

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Eficiencia de extracción y caracterización de ácidos grasos poliinsaturados en
Chlorella vulgaris, cultivada a escala de laboratorio**

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

Autores:

María de los Ángeles Martínez Vire

Natalia Estefanía Urgilés Castro

Director:

Fabián León Tamariz

ORCID:  0000-0003-1540-8087

Cuenca, Ecuador

2023-10-05

Resumen

Frente al crecimiento poblacional y el cambio climático se prevé una posible disminución en la cantidad y valor nutricional en alimentos animales y vegetales. Las microalgas representan una alternativa suplementaria que puede satisfacer las necesidades nutricionales de la población. La ventaja de su empleo radica en la producción de compuestos de alto valor que el cuerpo no es capaz de sintetizar, como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) que contribuyen al bienestar corporal. El objetivo de este proyecto evalúa el perfil de ácidos grasos, especialmente los poliinsaturados producidos por cultivos de *Chlorella vulgaris* provenientes de laboratorio frente a una cepa comercial de *Chlorella sp.*, además compara la eficiencia de metodologías pre-extractivas. Posterior al cultivo de estos microorganismos se utilizaron técnicas como liofilización, micronización y fluidos supercríticos (SCF) empleando CO₂ como solvente y etanol como cosolvente para la obtención de extractos; en la detección de PUFA's se empleó cromatografía de gases con detector de ionización a la llama. Se comprobó que la micronización es una técnica eficiente que permite optimizar los procesos extractivos obteniéndose un perfil de ácidos grasos comparable en cuanto a composición en todas las muestras. En relación con la cantidad de PUFA's, específicamente ácido linoleico (omega-6) y ácido linolénico (omega-3), la muestra comercial presentó mayor concentración que la cultivada; sin embargo, al desconocer su método de cultivo y la variedad de especies presentes no se puede asegurar que sus características nutricionales sean mejores que la cultivada a escala de laboratorio.

Palabras clave: Chlorella vulgaris, PUFAs, micronización, fluidos supercríticos, cromatografía de gases



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Given population growth and climate change, a possible decrease in the quantity and nutritional value of animal and plant-based foods is probable. Microalgae represent a supplementary alternative capable of meeting the nutritional needs of the population. The advantage of their utilization lies in the production of high-value compounds that the body is incapable of synthesizing, such as polyunsaturated fatty acids (PUFAs) that contribute to bodily well-being. The objective of this project assesses the fatty acid profile, especially polyunsaturated fatty acids, produced by laboratory-cultivated *Chlorella vulgaris* cultures compared to a commercial strain of *Chlorella* sp. It also compares the efficiency of pre-extraction methodologies. Following the cultivation of these microorganisms, techniques such as freeze-drying, micronization, and supercritical fluids (SCF) using CO₂ as a solvent and ethanol as a cosolvent were employed to obtain extracts. Gas chromatography with flame ionization detection was used for the detection of PUFAs. It was demonstrated that micronization is an efficient technique that allows for the optimization of extraction processes, resulting in a comparable fatty acid profile in all samples. In terms of the quantity of PUFAs, specifically linoleic acid (omega-6) and linolenic acid (omega-3), the commercial sample exhibited a higher concentration than the laboratory-cultivated one. However, due to the unknown cultivation method and the variety of species present, it cannot be guaranteed that its nutritional characteristics are superior to the laboratory-cultivated sample on a larger scale.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, PUFAs, micronization, supercritical fluids, gas chromatography



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Dedicatoria.....	8
Introducción	9
Capítulo I	11
1. Marco Teórico.....	11
1.1. Generalidades de las microalgas.....	11
1.2. Especie de interés: <i>Chlorella vulgaris</i>	11
1.3. Cultivo de microalgas	13
1.3.1. Tipos de medios de cultivo	15
1.4. Tratamientos Pre-extractivos.....	15
1.4.1. Liofilización	16
1.4.2. Micronización.....	16
1.5. Compuestos de interés: ácidos grasos poliinsaturados (PUFA´s).....	16
1.5.1. Origen o síntesis en microalgas.....	16
1.5.2. Funciones orgánicas en seres humanos.....	18
1.5.3. Beneficios fisiológicos y aplicaciones.....	18
1.6. Técnicas de extracción a partir de biomasa de microalgas.....	18
1.6.1. Fluidos supercríticos	18
1.6.2. Maceración	19
1.6.3. Ultrasonido	20
1.6.4. Extracción por solventes	20
1.7. Métodos analíticos de cuantificación	20
1.7.1. Cuantificación de PUFA´s por GC-FID.....	20
1.7.1.1. Derivatización de ácidos grasos.....	20
1.7.1.2. Cromatografía de Gases-Detección de Ionización a la Llama (GC-FID)	21
Capítulo II	22
2. Materiales y métodos.....	22
2.1. Materiales y reactivos.....	22
2.2. Equipos	22
2.3. Métodos.....	23

