

# UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Determinación de ácidos grasos poliinsaturados en extractos de microalgas (*Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*) obtenidos mediante extracción por solventes y fluidos supercríticos”.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica.

Autoras:

Paola Alexandra Gárate Carreño

CI: 0302022744

Correo electrónico: paoale\_gc@hotmail.com

María Paz Ullauri Medina

CI: 0105564694

Correo electrónico: pazauaurim@gmail.com

Tutor:

Dr. Fabián León Tamariz, PhD.

CI: 0102311610

Asesora:

BQF. Jéssica Priscila Calle López, Mgt.

CI: 0102838497

**Cuenca, Ecuador**

21 de noviembre de 2022

## Resumen

Las microalgas han despertado en la última década un gran interés a nivel de la ciencia y la industria, debido a la presencia de varios metabolitos de utilidad. De entre ellos se destacan los lípidos, principalmente ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), que pueden ser utilizados con diversos fines, por ejemplo, energéticos para la obtención de biocombustibles, de valor nutritivo, para el desarrollo de suplementos alimenticios. Además, los PUFA's tienen relevancia en la prevención y el tratamiento de varias enfermedades, como por ejemplo, a nivel cardiovascular, capaces de disminuir la presión sanguínea y los niveles de colesterol en sangre. Actúan también como antiproliferativos disminuyendo la producción de células cancerosas en diferentes tipos de cáncer. Los PUFA's se pueden obtener a partir de microalgas cultivadas en medios artificiales, en diferentes escalas, y pueden ser considerados eco-amigables.

En este trabajo de titulación se buscó determinar la presencia y cantidad de PUFA's en cultivos de dos especies de microalgas: *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*. Para esto se utilizaron los medios de cultivo Blue Green-11 y Wright respectivamente, en modalidad cerrada. A partir de biomasa liofilizada, se obtuvieron extractos mediante la aplicación de dos técnicas: extracción mediante solventes con n-hexano 100%, y por fluidos supercríticos, con CO<sub>2</sub> como fluido extractor y etanol absoluto como co-solvente. Por cromatografía de gases con detección de ionización a la llama se determinó la composición de los distintos extractos respecto al contenido de PUFA's. Se evidenció que la extracción mediante fluidos supercríticos es más eficiente en cuanto a la diversidad y cantidad de ácidos grasos obtenidos a partir de *Nannochloropsis oculata*, mientras que para *Tetraselmis suecica*, se observa mayor eficacia en la extracción por solventes con n-hexano 100%. Estos resultados pueden explicarse quizá por distintas variables, como diferencias en la estructura y composición de la pared celular, condiciones de extracción aplicada en cada caso.

**Palabras claves:** Microalgas. Ácidos grasos poliinsaturados. *Nannochloropsis oculata*. *Tetraselmis suecica*. Extracción solventes. Fluidos supercríticos.

## Abstract

Microalgae have aroused great interest in science and industry in the last decade, due to the presence of several useful metabolites. Among them, lipids stand out, mainly polyunsaturated fatty acids (PUFA's), which can be used for various purposes, for example, energy to obtain biofuels, nutritional value, for the development of food supplements. In addition, PUFAs are relevant in the prevention and treatment of several diseases, for example, at the cardiovascular level, capable of lowering blood pressure and blood cholesterol levels. They also act as antiproliferatives, decreasing the production of cancer cells in different types of cancer. PUFA's can be obtained from microalgae cultivated in artificial environments, at different scales, and can be considered eco-friendly.

In this titling work, we sought to determine the presence and quantity of PUFA's in crops of two species of microalgae: *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica*. For this, the Blue Green-11 and Wright cultivation methods were used, respectively, in closed mode. From lyophilized biomass, extracts were obtained by applying two techniques: solvent extraction with n-hexane 100%, and supercritical fluids, with CO<sub>2</sub> as extracting fluid and absolute ethanol as co-solvent. By gas chromatography with flame ionization detection, the composition of the different extracts was determined with respect to the content of PUFA's. It was evidenced that the extraction by supercritical fluids is more efficient in terms of the diversity and quantity of fatty acids obtained from *Nannochloropsis oculata*, while for *Tetraselmis suecica*, greater efficiency is observed in solvent extraction with 100% n-hexane. These results can perhaps be explained by different variables, such as differences in the structure and composition of the cell wall, and extraction conditions applied in each case.

**Keywords:** Microalgae. Polyunsaturated fatty acids. *Nannochloropsis oculata*. *Tetraselmis suecica*. Solvent extraction. Supercritical fluids.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen .....	1
Abstract .....	2
Abreviaturas .....	8
DEDICATORIA.....	13
DEDICATORIA.....	14
AGRADECIMIENTO.....	15
INTRODUCCIÓN .....	16
OBJETIVOS .....	17
Objetivo general: .....	17
Objetivos específicos:.....	17
HIPÓTESIS .....	18
1.    MARCO TEÓRICO.....	19
1.1.    Descripción general de microalgas.....	19
1.2.    Especies de interés en este estudio.....	19
1.2.1. <i>Tetraselmis suecica</i> .....	19
1.2.2. <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	20
1.3.    Cultivo de microalgas.....	21
1.3.1.    Condiciones de cultivo .....	22
1.3.2.    Medios de cultivo .....	22
1.4.    Ácidos grasos poliinsaturados.....	22
1.5.    Ácidos grasos poliinsaturados en microalgas .....	23
1.6.    Técnicas de extracción .....	26
1.6.1.    Métodos de extracción mediante solventes.....	26
1.6.1.1.    Maceración.....	27
1.6.1.2.    Maceración asistida por ultrasonido.....	27
1.6.2.    Fluidos supercríticos.....	28
1.7.    Análisis de extractos lipídicos.....	29
1.7.1.    Cromatografía de gases .....	29
2.    MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
2.1.    Materiales y Reactivos.....	30
2.2.    Etapa I o fase de cultivo .....	30
2.2.1.    Cultivo de microalgas.....	30
2.2.2.    Obtención de Biomasa.....	31
2.2.3.    Liofilización de Biomasa .....	31
2.3.    Etapa II o Fase de extracción.....	31
2.3.1.    Extracción mediante solventes .....	31



2.3.2.	Extracción mediante fluidos supercríticos.....	32
2.3.3.	Concentración de los extractos .....	32
2.4.	Etapa III o Evaluación de los métodos de extracción .....	33
2.4.1.	Derivatización de extractos .....	33
2.4.2.	Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases.....	33
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1.	Rendimiento de biomasa microalgal de <i>Nannochloropsis oculata</i> y <i>Tetraselmis suecica</i> . .....	38
3.2.	Rendimiento de extracción por solventes frente al rendimiento de extracción por fluidos supercríticos. ....	38
3.3.	Análisis de ácidos grasos obtenidos a partir de <i>Nannochloropsis oculata</i> . ....	38
3.4.	Análisis de ácidos grasos obtenidos a partir de <i>Tetraselmis suecica</i> . ....	41
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	47
4.1.	Conclusiones.....	47
4.2.	Recomendaciones.....	47
	REFERENCIAS.....	48
	ANEXOS .....	55

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Tetraselmis suecica</i> vista bajo un microscopio óptico.....	20
<b>Figura 2.</b> <i>Nannochloropsis oculata</i> vista bajo un microscopio óptico .....	21
<b>Figura 3.</b> Curva de calibración del estándar del ácido graso poliinsaturado - ácido linolénico C18:3. ....	34
<b>Figura 4.</b> Cromatograma de <i>Nannochloropsis oculata</i> extraída por solventes. ....	39
<b>Figura 5.</b> Cromatograma de <i>Nannochloropsis oculata</i> extraída por fluidos supercríticos. ....	39
<b>Figura 6.</b> Cromatograma de <i>Tetraselmis suecica</i> extraída por solventes. ....	41
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de <i>Tetraselmis suecica</i> extraída por fluidos supercríticos. ....	42

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones de ácidos grasos obtenidos a partir de <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	40
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones de ácidos grasos obtenidos a partir de <i>Tetraselmis suecica</i> .....	42

## Índice de anexos

<b>ANEXO 1.</b> Fotos y tablas de la Etapa I o Fase de cultivo.....	55
<b>Anexo 1.1.</b> Foto del cultivo de la microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	55
<b>Anexo 1.2.</b> Foto del cultivo de la microalga <i>Tetraselmis suecica</i> .....	55
<b>Anexo 1.3.</b> Composición y preparación del medio BG11.....	55
<b>Anexo 1.4.</b> Preparación de solución stock de traza de metales para el medio BG11.....	56
<b>Anexo 1.5.</b> Composición y preparación del medio WC.....	56
<b>Anexo 1.6.</b> Preparación de solución stock de traza de metales para el medio WC.....	56
<b>Anexo 1.7.</b> Solución stock de vitaminas para el medio WC.....	57
<b>Anexo 1.8.</b> Fotos de la congelación y liofilización de la biomasa microalgal.	57
<b>ANEXO 2.</b> Fotos de la Etapa II o Fase de extracción.....	57
<b>Anexo 2.1.</b> Fotos de la extracción mediante solvente químico con baño de ultrasonido.....	57
<b>Anexo 2.2.</b> Equipo para extracción mediante fluidos supercríticos.....	57
<b>Anexo 2.3.</b> Fotos del rotavapor, extracto concentrado y concentrador al vacío para concentración de extractos por solventes.....	58
<b>Anexo 2.4.</b> Concentración de los extractos por fluidos supercríticos con nitrógeno gaseoso.....	58
<b>ANEXO 3.</b> Fotos de la Etapa III o Evaluación de los métodos de extracción...	59
<b>Anexo 3.1.</b> Fotos de la derivatización por metilación de los extractos.....	59
<b>Anexo 3.2.</b> Foto del equipo de cromatografía de gases.....	59
<b>Anexo 3.3.</b> Curva de calibración del estándar del Ácido oleico C18:1.....	59
<b>Anexo 3.4.</b> Curva de calibración del estándar del Ácido araquidónico C20:4 .....	59
<b>Anexo 3.5.</b> Resultados obtenidos por cromatografía para <i>Nannochloropsis oculata</i> extraída por solventes.....	60
<b>Anexo 3.6.</b> Resultados obtenidos por cromatografía para <i>Nannochloropsis oculata</i> extraída por fluidos supercríticos.....	60
<b>Anexo 3.7.</b> Resultados obtenidos en el cromatograma para <i>Tetraselmis suecica</i> extraída por solventes.....	61
<b>Anexo 3.8.</b> Resultados obtenidos en el cromatograma para <i>Tetraselmis suecica</i> extraída por fluidos supercríticos.....	61

## Abreviaturas

**PUFA's:** Poly-Unsaturated Fatty Acids

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno gaseoso

**BG-11:** Blue Green -11

**WC:** Wright

**CG:** Cromatografía de gases

**EPA:** Ácido eicosapentaenoico

**ARA:** Ácido araquidónico

**DHA:** Ácido docosahexaenoico

**ALA:** Ácido alfa-linoleico

**AL:** Ácido linoleico

**AGPICL:** Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

**pH:** Potencial hidrógeno

**TR:** Tiempo de retención

**GEI:** Gases de efecto invernadero

**PNT:** Procedimiento normalizado de trabajo

**FAME:** Fatty Acid Methyl Esters

**FD:** Factor de dilución

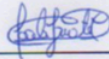
**DER<sub>NATIVO</sub>:** Factor de rendimiento

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Paola Alexandra Gárate Carreño, autora del trabajo de titulación "Determinación de ácidos grasos poliinsaturados en extractos de microalgas (*Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*) obtenidos mediante extracción por solventes y fluidos supercríticos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 21 de noviembre de 2022



---

Paola Alexandra Gárate Carreño

C.I: 0302022744

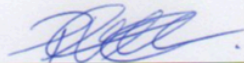


## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

María Paz Ullauri Medina, autora del trabajo de titulación "Determinación de ácidos grasos poliinsaturados en extractos de microalgas (*Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*) obtenidos mediante extracción por solventes y fluidos supercríticos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 21 de noviembre de 2022



---

María Paz Ullauri Medina

C.I: 0105564694

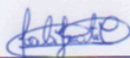
## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Paola Alexandra Gárate Carreño en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Determinación de ácidos grasos poliinsaturados en extractos de microalgas (*Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*) obtenidos mediante extracción por solventes y fluidos supercríticos", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 21 de noviembre de 2022



---

Paola Alexandra Gárate Carreño  
C.I: 0302022744



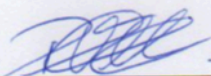
## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

María Paz Ullauri Medina en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Determinación de ácidos grasos poliinsaturados en extractos de microalgas (*Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*) obtenidos mediante extracción por solventes y fluidos supercríticos", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 21 de noviembre de 2022



---

María Paz Ullauri Medina  
C.I: 0105564694

## DEDICATORIA

A mi esposo Alex, por su paciencia, por siempre creer en mí y no dejarme rendir, también por brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente, la ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante para lograrlo. Por estar a mi lado en todo momento inclusive en los momentos más difíciles, por darme tu amor todos los días, lo que me motiva a cumplir todo lo que me proponga.

A mi amado hijo Joaquín, por ser mi fuente de motivación e inspiración para superarme cada día más, agradezco cada una de tus sonrisas y tus muestras de cariño hacia mí. Todos mis esfuerzos han valido la pena porque has estado a mi lado, iluminándome con tu amor.

