiciones (control, estrés A, estrés B) y comparando los dos métodos de extracción (Zhekisheva et al. 2002 y *n*-hexano).

Ácidos Grasos	Lípidos neutros		Glicolípidos		Fosfolípidos	
	Extracción Zhekisheva	Extracción hexano	Extracción Zhekisheva	Extracción hexano	Extracción Zhekisheva	Extracción hexano
C6:0	nd	nd	nd	nd	tr	1,62
C8:0	nd	nd	nd	nd	tr	nd
C10:0	tr	tr	nd	nd	nd	nd
C12:0	0,21	0,10	nd	nd	nd	tr
C13:0	nd	tr	nd	nd	nd	tr
C14:0	1,25 ± 0,04	0,76 ± 0,06	1,75 ± 0,02	1,25 ± 0,09	2,01 ± 0,06	1,61 ± 0,11
C14:1	tr	tr	3,47	0,90	5,01	4,85
C15:0	0,19	0,10	3,86	0,76	5,54	0,78
C15:1	nd	nd	5,19	3,4	7,27	5,01
C16:0	22,49 ± 0,28	19,70 ± 0,04	25,12 ± 0,15	31,38 ± 0,44	23,27 ± 2,3	34,68 ± 0,73
C16:1	0,64	0,57	0,59	0,60	0,51	1,00
C17:0	0,19	0,15	tr	0,74	0,47	0,90
C18:0	3,15 ± 0,04	2,70 ± 1,05	3,98 ± 0,21	9,89 ± 0,90	4,38 ± 0,06	6,08 ± 0,04
C18:1n9t	tr	0,07	tr	tr	0,88	nd
C18:1n9c	19,36 ± 0,26	19,91 ± 0,09	8,09 ± 0,24	14,54 ± 0,54	7,96 ± 2	15,68 ± 0,54
C18:2n6t	6,67 ± 0,13	6,18 ± 0,04	6,56 ± 0,04	2,55 ± 0,34	3,50 ± 0,15	1,72 ± 0,84
C18:2n6c	20,23 ± 0,16	23,30 ± 0,84	9,65 ± 0,31	12,21 ± 0,64	8,11 ± 0,76	13,69 ± 0,84
C20:0	0,20	0,32	tr	0,78	0,40	0,78
C18:3n6	0,86	0,93	0,60	0,63	0,80	1,99
C20:1	0,13	0,20	tr	tr	nd	tr
C18:3n3	16,18 ± 0,12	17,25 ± 0,04	20,51 ± 0,06	10,23 ± 1,8	10,67 ± 0,21	10,30 ± 0,06
C20:2	0,32	0,21	0,71	0,98	0,97	1,48
C22:0	0,18	0,28	tr	0,90	0,40	0,3
C22:1n9	tr	0,10	nd	nd	nd	nd
C20:4n6	0,89	0,78	0,26	1,05	0,55	2,48
C24:0	tr	0,10	tr	0,32	0,42	nd
C20:5n3	0,57	0,43	tr	0,89	0,21	1,78
C22:5n3	nd	tr	nd	1,52	0,15	2,37
% AGS	27,81 ± 0,42 <sup>(a)</sup>	24,21 ± 0,36 <sup>(d)</sup>	34,71 ± 4,32 <sup>(d)</sup>	46,02 ± 0,01 <sup>(h)</sup>	37,08 ± 1,38 <sup>(e)</sup>	45,67 ± 0,61 <sup>(h)</sup>
% AGM	20,07 ± 0,06 <sup>(g)</sup>	20,89 ± 0,10 <sup>(c)</sup>	17,34 ± 2,02 <sup>(i)</sup>	15,14 ± 0,16 <sup>(a)</sup>	19,69 ± 3,01 <sup>(j)</sup>	16,68 ± 0,16 <sup>(a)</sup>
% AGP	45,80 ± 0,18 <sup>(k)</sup>	48,88 ± 0,31 <sup>(l)</sup>	38,28 ± 1,95 <sup>(d)</sup>	30,05 ± 0,16 <sup>(e)</sup>	24,97 ± 4,38 <sup>(j)</sup>	35,81 ± 0,29 <sup>(j)</sup>

**Tabla 13.** Comparación de los perfiles de los ácidos grasos de lípidos extraídos con ambos métodos (Zhekisheva et al. 2002 y *n*-hexano), a partir de cultivos control de *Haematococcus pluvialis*. Los valores representan los valores medios de cuatro réplicas. Iguales superíndices indican diferencias no significativas entre los mismos. En la tabla sólo se indican los desvíos estándar de los principales ácidos grasos.

Ácidos Grasos	Lípidos neutros		Glicolípidos		Fosfolípidos	
	Extracción Zhekisheva	Extracción hexano	Extracción Zhekisheva	Extracción hexano	Extracción Zhekisheva	Extracción hexano
C6:0	1,33	0,26	3,99	1,29	2,50	0,89
C8:0	0,27	nd	0,40	0,33	0,40	0,264
C10:0	0,23	nd	0,35	0,23	0,48	0,474
C12:0	0,30	0,07	tr	0,24	nd	0,382
C13:0	nd	nd	nd	0,18	nd	0,228
C14:0	1,35 ± 0,29	0,52 ± 0,75	1,81 ± 0,76	1,22 ± 0,50	1,82 ± 0,07	1,88 ± 0,20
C14:1	nd	nd	tr	0,13	tr	0,38
C15:0	0,27	0,10	0,79	0,96	0,79	0,57
C15:1	nd	nd	tr	tr	nd	nd
C16:0	18,87 ± 0,57	17,87 ± 0,59	18,94 ± 0,28	25,03 ± 1,60	25,67 ± 1,05	26,90 ± 0,29
C16:1	0,58	0,27	0,88	1,53	0,82	1,06
C17:0	0,32	0,15	0,43	1,35	0,51	0,43
C18:0	7,07 ± 1,05	4,96 ± 0,89	9,62 ± 0,85	5,75 ± 1,05	7,45 ± 1,35	6,60 ± 0,79
C18:1n9t	0,67 ± 0,13	0,38 ± 0,79	1,73 ± 0,20	0,62 ± 0,50	1,91 ± 0,29	1 ± 0,40
C18:1n9c	18,25 ± 0,11	22,84 ± 0,20	14,71 ± 1,25	21,94 ± 0,56	21,56 ± 1,58	16,38 ± 1,1
C18:2n6t	5,37 ± 0,85	3,47 ± 0,80	4,72 ± 1,85	0,23 ± 0,79	0,51 ± 0,22	1,8 ± 0,11
C18:2n6c	22,06 ± 0,85	29,24 ± 0,29	15,49 ± 0,75	14,21 ± 2,15	19,16 ± 0,85	16,95 ± 1,1
C20:0	0,32	0,37	0,33	1,15	0,36	0,47
C18:3n6	1,02	0,78	0,37	0,72	1,50	0,80
C20:1	0,23	0,13	tr	0,21	0,20	0,26
C18:3n3	12,01 ± 0,89	8,46 ± 1,64	12,45 ± 0,26	3,62 ± 0,84	6,01 ± 1,36	8,46 ± 0,29
C20:2	1,15	0,43	tr	0,49	0,35	1,15
C22:0	0,31	0,40	0,37	0,70	0,35	0,26
C22:1n9	0,17	0,11	nd	0,24	nd	nd
C20:4n6	1,21	0,88	0,68	0,99	0,58	1,59
C24:0	0,20	0,23	0,11	nd	tr	0,3
C20:5n3	0,48	0,32	0,38	0,54	0,39	0,77
C22:5n3	nd	tr	nd	0,50	0,19	0,23
% AGS	30,36 ± 1,19 <sup>(b)</sup>	25,79 ± 0,18 <sup>(b)</sup>	38,06 ± 5,97 <sup>(d)</sup>	39,43 ± 0,12 <sup>(a)</sup>	46,91 ± 3,19 <sup>(f)</sup>	39,53 ± 0,42 <sup>(b)</sup>
% AGM	19,91 ± 0,12 <sup>(g)</sup>	23,63 ± 0,10 <sup>(d)</sup>	18,14 ± 6,09 <sup>(i)</sup>	24,77 ± 0,26 <sup>(b)</sup>	24,49 ± 3,81 <sup>(i)</sup>	26,44 ± 4,88 <sup>(c)</sup>
% AGP	43,15 ± 0,68 <sup>(i)</sup>	42,37 ± 0,03 <sup>(e)</sup>	35,01 ± 2,63 <sup>(d)</sup>	22,63 ± 0,22 <sup>(d)</sup>	29,51 ± 5,58 <sup>(i)</sup>	29,06 ± 0,14 <sup>(d)</sup>

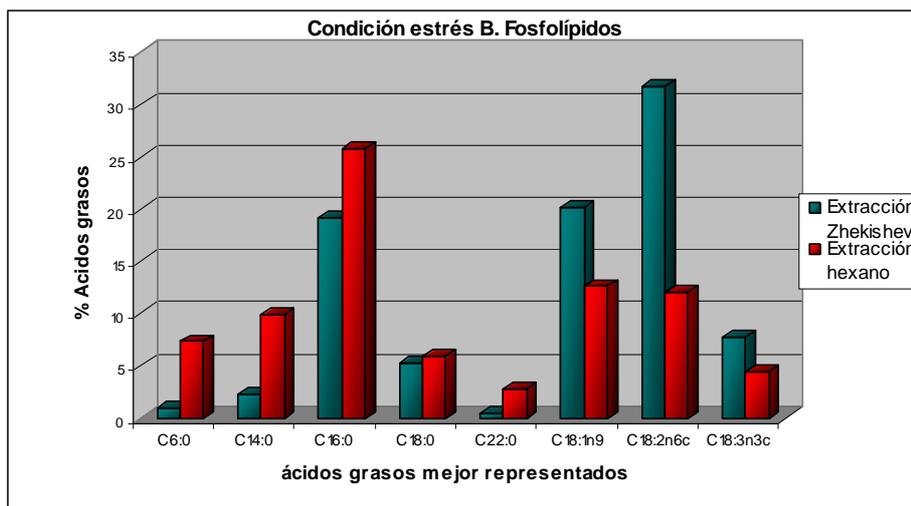
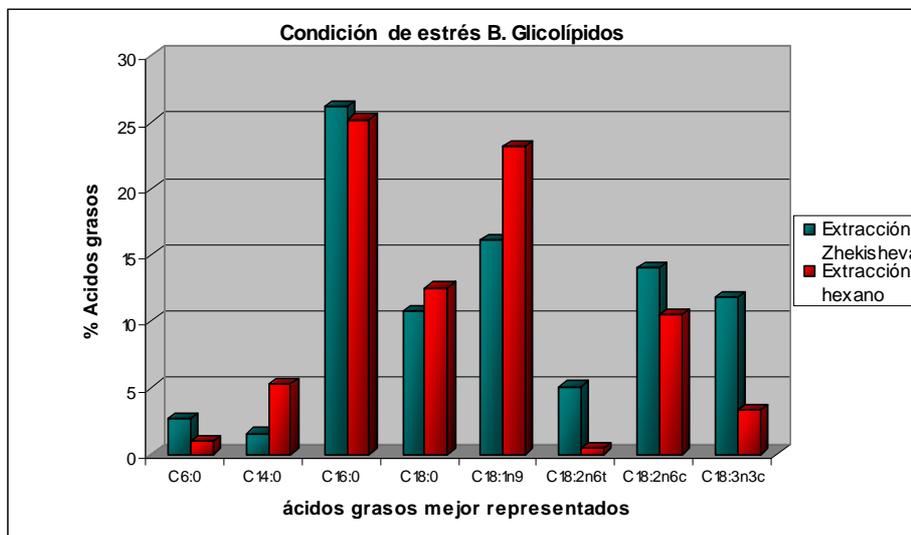
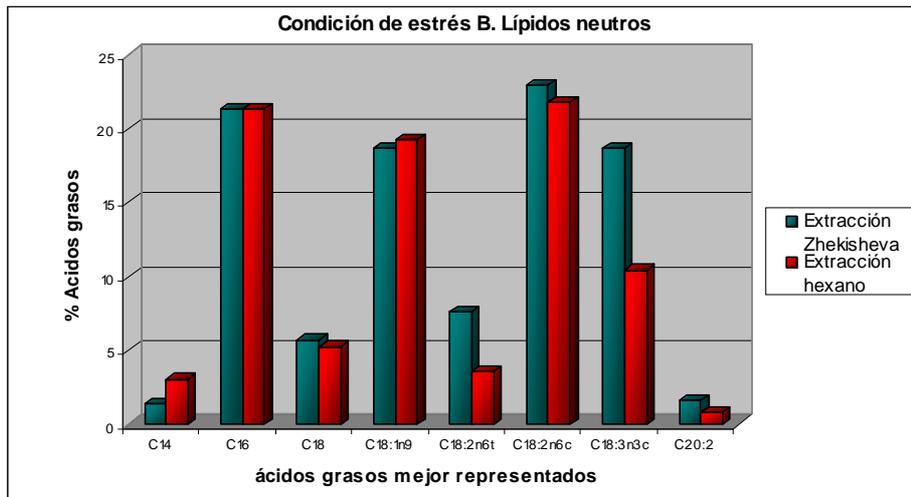
**Tabla 14.** Comparación de los perfiles de los ácidos grasos de lípidos extraídos con ambos métodos (Zhekisheva et al. 2002 y *n*-hexano), a partir de cultivos bajo condiciones de estrés A de *H. pluvialis*. Los valores representan los valores medios de cuatro réplicas. Iguales superíndices indican diferencias no significativas entre los mismos. En la tabla sólo se indican los desvíos estándar de los principales ácidos grasos.