2.3.1. Etapa I: Etapa de cultivo.....	23
2.3.1.1. Cultivo de microalga	23
2.3.1.2. Obtención de biomasa	25
2.3.1.3. Micronización de biomasa.....	25
2.3.1.4. Liofilización de biomasa.....	26
2.3.2. Etapa II: Etapa de extracción.....	27
2.3.2.1. Fluidos Supercríticos	27
2.3.3. Etapa III: Etapa de determinación de ácidos grasos poliinsaturados.....	29
2.3.3.1. Derivatización de ácidos grasos poliinsaturados.....	29
2.3.3.2. Cromatografía de Gases con Detector de Ionización a la Llama	29
2.3.3.3. Cuantificación de ácidos grasos presentes en la muestra	30
Capítulo III	33
3. Resultados y Discusión	33
Capítulo IV	39
4. Conclusiones y Recomendaciones	39
4.1. Conclusiones	39
4.2. Recomendaciones	39
Referencias.....	40

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> observada al microscopio	12
Figura 2. Cepario de microalgas con condiciones controladas de luz, temperaturas y pH.....	13
Figura 3. Cultivo de microalgas en sistema cerrado (fotobiorreactor del tipo placa plana y tubular)	14
Figura 4. Esquematización de la síntesis de lípidos por microalgas	17
Figura 5. Esquema de trabajo para el procesamiento de las muestras A, B, C y D.....	23
Figura 6. Cultivos de la microalga de especie <i>Chlorella vulgaris</i>	24
Figura 7. Micronización para ruptura de la pared celular.....	26
Figura 8. Proceso de liofilización.....	27
Figura 9. Equipo de extracción de compuestos bioactivos por medio de fluidos supercríticos, específicamente CO ₂	28
Figura 10. Concentración de los extractos a través de nitrógeno gaseoso	28
Figura 11. Cromatógrafo de gases acoplado a un detector con ionización a la llama	29
Figura 12. Curva de calibración del estándar del ácido graso C 18:2 (ácido linoleico)	31
Figura 13. Cromatograma correspondiente a la muestra D (reconstituida y micronizada)	38
Figura 14. Microalga <i>Chlorella sp.</i> , de origen comercial, observada al microscopio con lente 40x	38

Índice de tablas

Tabla 1. Preparación del medio de cultivo WC modificado.....	24
Tabla 2. Patrones empleados para la identificación de ácidos grasos en <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Chlorella sp</i>	30
Tabla 3. Datos obtenidos del cromatograma para la muestra A	33
Tabla 4. Datos obtenidos del cromatograma para la muestra B	34
Tabla 5. Datos obtenidos del cromatograma para la muestra C	34
Tabla 6. Datos obtenidos del cromatograma para la muestra D	35
Tabla 7. Resultados obtenidos de la concentración de cada uno de los ácidos grasos identificados y cuantificados mediante GC-FID	37

Dedicatoria

A la Universidad de Cuenca por la formación académica que nos provee como estudiantes de la Carrera de Bioquímica y Farmacia, otorgándonos las herramientas necesarias para nuestro desarrollo profesional.

A nuestro Tutor el Dr. Fabián León Tamariz, por brindarnos toda su ayuda, tiempo, dedicación, y por compartirnos su conocimiento científico para la resolución de problemas durante el desarrollo de este proyecto.

A la BQF. Jessica Calle López, nuestra asesora, por haber estado presente todo el tiempo brindándonos su cariño, apoyo y motivación; y por permitirnos recurrir a su capacidad científica.

A los docentes que nos dedicaron su tiempo y paciencia durante este periodo.

A nuestros amigos más cercanos, por motivarnos durante todo el trayecto universitario y por ofrecernos su ayuda cuando lo necesitamos.

A nuestros padres, por su amor incondicional y su gran apoyo durante todo nuestro desarrollo académico dándonos palabras de aliento y motivándonos a ser perseverantes para llegar hasta donde estamos hoy.