A mis padres Alfredo y Jacqueline, y a mi hermano César por su apoyo incondicional siempre y por sus consejos para hacer de mí una mejor persona.

A mi Abuelita Marcia, que sé que aunque no está presente de cuerpo, siempre está acompañándome.

Pao.

## DEDICATORIA

A mi Mamá Loly, por ser mi ejemplo a seguir, mi guía y mi apoyo incondicional e ilimitado que siempre me ha brindado la fortaleza para superar cualquier obstáculo a lo largo de toda mi vida, formándome para ser la mujer que soy hoy en día.

A mis Hermanos Paúl y Juan, por su cariño y por estar siempre presentes en los momentos más importantes.

Al amor de mi vida, mi prometido Pedro, por su amor, comprensión y palabras de aliento que me motivan y me inspiran todos los días para alcanzar mis sueños.

A mi mejor amiga Gaby, por ser mi soporte incondicional desde que teníamos seis años, no existen palabras suficientes para expresarte el cariño y admiración que siento por ti, eres la mejor amiga que alguien puede tener.

Paz.

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios, por brindarnos vida, sabiduría y salud, para culminar nuestros estudios.

A nuestras familias por el apoyo incondicional brindado durante nuestra vida académica quienes han creído en nosotros siempre, dándonos ejemplo de superación, humildad y sacrificio.

A la Universidad de Cuenca por permitirnos ser profesionales en la carrera que tanto nos apasiona, gracias a cada maestro que formó parte de este proceso integral de formación.

A nuestro Tutor Dr. Fabián León Tamariz, por habernos brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico durante este periodo.

A nuestra Asesora de Tesis BQF. Jessica Calle López, por sus palabras de apoyo y motivación.

A la Dra. Johana Ortiz, por su paciencia, dedicación y enseñanzas.

A la BQF. Salomé Zea, por su cariño, ya que siempre contamos con su apoyo para cumplir este proyecto.

Pao y Paz.

## INTRODUCCIÓN

La elevada producción de combustibles derivados del petróleo ha generado escasez de reservas de crudo, debido a que la población mundial crece a un ritmo exponencial. Se estima que las reservas puedan llegar a agotarse a mediados del año 2040, lo que ha provocado un incremento en el precio del combustible (Castillo et al, 2017). Además, se conoce que en la atmósfera existen concentraciones de gases de efecto invernadero como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el metano (CH<sub>4</sub>) y el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), provocadas por las emisiones industriales. Se cree que el CO<sub>2</sub> procedente de la quema de combustibles fósiles, es el responsable del 60% del calentamiento global (Andrade-Castañeda, Arteaga-Céspedes & Segura-Madrigal, 2017). De acuerdo con Hernández-Pérez & Labbé, (2014) para el año 2300, el CO<sub>2</sub> atmosférico alcanzará un máximo de 1900 a 2000 ppm, 5 veces mayor que el actual. Este aumento ya ha provocado un incremento en la acidificación del agua en los océanos, afectando a organismos con conchas o corazas formadas por carbonato de calcio, causando la pérdida de parte de su esqueleto carbonado (Fernandez, 2014).

Las proyecciones mostradas plantean la urgente necesidad de promover el uso de nuevas alternativas renovables como los biocombustibles, mismos que se producen a partir de biomasa, nombre que se da a cualquier materia orgánica de origen reciente que haya derivado de vegetales o animales como el resultado de un proceso de conversión fotosintético (Serna, Barrera & Montiel, 2011).

La utilización de microalgas en la producción de biocombustibles se ha convertido en una alternativa gracias a varios factores tales como su elevado contenido de lípidos, en especial PUFA's. Su capacidad de acumular entre un 20 y un 80% en triglicéridos, le brinda un perfil idóneo para la obtención de biocombustibles. Además, las microalgas presentan una mayor eficiencia fotosintética; son capaces de asimilar el CO<sub>2</sub> y otros nutrientes, superando a cualquier otro vegetal utilizado tradicionalmente para la obtención de aceite; presentan un rápido desarrollo y multiplicación celular, llegando incluso a duplicar su número en un día. De igual manera, no requieren tierras cultivables,

demandan menor consumo de agua renovable y pueden cultivarse en agua salobre. Su alta productividad energética es de 7 a 31 veces mayor a la palma africana, y decenas a centenas mayor que otras plantas oleosas, como el maíz, la soya, la canola y el coco. Lo que las convierte en una fuente potencial para la obtención de biocombustibles de tercera generación (Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Fernandez, 2014; Rodríguez, 2017; Salazar, 2012; Saladini, Patrizi, Pulselli, Marchettini, & Bastianoni, 2016).

Mediante este trabajo de titulación, a fin de contribuir con el estudio de alternativas viables de solución a la problemática descrita, se propuso evaluar dos métodos extractivos para determinar el de mayor efectividad para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) a partir de dos tipos de microalgas, *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*. Se utilizó extracción asistida por ultrasonido con solventes, y extracción por fluidos supercríticos. Se evaluó su eficacia mediante la cuantificación de estos ácidos grasos a través de cromatografía de gases con detección de ionización a la llama.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

- Establecer el método de extracción idóneo para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) a partir de cultivos de microalgas de las cepas *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica* cultivadas en el Laboratorio de microalgas, grupo de Plantas Medicinales y Productos Naturales, Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca.

### Objetivos específicos:

- Aplicar los métodos de extracción asistida por ultrasonido con solventes y fluidos supercríticos para la obtención de PUFA's a partir de las microalgas cultivadas.
- Cuantificar la cantidad de PUFA's obtenidos por cada método de extracción mediante cromatografía de gases posterior a su derivatización mediante metilación.

- Comparar la efectividad de extracción de los métodos por solventes y fluidos supercríticos de acuerdo a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados obtenidos.

## **HIPÓTESIS**

El método de extracción por fluidos supercríticos es más eficiente para la extracción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) a partir de cultivos de microalgas que la utilización de solventes.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Descripción general de microalgas

Las microalgas son organismos microscópicos, unicelulares, eucariotas, que pueden ser marinos o de agua dulce. Crecen en suspensión dentro de un cuerpo acuático, presentan un tamaño promedio de entre 5 y 50  $\mu\text{m}$ , por lo cual son fácilmente digeribles por muchos organismos cuya fuente principal de alimento es el fitoplancton. Pertenecen al reino plantae, poseen clorofila, lo que les otorga un aspecto verdoso parecido al de las plantas. Requieren de la luz para desarrollarse y crear materia orgánica a través de la fotosíntesis, se clasifican como talofitas o plantas inferiores, debido a que presentan una estructura simple, no vascularizada, caracterizada por la ausencia de raíz, tallo y hojas, sus estructuras reproductivas se encuentran desprotegidas, además pueden ser productoras de esporas (López, 2017; Montes, 2014; Salazar, 2012). En función de su taxonomía se dividen en grupos incluyendo: azul-verde, verde, verde-amarillo, rojo, marrón y las algas de oro. Existen más de 50.000 especies de microalgas. Hasta la actualidad se han descrito aproximadamente 30.000 especies, mismas que poseen formas esféricas, elípticas, cilíndricas o en espiral (Vega, 2019).

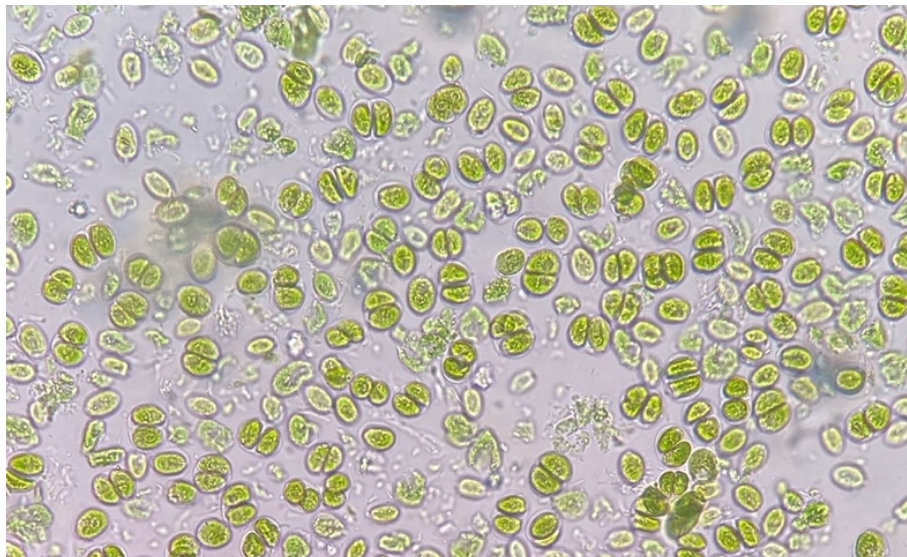
### 1.2. Especies de interés en este estudio

#### 1.2.1. *Tetraselmis suecica*

Pertenecen a la clase *Prasinophyceae*, dentro de la división *Chlorophyta*. Es una microalga marina unicelular, móvil, de color verde debido a la presencia de clorofila a y b. Se caracteriza por su forma generalmente ovalada, con cuatro flagelos isodinámicos que surgen de una invaginación apical que se observa en la porción anterior de la célula, y que se encuentra ubicada en la misma dirección en la que avanza. El diámetro celular es de 10  $\mu\text{m}$  aproximadamente, como se presenta en la **Figura 1**. Esta especie, es considerada el flagelado marino más fácil de cultivar en gran escala, se la utiliza como fuente de alimento para larvas de moluscos y crustáceos, puesto que dispone de un valor nutritivo altamente considerable (Ulloa, 2011). *Tetraselmis suecica* es considerada una extraordinaria fuente de PUFA's, además de poseer grandes cantidades de proteínas, lípidos y carbohidratos, contiene además  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E,



carotenoides como fucoxantina y  $\beta$ -caroteno, y varios esteroides, siendo el principal el campesterol. Se aprovecha su composición de ácidos grasos y esteroides para usarlos como marcadores en la cadena alimenticia (Osuna, 2015).



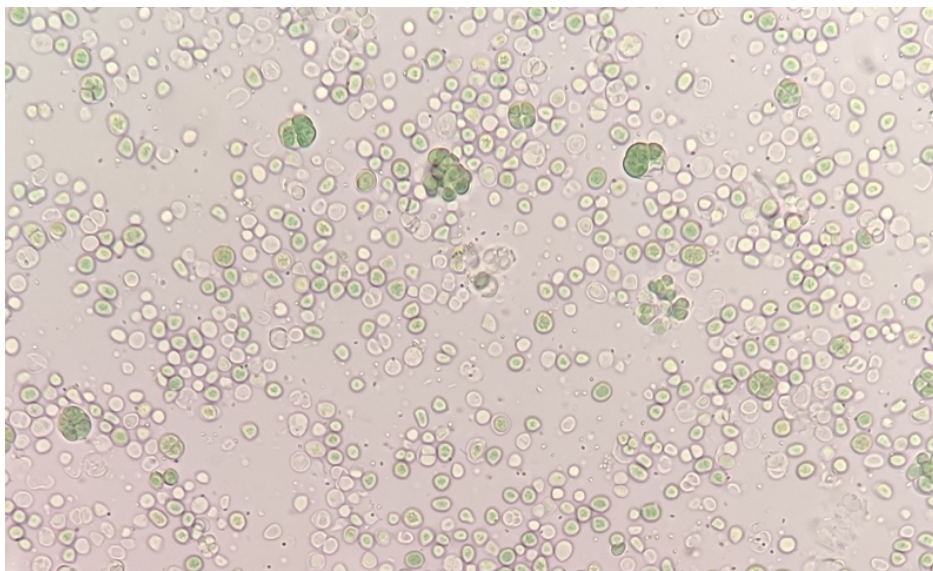
**Figura 1.** *Tetraselmis suecica* vista bajo un microscopio óptico. **Fuente:**  
Autoras

### 1.2.2. *Nannochloropsis oculata*

Pertenece a la clase *Eustigmatophyceae*, familia de las Monodopsidáceas, es una microalga eucariota, unicelular, de rápido crecimiento, que presenta formas subsféricas o cilíndricas, miden alrededor de 2 y 4  $\mu\text{m}$ . Contiene clorofila a y algunos pigmentos como astaxantina, zeaxantina y canthaxantina, carecen completamente de clorofila b y c. Los cloroplastos se caracterizan por presentar una coloración de amarillo a verde (Osorio et al., 2020; Martínez et al., 2017). Se presenta una fotografía microscópica de la especie en la **Figura 2**.

*Nannochloropsis oculata* es reconocida por su valor nutricional como una excelente fuente de proteínas, carbohidratos, lípidos y vitaminas, contiene además elevadas cantidades PUFA's. Se ha determinado que esta microalga posee la capacidad de transformar hasta aproximadamente un 60% de su biomasa en lípidos (Sánchez, 2021), especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido araquidónico (ARA), docosahexaenoico (DHA) que son de gran importancia nutricional para la formación del sistema nervioso y el desarrollo de larvas en organismos marinos (Osorio et al., 2020). Además, esta microalga ha

sido utilizada como alimento para el rotífero *Brachionus plicatilis* Mueller, el cual transfiere eficazmente los ácidos grasos poliinsaturados algales a las larvas de peces marinos (Montes, 2014). También, por su alto contenido de ácido palmítico (C16:0) y palmitoleico (C16:1n-7), es considerada una gran fuente en la producción de biodiésel (Martínes et al., 2017).