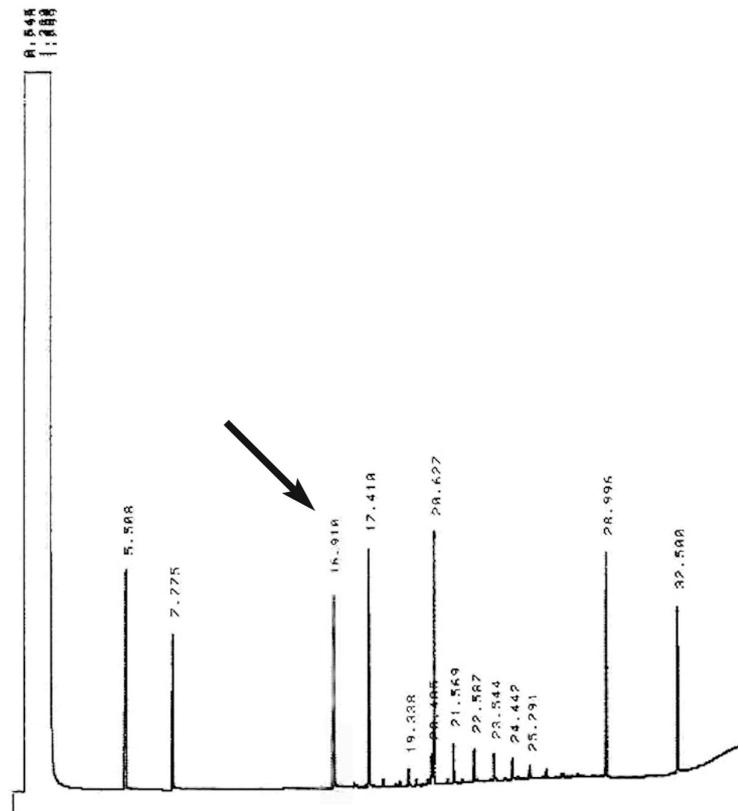
**Figura 63.** Contenido relativo de los principales ácidos grasos de las tres fracciones lipídicas en cultivos de *Haematococcus pluvialis* bajo condiciones de estrés A. Comparación entre ambos métodos de extracción (Zhekisheva et al. 2002 y n-hexano).

Ácidos Grasos	Lípidos Neutros		Glicolípidos		Fosfolípidos	
	Extracción Zhekisheva	Extracción hexano	Extracción Zhekisheva	Extracción hexano	Extracción Zhekisheva	Extracción hexano
C6:0	0,25	0,11	2,65	1,00	0,93	7,32
C8:0	0,13	tr	0,35	0,15	tr	0,54
C10:0	tr	0,21	0,28	0,07	0,25	0,51
C12:0	0,44	0,63	0,36	0,82	tr	0,50
C13:0	0,16	0,10	0,25	0,18	tr	tr
C14:0	1,35 ± 0,56	3,04 ± 0,23	1,55 ± 1,24	5,31 ± 1,05	2,22 ± 1,28	9,87 ± 0,50
C14:1	nd	0,22	tr	0,51	tr	tr
C15:0	0,44	0,44	0,47	1,00	0,44	0,78
C15:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C16:0	21,29 ± 0,86	21,30 ± 1,80	20,32 ± 1,86	25,18 ± 1,56	19,10 ± 0,78	25,79 ± 2
C16:1	0,83	0,78	1,47	1,39	0,76	0,99
C17:0	0,32	0,35	0,47	0,67	0,47	0,71
C18:0	5,69 ± 0,75	5,23 ± 0,56	10,80 ± 0,28	12,53 ± 1,50	5,68 ± 1,28	5,91 ± 0,80
C18:1n9t	tr	tr	1,05	1,93	0,20	0,14
C18:1n9c	18,35 ± 0,36	19,24 ± 0,26	16,11 ± 0,28	23,16 ± 0,89	20,11 ± 0,68	12,62 ± 1,27
C18:2n6t	7,57 ± 0,94	3,55 ± 0,84	5,09 ± 0,15	0,40 ± 0,05	0,41 ± 0,85	0,24 ± 0,03
C18:2n6c	22,90 ± 0,33	21,75 ± 0,59	14,06 ± 1,55	10,53 ± 0,71	31,78 ± 0,03	12,62 ± 0,85
C20:0	0,27	0,29	0,49	0,35	0,52	0,25
C18:3n6	0,95	0,57	0,30	0,22	0,70	0,73
C20:1	0,17	0,14	tr	0,16	0,16	nd
C18:3n3	18,69 ± 0,44	10,44 ± 0,84	11,80 ± 0,80	3,34 ± 1,45	7,78 ± 0,86	4,36 ± 0,70
C20:2	1,59	0,78	tr	0,37	1,07	0,73
C22:0	0,25	0,30	0,73	0,24	0,44	2,72
C22:1n9	0,16	0,23	2,76	1,80	nd	nd
C20:4n6	0,84	0,55	0,84	tr	0,62	0,59
C24:0	tr	tr	0,37	nd	0,13	nd
C20:5n3	0,49	0,30	0,18	0,48	0,81	1,00
C22:5n3	nd	nd	nd	0,22	0,31	0,86
% AGS	29,62 ± 0,73 <sup>(b)</sup>	32,17 ± 1,13 <sup>(b)</sup>	40,23 ± 8,34 <sup>(d)</sup>	47,80 ± 0,19 <sup>(a)</sup>	30,14 ± 9,31 <sup>(e,o)</sup>	52,17 ± 0,62 <sup>(b)</sup>
% AGM	18,96 ± 0,65 <sup>(h)</sup>	20,69 ± 0,81 <sup>(c)</sup>	17,78 ± 1,73 <sup>(i)</sup>	27,14 ± 0,07 <sup>(c)</sup>	21,08 ± 0,73 <sup>(j)</sup>	11,73 ± 0,49 <sup>(d)</sup>
% AGP	47,23 ± 0,56 <sup>(m)</sup>	37,93 ± 0,86 <sup>(a)</sup>	36,35 ± 2,55 <sup>(d)</sup>	17,35 ± 0,31 <sup>(b)</sup>	43,07 ± 14,06 <sup>(o)</sup>	25,14 ± 0,10 <sup>(a)</sup>

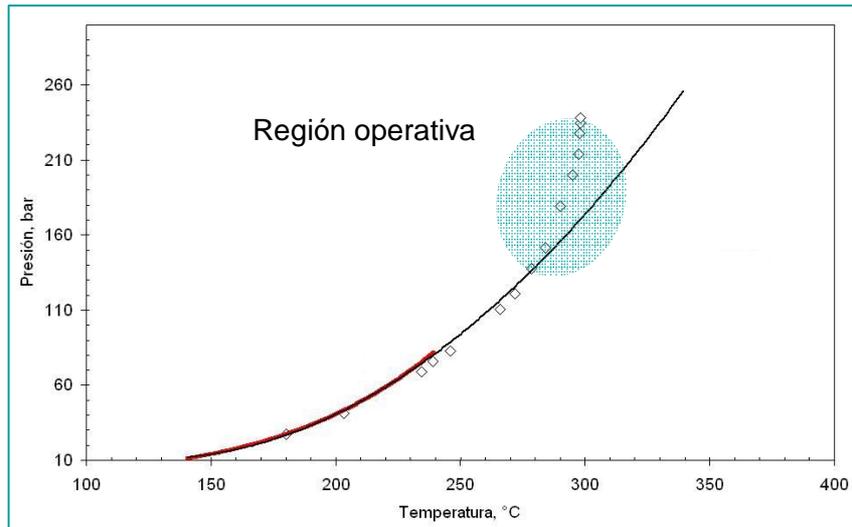
**Tabla 15.** Comparación de los perfiles de los ácidos grasos de lípidos extraídos con ambos métodos (Zhekisheva et al. 2002 y n-hexano), a partir de cultivos bajo condiciones de estrés B de *Haematococcus pluvialis*. Los valores representan los valores medios de cuatro réplicas. Iguales superíndices indican diferencias no significativas entre los mismos. En la tabla sólo se indican los desvíos estándar de los principales ácidos grasos.



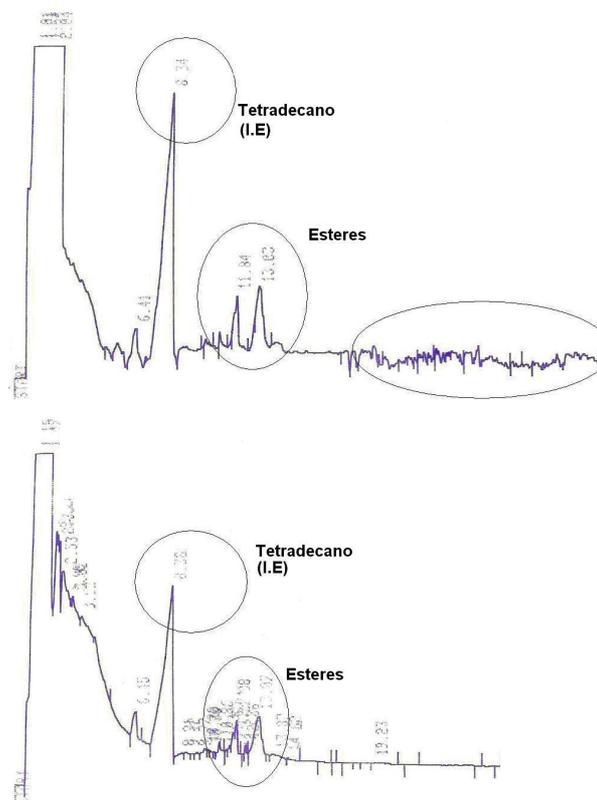
**Figura 64.** Contenido relativo de los principales ácidos grasos de las tres fracciones lipídicas en cultivos de *Haematococcus pluvialis* bajo condiciones de estrés B. Comparación entre ambos métodos de extracción (Zhekisheva et al. 2002 y n-hexano).



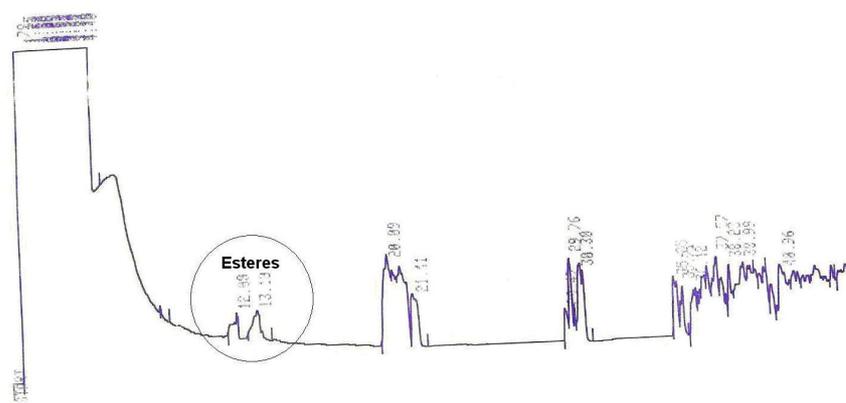
**Figura 65.** Cromatograma. Obtención de biodiesel por el método convencional por catalisi ácida. La flecha indica la presencia de ésteres.