Con amor, María y Natalia.

Introducción

De acuerdo con la FAO (2022), el importante aumento de la población en zonas de desarrollo y la disminución de la productividad agrícola han provocado un cambio drástico en la forma como se producen, distribuyen y consumen los alimentos, haciendo que el mundo deba buscar nuevas formas de abordar la seguridad alimentaria. Se prevé que para el año 2050, la población aumentará en más de un tercio, por ende, se requiere aumentar la producción de alimentos mediante diversos mecanismos para asegurar su cantidad y calidad nutricional.

Otro de los factores relacionados con la inseguridad alimentaria es el cambio climático. Esto ha provocado que los ecosistemas marinos y terrestres se vean alterados, afectando la producción, el valor nutricional de los alimentos y la concentración de sus componentes. Asimismo, la sobreexplotación de fuentes de origen animal o vegetal puede limitar su disponibilidad, lo que conlleva problemas económicos, y una opción poco sostenible a largo plazo, suponiendo una dificultad adicional para mantener la seguridad alimentaria en el país (Barraza-Guardado et al., 2020).

Ante esta situación, se necesita cubrir las carencias nutricionales con fuentes alternativas y suplementarias, que permitan satisfacer las necesidades de la población promoviendo la optimización de recursos y un desarrollo sustentable y rentable. Las microalgas se destacan a nivel comercial por ser consideradas como suplementos alimentarios saludables; sin embargo, son poco conocidas por la población.

Estos microorganismos se caracterizan por ser “biofábricas sostenibles” porque además de su capacidad de mitigar el dióxido de carbono atmosférico, son capaces de producir gran diversidad de compuestos de alto valor, dentro de los cuales se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's); estos últimos no sintetizables por nuestro organismo. La adición en la dieta o su consumo como suplementos dietéticos presenta una serie de efectos beneficiosos en la salud de la piel, agudeza visual, sistemas corporales, desarrollo cognitivo infantil (adición en la fórmula infantil), además de mejorar el sistema inmunológico por su capacidad antioxidante facilitando el combate de enfermedades como el cáncer (Fernandes & Cordeiro, 2021).

En base a lo anterior, el presente proyecto planteó la investigación comparativa de la fracción lipídica (PUFA's) extraída mediante fluidos supercríticos (“SCF” por sus siglas en inglés) a partir de la especie *Chlorella vulgaris* cultivada en condiciones experimentales en el laboratorio del departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca frente a un producto comercial de la

especie *Chlorella sp.*, mediante su análisis a través de Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización a la llama (GC-FID).

Capítulo I

1. Marco Teórico

1.1. Generalidades de las microalgas

Las microalgas y cianobacterias son microorganismos fotosintéticos eucarióticos y procariotas de aproximadamente 0,5 a 200 μm de tamaño, capaces de convertir dióxido de carbono y luz solar en compuestos de carbono y energía. Son responsables de la producción del 50% del oxígeno atmosférico y representan un grupo megadiverso con más de 200.000 especies, de las cuales pocas son aprobadas por la FDA para el consumo humano (Torres-Tiji et al., 2020).

Las ventajas prácticas para su cultivo son: su posible producción a gran escala, su facilidad de crecimiento en condiciones poco favorables o diversas, como aguas potables, no potables o aguas saladas, y su gran contenido de nutrientes (Olguín, 2012). El valor nutricional está influenciado por las condiciones fisicoquímicas del medio sobre el cual se desarrollan las microalgas, de esta manera, su composición varía de acuerdo al nivel de exposición a la luz, temperatura, pH, concentración de nutrientes en el medio y uso de CO_2 (Hernández-Pérez & Labbé, 2014a).

Actualmente, su empleo ha ganado relevancia a nivel global por la obtención de compuestos bioactivos para el consumo humano, animal, cosmético y producción del biodiesel (Olguín, 2012). Se ha demostrado que las microalgas se pueden emplear como suplementos alimenticios por contener grandes cantidades de carbohidratos, lípidos, proteínas, pigmentos, antioxidantes, vitaminas y minerales. Los géneros de microalgas más empleadas para estos fines son: *Dunatiella*, *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Nannochloropsis*, *Nitzchia*, *Navicula*, *Scenedesmus*, *Cryptocodinium* y *Chaetoceros*, entre otros (Torres-Tiji et al., 2020).