**Figura 2.** *Nannochloropsis oculata* vista bajo un microscopio óptico. **Fuente:**  
Autoras

### 1.3. Cultivo de microalgas

Para dar comienzo al proceso de cultivo de una microalga, es necesario el desarrollo de sistemas que favorezcan su crecimiento. Por consiguiente, el diseño y optimización de los fotobiorreactores es fundamental para el crecimiento de estos microorganismos. Los mismos deben presentar ciertas características como alta productividad volumétrica, costos bajos de inversión y mantenimiento, además de un fácil control de parámetros como agitación, temperatura, pH, entre otros (Dragone, Fernandes & Teixeira, 2010).

Existen dos tipos de sistemas para el crecimiento de microalgas, abiertos y cerrados. Los sistemas abiertos son aquellos en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera, y los sistemas cerrados conocidos como fotobiorreactores, en donde el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera. La selección del tipo de sistema de cultivo a escala productiva es crucial, ya que es importante determinar la disponibilidad de recursos hídricos, suelos, asimismo el tipo y valor

del producto final desarrollado a partir de la biomasa (Hernández-Pérez, & Labbé, 2014).

### 1.3.1. Condiciones de cultivo

Los principales componentes que deben tener los medios para el cultivo de microalgas son el agua, carbono, oxígeno, hidrógeno, fósforo, nitrógeno, macronutrientes como cloruro de sodio, magnesio, sales de calcio, potasio, sulfatos y micronutrientes como cobre, zinc, manganeso entre otros. Además de vitaminas como la tiamina, biotina y cianocobalamina. Es importante controlar las condiciones de cultivo como la temperatura, intensidad de luz, velocidad de aireación, pH, y aporte de dióxido de carbono (Fernandez, 2014; Hernández-Pérez, & Labbé, 2014).

### 1.3.2. Medios de cultivo

**Wright (WC):** Es un medio ligeramente alcalino, contiene bicarbonato de sodio, silicato, sulfato de magnesio y fosfato en bajas concentraciones, contiene además elementos como traza de metales y vitaminas, se usa para cultivar especies tolerantes de pH neutro entre 7 y 8 (Benenaula, 2021).

**Blue Green-11 (BG-11):** Está triplemente suplementado con nitrato de sodio y se utiliza a un pH neutro entre 7 y 8. Presenta altas concentraciones de nitrato y fósforo (Sevilla, 2014).

## 1.4. Ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), son compuestos orgánicos formados por átomos de carbono de longitud variable, con un grupo carboxílico en un extremo y un grupo metilo en el otro. La denominación de insaturados se da por la presencia de dobles enlaces en su estructura. Su nombre procede del inglés Poly-Unsaturated Fatty Acids (López, Cárdenas & Quintero, 2014).

Los PUFA's contienen de 2 a 6 dobles enlaces en su cadena carbonada. Los de cadena larga, mayor a 18 carbonos, se sintetizan a partir de los ácidos grasos esenciales, mediante reacciones de elongación consistentes en el aumento de 2

unidades carbonadas, y desaturación, que es el aumento de dobles enlaces, dependiendo de las necesidades del organismo. Existen dos series de PUFA's: la serie  $\omega$ -6 y la serie  $\omega$ -3, esto depende de la posición del primer doble enlace en la cadena carbonada a partir del extremo opuesto al ácido carboxílico (Guía Metabólica, 2014; López, Cárdenas & Quintero, 2014).

La principal función de éstos es brindar un alto grado de fluidez a las membranas celulares, permitiendo así el movimiento de proteínas en su superficie y dentro de la bicapa lipídica. Otra función importante, es la producción de los eicosanoides, a partir de los n-3 y n-6 tras la acción de ciclooxigenasas y lipooxigenasas. Los más importantes son el ácido alfa-linolénico (ALA) de la serie omega-3 y el ácido linoleico (AL) de la serie omega-6. Son ácidos grasos esenciales que deben ingerirse con la dieta (Guía Metabólica, 2014; López, Cárdenas & Quintero, 2014).

## **1.5. Ácidos grasos poliinsaturados en microalgas**

Los ácidos grasos que se encuentran presentes en las microalgas pueden variar no solo entre especies, sino también entre cepas de microorganismos, dependientes de las condiciones de cultivo, periodo de cosecha y edad del mismo (Rodríguez, 2017).

Las microalgas presentan una mayor capacidad para sintetizar y almacenar PUFA's, mayores a dieciocho carbonos, que son en su mayoría ácidos grasos esenciales de los grupos  $\omega$ -3 como el ácido alfa-linolénico (C18:3), ácido eicosapentanoico EPA (C20:5) y ácido docosahexanoico DHA (C22:6), o del grupo  $\omega$ -6, como el  $\gamma$ -linolénico (C18:3) y linoleico (C18:2) (Akoh, 2017). Se ha relacionado que la producción de EPA y DHA incrementa en cultivos que permanecen bajo oscuridad en algunas especies como *Tetraselmis spp.* Además, se ha demostrado que los sistemas de producción heterotróficos revelan una productividad de PUFA's omega-3, de 2 o 3 órdenes de mayor magnitud por encima de las obtenidas bajo autotrofia (Castillo et al., 2017; Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Tadeo-Sánchez et al., 2014; Swanson et al., 2012).

Investigadores de todo el mundo han destacado la importancia de los PUFA's presentes en microalgas para la producción de biodiesel, despertando gran interés debido a su alto contenido de lípidos y al hecho de que la síntesis de estos puede ser manipulada por cambios en las condiciones de cultivo, y pueden estar modificadas genéticamente para mejorar su rendimiento y características productivas (Ho et al., 2013; Saifullah, Karim & Ahmad-yazid, 2014).

Los biocombustibles se clasifican en cuatro tipos: i) los de primera generación, se producen a partir de aceites o azúcares comestibles que provienen de plantas como el maíz, caña de azúcar o girasol; ii) los de segunda generación, se obtienen de materias primas no utilizables para alimentación humana, como son los residuos agrícolas, forestales o el aceite usado de cocina (Cortés-Sánchez, Gata-Montero, Pipió-Tertero, Rodríguez-Rivas & Sánchez-Santos, 2019); iii) de tercera generación, usan microorganismos de cultivo acuático como materia prima, es decir, algas y microalgas, que se caracterizan por tener una gran capacidad de crecimiento rápido y potencial energético; iv) y, los de cuarta generación, que se derivan de la bioconversión de organismos vivos como microorganismos y plantas, aplicando herramientas biotecnológicas (Saladini, Patrizi, Pulselli, Marchettini, & Bastianoni, 2016).

Los biocombustibles de tercera generación como el biodiesel obtenido de microalgas son muy interesantes debido a que tienen una tasa de fijación de CO<sub>2</sub> más alta en comparación con los cultivos terrestres, lo que permite que almacenen el carbono en forma de lípidos para la producción de biodiesel (Castillo et al., 2017; Saladini et al., 2016). Además, estos carecen de los principales inconvenientes asociados a la producción de biocombustibles de primera y segunda generación. Tales como las limitaciones económicas y ambientales y, de los biocombustibles de cuarta generación, que incorporan tecnología de captura y almacenamiento de carbono que excedería todas las opciones carbono-neutras disponibles en la actualidad (Castillo et al, 2017; Rodríguez, 2017; Saladini, Patrizi, Pulselli, Marchettini, & Bastianoni, 2016).

La fuente comercial de ácidos grasos poliinsaturados actualmente es el aceite de pescado, el cual presenta una gran cantidad de estas sustancias debido a



que los peces se nutren en gran proporción de fitoplancton marino (Cerón, 2013). El aceite de microalgas se considera como una alternativa disponible, en términos de aceptabilidad social y económica y mayor seguridad energética. Las microalgas son capaces de producir aceite durante todo el año, producen entre 15 y 300 veces más aceite para la producción de biodiésel que los cultivos tradicionales por superficie (Castillo et al., 2017; Saladini et al., 2016). Los PUFA's provenientes de microalgas, tienen además, algunas ventajas sobre los ácidos grasos de origen animal, los cuales, en muchos casos tienen olores desagradables, presentan contaminación con metales pesados, grandes cantidades de colesterol, diferentes tóxicos que tienden a acumularse en las grasas del pescado, producción muy variable, y composición muy heterogénea, lo cual dificulta la purificación de estos lípidos. En comparación con la producción de biodiesel a partir de lípidos de microalgas que no presenta toxicidad y es altamente biodegradable (Tadeo-Sánchez et al., 2014; Swanson et al., 2012).

Entre otras aplicaciones los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga (AGPICL omega-3) EPA y DHA, se consideran actualmente de gran importancia nutricional debido a los efectos positivos que presentan en la salud por lo cual se sugiere su suplementación (Tadeo-Sánchez et al., 2014; Swanson et al., 2012). Algunas microalgas como la Spirulina (*Arthrospira*) son utilizadas debido a su alto contenido proteico y su impresionante valor nutricional, representan una fuente esencial de ácidos grasos y ácido linoleico que no pueden sintetizar los humanos (Valenzuela, Sanhueza & Valenzuela, 2015). En la actualidad son usados como aditivos en leches infantiles y en la producción de huevos enriquecidos con Omega-3 (Santos, González-Arechavala, & Martín-Sastre, 2014). Valenzuela y colaboradores (2011) enfatizan la relevancia de los PUFA's en la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades, por ejemplo, los PUFA's omega-3 actúan sobre el aparato cardiovascular ejerciendo un efecto protector; son capaces de reducir la presión sanguínea y los niveles de colesterol en sangre. Según Ottens (2012) en diversas especies de microalgas se han detectado capacidades quimiopreventivas en extractos lipídicos, ya que actúan como antiproliferativos disminuyendo la producción de células cancerosas en diferentes tipos de cáncer. Esta efectividad ha sido asociada a la especie y a

factores medioambientales o de estrés en el entorno en que las microalgas se desarrollan, así como la técnica empleada para extraer los lípidos.

## **1.6. Técnicas de extracción**

La extracción de metabolitos a partir de microalgas, incluidos los ácidos grasos, se optimizan luego de alcanzar la disrupción celular, mediante la ruptura de la pared celular. Esto es debido a que la mayor parte de los componentes generados por el microorganismo, se encuentran en el interior de los organelos, principalmente en las vacuolas, que sirven como reserva de diferentes productos como almidón y lípidos. (Lee et al., 2017; Lewandowski et al., 2018; Singh & Saxena, 2015).

Entre los métodos de ruptura se mencionan métodos mecánicos y no mecánicos conocidos también como químicos y enzimáticos. Los métodos mecánicos requieren un considerable aporte energético, mientras que los métodos no mecánicos requieren del uso de sustancias químicas o biológicas que al interactuar con la pared celular de la microalga, provocan su degradación parcial (Lee et al., 2017; Rodríguez, 2017).

Una vez alcanzada la ruptura de la pared, o concomitantemente a este proceso, se pueden utilizar diferentes métodos de extracción, como la extracción con solventes químicos, extracción asistida por microondas, ondas de ultrasonido, extracción mediante fluidos supercríticos, autoclavado, shock osmótico y extracción enzimática (Salazar, 2012).

### **1.6.1. Métodos de extracción mediante solventes**

Se puede definir a un solvente como un líquido capaz de disolverse y extraer la o las sustancias de interés, debido a que presenta propiedades que le permiten arrastrar el soluto correctamente disuelto en su seno, además de ser inmiscible o parcialmente inmiscible (Romero-Rosinelli, 2017).

La técnica de extracción con solventes usualmente se usa para la obtención de lípidos de células microbianas. Actualmente, para la extracción de lípidos en

microalgas se usan n-hexano, cloroformo, acetona, benceno y ciclohexano, que pueden disolver lípidos fácilmente, a pesar de que dejan residuos en la célula. La tasa de extracción de solventes se ve significativamente afectada por condiciones operativas, como temperatura y presión (Mora-Barrantes, 2021; Show et al., 2015).

La extracción de biomasa seca con disolventes, ha demostrado ser mucho más eficaz para la recuperación de metabolitos intracelulares de características lipídicas que la extracción a partir de biomasa húmeda, debido al incremento de la selectividad de los solventes lipofílicos por los metabolitos de esta naturaleza (Mora-Barrantes, 2021; Show et al., 2015).

### **1.6.1.1. Maceración**

Se entiende por maceración, al proceso extractivo que permite el contacto entre el solvente y la muestra durante un tiempo específico que puede variar entre algunas horas hasta varios días, incluso catorce. Se realiza en recipientes o equipos cerrados, protegidos de la luz solar, para evitar interacciones. Es un proceso discontinuo, donde la muestra interactúa con el solvente agregado en cantidades determinadas. Constituyendo un agregado homogéneamente mezclado en el cual el solvente actúa simultáneamente sobre todas las porciones de la muestra, circulando en todas las direcciones y sentidos, hasta alcanzar una concentración en equilibrio con la del contenido celular. La naturaleza de los componentes extraídos depende directamente de la materia prima empleada, así como del solvente utilizado en la extracción (Carrión & García, 2010; Tituaña, 2013).