**Fig. 66.** Obtención de biodiesel a partir de *Haematococcus pluvialis*, utilizando metanol supercrítico. (—) Presión de vapor de metanol (—) Extrapolación de la curva de presión de vapor de metanol (◇) Trayectoria experimental. La figura muestra la curva de presión de metanol y la región de operación estudiada.



**Figura 67.** Obtención de biodiesel a partir de *Haematococcus pluvialis* utilizando metanol en estado supercrítico. Productos sililados y sometidos a cromatografía con estándar interno (tetradecano). Contenido de ésteres: 19,3 %.



**Figura 68.** Obtención de biodiesel a partir de *Haematococcus pluvialis* utilizando metanol en estado supercrítico. Ensayo de cromatografía sin sililación y estándar interno.

## DISCUSIÓN

### Síntesis de lípidos

Hu et al. (2008) recopilaron información de más de 60 años, acerca de las especies de microalgas productoras de lípidos, de las vías biosintéticas de los ácidos grasos y triacilgliceroles, como así también, de los factores ambientales y biológicos que pueden afectar estas vías. Sin embargo, con respecto a la composición de los ácidos grasos, indicaron que mucha de la información provista procede de un número limitado de especies de algas estudiadas hasta el presente, en las cuales la mayoría de los resultados provienen del total de lípidos extraídos y no del análisis de las clases individuales de lípidos. Es por esta razón que ha surgido la necesidad de nuevos estudios enfocados principalmente en la determinación del contenido y composición lipídica, como así también, en los protocolos de extracción de aceites y caracterización de ácidos grasos para la optimización de los procesos de producción de biodiesel a partir de microalgas.

### Caracterización de glóbulos lipídicos con microscopios óptico y electrónico

Las observaciones con microscopio electrónico de transmisión permitieron evidenciar en *H. pluvialis* depósitos de glóbulos lipídicos en el citoplasma, acumulados durante condiciones de estrés. El fluoróculo Rojo Nilo constituyó una herramienta rápida y segura para determinar la presencia de lípidos neutros, no solo en las zoósporas, que carecen de pared celular resistente, sino también en los cistos. Esta técnica previamente fue empleada para detectar lípidos neutros en diversas especies de microalgas como *Nannochloropsis* sp. *Dunaliella salina*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Tetraselmis suecica* (Sukenik et al. 1989, Eley et al. 2007, Mendoza Gusmán et al. 2010).

## Extracción y Composición lipídica

### Caracterización de lípidos extraídos por el método de Zhekisheva et al. (2002)

La extracción de lípidos en tejidos animales resulta más sencilla que en tejidos vegetales, dado que en ausencia de pared celular, la penetración del solvente o sistema de solventes se ve favorecida por un simple homogeneizado o mezcla (Folch et al. 1957, Bligh y Dyer 1959). Sin embargo, en tejidos ó células vegetales y en especial en microalgas, el método de extracción no está estandarizado, dependiendo del tamaño celular, de las características físicas y químicas de la pared celular, del medio de incubación, etc. El éxito de la extracción lipídica, en varias especies de microalgas estudiadas, como por ejemplo, *Scenedesmus obliquus* (Wiltshire et al. 2000), *Chlorella vulgaris* (Xu et al. 2006, Widjaja et al. 2009), *Chaetoceros gracilis* (Pernet y Tremblay 2003), *Nannochloropsis* sp. (Gouveia y Oliveira 2009) y *Haematococcus pluvialis* (Damiani et al. 2010) depende fundamentalmente del proceso de ruptura celular y del o los solventes utilizados.

La presencia de una gruesa pared formada por una capa externa de algaenano en los cistos de *H. pluvialis* (Damiani et al. 2006) constituyó una barrera física importante; razón por la cual, los métodos de extracción tradicionales, como por ejemplo el propuesto por Folch (1957), no proporcionaron los resultados esperados. Resultados similares fueron obtenidos en otras especies de microalgas con paredes con algaenanos, como *Scenedesmus dimorphus*, *S. obliquus* y *Chlorella protothecoides* (Wiltshire et al. 2000, Shen et al. 2009), donde debieron ser aplicados pasos previos de ruptura celular mecánica como ultrasonificación, molienda húmeda o alta presión.

El proceso de liofilizado y el posterior tratamiento químico con DMSO empleado en el método de Zhekisheva et al. (2002) para la extracción de lípidos, posibilitó el

debilitamiento de la pared celular de los cistos de *H. pluvialis* permitiendo, de esta manera, la liberación del contenido intracelular.

Si bien la acumulación de ácidos grasos en las microalgas bajo limitación de nitrógeno es un fenómeno ampliamente conocido (Ben-Amotz et al. 1985, Yu et al. 1987, Roessler 1990, Rodolfi et al. 2009), el efecto de la intensidad de luz en el contenido de ácidos grasos ha sido estudiado en menor medida (Zhekisheva et al. 2002, Cerón et al. 2007). Por esta razón en este estudio, se puso énfasis en examinar la relación entre la acumulación de lípidos y alta intensidad de luz en cultivos de *H. pluvialis* en presencia o ausencia de nitrógeno. Las dos condiciones de estrés ensayadas provocaron un incremento de alrededor del doble en el contenido de lípidos totales con respecto al cultivo control, sin embargo, en cultivos con alta intensidad de luz y sin nitrógeno (condición de estrés B) la tasa de crecimiento se vio fuertemente afectada, alcanzando valores extremadamente bajos, comparada con los cultivos estresados con alta intensidad de luz y medio completo (condición de estrés A). Cerón et al. (2007) detectaron en cultivos de *H. pluvialis*, creciendo con alta intensidad lumínica pero con moderadas limitaciones de nitrógeno (1,7 mM), rendimientos lipídicos de aproximadamente 39,8 %.

En ambas condiciones de estrés el incremento de lípidos totales se correlacionó con un aumento significativo del contenido de lípidos neutros y fosfolípidos, con respecto al control. Sin embargo, las diferencias entre los contenidos de glicolípidos no fueron significativas ( $P=0,95$ ).

Con respecto al perfil de ácidos grasos, éste fue similar en cultivos control y en ambas condiciones de estrés. Coincidentemente Zhekisheva et al. (2002) no observaron diferencias con respecto a la composición de ácidos grasos en cultivos de una cepa alemana de *H. pluvialis*, sometidos a altas intensidades de luz o a limitación de nitrógeno. En la especie en estudio se observó, en ambas condiciones de estrés, una leve disminución del contenido relativo de ácido oleico en la fracción de lípidos neutros; sin

embargo, este se duplicó y triplicó en las fracciones de glicolípidos y fosfolípidos respectivamente. Zhekisheva et al. (2002) observaron en la cepa alemana de *H. pluvialis* un incremento del contenido del ácido oleico en la fracción de triglicéridos, lo cual se vio reflejado en el aumento del contenido de lípidos totales. De la misma manera Cerón et al. (2007) indicaron que el ácido oleico fue el principal ácido graso monoinsaturado presente en los cistos. Las diferencias en el contenido relativo del ácido oleico observadas en este estudio podrían ser atribuidas a distintas condiciones de cultivo a las cuales fue sometida la cepa argentina de *H. pluvialis*, ya que: 1) los cultivos en algunos casos no fueron suplementados con CO<sub>2</sub>, y en otros casos la cantidad y periodicidad de incorporación de este gas fue mucho menor que la indicada por Zhekisheva et al. (2002) y Cerón et al. (2007), 2) los cultivos estresados fueron sometidos a luz continua, en lugar de fotoperíodo, 3) la limitación de nitrógeno se realizó en simultáneo con alta intensidad de luz, 4) las mediciones del contenido lipídico se realizaron en tiempos diferentes a los indicados por Zhekisheva et al. (2002) para la cepa alemana.

Si bien el perfil de ácidos grasos de los aceites extraídos con el método de Zhekisheva et al. (2002) fue cualitativamente similar en las dos condiciones de estrés ensayadas en *H. pluvialis*, se pueden destacar algunas diferencias cuantitativas. En las microalgas cultivadas bajo alta intensidad de luz y medio completo (condición de estrés A) se observó en la fracción de lípidos neutros un incremento en el contenido de AGMs, conjuntamente con una disminución en el contenido relativo de AGPs (gráfico 2) ( $\alpha = 0,05$ ). Asimismo, en la condición de estrés A se detectó mayor proporción de AGSs en la fracción de fosfolípidos, atribuyéndolo a un aumento de ácidos palmítico y esteárico. Por otro lado, en los cultivos creciendo bajo alta intensidad de luz y limitación de nitrógeno (estrés B) se observó mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados en las fracciones de lípidos neutros ( $\alpha = 0,05$ ) y fosfolípidos; alcanzando el contenido relativo de ácido linolénico (C18:3n3) valores de alrededor del 18% en la fracción neutra.

La presencia del ácido graso linolelaídico (C18:2n6*trans*), no había sido indicada con anterioridad para otras cepas de *H. pluvialis* (Zhekisheva et al. 2002, Rosa et al. 2005, Cerón et al. 2007). Según Khotimchenko y Yakovleva (2005) el incremento en el contenido relativo de ácidos grasos *trans*, estaría relacionado con exposiciones a altas intensidades de luz; sin embargo, en este estudio contenidos relativos del ácido graso linolelaídico iguales y hasta mayores fueron observados en las fracciones lipídicas polares y no polares de los cultivos control.

#### Comparación de los lípidos extraídos con los métodos de n-hexano (Shen et al. 2009) y de Zhekisheva et al. (2002)

Se testeó el efecto de la extracción con *n*-hexano en la recuperación de lípidos totales y en la caracterización de los ácidos grasos a partir de biomasa liofilizada de *H. pluvialis* en cultivos control, estrés A y estrés B. Los resultados obtenidos con los diferentes métodos de extracción de lípidos demostraron que, el método utilizado afecta significativamente el contenido de lípidos totales y la composición de las fracciones en la especie en estudio.

En todas las condiciones de cultivo ensayadas el método propuesto por Zhekisheva et al. (2002) fue más eficiente en la recuperación de lípidos totales con respecto al método que utilizó *n*-hexano como solvente de extracción. La menor eficiencia de este último método podría atribuirse a la formación de una emulsión difícil de romper entre el hexano y el DMSO (ruptura celular química empleada), en la que intervienen los fosfolípidos como emulsionantes. Esto no ocurrió al utilizar el método propuesto por Zhekisheva et al. (2002), dado que el metanol y el DMSO son solventes polares, por lo que son miscibles y forman una sola fase. Contrariamente, el hexano como único solvente de extracción, fue el método más eficiente en la recuperación de lípidos totales en las microalgas *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella protothecoides* (Shen et al. 2009).

Esto sugiere que la eficiencia del sistema de solventes en la extracción lipídica, dependerá de la especie microalgal en estudio y principalmente de su compatibilidad con el método de ruptura celular.

En este estudio se prestó particular atención a la fracción neutra, la cual es el principal sustrato para la obtención de biodiesel (Vasudevan y Briggs 2008, Rodolfi et al. 2009). Particularmente, en la extracción con hexano y en las tres condiciones de cultivo ensayadas, el contenido relativo de lípidos neutros fue significativamente mayor que el de los lípidos polares. Esto podría atribuirse a que el hexano es un solvente no polar, por lo cual tiene mayor afinidad por los lípidos neutros que por las fracciones polares. Según Guckert et al. (1988), el hexano es un solvente “selectivo” en la extracción de lípidos neutros con escasa recuperación de la mayoría de los lípidos polares. Esta selectividad del hexano por la fracción neutra, podría ser una elección prometedora para la extracción de lípidos a partir de biomasa microalgal en la obtención de biodiesel.

En cultivos de *H. pluvialis* estresados bajo la condición A, se observó que cuando los lípidos se extrajeron con hexano la proporción de AGSs fue significativamente menor que con el método propuesto por Zhekisheva et al. 2002, con menores contenidos relativos de los ácidos palmítico y esteárico. Característica a tener en cuenta al momento de predecir algunas propiedades del biodiesel a obtener, ya que, altos porcentajes del ácido palmítico y esteárico, conducen a propiedades de fluidez de inferior calidad a bajas temperaturas, ya que los metil ésteres de ambos ácidos son los primeros en precipitar ocasionando taponamientos indeseados en los filtros (Dunn 2005, Francisco et al. 2010).

También se puede destacar una mayor proporción de AGMs en los lípidos extraídos con hexano en ambas condiciones de estrés, con respecto a aquellos extraídos con el método de Zhekisheva et al. (2002); siendo el ácido oleico el ácido graso mejor representado.