### **1.6.1.2. Maceración asistida por ultrasonido**

Es un método modificado de la maceración, se lo puede definir por la producción de ciclos rápidos de compresión y descompresión de las ondas sónicas sobre el solvente, producidas por la transmisión de una corriente eléctrica a un sistema mecánico (Salazar, 2012). Los ciclos continuos generan cavitación, que se define como la generación, crecimiento y colapso de micro burbujas de vapor en el interior de un fluido líquido. El periodo de implosión de estas burbujas es de



milisegundos o microsegundos, en el cual se libera una gran cantidad de energía en un corto lapso de tiempo (Gutiérrez-Mosquera, Arias-Giraldo, & Cardona-Naranjo, 2019). El periodo de implosión de acuerdo con (Corrêa et al., 2020) provoca la ruptura de la estructura celular, creando poros en la membrana celular, lo que facilita la accesibilidad del disolvente a la matriz vegetal, ya que altera la permeabilidad de las membranas celulares (Ruvira-Quintana, 2016).

Una ventaja importante que presenta este método es la reducción del tiempo de procesamiento. La desventaja que presenta esta técnica es que el uso continuo produce una elevación en la temperatura, además de generar radicales libres, por lo que, controlar la temperatura en el equipo es un punto clave para la correcta aplicación de la técnica (Ruvira-Quintana, 2016).

## **1.6.2. Fluidos supercríticos**

Se denomina fluido supercrítico a una sustancia pura que se encuentre operando en condiciones de presión y temperatura por encima de su punto crítico. Esta zona se conoce como “estado supercrítico” y manifiesta propiedades peculiares en los compuestos, de forma que presentan características tanto de líquidos como de gases. Esta particularidad les permite tener una incrementada densidad, baja viscosidad y elevada difusividad, propiedades susceptibles a cambios ya sea por efecto de la disminución o aumento de presión o temperatura. Que permiten a fluidos en estado supercrítico, modificar su penetración en estructuras celulares, y mejorar su poder disolvente (López-García, Vega-Merino & Sánchez-Belloso, 2012) (Vilca, 2019).

La extracción mediante fluidos supercríticos puede realizarse de dos formas: estática o dinámica. En la forma estática, la celda o cilindro de extracción es presurizado manteniendo cerrada la válvula de salida del extractor. Finalizado el tiempo de contacto, la válvula es abierta, permitiendo el paso del fluido con los compuestos extraídos al sistema de colección. En la forma dinámica, el fluido en estado supercrítico se deja fluir de manera continua por el cilindro de extracción, manteniendo las válvulas de entrada y salida del cilindro extractor abiertas durante el tiempo de operación (Brunner, 2013).

La eficiencia de extracción depende de varios factores, como la temperatura, la presión, y las características de la muestra, así como de la interacción entre los compuestos y los fluidos supercríticos. Se ha determinado también, que esta tecnología es adecuada para la extracción y fraccionamiento de lípidos neutros como los triglicéridos, desacidificación de aceites de alto contenido de ácidos grasos. Sin embargo, a pesar de ser una tecnología simple en su proceso, requiere de un alto costo de inversión en equipos (López-García, Vega-Merino & Sánchez-Belloso, 2012).

El uso del CO<sub>2</sub> en esta técnica de extracción no requiere de una etapa de separación, debido a que se encuentra en estado gaseoso a presión ambiente, lo que facilita su recuperación y reutilización evitando de esta manera el efecto invernadero. Además, tiene una mayor selectividad, menor tiempo de extracción y carece de toxicidad comparado con disolventes orgánicos (López-García, Vega-Merino & Sánchez-Belloso, 2012).

## **1.7. Análisis de extractos lipídicos**

### **1.7.1. Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es considerada una de las técnicas analíticas más sensibles para la separación de compuestos orgánicos volátiles de una determinada mezcla, sean estos polares o no polares. Haciendo posible la identificación y cuantificación de los componentes individuales. El fundamento de este equipo se basa en las diferencias de volatilidad y solubilidad de la mezcla de los solutos a separar. En la cromatografía de gases la fase móvil utilizada es un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente, un líquido retenido en una columna empaquetada o en las paredes de una columna capilar. Su principal limitación se presenta en la variabilidad térmica de los analitos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización (Agilent Technologies, 2022; Narvárez & Quito, 2015).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales y Reactivos

El nitrato de sodio, cloruro de calcio dihidratado, ácido cítrico monohidratado, bicarbonato de sodio, n-hexano grado análisis, hidróxido de potasio y sulfato de sodio anhidro fueron obtenidos de Merck® (Darmstad, Alemania). El citrato de amonio y hierro, ácido etilendiaminotetraacético sal disodio dihidratada, molibdato de sodio dihidratado, nitrato de cobalto hexahidratado, metanol grado análisis y ácido sulfúrico 96 % se adquirieron de Sigma-Aldrich® (Darmstad, Alemania). El sulfato de zinc heptahidratado, sulfato de cobre pentahidratado y cloruro férrico hexahidratado, se obtuvieron de Fisher Scientific® (Massachusetts, Estados Unidos). El sulfato de magnesio heptahidratado y el etanol absoluto grado análisis se adquirieron de J.T Baker ® (Pensilvania, Estados Unidos). El fosfato dipotásico y ácido Bórico fueron de VWR® (Pensilvania, Estados Unidos). El cloruro de manganeso tetrahidratado y cloruro de cobalto hexahidratado se adquirieron de Alfa Aesar® (Massachusetts, Estados Unidos). La biotina fue de AMRESCO® (Ohio, Estados Unidos). Se utilizó la cianocobalamina de Research Organics® (Ohio, Estados Unidos). El dióxido de carbono pureza de 99.99% y los gases (nitrógeno, aire sintético) pureza 99.99 % fueron de Linde® (Linde, Alemania). El nitrógeno gaseoso grado 3,0 marca Vidasas® (Cuenca, Ecuador).

### 2.2. Etapa I o fase de cultivo

#### 2.2.1. Cultivo de microalgas

La especie *Nannochloropsis oculata* fue cultivada en medio BG11 cuya composición y preparación se describe a detalle en los **Anexos 1.3 y 1.4** y la especie *Tetraselmis suecica* fue cultivada en medio WC cuya composición y preparación se describe a detalle en los **Anexos 1.5, 1.6 y 1.7**. Estas especies de microalgas fueron sembradas en frascos estériles de vidrio con un volumen de uno y dos litros de capacidad, cerrados herméticamente, sometidos a ciclos de luz-oscuridad cada 12 h, a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C, con agitación constante y una línea de aire procedente de un motor de aireación según Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) del Laboratorio (Universidad de Cuenca, 2019).

## **2.2.2. Obtención de Biomasa**

Se procedió a la recolección de la biomasa microalgal, luego de un periodo de crecimiento de 3 a 4 semanas. Se utilizó una centrifuga 2-6 marca SIGMA® (Darmstad, Alemania), en la cual se centrifugó cuatro tubos con aproximadamente 80 mL de biomasa cultivada cada uno, a una velocidad de 2000 rpm y un tiempo de 5 min. Se retiró el sobrenadante y se realizaron tres ciclos de lavado utilizando agua destilada con el objetivo de eliminar material residual del medio de cultivo. Al finalizar los ciclos de lavado, se recogió la biomasa presente y se almacenó en tubos Falcon de 50 mL de capacidad previamente pesados y etiquetados, los mismos que se almacenaron en refrigeración según PNT (Universidad de Cuenca, 2019).

## **2.2.3. Liofilización de Biomasa**

Se colocó 40 mL de biomasa microalgal en tubos de liofilización, distribuidos uniformemente con el objetivo de que no se formen acumulaciones de biomasa y se congeló por un tiempo de tres horas en un Biofreezer Fisher Scientific® R134A (Massachusetts, Estados Unidos) a una temperatura de -80 °C. Se colocaron los tubos en el equipo liofilizador, FreeZone 2.5 de LABCONCO® (Kansas, Estados Unidos) previamente estabilizado a una presión de 0,090 mBar y una temperatura de -52 °C. Un periodo de 24 horas fue suficiente para concluir la liofilización de las muestras, luego de ello, se pesaron y almacenaron en tubos Falcon previamente pesados y etiquetados, los mismos que se conservaron en un Biofreezer a -20 °C hasta su extracción según PNT (Universidad de Cuenca, 2019).

## **2.3. Etapa II o Fase de extracción**

### **2.3.1. Extracción mediante solventes**

Se utilizó n-hexano al 100% como solvente, se colocaron 60 mL por cada 2g de biomasa microalgal, se protegió el vaso de la luz con papel de aluminio según el PNT (Universidad de Cuenca, 2019) y se dejó en reposo durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se traspasó la suspensión a un balón fondo redondo y se colocó en un baño de ultrasonido modelo 8893, Cole-Parmer® (Illinois, Estados

Unidos) en 3 ciclos de 5 h cada uno. Se mantuvo un control de temperatura de 28 a 35°C. Entre cada ciclo se realizó una filtración, se reservó el filtrado en refrigeración y el residuo se colocó nuevamente en otro balón y se añadió la misma cantidad de solvente. Al finalizar los tres ciclos, se reunió los filtrados en un solo balón de 250 mL que se conservó en refrigeración.

### **2.3.2. Extracción mediante fluidos supercríticos**

Se realizó en un equipo marca Waters ®, modelo MV10 (Milford, Estados Unidos). Se utilizó CO<sub>2</sub> que tiene la capacidad de actuar como solvente no polar y como cosolvente se utilizó etanol absoluto. Para *Nannochloropsis oculata*, se utilizó a una velocidad de flujo de 4,5 ml/min, temperatura de 40°C, 150 bares de presión, con 10% de cosolvente, se programó 20 ciclos durante 1 hora con condiciones dinámico-estático-dinámico. En el caso de *Tetraselmis suecica*, se utilizó a una velocidad de flujo de 4,75 ml/min, temperatura de 40°C, 175 bares de presión, como cosolvente se utilizó 5% etanol y se programó 20 ciclos durante 1 hora con condiciones dinámico-estático-dinámico según PNT (Universidad de Cuenca, 2019).

### **2.3.3. Concentración de los extractos**

Se utilizó un rotavapor marca Laborota 4000 Efficient de Heidolph ® (Schwabach, Alemania), con un baño a 28°C, rotación de 180 rpm por 5 min. Se re-disolvió el contenido del balón con pequeñas cantidades del solvente, se distribuyó uniformemente en cuatro tubos de vidrio de 10 mL previamente pesados y etiquetados, y se colocaron en el concentrador a vacío marca RapidVap de LABCONCO ® (Kansas, Estados Unidos), a una temperatura de 30°C, 30 rpm, 300 mBar de vacío durante ocho horas según PNT (Universidad de Cuenca, 2019). Posterior al secado, los tubos fueron pesados y almacenados a -20 °C hasta el análisis.

El extracto obtenido por medio de fluidos supercríticos se colocó en un frasco de vidrio de 10 mL de capacidad previamente pesado y etiquetado, se distribuyó uniformemente en cuatro tubos Falcon de 15 mL previamente pesados y etiquetados, y se utilizó una corriente de N<sub>2</sub> para eliminar el solvente de las

muestras. Los tubos se pesaron y se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta posterior análisis. Se realizó el mismo procedimiento con las dos especies de microalgas según PNT (Universidad de Cuenca, 2019).

## **2.4. Etapa III o Evaluación de los métodos de extracción**

### **2.4.1. Derivatización de extractos**

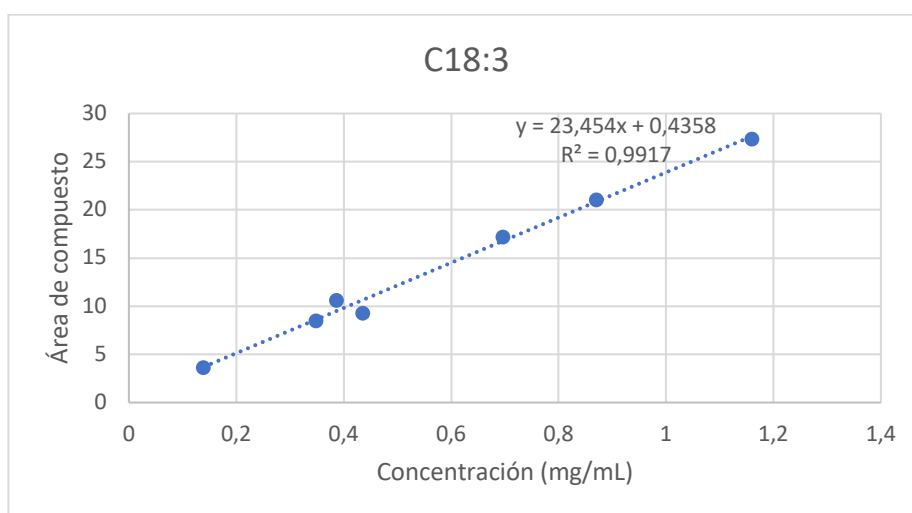
Para llevar a cabo de forma satisfactoria el análisis por cromatografía de gases, la muestra debe ser de carácter volátil. Por lo cual es necesario transformar el ácido graso en su éster metílico correspondiente, forma en la que es posible su medida mediante CG de acuerdo con Fuentes (2019). La muestra de extracto de *Tetraselmis suecica* fue derivatizada mediante metilación, a partir de 20 mg de extracto, al que se le añadieron 0.7 mL de hidróxido de potasio 10 M y 5.3 mL de metanol para análisis. Fue incubada a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1.5 horas en una estufa modelo E1305 marca VWR® (Pensilvania, Estados Unidos), con 5 s de agitación cada 20 min. Transcurrido este tiempo fue enfriada hasta temperatura ambiente. Se añadieron 0.58 mL de ácido sulfúrico 12 M y se mezcló por rotación hasta que aparezca un precipitado. Nuevamente se incubó a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1.5 horas, con agitación de 5 seg cada 20 min, y enfriada hasta temperatura ambiente. Se añadieron 3 mL de n-hexano y se mezcló por 5 min en Vortex. La mezcla fue centrifugada por 10 min a 3500 rpm en una centrífuga. Se separó la fase orgánica (sobrenadante) y se colocó en un tubo que contenía 1 mm de sulfato de sodio anhidro. Se deja reposar la mezcla por 10 min y se separa la fase orgánica que será el material usado para la inyección en el cromatógrafo. Para la muestra de extracto de *Nannochloropsis oculata* se realizó el mismo proceso de derivatización mediante metilación con la única modificación de que se partió de 200 mg de extracto.

### **2.4.2. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases**

Los ácidos grasos se analizaron por cromatografía de gases luego de haber sido derivatizados a metil-ésteres de ácidos grasos (FAME), en un cromatógrafo con detector FID marca Agilent Technologies® modelo 6890n G 1530 N (Santa Clara, Estados Unidos). Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de extracto derivatizado de la especie *Tetraselmis suecica* a  $220^{\circ}\text{C}$  con un Split de 1:10. La separación de los

compuestos se realizó en una columna capilar CP-Sil 88 (60 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.20  $\mu\text{m}$ ) con un flujo de 2 ml/min de Helio como gas portador. Se programó una rampa de temperatura que inició a 100°C, se incrementó a 180°C a razón de 8°C/min, se mantuvo a 180°C por 9 minutos y luego se incrementó a 230°C a 2°C/min, finalmente se mantuvo 1 min a 230°C. La detección de los compuestos se realizó a 250°C en un detector de ionización a la llama (FID), con un flujo de 30 ml/min de hidrógeno y 300 ml/min de aire sintético. Para la especie *Nannochloropsis oculata*, se realizó el mismo procedimiento descrito previamente con la variación de que se utilizó un Split de 1:2. La identificación de los ácidos grasos en forma de metil ésteres se realizó por comparación del tiempo de retención contra el estándar.

Para la cuantificación se utilizaron las curvas de calibración externas proporcionadas por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición del Departamento de Biociencias, misma que se presenta, a manera de ejemplo para el ácido linolénico, en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Curva de calibración del estándar del ácido graso poliinsaturado - ácido linolénico C18:3. **Fuente:** Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca.

La concentración se calculó en base a la ecuación de la recta, en donde “x” es la concentración y “y” el área bajo la curva obtenida en el cromatograma

respectivo para cada uno de los ácidos grasos presentes en las muestras analizadas, como se observa en la **Ecuación 1**.

**Ecuación 1.** Despeje de la ecuación del ácido linolénico C18:3 y reemplazo con los datos obtenidos.

$$y = mx + b$$

$$y = 23,454x + 0,4358$$

$$x = \frac{y - 0,4358}{23,454}$$

$$x = \frac{5,24444056 - 0,4358}{23,454}$$

$$x = 0,2050$$

Fue necesario realizar una corrección debido a que el Split utilizado para realizar las curvas de calibración fue de 1:5, mientras que en el extracto de la microalga *Tetraselmis suecica* se usó un Split de 1:10 y para la especie *Nannochloropsis oculata* se utilizó un Split de 1:2, como se observa en el ejemplo a continuación se realizó una multiplicación por el valor del Split utilizado en las curvas de calibración dividido para el Split aplicado en cada caso.

“x” multiplicado por Split (corregido)

Split corregido = 1:5 (Split curvas de calibración) / 1:2 (Split aplicado en muestra de *Nannochloropsis oculata*)

Split corregido = 2,5

$$0,2050 \times 2,5$$

$$x = 0,5125$$



Posterior, el cálculo del factor de dilución (FD) se obtuvo considerando el peso y las diluciones realizadas durante todo el proceso, mismo que abarca desde el peso inicial de microalga liofilizada para la obtención del extracto, hasta su posterior derivatización cómo se presenta a continuación, se expresa el resultado en mg/mL.

Cálculo del factor de dilución para *Nannochloropsis oculata* por fluidos supercríticos.

$$\begin{array}{ccc} 1\text{g} & \times & 6\text{ mL} \\ x & & 1,5\text{ mL} \end{array}$$

$$x = 0,25\text{ g} / 1,5\text{ mL} \text{ (0,25 g de concentración en 1,5 mL de extracto)}$$

$$x = 0,25\text{ g} \text{ (Concentrado) Re-disuelto en 1 mL}$$

Por lo tanto tenemos 0,25 g/mL

$$\text{Densidad del Hexano} = 0,6548\text{ g/mL}$$

Por lo tanto,

$$\begin{array}{ccc} 1\text{ mL} & \times & 654,8\text{ mg} \\ x & & 200\text{ mg} \end{array}$$

(200 mg de extracto reconstituido en hexano utilizado para derivatización)

$$x = 0,305\text{ mL}$$

$$\begin{array}{ccc} 1\text{ mL} & \times & 0,25\text{ g} \\ 0,305\text{ mL} & & x \end{array}$$

$$x = 76,25\text{ mg} / 3\text{mL} \text{ (76,25 mg presentes en 3 mL de extracto derivatizado)}$$

$x = 25,41\text{ mg/mL}$  (25,41 mg/mL presentes en 1 mL de extracto contenido en el vial)

**Factor de dilución (FD): 25,41 mg/mL**

Por último, se realizó el cálculo de la concentración total de cada ácido graso insaturado presente en cada muestra, multiplicando el valor de “x” corregido por el factor de dilución (FD), como se muestra a continuación.

Valor de “x” multiplicado el Factor de dilución (FD)

$$1,025 \times 25,41 \text{ mg/mL}$$

**Resultado:** 26,05 mg/mL de ácido linolénico presente en *Nannochloropsis oculata* por fluidos supercríticos.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Rendimiento de biomasa microalgal de *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*.

El rendimiento de biomasa obtenido de la microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada en medio BG-11, fue de 35 g de biomasa fresca de la cual se obtuvieron 3.8 g de biomasa liofilizada este rendimiento fue superior frente al obtenido de la microalga *Tetraselmis suecica* cultivada en medio WC, que a partir de 96 g de biomasa fresca se obtuvieron 4.8 g de biomasa liofilizada.

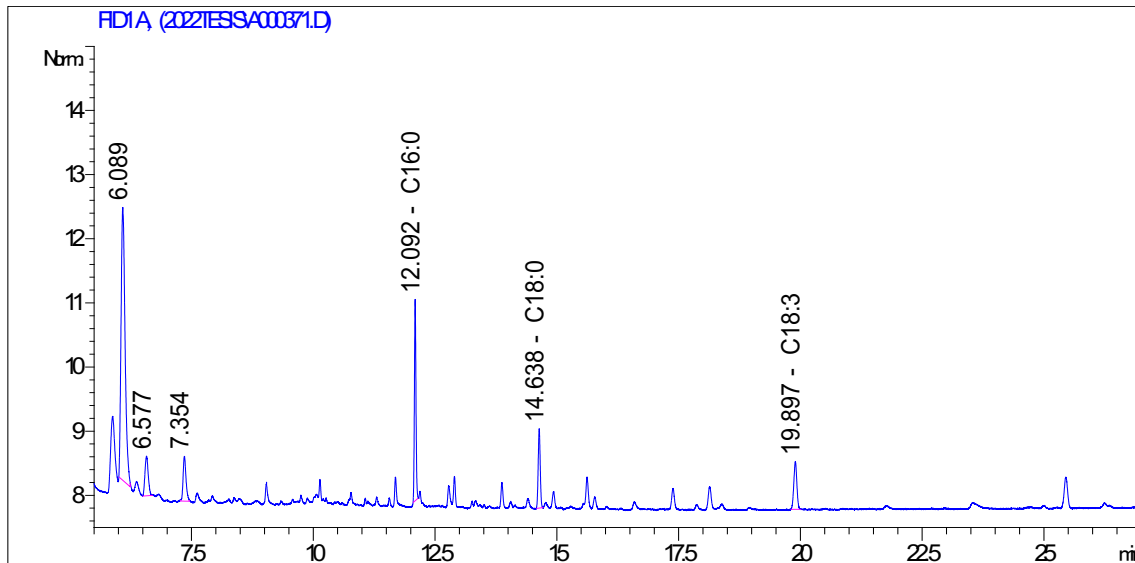
### 3.2. Rendimiento de extracción por solventes frente al rendimiento de extracción por fluidos supercríticos.

El factor de rendimiento o  $DER_{NATIVO}$  de extracción de la microalga *Nannochloropsis oculata* por maceración con solvente n-hexano fue de 62.5:1, frente al factor de rendimiento de extracción por fluidos supercríticos que fue de 1.11:1, lo que significa que para obtener 1 g de extracto en el primer caso son necesarios 62.5 g de microalga liofilizada mientras que en el segundo caso es necesario 1.11 g, observando una diferencia sumamente notable considerando que en ambos casos se partió de 1 g de microalga liofilizada. En cuanto al rendimiento de extracción de la microalga *Tetraselmis suecica* por maceración con solvente n-hexano fue de 2.21:1 frente al rendimiento de extracción por fluidos supercríticos que fue de 49:1, lo que significa que para obtener 1 g de extracto en el primer caso son necesarios 2.21 g de microalga liofilizada mientras que en el segundo caso son necesarios 49 g, presentando una diferencia considerable tomando en cuenta que en ambos casos se partió de 2 g de microalga liofilizada.

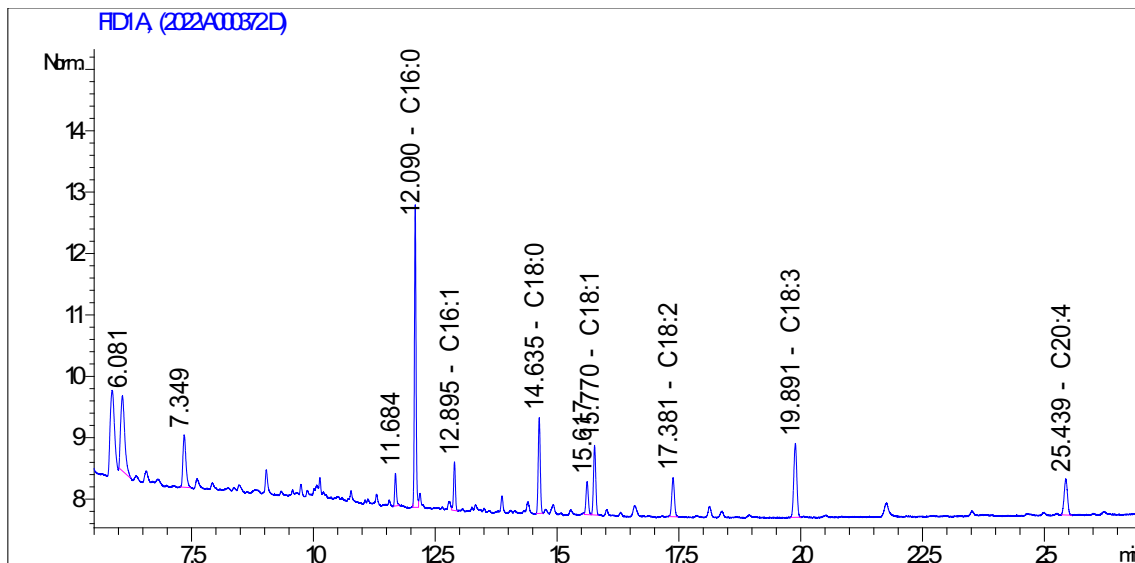
### 3.3. Análisis de ácidos grasos obtenidos a partir de *Nannochloropsis oculata*.

Los resultados del análisis de ácidos grasos para *Nannochloropsis oculata* extraída mediante solventes se observan en el cromatograma de la **Figura 4**, y el cromatograma de la extracción por fluidos supercríticos se observa en la **Figura 5**. Con los datos de los **Anexos 3.5 y 3.6**, se calcularon las

concentraciones de los ácidos grasos obtenidos a partir de los dos métodos extractivos, las cuales se presentan en la **Tabla 1**.