Con respecto a los AGPs, si bien no existieron diferencias significativas entre ambos métodos de extracción, resulta importante destacar que el contenido relativo del

ácido linolénico (C18:3n3c) en la extracción con hexano, estuvo muy por debajo del límite permitido por la Norma Argentina IRAM 6515 de la calidad del biodiesel. Esta característica se observó en ambas condiciones de estrés.

### **Cultivo de *Haematococcus pluvialis* a mayor escala (35 L) para la síntesis de lípidos.**

Si bien en los cultivos a mayor escala fue incorporado aire enriquecido con dióxido de carbono, no se observaron diferencias significativas en la extracción de lípidos con *n*-hexano, comparado con los cultivos no suplementados con CO<sub>2</sub>. Como ha sido mencionado por numerosos autores, la incorporación de este gas, implicaría un incremento en el contenido lipídico, especialmente en la fracción de los triglicéridos (Gordillo et al. 1998, Huntley y Redalje 2007, Widjaja et al. 2009). La aplicación de un mayor caudal de CO<sub>2</sub> y un mayor tiempo de exposición en los cultivos deberían ser ensayados en *H. pluvialis*.

### **Características de la materia prima obtenida**

No todos los aceites extraídos a partir de las microalgas, podrían ser utilizados para producir biodiesel compatible con los motores usados en la actualidad. Por ejemplo, los hidrocarburos producidos por *Botryococcus braunii* poseen longitud de cadena mayor a 30 carbonos (Banerjee et al. 2002), mientras que los aceites vegetales comúnmente usados para biodiesel poseen principalmente entre 16 y 18 carbonos (Durrett et al. 2008). De hecho el biodiesel necesita cumplir con ciertas exigencias de estándares preestablecidos. Las propiedades más importantes del biodiesel, como el número de cetano (calidad de ignición), propiedades de fluidez a bajas temperaturas, estabilidad oxidativa e índice de yodo están determinadas por la estructura de los ésteres grasos que forman parte del mismo (Knothe 2005, Chisti 2007). A su vez, las propiedades de los

ésteres grasos están determinadas por las características de los ácidos grasos, tales como la longitud de la cadena carbonada y el grado de insaturación, y de las características del alcohol que los constituyen (Knothe 2005).

La mayoría de los aceites de microalgas difieren de los aceites vegetales en que son ricos en ácidos grasos poliinsaturados con cuatro o más enlaces (Belardi et al. 2000, Chini Zittelli et al. 2006, Rodolfi et al. 2009). Por eso, estas características limitan las especies que podrían ser usadas en la producción de biodiesel. Es importante destacar que los principales ácidos grasos (ac. palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) que se presentan en los aceites de semillas de soja, canola, maíz, girasol y palma, comúnmente utilizados para producir biodiesel de primera generación (Freedman et al. 1986, Lang et al. 2001, Edem 2002, Durret et al. 2008) también se encuentran presentes en *H. pluvialis*.

De acuerdo al perfil de ácidos grasos observado en la especie en estudio, se podrían inferir algunas características del biodiesel a obtener. Si bien en la fracción de lípidos neutros la proporción de AGPs oscila entre 43% en las condiciones de estrés A, el grado de insaturación máximo de la cadena no excede los 3 dobles enlaces, como así también, la longitud de los ácidos grasos mayoritarios es intermedia con un máximo de 18 carbonos.

El biodiesel producido a partir de ácidos grasos con alto contenido de AGPs, posee propiedades favorables de fluidez a bajas temperaturas (Hu et al. 2008), sin embargo, estos ácidos grasos son particularmente susceptibles a la oxidación, y tienden a ocasionar problemas de inestabilidad durante el almacenamiento prolongado. Por lo que el calentamiento de ácidos grasos altamente insaturados, conduce a la formación de depósitos o deterioro de la lubricación del aceite. Este efecto se ve incrementado a medida que aumenta el número de dobles enlaces en la cadena de los ácidos grasos (Francisco et al. 2010).

El índice de yodo de los aceites es una medida del total de insaturaciones (Kyriakidis y Katsiloulis 2000, Knothe 2002, Chisti 2007). El índice de yodo calculado en los aceites de *H. pluvialis* obtenido en condiciones de estrés A (99,64 g I<sub>2</sub>/100 g) estuvo por debajo de los estándares Europeos para biodiesel EN 14214, que determina como valor máximo 120 g I<sub>2</sub>/100 g (Mittelbach 1996, Chisti 2007).

### **Obtención de biodiesel y evaluación del rendimiento.**

Numerosas técnicas y procesos de producción fueron propuestos para transformar los triglicéridos de los aceites en los alquil ésteres de ácidos grasos (biodiesel). Algunas de ellas incluyen la transesterificación catalizada por una base o un ácido, aunque también algunos procesos usando fluidos supercríticos, como metanol o etanol, fueron empleados evitando de esta manera el uso de catalizadores (Warabi et al. 2004, Brignole et al. 2005). La mayoría de los procesos utilizados industrialmente emplean catalizadores alcalinos homogéneos (NaOH o KOH) en un reactor con ultrasonido o cavitación operando en modo batch (Gogate 2008, Kalva et al. 2008, Gogate y Kabadi 2009).

#### **A) Método convencional por catálisis ácida**

En la especie en estudio la extracción de lípidos en mayores volúmenes con el objeto de producir biodiesel, se realizó a partir del método que utilizó *n*-hexano como solvente y a partir de cultivos estresados con alta intensidad de luz y medio de cultivo completo (condiciones de estrés A).

A partir del aceite de *H. pluvialis* fue posible obtener biodiesel llevando a cabo la reacción por catálisis ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). El rendimiento de la reacción  $\eta_R \cong 0,69$  (70%) resultó más bajo que el típico rendimiento industrial ( $\eta_R \cong 1$  g biodiesel/g triglicéridos) cuando se utiliza como reactivo un aceite refinado. Esta disminución en el rendimiento

podría deberse a que la muestra inicial de reactivos (lípidos totales) no estuvo compuesta únicamente por triglicéridos sino además por otros compuestos tales como glicolípidos, fosfolípidos y un porcentaje no determinado de pigmentos. Algunos de estos compuestos son solubles en agua y se eliminarían junto con la fase acuosa provocando un descenso en el rendimiento de la reacción. Además, parte del producto (biodiesel) podría haber sido eliminado en la etapa de lavado debido a la presencia de emulsionantes (fosfolípidos). A escala industrial los lípidos solubles en agua son eliminados previamente del aceite crudo a través de procesos de desgomado.

El rendimiento de la extracción ( $\eta_E \approx 16\%$ ) fue confirmado con otras extracciones a pequeña escala, realizadas a partir de cultivos de la misma especie. Puede esperarse que este rendimiento aumente si se consigue aumentar la recuperación de lípidos en la etapa de extracción con solvente (*n*-hexano). Además, se observó presencia de gotas emulsionadas de lípidos en el refinado que en principio representarían un deterioro del rendimiento de extracción.

## **B) Método de metanol supercrítico**

El principio básico del método de metanol supercrítico en la obtención de biodiesel, se basa en el efecto de la temperatura y presión sobre las propiedades termofísicas del metanol, tales como viscosidad, difusibilidad, densidad y polaridad. Cuando las condiciones experimentales llegan más allá del punto crítico, el metanol alcanza una simple fase fluida. Con este cambio de fase, el metanol aumenta la difusibilidad, decrece la viscosidad y presenta una densidad que puede ser manipulada sobre un rango de pequeños cambios en la temperatura y presión. Estas propiedades indican que el metanol supercrítico puede ser usado como un solvente con características de transferencia superior (Kusdiana y Saka 2001, Demirbas 2007, 2009).

De acuerdo al ensayo realizado en *H. pluvialis* se puede concluir que fue factible la extracción del aceite contenido en la biomasa liofilizada, utilizando metanol a alta temperatura (300 °C). También se puso en evidencia que se efectuó en forma efectiva la *trans*-esterificación de los triglicéridos presentes en los aceites. Sin embargo, también se produjo la extracción y reacción de otros compuestos, como glicoles y fosfolípidos.

Sería necesario estudiar medios de separación de los ésteres presentes en el producto de la reacción mediante agentes de separación másico. Una alternativa es el uso de agua para lavar la glicerina y glicoles, y luego acetona para separar los fosfolípidos del biodiesel. También es preciso estudiar otras condiciones de operación (temperatura y presión) para evaluar si es posible extraer los triglicéridos y disminuir la extracción de otros compuestos que no son deseables en el biodiesel.

El método de metanol supercrítico, presenta algunas ventajas sobre el método de catálisis ácida. Estudios experimentales recientes (Saka y Kusdiana, 2001, Cao et al. 2005) sobre transesterificación de aceites vegetales para la producción de alquil ésteres de ácidos grasos (biodiesel), demostraron que trabajando en condiciones supercríticas es posible obtener altas velocidades de reacción sin el uso de catalizadores. El método convencional de transesterificación utiliza catalizadores básicos (NaOH) o ácidos (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a temperaturas moderadas. En estas condiciones la reacción es lenta (particularmente con catalizadores ácidos) y en general la remoción del catalizador y la obtención de productos de saponificación (con catalizadores básicos) dificultan la purificación de los productos de reacción (biodiesel y glicerina). El incremento de la velocidad de reacción, sumado a la posibilidad de obtener conversiones muy elevadas, permitiría en principio reducir los costos de la transesterificación de aceites. Se intensifica el proceso y se facilita la recuperación de los productos aguas abajo del reactor. Una ventaja adicional es que se puede trabajar con aceites de elevado contenido de acidez y agua, que no son aptos o requieren un tratamiento especial cuando se utilizan catalizadores básicos.

## Consideraciones finales

*H. pluvialis* es considerada una especie robusta dado que es fácil de cultivar bajo condiciones óptimas (Vonshak y Richmond 1985, Cohen 1999), sin embargo, las condiciones que inducen la síntesis de lípidos reducen su tasa de crecimiento, de la misma manera que fue reportado para otras microalgas (Siron et al. 1989, Illman et al. 2000, Griffiths y Harrison, 2009, Rodolfi et al. 2009). Si bien el contenido lipídico registrado bajo la condición de estrés A ensayada fue relativamente alto (34,85% por biomasa de peso seco), estos valores no son aún suficientes como para reunir los requerimientos comerciales para la producción de biodiesel. Por lo tanto es necesario optimizar aún más las condiciones de cultivo para que la especie en estudio constituya una fuente viable de materia prima. Se propone: a) incrementar la biomasa con la implementación de una estrategia de cultivo en dos fases que incluyan: una fase inicial de crecimiento rápido en biorreactores con un medio enriquecido en nutrientes, seguida de una segunda fase inductora de lípidos, en grandes piletones abiertos y pobres en nutrientes (Borowitzka et al. 1991, 2005; Olaizola 2000, García-Malea López et al. 2005, 2006; Masojídek et al. 2009) y b) suplementar los cultivos con CO<sub>2</sub> durante las fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria que incluye la síntesis de lípidos. Esta estrategia ya ha sido probada con éxito en algunas especies de microalgas en otros países (Mazzuca Sobczuk y Chisti 2010).

La selección de cepas productivas, de rápido crecimiento y ambientadas a las condiciones del clima local es de fundamental importancia para el éxito de cualquier cultivo a gran escala y particularmente para productos de bajo valor agregado como lo es el biodiesel (Griffiths y Harrison 2009). Otra consideración a tener en cuenta al momento de elegir la especie a explotar es el costo de la cosecha post-cultivo (Borowitzka 1997). El gran tamaño celular y la capacidad de autoflocular de los cistos de *H. pluvialis* son dos características que juegan a favor en esta especie.

En resumen: *H. pluvialis* constituye una fuente potencial de materia prima lipídica para la producción de biodiesel, dado que: 1- es una especie capaz de acumular lípidos en respuesta a condiciones de estrés, 2- los lípidos neutros constituyen la principal fracción sintetizada, los cuales son el sustrato preferido para la producción de biodiesel, 3- el perfil de los ácidos grasos es adecuado para la producción de biodiesel, 4- los principales ácidos grasos poseen longitud de cadena hidrocarbonada más corta o igual que C18, 5- el grado de insaturación de los ácidos grasos en la fracción de AGPs, no excede a tres dobles enlaces, 6- sintetiza en forma simultánea lípidos y astaxantina, un co-producto de alto valor agregado, 7- es fácil de cultivar en fotobiorreactores y a mayor escala en piletones abiertos (Borowitzka et al. 1991, Olaizola 2000, Borowitzka 2005, García-Malea López et al. 2006, Huntley y Redalje 2007, Masojídek et al. 2009), 8- posee células de gran tamaño, lo cual facilita el proceso de cosecha por medio de técnicas económicas (Mata et al. 2010), y 9- existe la posibilidad de aplicar métodos mecánicos, industriales y convencionales, tradicionalmente usados en la extracción de astaxantina (Olaizola 2000, Cysewski y Todd Lorenz 2004), los cuales deberán ser probados en la cepa argentina.