**Figura 4.** Cromatograma de *Nannochloropsis oculata* extraída por solventes.



**Figura 5.** Cromatograma de *Nannochloropsis oculata* extraída por fluidos supercríticos.

**Tabla 1.** Concentraciones de ácidos grasos obtenidos a partir de *Nannochloropsis oculata*.

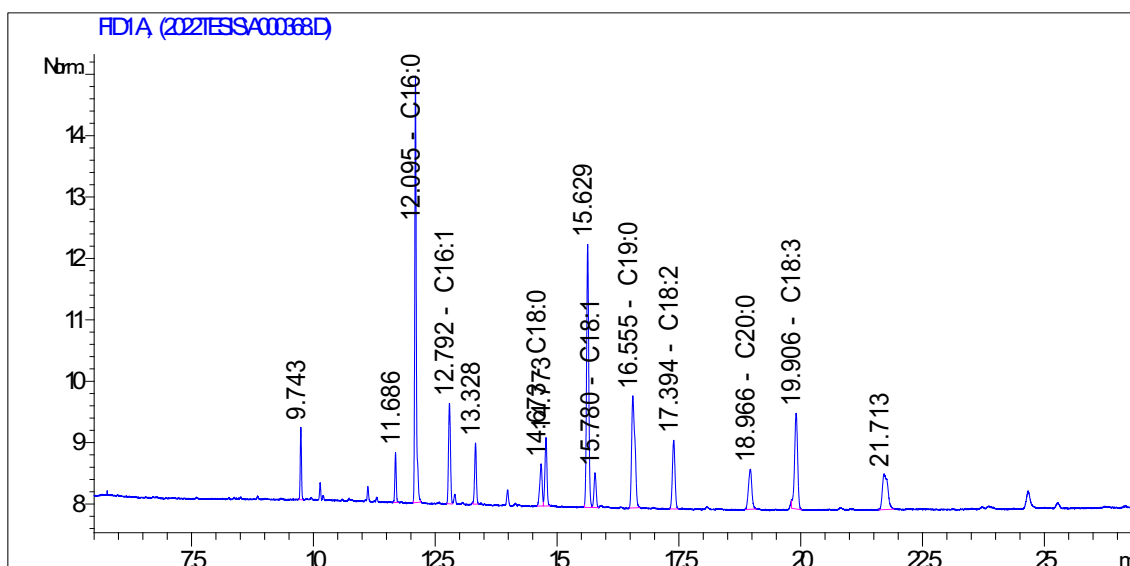
Ácidos grasos	Concentración (mg/mL)	
	Extracción por solventes	Extracción por fluidos supercríticos
Ácido palmítico C16:0	2,84	5,06
Ácido palmitoleico C16:1	-	0,42
Ácido esteárico C18:0	1,35	2,03
Ácido oleico C18:1	-	0,52
Ácido linoleico C18:2	-	1,88
Ácido linolénico C18:3	15,21	26,05
Ácido araquidónico C20:4	-	9,87

La microalga *Nannochloropsis oculata* contiene cantidades elevadas de ácidos grasos poliinsaturados. De acuerdo con Martínez y colaboradores (2017) esta microalga tiene como componentes lipídicos a los ácidos grasos mirístico C14:0, ácido pentadecanoico C15:0, ácido palmítico C16:0, ácido palmitoleico (C16:1n-7), ácido esteárico C18:0, ácido oleico C18:1, ácido linoleico C18:2, ácido linolénico C18:3, ácido eicosapentanoico C20:5, ácido araquidónico C20:4 y ácido docosahexaenoico (22:6n-3). Según Flores (2013) los ácidos grasos predominantes son el ácido palmítico C16:0, ácido palmitoleico (C16:1n-7) y ácido eicosapentanoico C20:5. De acuerdo con Tadeo-Sánchez y colaboradores (2014) *N. oculata* presenta grandes cantidades de PUFA's como el ácido oleico C18:1, ácido linoleico C18:2, el ácido linolénico C18:3 y ácido araquidónico C20:4. Comparativamente respecto a los resultados obtenidos, se evidenció que se encuentran presentes la mayor parte de ácidos grasos poliinsaturados citados previamente en la literatura, en los que se destaca la presencia de ácido palmítico C16:0, ácido palmitoleico C16:1, ácido esteárico C18:0, ácido oleico C18:1, ácido linoleico C18:2, ácido linolénico C18:3 y ácido araquidónico C20:4, presentando una mayor concentración el ácido linolénico C18:3, seguido del ácido araquidónico C20:4.

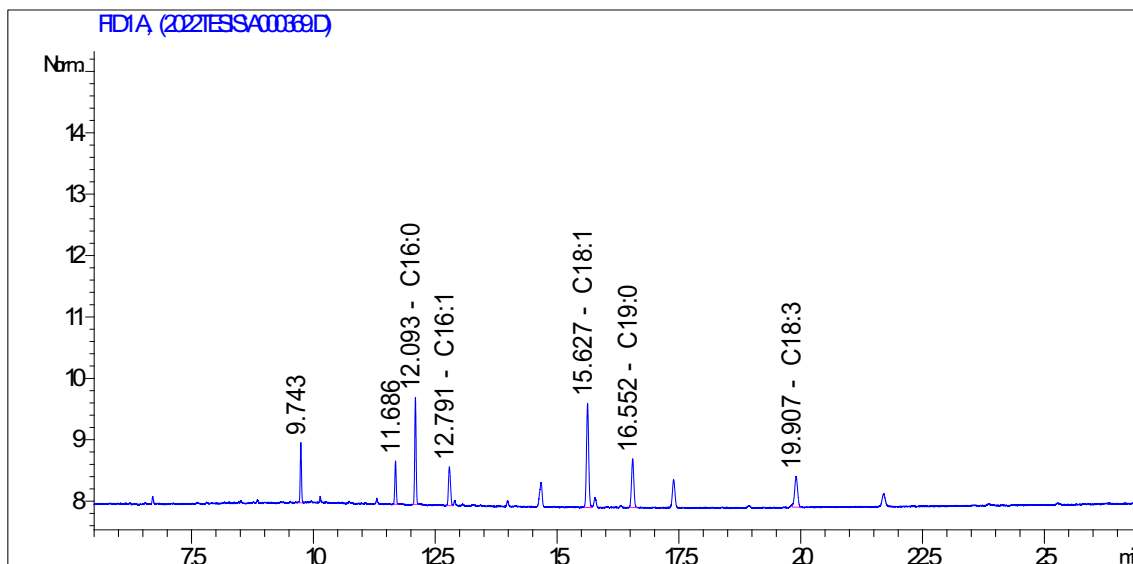
En este estudio se evidencia que en la muestra de la microalga *Nannochloropsis oculata* extraída mediante fluidos supercríticos, se obtuvo mayor cantidad y variedad de ácidos grasos poliinsaturados en comparación a la muestra de la microalga *Nannochloropsis oculata* extraída mediante solventes.

### 3.4. Análisis de ácidos grasos obtenidos a partir de *Tetraselmis suecica*.

Los resultados del análisis de ácidos grasos para *Tetraselmis suecica* extraída mediante solventes y fluidos supercríticos se observan en los cromatogramas de la **Figura 6**, y la **Figura 7** respectivamente. Con los datos de los **Anexos 3.7** y **3.8**, se calcularon las concentraciones de los ácidos grasos obtenidos a partir de los dos métodos extractivos, las cuales se presentan en la **Tabla 2**.



**Figura 6.** Cromatograma de *Tetraselmis suecica* extraída por solventes.



**Figura 7.** Cromatograma de *Tetraselmis suecica* extraída por fluidos supercríticos.

**Tabla 2.** Concentraciones de ácidos grasos obtenidos a partir de *Tetraselmis suecica*.

Ácidos grasos	Concentración (mg/mL)	
	Extracción por solventes	Extracción por fluidos supercríticos
Ácido palmítico C16:0	1,51	0,17
Ácido palmitoleico C16:1	0,41	0,08
Ácido esteárico C18:0	0,09	-
Ácido oleico C18:1	Valor negativo	0,27
Ácido linoleico C18:2	0,98	-
Ácido linolénico C18:3	7,02	2,36

De acuerdo con el estudio de Jiménez (2016) los principales ácidos grasos presentes en la microalga *Tetraselmis suecica* son el ácido palmítico C16:0, ácido esteárico C18:0, ácido oleico C18:1, ácido linolénico C18:3 y el ácido eicosapentanoico C20:5. Y según Soto-León y colaboradores (2014) al evaluar los perfiles lipídicos por medio de cromatografía de gases, se observó que la composición de ácidos grasos fue de: ácido palmítico C16:0, ácido esteárico C18:0, ácido oleico C18:1, ácido linoleico C18:2, ácido linolénico C18:3, de los

ácidos grasos poliinsaturados el que presentó una mayor concentración fue el ácido oleico C18:1, seguido del ácido linolénico C18:3. Comparativamente respecto a los resultados obtenidos, en la microalga *Tetraselmis suecica* se evidencia la presencia de ácido palmítico C16:0 ácido palmitoleico C16:1, ácido esteárico C18:0, ácido oleico C18:1, ácido linoleico C18:2 y ácido linolénico C18:3, los mismos que se encuentran descritos en la teoría concordando con que existe una mayor presencia de ácido linolénico en esta microalga y con la diferencia de que el ácido oleico se presenta en bajas cantidades en extracción por fluidos supercríticos, y en el caso de la extracción por solventes presenta un valor negativo ya que se encuentra fuera del límite de detección. Además, se observa la presencia de ácido araquídico C20:0, del cual no fue posible su cuantificación debido a que se carecía de la curva de calibración para este ácido graso.

En este estudio se observa que la muestra de la microalga *Tetraselmis suecica* extraída mediante fluidos supercríticos presenta menor cantidad y variedad de ácidos grasos poliinsaturados en comparación con la muestra de la microalga *Tetraselmis suecica* extraída mediante solventes.

Es importante recalcar que el contenido lipídico presente en las microalgas puede variar dependiendo de la especie y de las condiciones de cultivo. Los componentes lipídicos C16:0 y C18:0 pertenecen al grupo de ácidos grasos que se encuentran normalmente en las microalgas, independientemente de la especie y de las condiciones de cultivo de las mismas, por el contrario, la presencia de C18:1, C18:2 y C18:3 se encuentra en función de la especie y condiciones de crecimiento que se apliquen durante el cultivo como el pH, luz, agitación y temperatura entre los más estudiados (Amaro, Guedes & Malcata, 2011; Leal et al., 2017).

Al realizar la extracción por solventes se utilizó n-hexano con el cual es posible extraer más del 95% de los ácidos grasos presentes en la biomasa de acuerdo con Giraldo, Velásquez, & Cuartas (2010). En este caso no fue necesario realizar ninguna modificación a la técnica de extracción empleada en ninguna de las dos especies de microalgas.



En cuanto a la extracción mediante fluidos supercríticos se utilizó dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) debido a su baja temperatura crítica de 31°C y presión de 74 bar. Al comportarse el CO<sub>2</sub> como un solvente no polar, se requirió la adición de pequeñas cantidades de un disolvente orgánico polar, por lo que se utilizó etanol como co-solvente debido a que presenta una temperatura crítica de 240,75 °C y una presión de 61,40 bar de acuerdo con Villanueva-Bermejo y colaboradores (2017). La adición de este modificador o co-solvente provoca cambios en las propiedades del fluido supercrítico confiriendo cierta polaridad, lo que le permite aumentar su capacidad disolvente (Roman et al., 2016).

En la técnica planteada para la extracción por fluidos supercríticos, el objetivo fue alcanzar una presión de 180 bar, ya que como indica Reyes (2018) la presión del fluido es el principal parámetro que repercute en la recuperación de la extracción. Un aumento de esta presión a una temperatura determinada da como resultado una elevación en la densidad del fluido, lo que representa una mejor solubilidad de los solutos. Como resultado, a mayor presión de extracción, menor es el volumen de fluido requerido para una extracción. Fue necesario realizar modificaciones en las condiciones técnicas aplicadas para obtener el extracto lipofílico en cada especie de microalga trabajada, por lo cual en la microalga *Tetraselmis suecica*, se utilizó una presión de 175 bar, mientras que para la microalga *Nannochloropsis oculata*, se utilizó a una presión de 150 bar, además se requirió un aumento en la cantidad de cosolvente del 10%, debido a que la estructura que presentó esta microalga liofilizada se caracterizó por ser de un tamaño considerable, además de ser altamente porosa lo cual provocó que la cantidad de co-solvente planteada al inicio de la técnica del 5% no sea suficiente.

Por otra parte, en el caso de la microalga *Tetraselmis suecica* debido a características propias de su estructura esta se encontraba como un polvo muy fino luego de ser liofilizada, presentando modificaciones en la forma de la partícula, lo que pudo elevar la resistencia interna de transferencia de masa. Como indica Pereira y Meireles (2010), existen varios factores que influyen en la transferencia de masa del proceso de extracción como son el tamaño de partícula, forma y porosidad de la muestra, provocando la canalización dentro

del lecho de la extracción, reduciendo la tasa de extracción a falta de homogeneidad en fluidos supercríticos. Por ello, con la finalidad de aumentar la eficiencia de extracción, se debe triturar la matriz sólida para incrementar el área de contacto y en consecuencia la transferencia de masa, pero se debe evitar el uso de partículas demasiado pequeñas.

Otra variable que se debe considerar al emplear fluidos supercríticos es el tipo de extracción. Según Román y colaboradores (2016) se suele pensar que la extracción dinámica presenta mejores y más cortas recuperaciones, ya que durante el proceso se da una continua renovación que ingresa en contacto con la muestra, lo que dificulta que el fluido llegue a saturarse. En cambio, la extracción estática facilita la penetración del fluido en los poros de la muestra, alcanzando el equilibrio de reparto del analito entre la matriz y el fluido. Por esta razón la técnica de extracción estática es la más empleada actualmente, seguida por una extracción dinámica corta, donde se recolecta el compuesto de interés. Por ello en este caso se utilizó una combinación de extracción dinámico-estático-dinámico, para alcanzar así un mayor porcentaje de extracción.