Este estudio provee información de base útil para futuras investigaciones tendientes a buscar las condiciones más adecuadas para mejorar el rendimiento del aceite, su proceso de extracción y de obtención de biodiesel.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adair, W.S. and Appel, H. 1989. Identification of a highly conserved hydroxylproline-rich glycoprotein in the cell walls of *Chlamydomonas reinhardtii* and two other Volvocales. *Planta* 179: 381-386.
- Adair, W.S. and Snell, W.J. 1990. The *Chlamydomonas reinhardtii* cell wall: structure, biochemistry and molecular biology. In: Adair W.S., Mecham R.P. (eds) Organization and assembly of the plant and animal extracellular matrix. Academic Press, New York, pp 15-84.
- Agba, E.H. and Ibanga, E.J. 2008. Effects of X-Rays on the Physico-Chemical Properties of Soybean oil. *The Pacific J. Science Technol.* 9: 665-667.
- Aken, M.E. & Pienaar, R.N. 1985. Preliminary investigations on the chemical composition of the scale-boundary and cyst wall of *Pyramimonas pseudoparkeae* (Prasinophyceae). *South African J. Bot.* 51: 408-416.
- Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P.D. and Karr, A. 1967. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5: 340-345.
- Allard, B., Rager, M. and Templier, J. 2002. Occurrence of high molecular weight lipids (C<sub>80</sub>) in the trilaminar outer cell walls of some freshwater microalgae. A reappraisal of algaenan structure. *Organic Geochemistry* 33: 789-801.
- Allard, B. and Templier, J. 2000. Comparison of neutral lipid profile of various trilaminar outer cell wall (TLS)- containing microalgae with emphasis on algaenan occurrence. *Phytochemistry* 54: 369-380.
- Andersen, R.A., Barr, D.J.S., Lynn, D.H., Melkonian, M., Moestrup, Ø. and Sleigh, M.A. 1991. Terminology and nomenclature of the cytoskeletal elements associated with the flagellar/ciliary apparatus in protists. *Protoplasma* 164: 1-8.

- AOCS, 2001. In: D.E. Firestone. *Official methods and recommended practices of AOCS*. 4th ed. Illinois: The American Oil Chemists' Society, AOCS Press.
- Atkinson, A.W., Gunning, B.E.S. & John, P.C.L. 1972. Sporopollenin in the Cell Wall of *Chlorella* and Other Algae: Ultrastructure, Chemistry, and Incorporation of <sup>14</sup>C-Acetate, Studied in Synchronous Cultures. *Planta* 107:1-32.
- Azov, Y. 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1300-1306.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2002. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22: 245-279.
- Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M. & Arad, S. 1995. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *J. Plant Physiol.* 146: 527-34.
- Belarbi, E.H., Molina Grima, E., Chisti, Y.A. 2000. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 516-29.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T. and William, T. 1985. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21: 72-81.
- Berger, J.P., Gouygou, J.P., Dubacq, J.P. & Durand, P. 1995. Reassessment of lipid composition of the diatom *Skeletonema costatum*. *Phytochemistry* 39 (5): 1017-1021.
- Berkaloff, C., Casadevall, E., Largeau, C., Metzger, P., Peracca, S. & Virlet J. 1983. The resistant polymer of the walls of the hydrocarbon-rich alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 22: 389-97.
- Bibby, B.T. and Dodge, J.D. 1972. The encystment of a freshwater dinoflagellate: a light and electron-microscopical study. *Brit. Phycol. J.* 7: 85-100.

- Bidigare, R.R., Ondrusek, M.E., Kennicutt, M.C., Iturriaga, R., Harvey, H.R., Hoham, R.W. & Macko, S.A. 1993. Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J. Phycol.* 29: 427-434.
- Bijl, H.L., Wolf, J.H., Schaap, A. & Visser, J.M.J. 2004. Preparation of microbial polyunsaturated fatty acid containing oil from pasteurised biomass. US. Patent 6727373.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Blokker, P., Schouten, S., De Leeuw, J.W., Sinninghe Damsté, J.S. and van den Ende, H. 1999. Molecular structure of the resistant biopolymer in zygospore cell walls of *Chlamydomonas monoica*. *Planta* 207: 539-543.
- Blokker, P., Schouten, S., van den Ende, H., De Leeuw, J.W., Hatcher, P & Sinninghe Damsté, J.S. 1998. Chemical structure of algaenans from the fresh water algae *Tetraedron minimum*, *Scenedesmus communis* and *Pediastrum boryanum*. *Organic Geochemistry* 29: 1453-1468.
- Bold, H.C. and Wynne, M.J. 1985. Introduction to the Algae, 2<sup>nd</sup> edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Bondioli, P. 2004. The preparation of fatty acid esters by means of catalytic reactions. *Topics in Catalysis* 27: 77-82.
- Borowitzka, M.A. 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* 9: 393-401.
- Borowitzka, M.A. 2005. Culturing Microalgae in outdoor ponds. In: Algal culturing techniques (ed. Anderson R.A.), 1st edn. Elsevier, Burlington USA. pp 205-219.

- Borowitzka, M.A., Huisman, J.M. and Osborn, A. 1991. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *J. Appl. Phycol.* 3: 295-304.
- Boussiba, S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Plant Physiol.* 108: 111-117.
- Boussiba, S., Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol.* 3: 1077-1082.
- Boussiba, S., Wang, B., Yuan, J.P., Zarka, A. & Chen F. 1999. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.* 21: 601-604.
- Bowen, W.R. 1965. The fine structure of the unicellular green algae *Eremosphaera* and *Haematococcus*. *Dissert. Abstr.* 25: 4924-4925.
- Bowen, W.R. 1967. Ultrastructural aspects of the cell boundary of *Haematococcus pluvialis*. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 86: 36-43.
- Brady, J.D., Sadler, I.H., Fry, S.C. 1998. Pulcherosine, an oxidatively coupled trimer of tyrosine in plant cell walls: Its role in cross-link formation. *Phytochemistry* 47: 349-353.
- Braten, T. 1975. Observations on mechanisms of attachment in the green algae *Ulva mutabilis* Føyn. An ultrastructural and light microscopical study of zygotes and rhizoids. *Protoplasma* 84: 161-173.
- Braun, A. 1849. *Betrachtungen über die Erscheinung der Verjüngung in der Natur*. Poppen, Freiburg im Breisgau pp363.
- Brinda, B.R., Sarada, R., Sandesh Kamath, B. and Ravishankar, G.A. 2004. Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* –cultural and regulatory aspects. *Current Science* 87: 1290-1295.

- Brown, D.L., Leppard, G.G. & Massalki, A. 1976. Fine Structure of Encystment of the Quadri Alga, *Polytomella agilis*. *Protoplasma* 90: 139-154.
- Brown, L.M. & Zeiler, K. G. 1993. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Conver. Manage.* 34 (911): 1005-10013
- Burczyk, J. 1987. Biogenetic relationships between ketocarotenoids and sporopollenins in green algae. *Phytochemistry* 26: 113-119.
- Cáceres, E.J. 1995. Métodos de preparación de algas para su observación con microscopía electrónica de transmisión convencional (METC). En *Manual de métodos ficológicos*, Ed. Alveal, K., Ferrario, M.E., Oliveira, E. y Sar, E. Universidad de Concepción, Chile. pp. 147-168.
- Cáceres, E.J. & Robinson, D.G. 1981. Ultrastructural Studies of *Sphaeroplea annulina* (Chlorophyceae). II. Spermatogenesis and structure of the male gamete. *J. Phycol.* 17: 173-180.
- Cannon, M.C., Terneus, K., Hall, Q., Tan, L., Wang, Y., Wegenhart, B.L., Chen, L., Lampion, D.T.A., Chen, Y. and Kieliszewski, M.J. 2008. Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. [www.pnas.org/cgi/content/full/0711980105/DC1](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0711980105/DC1).
- Cao, W., Han, H. and Zhang, J. 2005. Preparation of biodiesel from soybean oil using supercritical methanol and co-solvent. *Fuel* 84: 347-351
- Cerón, M.C., García-Malea, M.C., Rivas, J., Acien, F.G., Fernández, J.M., Del Río, E., Guerrero, M.G and Molina, E. 2007. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Appl. Microbial. Cell Physiol.* 74: 1112-1119.
- Ching-Piao, L., Liang-Ping, L. 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP1324. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42: 207-214.

- Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M.R. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261: 932-943.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
- Cifuentes, A.S., González, M.A., Vargas, S., Hoenesen, M. and González, N. 2003. Optimization of biomasa, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* flotox strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological. Reserch* 36: 343-357.
- Cohen, Z. 1999. *Chemicals from microalgae*. Taylor and Francis, London. p. 419.
- Cooper, R.A., Bowen, I.D. and Lloyd, D. 1974. The properties and subcellular localization of acid phosphatases in the colourless alga. *Polytomella caeca*. *J. Cell Scien.* 15: 605-618.
- Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo, B.O. and Fábregas, J. 1996. Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. *Biotechnol. Lett.* 18: 213-218.
- Costa Neto, P.R., Rossi, L.F.S., Zagonel, G.F., Ramos, L.P. 2000. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel a través da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova* 23: 531-537.
- Cysewski, G.R., Todd Lorenz, R. 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – species of high potential. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture: *Biotechnol. Appl. Phycol.* Blackwell Publisher Ltd., pp. 281–288.
- Damiani, M.C., Leonardi, P.I., Pieroni, O and Cáceres, E.J. 2006. Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behaviour during cyst germination. *Phycologia* 45: 616–623.

- Damiani, M.C., Popovich, C.A., Constenla, D. and Leonardi, P.I. 2010. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresour. Technol.* 101: 3801–3807.
- Davies, B.H. 1976. Chemistry and biochemistry of Plant Pigments. *Academic Press, London* 2: 38-65.
- De Vries, P.J.R., Simons, J. & Van Beem, A.P. 1983. Sporopollenin in the spore wall of *Spirogyra* (Zygnemataceae, Chlorophyceae). *Acta Botanica Neerlandica* 32:25-28.
- Delwiche, C.F., Graham, L.E. & Thomson, N. 1989. Lignin-like compounds and sporopollenin in *Coleochaete*, an Algal Model for land Plant Ancestry. *Science*. 245: 399-401.
- Derenne, S., Largeau, C. Berkaloff, C. Rousseau, B. Wilhelm, C. & Hatcher, P.G. 1992a. Nonhydrolysable macromolecular constituents from outer walls of *Chlorella fusca* and *Nanochlorum eucaryotum*. *Phytochemistry* 31: 345-350.
- Demirbas, A. 2007. Biodiesel from sunflower oil in supercritical methanol with calcium oxide. *Energy Convers. Manage.* 48: 937-941.
- Demirbas, A. 2009. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers. Manag.* 50: 14-34.
- Dodge, J.D. 1975. *The Fine Structure of Algal Cells*. Academic Press Inc. London. pp 261.
- Domínguez, E., Mercado, J.A., Quesada, M.A. and Heredia, A. 1999. Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. *Sex Plant Reprod.* 12: 171-178.
- Domínguez-Bocanegra, A.R., Guerrero Legarreta, I., Martínez Jeronimo, F. & Tomasini Campocosio, A. 2004. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 92: 209-214.