El método de fluidos supercríticos ha ganado gran interés en años recientes, debido a ciertas ventajas que posee, una de las principales es que es un procedimiento amigable con el medio ambiente debido a que no usa sustancias tóxicas y en caso de hacerlo, en pequeñas cantidades, al igual que no requiere realizar procesos adicionales de separación, y puesto a que trabaja con fluidos supercríticos es posible ajustar el poder de solvatación del mismo manipulando algunas variables permitiendo de esta manera realizar extracciones selectivas, rápidas y eficientes en las que se obtiene un extracto estable y uniforme (Bishr et al., 2017; Favareto et al., 2017). Estudios recientes muestran que esta tecnología es atractiva en procesos convencionales, para obtener aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados y con un contenido reducido de contaminantes (Bonilla-Méndez, & Hoyos-Concha, 2018).

Otras ventajas que presentan los fluidos supercríticos es que son buenos disolventes debido a su capacidad para disolver sustancias de forma similar a los disolventes orgánicos, y a que su viscosidad y coeficiente de difusión se

encuentran próximos a los de los gases, facilitan así las propiedades de transporte de estos fluidos, mejoran la transferencia de masa y reducen el tiempo de extracción. Al ser la tensión superficial de los fluidos supercríticos igual a cero, estos son particularmente adecuados para la extracción de sustancias contenidas en matrices sólidas. Al usar una temperatura moderada, ambiente libre de oxígeno y extracción de lípidos de baja polaridad, evita la extracción de impurezas. Por otra parte, el disolvente se recupera y recircula fácilmente; por ello, la extracción supercrítica se puede considerar un proceso altamente sostenible e intensivo, además los extractos obtenidos presentan un aroma y sabor más natural (Rubio et al., 2010; Vilca, 2019). Por el contrario, el uso de solventes como el n-hexano genera grandes cantidades de solvente residual, es destructivo para el medio ambiente e implica un alto consumo de tiempo (Adeoti & Hawboldt, 2014).

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. Conclusiones

El presente estudio tuvo como objetivo establecer el método de extracción idóneo para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) a partir de cultivos de microalgas de las cepas *Nannochloropsis oculata* y *Tetraselmis suecica*. Específicamente, se evaluaron los métodos extractivos por solventes y fluidos supercríticos determinando el más óptimo de acuerdo a la cantidad y variedad de PUFA's presentes en cada caso.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo se evidenció que el método de extracción con el que se obtiene mayor variedad y concentración de PUFA's es fluidos supercríticos en cuanto a la microalga *Nannochloropsis oculata*, mientras que para *Tetraselmis suecica* se observa mayor eficacia en la extracción por solventes con n-hexano 100%.

En base a la experimentación realizada no podemos concluir cual es el método de extracción idóneo para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados, debido a que se trabajó en diferentes condiciones de acuerdo a la especie de microalga, considerando las diferencias en la estructura, composición de la pared celular y condiciones técnicas aplicadas en cada método.

### 4.2. Recomendaciones

- Continuar con la investigación científica de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) en diferentes especies de microalgas, considerando la biodiversidad de microalgas existentes.
- Optimizar la metodología de extracción por fluidos supercríticos para mejorar la efectividad en el proceso extractivo.

## REFERENCIAS

- Adeoti, I. A., & Hawboldt, K. (2014). A review of lipid extraction from fish processing by-product for use as a biofuel. *Biomass and Bioenergy*, 63, 330-340. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.02.011.
- Akoh, C.C. (2017). *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 4th ed. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315151854>
- Agilent Technologies (2022, Agosto 12). *Fundamentos de la cromatografía de gases: hardware*. Agilent Technologies. <http://agilent.com/cs/...20t%C3%A9mica%20adecuadas>.
- Amaro, H.M., Guedes, A.C. & Malcata, F.X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy* 88, 3402- 3410
- Andrade-Castañeda, H., Arteaga-Céspedes, C., & Segura-Madriral, M. (2017). Emisión de gases de efecto invernadero por uso de combustibles fósiles en Ibagué, Tolima (Colombia). *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*. 18(1):103-112. DOI: [http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18\\_num1\\_art:561](http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:561)
- Benenaula, T.V. (2021). Comparación de eficiencia en los métodos de fraccionamiento para microalgas y/o cianobacterias a través de la evaluación de la actividad antioxidante. Cuenca- Ecuador: *Universidad de Cuenca- Facultad de Ciencias Químicas*.
- Benjamin, O., Moses, A., Ogidi, C. O., & Akinyele, B. J. (2019). Bioactivity of Citrus essential oils (CEOs) against microorganisms associated with spoilage of some fruits. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 5, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0160-5>.
- Bishr, M., El-Degwy, M., Abdel-Hady, M., Amin, M., & Salama, O. (2017). Supercritical fluid extraction of  $\gamma$ -Pyrone from *Ammi visnaga* L. fruits. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1):57–62. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.09.001>
- Bonilla-Méndez, J.R., & Hoyos-Concha, J.L. (2018). Métodos de extracción, refinación y concentración de aceite de pescado como fuente de ácidos grasos omega-3. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, 19(3): 621-644 [https://doi.org/10.21930/rcta.vol19\\_num2\\_art:684](https://doi.org/10.21930/rcta.vol19_num2_art:684)

- Brunner, G. (2013). *Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes*. (Vol.4). Springer Science & Business Media.
- Carrión, A., García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica. Cuenca – Ecuador: *Universidad de Cuenca- Facultad de Ciencias Químicas*.
- Castillo, O., Torres-Badajoz, S., Núñez-Colín, C., Peña-Caballero, V., Rodríguez-Núñez J. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas Biodiesel production from microalgae: progress and biotechnological prospects. 27(3):337-352. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-88972017000300337](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972017000300337)
- Cerón, M. (2013). Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. *Cuadernos de estudios agroalimentarios*, pp. 87-105.
- Corrêa, P. S., Morais Júnior, W. G., Martins, A. A., Caetano, N. S., & Mata, T. M. (2020). Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. *Processes*, 9(1):10. <https://doi.org/10.3390/pr9010010>
- Cortés-Sánchez, M., Gata-Montero, E., Pipió-Ternero, A., Rodríguez-Rivas, A., & Sánchez-Santos, J. (2019). Biocombustibles: tipos y estrategias de producción. *Universidad Pablo de Olavide*. ISSN-e 2173-0903
- Dragone, G., Fernandes, B., Teixeira, J.A. (2010). Third Generation Biofuels from Microalgae, Current Research, *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, pp. 1355-1366.
- Favareto, R., Teixeira, M. B., Soares, F. A. L., Belisário, C. M., Corazza, M. L., & Cardozo-Filho, L. (2017). Study of the supercritical extraction of Pterodon fruits (Fabaceae). *Journal of Supercritical Fluids*, 128, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.028>
- Fernandez, J. M. (2014). Cultivo de microalgas. En ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas (pág. 1-2). *Sevilla: Universidad de Almería*. Obtenido de: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-2-cultivo-de-microalgas.html>
- Flores, L. (2013). Validación del método analítico para la cuantificación de ácidos grasos en biomasa de la microalga *Nannochloropsis sp.* *Lima-Perú. Universidad Nacional de Ingeniería*.

- Fuentes, P. (2019). Determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases para la diferenciación de nueces (*Juglans Regia*) según su origen. *Cádiz-España. Universidad de Cádiz*.
- Giraldo, H., Velásquez, J.A., Cuartas, P. (2010). Extracción con solventes y purificación de aceite a partir de semillas de *Jatropha curcas*. *Revista Investigaciones Aplicadas* ISSN 2011-0413 Medellín - Colombia Vol. 4, No.2 pp.77-86.
- Guía Metabólica. (07 de Octubre de 2014). Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). *Hospital Sant Joan de Barcelona*. Obtenido de: <https://metabolicas.sjdhospitalbarcelona.org/noticia/acidos-grasos-poliinsaturados-pufas#:~:text=Los%20PUFAs%20son%20compuestos%20org%C3%A1nicos,ingl%C3%A9s%20Poly%2DUnsaturated%20Fatty%20Acids>.
- Hernández-Pérez, A., Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía* 49, n.o 2: 157-173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Ho, S., Huang, W., Chen, T., Hasunuma, A., Kondo, J., & Chang, J. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 191–198.
- Jiménez, S. (2016). Aislamiento y caracterización bioquímica de microalgas de Baja California como alternativas para la producción de lípidos. *Baja California-México: CISESE*.
- Lam, G. (2017). *Harvesting and Cell Disruption of microalgae* (pp. 10–25) [Tesis de Doctorado]. <https://edepot.wur.nl/412263>
- Leal, G., Abril, J., Martínez, S., Muñoz, Y., Peñaranda, E., Urbina, N. (2017). Producción de Ácidos Grasos Poliinsaturados a partir de Biomasa Microalgal en un Cultivo Heterotrófico. *Rev.ion.* 30(1):91-103.
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y.K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244(45), 1317–1328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Lewandowski, I., Lippe, M., Montoya, J., Dickhöfer, U., Langenberger, G., Pucher, J., Lippert, C. (2018). Primary Production. *In Bioeconomy* (pp. 97–178). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68152-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68152-8_6)



- López, B., Cárdenas, D., & Quintero, J. (2014). Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la alimentación del lactante: cuantificación de éstos en algunas fórmulas lácteas para bebés de 0 a 6 meses, comercializadas en la ciudad de Medellín, 2012. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 32(3): 322-331.
- López, A. (2017). Potencial de Cepas de Microalgas Aisladas de la Costa de Yucatán para la Producción de Biodiesel. Mérida-Yucatán: Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- López-García, L., Vega-Merino, R., Sánchez-Belloso, A. (2012). Extracción con fluidos supercríticos. *Reduca*. 4;10: 142. <http://www.revistareduca.es/index.php/reduca/article/view/1210/1223>
- Martínez, M., Sánchez, R., Meza, E., Ulloa, R., & Saldívar, J. (2017). Síntesis de lípidos de la microalga *Nannochloropsis oculata* para su uso potencial en la producción de biodiésel. *Rev. Int. Contam. Ambie.* (33): 85-91.
- Montes, O. G. (2014). Efecto de la intensidad de la luz y de la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga *Nannochloropsis* sp., cultivada en un biorreactor plano. Ensenada, Baja California, México: CICESE.
- Mora-Barrantes, J., Morera-Ramos, L., Ulate-Salas, M., Núñez-Agüero, V., Acuña-Salazar, E., Cordero-Carvajal, M. (2021). Clasificación del riesgo químico de solventes orgánicos mediante la aplicación del método "CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents". Un caso de estudio en cursos de docencia universitaria de química orgánica y bioquímica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 35-1. Pág. 28-43.
- Narváez, D.E., Quito, N.Y. (2015). Estandarización del método para alcoholes por cromatografía de gases. Cuenca-Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Osorio, K., Palacios, K., Lumbi-Ortega, D., Hsieh, P., & Zuniga-González, C. (2020). Capacidad reproductiva de *Nannochloropsis oculata* en diferentes concentraciones de salinidad y fertilizante: Una contribución a la Bioeconomía acuícola. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático*, vol. 6, núm. 12.
- Osuna, E. N. (2015). Efecto de la microalga *Tetraselmis suecica* en el desarrollo del tracto digestivo crecimiento de larvas del pargo lunajero (*Lutjanus*

guttatus). La Paz: Instituto Politécnico Nacional- Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

Ottes, R. (2012). Actividad antiproliferativa de los extractos de lípidos de microalgas marinas en células de melanoma: participación de omega-3 y/o omega-6. *Porto Alegre-Brasil. Universidad Federal de Río Grande del Sur*.

Pereira, C. G., & Meireles, M. A. A. (2010). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 340-372.

Reyes, J. (2018). Extracción con fluidos supercríticos: aplicaciones de interés farmacéutico. *Sevilla- España: Universidad de Sevilla*.

Rodríguez, A. P. (2017). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. *Cuenca- Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana*.

Roman, M., Rivera, C., Cardona, L., Muñoz, L., Gómez, D., Passaro, C., & Quiceno, J. (2016). Guía de extracción por fluidos supercríticos: Fundamentos y Aplicaciones. Rionegro-Antioquia. *SENNOVA*

Romero, D. (2020). Estudio de la extracción a alta presión de activos de piel de limón y su posible uso en la impregnación de CO<sub>2</sub> supercrítico en la obtención de envases activos para su uso alimentario. *Universidad de Cádiz. Facultad de Ciencias*.

Rubio, N., Beltrán, S., Jaime, I., Diego, S. M., Sanz, M. T., & Carballido, J. R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1), 1-12. doi:10.1016/j.ifset.2009.10.006.

Ruvira-Quintana, B. (2016). Estudio del efecto de la aplicación de ultrasonidos sobre la biodegradabilidad anaerobia de diferentes especies de microalgas. Valencia – España: Universidad Politécnica de Valencia.

Saifullah, A., Karim, A., & Ahmad-yazid, A. (2014). Microalgae: An Alternative Source of Renewable Energy. *Am. J. Eng. Res.*, 3(3):330–338.

Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F., Marchettini, N., & Bastianoni, S. (2016). Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels, *Renew. Sustain. Energy Rev*, vol 66. pp. 221–227.