- Domozych, D.S. 1989. The endomembrane system and mechanism of membrane flow in the green alga, *Gloeomonas kupfferi* (Volvocales, Chlorophyta) I. An ultrastructural analysis. *Protoplasma* 149: 95-107.
- Domozych, D.S. and Dairman M. 1993. Synthesis of the inner cell wall layer of the chlamydomonad flagellate, *Gloeomonas kupfferi*. *Protoplasma* 176: 1-13.
- Domozych, D.S., Mattox, K.R., Stewart, K.D. 1981b. The role of microtubules during the cytokinetic events of cell wall ontogenesis and papilla development in *Carteria crucifera*. *Protoplasma* 106: 193-204.
- Domozych, D.S. and Nimmons T.T. 1992. The contractile vacuole as an endocytic organelle of the chlamydomonad flagellate *Gloeomonas kupfferi* (Volvocales, Chlorophyta). *J. Phycol.* 28: 809-816.
- Domozych, D.S., Stewart, K.D., Mattox, K.R. 1981a. Development of the cell wall in *Tetraselmis*: role of the golgi apparatus and extracellular wall assembly. *J. Cell Scien.* 52: 351-371.
- Droop, M.R. 1956. *Haematococcus pluvialis* and its allies. The Sphaerellaceae. *Revue Algologique* 2: 53-70
- Duff, S.M.G., Sarath, G. & Plaxton, W.C. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Plant Physiol.* 90: 791-800.
- Dunn, R.O. 2005. Cold weather properties and performance of biodiesel, in *The Biodiesel Handbook*, ed. By Knothe, G., Krahl, J. and Gerpen, J.V. AOCS Press, Champaign IL. USA.
- Durrett, T., Benning, C., Ohlrogge, J. 2008. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J.* 54: 593-607.
- Edem, D.O. 2002. Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: A review. *Kluwer Academic Publishers* 57: 319-341.

- Elliot, A.M. 1934. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. *Archiv für Protistenkunde* 82: 250-272.
- Elsey, D., Jameson, D., Raleigh, B. & Cooney, M. J. 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Method* 68: 639-642
- Eriksson, O. 1981. The families of bitunicate Ascomycetes. *Opera Botánica* 60:1-220.
- Ettl, H. 1979. Die Protoplastenteilung und der Verlauf der Chloroplastenteilung während der asexuellen Fortpflanzung von *Chlamydomonas* (Volvocales, Chlorophyceae). *Arch. Hydrobiol., Suppl. 56, Algol. Stud.* 22: 40-113.
- Faust, B. 1992. Modern Chemical Techniques. *Royal Society of Chemistry* London, U.K.
- Ferrari, R.A., Oliveira, V.S., Scabio, A. 2005. Oxidative stability of biodiesel from soybean oil fatty acid ethyl esters. *Scientia Agricola* 62: 291-295.
- Ferreira, C.V., Taga, E.M. & Aoyama, H. 2000. Inhibition of acid phosphatase isoforms purified from mature soybean (*Glycine max*) seeds. *J. Enzym. Inhib.* 15: 403-410.
- Ferrer, N.C. & Cáceres, E.J. 1995. *Spirogyra salmonispora* sp. nov. (Zygnematophyceae, Chlorophyta), a new freshwater species of the section conjugata. *Archiv für Protistenkunde* 146: 101-106.
- Fidalgo, J.P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166: 105–116.
- Flotow, J. 1844. Über *Haematococcus pluvialis*. *Nova Acta Leopoldina* 20: 413-606.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol Chem.* 226: 497-507.

- Fábregas, J., Domínguez, A., Álvarez, D., Lamela, T., Otero, A. 1998. Factors controlling the production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* 20: 623-626.
- Francisco, E.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E. and Franco, T.F. 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* DOI 10-1002/jctb 2338.
- Freedman, B., Butterfield, R.O., Pryde, E. 1986. Transesterification kinetics of soybean oil. *JACOS* 63: 1375-1380.
- García-Malea López, M.C., Brindley, C., Del Río, E., Acien, F.G., Fernández, J.M., Molina, E. 2005. Modeling of growth and accumulation of carotenoids in *Haematococcus pluvialis* as a function of irradiance and nutrients supply. *Biochem. Eng. J.* 26: 107-114.
- García-Malea López, M.C., Del Río Sánchez, E., Casas López, J.L., Acien Fernández, F.G., Fernández Sevilla J.M., Rivas J., Guerrero, M.G., Molina, E. 2006. Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *J. Biotechnol.* 123: 329-342
- Gelin, F., Boogers, I., Noordeloos, A.A.M., Sinninghe Damsté, J.S., Hatcher, P.G. and De Leeuw J.W. 1996a. Novel, resistant microalgal polyethers: An important sink of organic carbon in the marine environment?. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60: 1275-1280.
- Gelin, F., Boogers, I., Noordeloos, A.A.M., Sinninghe Damsté, J.S., Riegman, R. and De Leeuw J.W. 1997b. Resistant biomacromolecules in marine microalgae of the classes Eustigmatophyceae and Chlorophyceae: geochemical implications. *Organic Geochemistry* 26: 659-675.
- Gelin, F., Sinninghe Damsté, J.S., Harrison, W.N., Reiss, C., Maxwell, J.R. and De Leeuw J.W. 1996b. Variations in origin and composition of kerogen constituents as revealed by analytical pyrolysis of immature kerogens before and after desulphurization. *Organic Geochemistry* 24: 705-714.

- Gelin, F., Volkman, J.K., Largeau, C., Derennec, S., Sinninghe Damsté, J.S., De Leeuw J.W. 1999. Distribution of aliphatic, nonhydrolyzable biopolymers in marine microalgae. *Organic Geochemistry* 30: 147-159.
- Gogate, P.R. 2008. Cavitation reactors for process intensification of chemical processing applications: a critical review. *Chemical Engineering and Processing* 47: 515-527.
- Gogate, P.R., Kabadi, A.M. 2009. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochem. Engin. J.* 44:60-72.
- Good, B.H. & Chapman, R.L. 1978. The ultrastructure of *Phycopeltis* (Chrolopidaceae: Chlorophyta). I. Sporopollenin in the cell walls. *Amer. J. Bot.* 65: 23-27.
- Goodenough, U.W., Gebhart, B., Mecham, R.E. and Heuser, J.E. 1986. Crystals of the *Chlamydomonas reinhardtii* cell wall: polymerization, depolymerization and purification of glycoprotein monomers. Department of Biology, Pulmonary Division, and Department of Cell Biology/Physiology, Washington University, St. Louis, Missouri 63130.
- Goodenough, U.W. and Heuser, J.E. 1985. The *Chlamydomonas* cell wall and its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze deep-etch technique. *J. Cell Biol.* 101: 1550-1568.
- Gordillo, F.J., Goutx, M., Figueroa, F.L., Niell, F.X. 1998. Effects of light intensity, CO<sub>2</sub> and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J. Appl. Phycol.* 10: 135-144.
- Gould, R.R. 1975. The basal bodies of *Chlamydomonas reinhardtii*. Formation from probasal bodies, isolation, and partial characterization. *J. Cell Biol.* 65: 65-74.
- Gouveira, L., Oliveira, A.C. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 269-274.

- Grief, C. and Shaw, P.J. 1987. Assembly of cell-wall glycoproteins of *Chlamydomonas reinhardtii*: oligosaccharides are added in medial and trans Golgi compartments. *Planta* 171: 302-312.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* DOI 10.1007/s 10811-008-9392-7.
- Grünewald, K. and Hagen, C. 2000. Extrusion of secondary carotenoid containing vesicles from flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae) *J. Appl. Bot.* 74:141-144.
- Guckert, J.B., Cooksey, K.E. and Jackson, L.L. 1988. Lipid solvent systems are not equivalent for analysis of lipid classes in the microeukaryotic green alga, *Chlorella*. *J. Microbiol. Methods* 8: 139-149.
- Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M. 2003. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends biotechnol.* 21: 210-216.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division Rates. En *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods & Growth Measurements* (Ed. Stein J. R.), Cambridge Univ. Press. pp 290-320.
- Guschina, I.A. and Harwood, J.L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45: 160-186.
- Hanagata, N. and Dubinsky, Z. 1999. Secondary carotenoid accumulation in *Scenedesmus komarekii* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 35: 960-966.
- Hagen, C., Braune, W. & Björn, L.O. 1994. Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* [Girod] Rostafinski (Volvocales). III. Action as a "sunshade". *J. Phycol.* 30: 241-248.
- Hagen, C., Grünewald, K., Schmidt, S. & Müller, J. 2000. Accumulation of secondary carotenoids in s of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an

- increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *Eur. J. Phycol.* 35: 75-82.
- Hagen, C., Grünewald, K., Xyländer, M. & Rothe, E. 2001. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in d cells of *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* 13: 79-87.
- Hagen, C., Siegmund, S. & Braune, W. 2002. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *Eur. J. Phycol.* 37: 217-226.
- Harker, M., Tsavalos, A.J., Young, A.J. 1995. Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* 7: 399-406.
- Harker, M., Tsavalos, A.J. & Young, A.J. 1996. Autotrophic growth and carotenoid protection of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 113-118.
- Harrigan, W.F. & McCance, M.E. 1966. *Laboratory methods in microbiology*. Academic Press London, pp 362.
- Harris, E.H. 1989. *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, San Diego.
- Hazen, T.E. 1899. The life history of *Sphaerella lacustris*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 6: 211-244.
- Held, M.A., Kamyab, A., Hare, M., Shpak, E., Kieliszewski, M.J. 2004. Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 279: 55474–55482.
- Hidalgo, J.P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166: 105-116.

- Hoen, P. 2000. Glossary of Pollen and Spore Terminology. In Part 3 (I-O). <File://C:\Glosario\GLOS-P3.HTM>.
- Holmes, J.A. & Dutcher, S.K. 1989. Cellular asymmetry in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Sci.* 94: 273-85.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-639.
- Hu, Q., Zhang, C.W., Sommerfeld, M. 2006. Biodiesel from algae: Lessons learned over the past 60 years and future perspectives. *J. Phycol.* 42, 12.
- Huntley, M.E., Redalje, D.G. 2007. CO<sub>2</sub> mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 12: 573-608.
- Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microbial. Technol.* 27: 631-635.
- Iversen, J. & Troels-Smith, J. 1950. Pollenmorphologische Definitionen und Typen. *Danmarks Geologiske Undersogelse*, Ser. 4. 3: 1-54.
- Ingold, C.T. 1933. Spore discharge in the Ascomycetes I. Pyrenomycetes. *New Phytologist* 32: 175-196.
- Jeon, Y-C., Cho, C-W. & Yun Y-S. 2006. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. *Enzyme Microbial. Technol.* 39: 490-495.
- Johnson, E.A. & An, G.H. 1991. Astaxanthin from Microbial Sources. *Crit. Rev. Biotechnol.* 11:297-326.

- Johnson, E.A., Villa, T.G. & Lewis, M.J. 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* 20: 123-134.
- Johnson, U.G., Porter K.R. 1968. Fine structure of cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*. Basal bodies and microtubules. *J. Cell Biol.* 38: 403-425.
- Jyonouchi, H., Sun, S., Mizokami, M., Gross, M.D. 1996. Astaxanthin, a Carotenoid without Vitamin A Activity, Augments Antibody Responses in Cultures Including T-helper Cell Clones and Suboptimal Doses of Antigen1 $\hat{A}$ . *Nutr. Cancer* 26: 313–324.
- Kakizono, T., Kobayashi, M. & Nagai, S. 1992. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferm. Bioeng.* 74: 403-405.
- Kalva, A., Sivasankar, T., Moholkar, V.S. 2008. Physical mechanism of ultrasound-assisted synthesis of biodiesel. *Industrial and Engineering Chemistry.* 48: 534-544.
- Kanel, J.S., Guelcher, S.A. 1999. Method for rupturing microalgae cells. US Patent 6000551.
- Kang, C.D., Lee, J.S., Park, T.H. and Sim, S.J. 2007. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 987-994.
- Karlson, B., Potter, D., Kuylenstierna, M. and Andersen, R.A. 1996. Ultrastructure, pigment composition and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. Nov. (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankton isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. *Phycologia* 35: 253-260.
- Khotimchenko, S.V., Yakovleva, I.M. 2005. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry* 66: 73-79.

- Knothe, G. 2002. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? *J. Am. Oil Chem. Soc.* 9: 847-853.
- Knothe, G. 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.* 86: 1059-1070.
- Knutsen, G. 1968. Repressed and derepressed synthesis of phosphatases during synchronous growth of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 161: 205-214.
- Kobayashi, M., Kakizono, T & Nagai, S. 1993. Enhanced carotenoids biosynthesis by oxidative stress in acetate induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 867-873.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y. Kakizono, T. Nishio, N. and Tsuji, Y. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferm. Bioeng.* 84: 94-97.
- Kodner, R.B., Summons, R.E., Knoll, A.H. 2009. Phylogenetic investigation of the aliphatic, non-hydrolyzable biopolymer algaenan, with a focus on green algae. *Organic Geochemistry* 40: 854-862.
- Kokinos, J.P., Eglinton, T.I., Goñi, M.A., Boon, J.J., Martoglio, P.A. & Anderson, D.M. 1998. Characterization of a highly resistant biomacromolecular material in the cell wall of a marine dinoflagellate resting cyst. *Organic Geochemistry* 28: 265-288.
- Kokot, S., Tuan, N.A. & Rintoul, L. 1997. Discrimination of reactive dyes on cotton fabric by Raman Spectroscopy and Chemometrics. *Appl. Spectrosc.* 51: 387-392.
- Kouwets, F.A. and van der Schaaf, P.J. 1993. Ultrastructural study of mitosis in the coenocytic soil alga *Protosiphon botryoides* (Chlorophyceae) with special reference to absolute configuration and behaviour of the basal apparatus. *Crypt. Bot.* 3: 221-34.