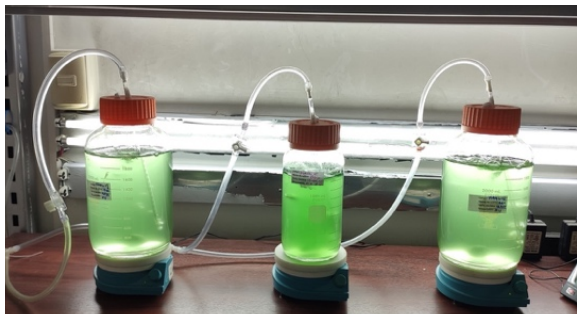
- Salazar, L. E. (2012). Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel. Piura: Universidad de Piura.
- Sánchez, D. S. (2021). Influencia de la deficiencia de nutrientes (C, N, P) en la remoción de diclofenaco por las microalgas *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii* CC137 y CC1731 [Tesis de pregrado]. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/7380/Tesis.FCQ.2021.Influencia.S%C3%A1nchez.PDF%20%28Versi%C3%B3n%20p%C3%ABblica%29.pdf?sequence=1&isAllowed=>
- Santos, A., González-Arechavala, Y., & Martín-Sastre, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales de mecánica y electricidad*, pp 20-28.
- Sevilla, J. M. (2014). Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas. Obtenido de Microalgal Biotechnology Corporation: <http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html>
- Serna, F., Barrera, L., & Montiel, H. (2011). Impacto Social y Económico en el Uso de Biocombustibles *Technol. Manag Innov.* 6(1) ISSN: 0718-2724.
- Show, K.Y., Lee, D.J., Tay, J.H. Lee, T.M., & Chang, J.S. (2015). Microalgal drying and cell disruption. *Bioresource Technology.* 184: 258-266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.139>
- Singh, J., & Saxena, R. C. (2015). An introduction to microalgae: Diversity and significance. *Handbook of marine microalgae* (2): 11-24. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9>
- Soto-León, S., Zazueta-Patrón, I.E., Piña-Valdez, P., Nieves-Soto, M., Reyes-Moreno, C., & Contreras-Andrade, I. (2014). Extracción de lípidos de tetraselmis suecica: proceso asistido por ultrasonido y solventes. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 13(3):723-737
- Swanson, D., Block, R., Mousa, S. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. *Adv Nutr.* (3): 1-7.
- Tadeo-Sánchez, L., Puentes-Cárdenas, I., Flores-Ortiz, C., Sánchez-García, D., Pineda-Camacho, G., Cristiani-Urbina, E. (2014). Producción de biodiésel por *Nannochloropsis* sp. bajo diferentes condiciones ambientales. 16, n.º 3: 276-298. <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543739009.pdf>

- Tituaña, G. (2013). Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales cultivadas por la asociación flor de campo en la estancia y mushukwiñary en tambalo de pasa, para promover su desarrollo. Ambato-Ecuador: *Universidad Técnica de Ambato*.
- Ulloa, R. (2011). Inducción de productos bioactivos en la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Ingeniería Química.
- Universidad de Cuenca. (2019). *Procedimiento Normalizado de Trabajo de Obtención de extractos de microalgas (OG 002)*.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J., & Valenzuela, R. (2015). Las microalgas: una fuente renovable para la obtención de ácidos grasos omega-3 de cadena larga para la nutrición humana y animal. *Rev. chil. nutr.* 42(3). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000300013>
- Valenzuela, R., Tapia, G., González, M., & Valenzuela, A. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Rev. Chil. Nutr. Vol. 38(3): 356-367*. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182011000300011>
- Vega, F. (2019). Uso de microalgas (*Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.) Inmovilizadas con esferas de alginato para la remoción de cromo. Ibarra: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Vilca, Y.I. (2019). Estudio de las condiciones óptimas de extracción mediante fluido supercrítico del extracto de las hojas de chiriyuyo (*Kalanchoe pinnata*). Quito: Universidad central del Ecuador. Facultad de Ingeniería Química.
- Villanueva-Bermejo, D., Zahran, F., García-Risco, M. R., Reglero, G., & Fornari, T. (2017). Supercritical fluid extraction of Bulgarian *Achillea millefolium*. *Journal of Supercritical Fluids*, 119, 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.10>

## ANEXOS

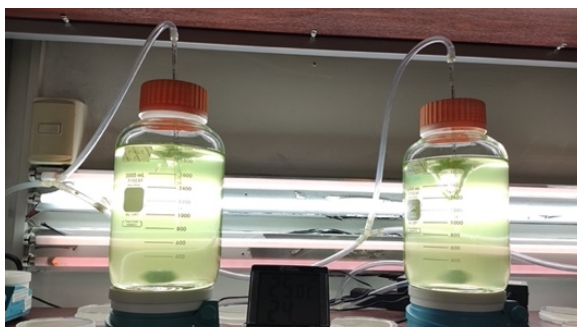
### ANEXO 1. Fotos y tablas de la Etapa I o Fase de cultivo

#### Anexo 1.1. Foto del cultivo de la microalga *Nannochloropsis oculata*



Fuente: Autoras

#### Anexo 1.2. Foto del cultivo de la microalga *Tetraselmis suecica*.



Fuente: Autoras

#### Anexo 1.3. Composición y preparación del medio BG11.

Componentes	Solución Stock
NaNO <sub>3</sub>	75 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40 g/L
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	75 g/L
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	36 g/L
Ácido cítrico monohidratado	6 g/L
Citrato amónico-férrico	0.6 g/L
Na <sub>2</sub> EDTA • 2H <sub>2</sub> O	0.1 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	2 g/L
Agua destilada	c.s.p.
Solución traza de metales	<b>Ver anexo 1.4</b>

Fuente: Autoras

**Anexo 1.4.** Preparación de solución stock de traza de metales para el medio BG11.

Componentes	Solución Stock
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g/L
MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	1.81 g/L
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.22 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.39 g/L
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0.08 g/L
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.05 g/L
Agua destilada	c.s.p. 950 mL

**Fuente:** Autoras

**Anexo 1.5.** Composición y preparación del medio WC.

Componentes	Solución Stock
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	10 g/L
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	22 g/L
CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	10 g/L
MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	180 g/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	6 g/L
Agua destilada	c.s.p.
Solución traza de metales	<b>Ver anexo 1.6</b>
Solución de vitaminas	<b>Ver anexo 1.7</b>

**Fuente:** Autoras

**Anexo 1.6.** Preparación de solución stock de traza de metales para el medio WC.

Componentes	Solución Stock
Na <sub>2</sub> EDTA • 2H <sub>2</sub> O	4.36 g/L
FeCl <sub>3</sub> • 2H <sub>2</sub> O	3.15 g/L
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	1 mL
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	1 mL
CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	1 mL
MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	1 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	1 mL

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 mL
Agua destilada	c.s.p. 950 mL

**Fuente:** Autoras

**Anexo 1.7.** Solución stock de vitaminas para el medio WC.

Componentes	Solución Stock
Biotina (Vitamina B7)	0.5 g/L
Cianocobalamina	0.5 g/L
Agua destilada	c.s.p.

**Fuente:** Autoras

**Anexo 1.8.** Fotos de la congelación y liofilización de la biomasa microalgal.



**Fuente:** Autoras

**ANEXO 2.** Fotos de la Etapa II o Fase de extracción.

**Anexo 2.1.** Fotos de la extracción mediante solvente químico con baño de ultrasonido.



**Fuente:** Autoras

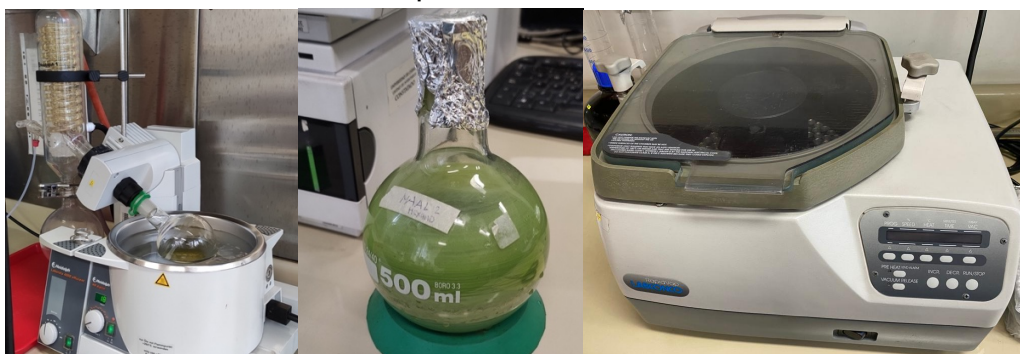
**Anexo 2.2.** Equipo para extracción mediante fluidos supercríticos.





**Fuente:** Autoras

**Anexo 2.3.** Fotos del rotavapor, extracto concentrado y concentrador al vacío para concentración de extractos por solventes.



**Fuente:** Autoras

**Anexo 2.4.** Concentración de los extractos por fluidos supercríticos con nitrógeno gaseoso.



**Fuente:** Autoras

**ANEXO 3.** Fotos de la Etapa III o Evaluación de los métodos de extracción.

**Anexo 3.1.** Fotos de la derivatización por metilación de los extractos.



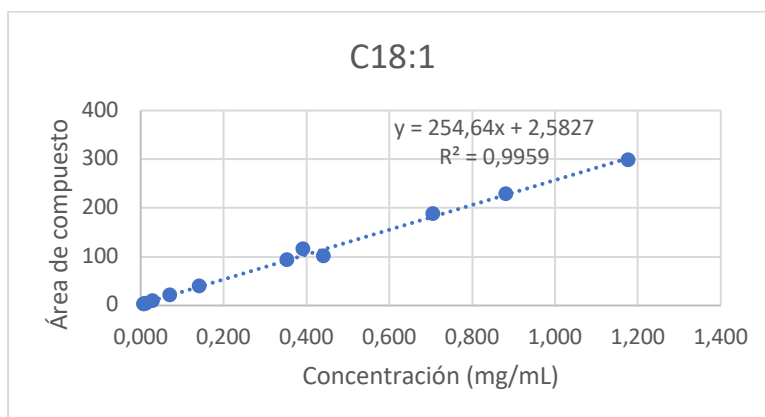
**Fuente:** Autoras

**Anexo 3.2.** Foto del equipo de cromatografía de gases.



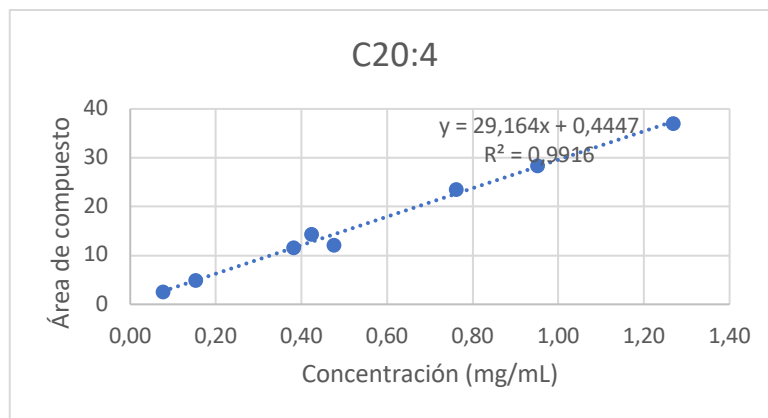
**Fuente:** Autoras

**Anexo 3.3.** Curva de calibración del estándar del Ácido oleico C18:1.



**Fuente:** Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca.

**Anexo 3.4.** Curva de calibración del estándar del Ácido araquidónico C20:4



**Fuente:** Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca.

**Anexo 3.5.** Resultados obtenidos por cromatografía para *Nannochloropsis oculata* extraída por solventes.

Pico	Tiempo de retención (TR)	Área bajo la curva
1	6,08904505	24,4196415
2	6,57695723	2,88142538
3	7,35449982	2,88984632
4	12,0916691	6,98571348
5	14,6384296	3,58674645
6	19,8970795	3,24537587

**Anexo 3.6.** Resultados obtenidos por cromatografía para *Nannochloropsis oculata* extraída por fluidos supercríticos.

Pico	Tiempo de retención (TR)	Área bajo la curva
1	6,08148289	7,1420126
2	7,34891701	3,64638948
3	11,6841831	1,31487656
4	12,0898314	10,9339085
5	12,8953075	1,88372564
6	14,634716	4,54987335
7	15,6174192	1,74880719
8	15,7703323	3,64864993
9	17,3814297	2,38797474

10	19,891016	5,24444056
11	25,4391174	2,71365047

**Anexo 3.7.** Resultados obtenidos en el cromatograma para *Tetraselmis suecica* extraída por solventes.

Pico	Tiempo de retención (TR)	Área bajo la curva
1	9,74272346	2,08803105
2	11,6855268	1,58366394
3	12,0948248	15,3548346
4	12,7922287	4,53527212
5	13,3275042	2,49341655
6	14,6732426	2,32080126
7	14,7731161	3,2165277
8	15,6287241	13,3629007
9	15,7797775	1,74388981
10	16,555191	8,67319107
11	17,3940125	4,17732859
12	18,9657516	3,1855886
13	19,9061108	6,90876865
14	21,7130737	4,43360472

**Anexo 3.8.** Resultados obtenidos en el cromatograma para *Tetraselmis suecica* extraída por fluidos supercríticos.

Pico	Tiempo de retención (TR)	Área bajo la curva
1	9,74271584	1,73333633
2	11,6855755	1,39992797
3	12,0934801	3,49249387
4	12,7905159	1,83312082
5	15,6269083	5,33659887
6	16,5519485	2,60980344
7	19,906908	2,13230038