- Kreimer, G. 1994. Cell Biology of Phototaxis in Flagellate Algae. *International Review of Cytology* 48: 229-311.
- Kuenzler, E.J. 1965. Glucose-6-phosphate utilization by marine algae. *J. Phycol.* 1: 156–164
- Kusdiana, D. & Saka, S. 2001. Development of bioediesel fuel production by supercritical methanol. *Fuel* 80: 693.
- Kyriakidis, N.B., Katsiloulis, T. 2000. Calculation of iodine value from measurements of fatty acid methyl esters of some oils: comparison with the relevant American oil chemist's society method. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 1235-1238.
- Lang, N.J. 1968. Electron microscopic studies of extraplastidic astaxanthin in *Haematococcus*. *J. Phycol.* 4: 12-19.
- Lang, X., Dalai, A.K., Bakhshi, N.N., Reaney, M.J., Hertz, P.B. 2001. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresour. Technol.* 80: 53-62.
- Lee, Y-K. & Ding, S.D. 1992. Can *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) be recovered from photoinhibition of photosynthesis? *Plant Cell Physiol.* 33: 815-818.
- Leonardi, P.I. and Cáceres, E.J. 1994. Comparative analysis of the fine structure of young and adult individuals of *Dunaliella salina* (Polyblepharidaceae, Chlorophyceae), with emphasis on the flagellar apparatus. *J. Phycol.* 30: 642-653.
- Leonardi, P.I. and Cáceres, E.J. 1997. Light and electron microscope observations of the life cycle of *Dunaliella salina* (Polyblepharidaceae, Chlorophyceae). *Nova Hedwigia* 64: 621-633.
- Leonardi, P.I., Rodríguez, M.C. and Cáceres, E.J. 2000. Fine structure of biflagellate zoospores of *Asterococcus superbis* (Tetrasporales, Chlorophyceae), including the absolute configuration of the flagellar apparatus. *J. Phycol.* 36: 714-722.

- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q. 2008. Dubois-Calero N. Biofuels from microalgae. *Biotechnol. Progr.* 24: 815-20.
- Lien, T. and Knutsen, G. 1973. Synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*: properties and regulation of repressible phosphatases. *Physiol. Plant* 28: 291-298.
- Liu, B.H. & Lee, Y.K. 1999. Composition and biosynthetic pathways of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp. *Biotechnol. Lett.* 21: 1007-1010.
- Lokhorst, G.M., Segaar, P.J. & Star, W. 1989. An ultrastructural reinvestigation of mitosis and cytokinesis in cryofixed sporangia of the coccoid green alga *Friedmannia israelensis* with special reference to septum formation and replication cycle of basal bodies. *Crypt. Bot.* 1: 275-94.
- Loos, E. and Meindl, D. 1982. Composition of the cell wall of *Chlorella fusca*. *Planta* 156: 270-273.
- Lorenz, R.T. & Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18: 160-167.
- Lubian, L.M., Blasco, J.B. and Establier, R. 1992. A comparative study of acid and alkaline phosphatase activities in several strains of *Nannochloris* (Chlorophyceae) and *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae). *Br. Phycol. J.* 27: 119-130.
- Marano, F., Santa María, A. & Krishnawamy, S. 1985. The flagellar apparatus of *Dunaliella*: isolation of basal body-flagellar root complex. *Protoplasma.* 127: 82-92.
- Marano-Le Baron, F. and Izard, M.C. 1972. Etude des réactions de l'appareil de Golgi et du Systeme vacuolaire Dans des cellules traitées par la phase gazeuse de la fumée de cigarette. *C. R. Acad. Sc. Paris.* 274: 686-692.

- Masojídek, J., Sergejevová, M., Rottnerová, K., Jirka, V., Korečko, J., Kopecký, J., Zaťková, I., Torzillo, G., Štys, D. 2009. A two-stage solar photobioreactor for cultivation of microalgae based on solar concentrators. *J. Appl. Phycol.* 21: 55-63.
- Mata, T.M, Martins, A.A. and Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-232.
- Matagne, R.F., Loppes, R. and Deltour, R. 1976. Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii*: biochemical and cytochemical approach with specific mutants. *J. Bacteriol.* 126: 937-950.
- Mattox, K.R. & Stewart, K.D. 1984. Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. In: *Systematics of the Green Algae*. Academic Press, New York, pp. 29-72.
- May, G., Southworth, D. & Dickinson, D. 1975. Analysis of sporopollenin isolated from pollen of *Ambrosia artemisiifolia* and *Ambrosia trifida*. *Grana* 15: 149-152.
- Mazucca Sobczuk, T. and Chisti, Y. 2009. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85: 100-108.
- McFadden, G.I. and Melkonian, M. 1986. Golgi apparatus activity and membrane flow during scale biogenesis in the green flagellate *Scherffelia dubia* (Prasinophyceae). I: Flagellar regeneration. *Protoplasma* 130: 186-198.
- Mendes-Pinto, M.M., Raposo, M.F.J., Bowen, J., Young, A.J. & Morais, R. 2001. Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *J. Appl. Phycol.* 13: 19-24.
- Mendoza, H., Martel, A. M., Jiménez del Río, M., García Reina, G. 1999. Oleic acid is the main fatty acid related with carotenogenesis in *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.* 11: 15-19.

- Mendoza Guzmán, H., de la Jara Valido, A., Carmona Duarte, L. and Freijames Presmanes K. 2010. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecia* in response to culture conditions. *Aquacult Int.* 18: 189-199.
- Mesquita, J.F., Santos Dias, J.D. and Martinho, A.P. 1980b. Chromoplast differentiation in fruits of *Musa* sp. (banana-tree). *Biol. Cellulaire* 39: 343-348.
- Michetti, K.M. 2003. Biología, taxonomía y estructura fina de Chaetophorales (Chlorophyta). Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur. pp 196.
- Miller, D.H., Mellman, I.S., Lamport, D.T.A. and Miller, M. 1974. The chemical composition of the cell wall of *Chlamydomonas gymnogama* and the concept of a plant cell wall protein. *Cell Biol.* 63: 420–429.
- Mittelbach, M. 1996. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: specifications and quality control of biodiesel. *Bioresour. Technol.* 56: 7-11.
- Montsant, A., Zarka, A. & Boussiba, S. 2001. Presence of a Nonhydrolyzable Biopolymer in the Cell Wall of Vegetative Cells and Astaxanthin-Rich Cysts of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Marine Biotechnol.* 3: 515-521.
- Moraes, G. 1991. Phosphate uptake by *Ankistrodesmus densus* under batch culture and phosphate limited conditions. *Rev. Brasil. Biol.* 51: 847-851.
- Morrison, I.M. 1988. Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. *Phytochemistry* 27: 1097-1100.
- Morrison, W.R. & Smith, L.M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Lipid Research.* 5: 600-608.
- Nakanishi, K. & Solomon, P.A. 1977. Infrared Absorption Spectroscopy. *Holden-Day*, 2 Ed., San Francisco, U.S.A.

- Norman, H.A., Thompson, G.A. Jr. 1985. Effects of low-temperature stress on the metabolism of phosphatidylglycerol molecular species in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol. Biochem.* 242: 168-175.
- Nozaki, H., Aizawa, K. and Watanabe, M.M. 1994. A taxonomic study of four species of *Carteria* (Volvocales, Chlorophyta) with cruciate anterior papillae, based on cultured material. *Phycologia* 33: 239-247.
- O'Brien, T. and McCully, M. 1981. *The Study of Plant Structure*. Termocarphi, Melbourne, Australia. p 357.
- Olaizola, M. 2000. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25000-liter outdoor photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 12: 499-506.
- Orosa, M., Valero, J.F., Herrero, C. & Abalde, J. 2001. Comparison of the accumulation of Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnol. Lett.* 23: 1079-1085.
- Ostergaard Jensen, M. & Moestrup, O. 1997. Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: life history and growth at different temperatures and salinities. *Eur. J. Phycol.* 32: 9-18.
- Pappas, C., Rodis, P., Tarantilis, P.A. & Polossiou, M. 1999. Predictions of the pH in wood by diffuse Reflectance Infrared fourier-transform Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 53: 805-810.
- Patni, N.J., Billmire, E. & Aaronson, S. 1974. Isolation of the *Ochromonas danica* plasma membrane and identification of several membrane enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 373: 347-355.
- Peebles, F. 1909. The life history of *Sphaerella lacustris* with special reference to the nature and behavior of the zoospores. *Centralblatt für Bacteriologie, Parasitenkunde und Infektions-krankheiten, Abt.* 24: 511-521.

- Pelton, J.T. and McLean, L.R. 2000. Spectroscopy methods for analysis of protein secondary structure. *Anal. Biochem.* 277: 167-176.
- Pernet, F. and Tremblay, R. 2003. Effect of ultrasonication and grinding on the determination of lipid class content of microalgae harvested on filters. *Lipids* 38: 1191-1195.
- Petkowicz, C.L.O., Schaefer, S. and Reicher, F. 2007. The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. *Carbohydr. Polym.* 69: 659-664.
- Pocock, M. A. 1959. *Haematococcus* in Southern Africa. *Transactions of the Royal Society of South Africa.* 36: 5-55.
- Prado-Fernandez, J., Rodríguez-Vázquez, J. A., Tojo, E. and Andrade, J.M. 2003. Quantitation of  $\kappa$ - and  $\lambda$ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. *Analytica Chimica Acta* 480: 23-37.
- Pretsch, E., Seibl, J., Simon, W. & Clerc, T. 1983. Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds. *Springer-Verlag, Germany.*
- Price, C.A. 1962. Repression of acid phosphatase synthesis in *Euglena gracilis*. *Science* 21: 135-46
- Puel, F., Largeau, C. & Giraud, G. 1987. Occurrence of a resistant biopolymer in the outer walls of the parasitic alga *Prototheca wickerhamii* (Chlorococcales): ultrastructural and chemical studies. *J. Phycol.* 23: 649-656.
- Rabbani, S., Beyer, P., Lonting, J.V., Huguency, P., Kleining, H. 1998. Induced  $\beta$ -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* 116: 1239-48.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S., Rengasamy, R. 2008. A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.* 34: 77-88.

- Reid, N. 1975. *Ultramicrotomy. Practical methods in electron microscopy*. Editor: A.M. Glauert. North-Holland/American Elsevier. pp 353.
- Remias, D., Albert, A. & Lütz, C. 2010. Effects of realistically simulated, elevated UV irradiation on photosynthesis and pigment composition of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis* and the arctic soil alga *Tetracystis* sp. (Chlorophyceae). *Photosynthetica* 48: 269-277. DOI: 10.1007/s 11099-010-0033-4
- Remias, D., Lütz-Meindl U. and Lütz C. 2005. Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. *Eur. J. Phycol.* 40: 259-268.
- Reymond, O.L. & Pickett-Heaps, J.D. 1983. A routine flat embedding method for electron microscopy of microorganisms allowing selection and precisely orientated sectioning of single cells by light microscopy. *J. Microsc.* 130: 79-84.
- Reynolds, D.R. 1971. Wall Structure of a Bitunicate Ascus. *Planta* 98: 244-257.
- Ringo, D.L. 1967. Flagellar motion and fine structure of the flagellar apparatus in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 33: 543-571.
- Roberts, K., Hills, G.J. and Shaw, P.J. 1982. The structure of algal cell wall. In: Harris J. (ed.) *Electron microscopy of proteins*, vol 3. Academic Press, London, pp 1-40.
- Robinson, D.G. 1985. *Plants membranes: endo and plasmamembranes of plant cells*. Wiley, New York (Cell biology monographs, vol 3, pp 331).
- Robinson, D.G., Ehlers, U., Herken, R., Herrmann, B., Mayer, F., Schürmann, F.W. 1987. *Methods of Preparation for Electron Microscopy*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp 190.
- Robinson, J.M. & Karnovsky, M.J. 1983. Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 1197-1208.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 2008. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and

- Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.
- Rodríguez, M.C. & Cerezo, A.S. 1996. The resistant “biopolimer” in cell walls of *Coelastrum sphaericum*. *Phytochemistry* 43: 731-734.
- Rodríguez, M.C., Necedal, M.D. & Cerezo A.S. 1999. The fibrillar polysaccharides and their linkage to algaenan in the trilaminar layer of the cell wall of *Coelastrum sphaericum* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 35: 1025-1031.
- Roessler, P.G. 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* 26: 393-399.
- Rosa, A., Deidda, D., Serra, A., Deiana, M., Assunta Dessi, M., Pompei, R. 2005. Omega-3 fatty acid composition and biological activity of three microalgae species. *J. Food Agricul. Environ.* 3: 120-124.
- Rowley, J.R. & Flynn, J.J. 1966. Single-stage carbon replicas of microspores. *Stain Technol.* 41: 287-290.
- Rubinstein, A.L., Broadwater, A.H., Lowrey, K.B., and Bedinger, P.A. 1995. Pex1, a pollen-specific gene with an extensin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 3086–3090.
- Saka, S. and Kusdiana, D. 2001. Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuels as treated in supercritical methanol. *Fuel* 80, 690:694.
- Salisbury, J.L., Baron, A.T. and Sanders, M.A. 1988. The centrin-based cytoskeleton of *Chlamydomonas reinhardtii*: distribution in interphase and mitotic cells. *The J. Cell Biol.* 107: 635-641.
- Santos, L.M.A. and Leedale, G.F. 1995. Some notes on the ultrastructure of small azoosporic members of the class Eustigmatophyceae. *Nova Hedwigia* 60: 219-225.

- Santos, M.F and Mesquita, J.F. 1984. Ultrastructural Study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia* 49: 215-228.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Markx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C.; Kruse, O., Hankamer, B. 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for biodiesel Production. *Bioenerg. Res.* 1: 20-43.
- Segaar, P.J. and Gerritsen, A.F. 1989. Flagellar roots as vital instruments in cellular morphogenesis during multiple fission (sporulation) in the unicellular green flagellate *Brachiomonas submarina* (Chlamydomonadales, Chlorophyta). *Crypt. Bot.* 1: 249-274.
- Sene, C.F.B., Mccann, M.C., Wilson, R.H. & Grinter, R. 1994. Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform Infrared spectroscopy (An Investigation of five Higher Plant Cell Walls and Their Components). *Plant Physiol.* 106: 1623-1631.
- Sengupta, S. & Rowley, J.R. 1974. Re-exposure of tapes at high temperatures and pressure in *Lycopodium clavatum* spore exine. *Grana* 14: 143-151.
- Shen, Y., Pei, Z., Yuan, W., Mao, E. 2009. Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 2: 51-57.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. 1998. A Look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae. *National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado.*
- Sherwood, M.A. 1981. Convergent evolution in Discomycetes from bark and wood. *J. Linnean Society of London Botany* 82: 15-34.
- Showalter, A.M. 1993. Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. *Plant Cell* 5: 9-23.

- Siron, R., Giusti, G., Berland, B. 1989. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55: 95-100.
- Smith, G.M. 1950. *The Fresh-Water Algae of the United States*, 2<sup>nd</sup> edition. McGraw-Hill, New York, 719 pp.
- Southworth, D. 1974. Solubility of pollen exines. *American Journal of Botany* 61: 36-44.
- Spurr, A.M. 1969. A low-viscosity epoxy embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31-43.
- Sprey, B. 1970. Die Lokalisierung von Sekundärcarotinoide von *Haematococcus pluvialis* Flotow. Em. Wille. *Protoplasma* 71: 235-250.
- Staehelein, L.A. 1997. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *J. Plant* 11: 1151-1165.
- Stein, J.R. 1973. Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press*.
- Stewart, J.K., Stewart, K.R. & Bold, H.C. 1978. The morphology and life history of *Characiosiphon rivularis* Iyengar (Chlorophyta, Characiosiphonaceae): a light and electronmicroscopic study. *Arch. Protistenk.* 120: 312-340.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. and Berner, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25: 686: 692.
- Sumper, M. and Hallmann, A. 1998. Biochemistry of the extracellular matrix of *Volvox*. *Int. Rev. Cytol.* 180: 51–85.
- Swanson, J. & Floyd, G.L. 1979. Acid phosphatase in *Asteromonas gracilis* (Chlorophyceae, Volvocales): a biochemical and cytochemical characterization. *Phycologia* 18: 362-368.

- Takeda, H. 1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 27: 224-232.
- Templier, J., Largeau, C., Casadevall, E. and Berkaloff, C. 1992. Chemical inhibition of resistant biopolymer in outer walls of the A and B races of *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 31: 4097-4104.
- Tjahjono, A.E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N., Nagai, S. 1994. Hyperaccumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol. Lett.* 16: 133-138.
- Törnqvist, L. 1989. Ultrastructural changes and altered localization of acid phosphatases in *Monoraphidium* and *Stichococcus* cells (Chlorophyceae) influenced by aluminum. *Environ. Experiment. Bot.* 29: 457-465.
- Torzillo, G., Goksan, T., Faraloni, C., Kopecky, J. and Masojidek, J. 2003. Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* during the shift from the green to red stage. *J. Appl. Phycol.* 15: 127-136.
- Triki, A., Maillard, P. and Gudin, C. 1997. Gametogenesis in *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyta). *Phycologia* 36: 190-194.
- Van den Ende, H. and VanWinkle-Swift, K.P. 1994. Mating-type differentiation and mate selection in the homothallic *Chlamydomonas monoica*. *Curr. Genet.* 25: 209–216.
- Van den Hoek, C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 623.
- Van Winkle-Swift, K.P. & Rickoll, W.L. 1997. The zygospore wall of *Chlamydomonas monoica* (Chlorophyceae): morphogenesis and evidence for the presence of sporopollenin. *J. Phycol.* 33: 655-665.
- Vasudevan, P.T., Briggs, M. 2008. Biodiesel production current state of the art and challenges. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 421-430.

- Vonshak, A. & Richmond, A. 1985. Problems in developing the biotechnology of algal biomass production. *Plant Soil* 89: 129–135.
- Vouilloud, A.A. 2008. Citología de Charales (Charophyta) de Argentina con especial referencia a su ultraestructura. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur. 40 pp.
- Walne, P.L. & Arnott, H.J. 1967. The comparative ultrastructure and possible function of eyespots: *Euglena granulate* and *Chlamydomonas eugametos*. *Planta* 77: 325-353.
- Wang, B, Hu Q, Sommerfeld, M. and Chen F.2004. Cell wall proteomics of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Proteomics* 4: 692-708.
- Wang, B., Li, Y., Wu, N. & Lan, C.Q. 2008. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 79: 707-18.
- Wang, B., Zarka, A., Trebst, A. & Boussiba, S. 2003. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. *J. Phycol.* 39: 1116-1124.
- Wanner, G. and Theimer, R.R. 1978. Membranous appendices of sferosomes (oleosomes): possible role in fat utilization in germinating oil seeds. *Planta* 140: 163-169.
- Warabi, Y. Kusdiana, D. Saka, S. 2004. Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols. *Bioresour. Technol.* 91: 283-287.
- Watanabe, S. and Floyd, G.L. 1989. Ultrastructure of the zoospores of the coenocytic algae *Ascochloris* and *Urnella* (Chlorophyceae), with emphasis on the flagellar apparatus. *Br. Phycol. J.* 24: 143-152.

- Widjaja, A., Chien, Chao-Chang, Ju, Yi-Hsu. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40: 13–20.
- Wiltshire, K.H., Boersma, M., Möller, A., Buhtz, H. 2000. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecol.* 34: 119-126.
- Woessner, J.P. and Goodenough, U.W. 1989. Molecular characterization of a zygote wall protein: An extensin-like molecule in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 1: 901–911.
- Wygasch, J. 1963. Die Blutregenalge und ihr Feinbau. *Mikrokosmos* 52: 293-297.
- Wygasch, J. 1965. Der rote Farbstoff der Blutregenalge. *Mikrokosmos* 54: 8-14.
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126: 499-507.
- Yokochi, T., Nakahara, T., Higashihara, T., Tanaka, S. & Yaguchi, T. 2003. Microorganisms capable of producing highly unsaturated fatty acids and process for producing highly unsaturated fatty acids by using the microorganisms. US Patent 6582941.
- Yu, S., Hubbard, J.S., Holzer, G., Tornabene, T.G. 1987. Total lipid production of the green alga *Nannochloropsis* sp. Q11 under different nitrogen regimes. *J. Phycol.* 23: 289-296.
- Yuan, J.P., Chen, F. 2000. Purification of *trans*-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry* 68: 443-448.
- Zeliber, J.L., Romankiw, L., Hatcher, P.G., Colwell, R.R. 1988. Comparative analysis of the chemical composition of mixed and pure cultures of green algae and their

- decomposed residues by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Appl. Environm. Microbiol.* 54: 1051-1060.
- Zhang, D.H., Lee, Y.K., Ng, M.L. & Phang, S.M. 1997. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* 9: 147-155.
- Zhang, X.W., Gong, Z.D. and Chen, F. 1999. Kinetic models for astaxanthin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23: 691-696.
- Zhekisheva, M., Boussiba, S., Khozin-Goldberg, I., Zarka, A. & Cohen, Z. 2002. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *J. Phycol.* 38: 325-331.
- Zhekisheva, M., Zarka, A., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. 2005. Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 41: 819-826.
- Zhukova, N. & Titlyanov, E. 2006. Effect of light intensity on the fatty acid composition of dinoflagellates symbiotic with hermatypic corals. *Bot. Mar.* 49: 339-346.

## Publicación de resultados

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis fueron presentados en congresos y publicados como se detalla a continuación:

### Publicaciones en revistas de aparición periódica

**Damiani M.C.**, Leonardi P.I., Pieroni O.I., Cáceres E.J. 2006. Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behaviour during cyst germination. *Phycologia* 45 (6): 616-623.

**Damiani M.C.**, Popovich C., Constenla D., Leonardi P.I. 2010. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potencial use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*. 101 (11):3801-3807.

### Comunicaciones a Congresos

**Damiani M.C.**, Leonardi P.I. y Cáceres E.J. 2001. Biología y Ultraestructura de *Haematococcus pluvialis* (Chlamydomonadaceae, Chlorophyta). XXVIII Jornadas Argentinas de Botánica. La Pampa, Argentina.

**Damiani M.C.**, Leonardi P.I., Cáceres E.J. y Pieroni, O. 2003. Estudio Ultraestructural y Químico de la pared de los cistos de *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). XXIX Jornadas Argentinas de Botánica. San Luis, Argentina.

**Damiani M.C.**, Leonardi P.I. Pieroni O. I. y Cáceres E. J. 2004. Análisis del comportamiento de la pared celular de los cistos de *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) durante su germinación y su implicancia en la extracción de astaxantina. I Congreso Latinoamericano sobre Biotecnología Algal. Buenos Aires, Argentina.

**Damiani M.C.**, Leonardi P.I. y Cáceres E.J. 2005. Una nueva interpretación de la pared de la célula flagelada de *Haematococcus pluvialis*. VII Congreso Iberoamericano y del Caribe de Ficología y V Reunión Iberoamericana. La Habana, Cuba.

**Damiani M.C.**, Leonardi P.I. y Cáceres E.J. 2007. Ultraestructura de las células vegetativas de *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Chlorophyta). XXXI Jornadas Argentinas de Botánica. Corrientes, Argentina.

**Damiani M.C.**, Constenla D., Popovich C. y Leonardi P.I. 2008. Extracción y caracterización de ácidos grasos en *Haematococcus pluvialis* bajo distintas condiciones de estrés. II Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal. Xalapa, México.

**Damiani M.C.**, Constenla D., Popovich C. y Leonardi P.I. 2009. Lípidos en *Haematococcus pluvialis* factibilidad de su uso en la producción de biodiesel. XXXII Jornadas Argentinas de Botánica. Córdoba, Argentina.

**Damiani M.C.**, Leonardi P.I. y Cáceres E.J. 2009. Ultrastructure of motile cells of the green alga *Haematococcus pluvialis* including the tridimensional reconstruction of the flagellar apparatus". 10th Inter-American Congress of Electron Microscopy and 1<sup>st</sup> Congress of the Argentina Society of Microscopy. Rosario, Argentina.