1.2. Especie de interés: *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris es una célula eucariota proveniente del reino Protista, división Chlorophyta del orden Chlorellales, familia Chlorellaceae. Es un alga verde unicelular esférica de 2-10 μm de diámetro que vive naturalmente en aguas dulces y puede formar colonias de hasta 64 células (**Figura 1**). A nivel del Ecuador se ha encontrado en las lagunas de los Parques Nacionales Cotopaxi, Llanganates, Cajas, El Ángel, Sangay, las Reservas Cotacachi-Cayapas, entre otros (Guamán & Gonzalez, 2016).

C. vulgaris se caracteriza por ser una célula asexual no mótil, de reproducción rápida a través de auto-esporulación. De tal manera, cuando maduran, las células hijas rompen la pared celular liberándose al medio (Safi et al., 2014). La **Figura 1** presenta una imagen de la estructura observada al microscopio de esta especie.

Figura 1.

Estructura de la microalga Chlorella vulgaris observada al microscopio.



Nota: Adaptado de Chlorella [Fotografía], por DietiNatura, 2017, Dieti Natura (<https://www.dieti-natura.es/plantas-y-activos/chlorella.html>)

Las especies de *Chlorella* poseen estructuras gruesas o robustas de pared celular compuestas principalmente por celulosa. De acuerdo con Weber et al., (2022) la pared celular está compuesta por un 20-25% de azúcares neutros, 15-20% de ácido urónico, 7-17% de glucosamina, y un 6-10% de proteínas. Se caracteriza por poseer una gran cantidad de clorofila, la cual le confiere un aroma a hierba (Yarmohammadi et al., 2021). Además, esta microalga contiene una variedad de nutrientes como fibra, vitaminas, minerales, carbohidratos (12-55%), proteínas (42-58%) de los cuales se pueden obtener más de 15 aminoácidos esenciales y lípidos (5-40%) siendo en su mayoría ácidos grasos insaturados (Chia et al., 2013).

Dentro del contenido de vitaminas y minerales se ha demostrado la presencia de riboflavina, tiamina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, ácido fólico, cobalamina, ácido ascórbico, retinol, tocoferol, potasio, calcio, sodio, hierro, fósforo, cobre, zinc, y entre otros. Además, *Chlorella vulgaris* se caracteriza por poseer pigmentos con carácter antioxidante y nutricional como la clorofila, betacarotenos, astaxantina, violaxantina, luteína, y cantaxantina (Yarmohammadi et al., 2021).

1.3. Cultivo de microalgas

Beltrán-Cediel et al. (2017) y García-Romeral et al. (2017) plantean que el éxito en el crecimiento de microalgas se fundamenta en un balance adecuado de nutrientes y condiciones ambientales dependientes de la especie, por lo que, los parámetros más importantes a considerar son:

- a) Luz: Su nivel radica en el alcance máximo de la tasa de crecimiento específica para cada especie. Si se sobrepasa se da la fotoinhibición.
- b) Temperatura: A mayor temperatura se promueve un mayor crecimiento, su valor óptimo es de 28° a 35° C, si es mayor, aumenta la respiración y reduce la productividad.
- c) Nutrientes: El nitrógeno se incorpora como nitrato (NO_3^-) o como amonio (NH_4^+), y el fósforo se emplea en formación de ácidos nucleicos y transformación de energía, su contenido es menos del 1% y su déficit limita el crecimiento algal.
- d) Aireación: Distribuye de forma homogénea luz en las células y favorece la transferencia de masa entre nutrientes y microalgas evitando la sedimentación en el fondo.
- e) pH: Existe un gradiente de concentración de hidrogeniones a través de la membrana que crea una variación de respuesta, cada microalga presenta un pH óptimo para su crecimiento (7 - 8) y un descenso llegaría a ser letal.
- f) Sales inorgánicas disueltas: Pueden afectar el crecimiento algal por la composición del medio o por la presión osmótica.

Algunos mecanismos e instalaciones de cultivo dentro de laboratorio se presentan en la

Figura 2.

Figura 2.

Cepario de microalgas con condiciones controladas de luz, temperaturas y pH.



Nota: Adaptado de *Cepario de microalgas* [Fotografía], por Infocampo, 2020, Infocampo Digital Media S.A. (<https://www.infocampo.com.ar/ante-el-interes-mundial-la-facultad-de-agronomia-construyo-el-cepario-de-microalgas-mas-grande-del-pais/>).

Existen dos diseños básicos de sistemas de cultivo para microalgas: los sistemas abiertos y los sistemas cerrados. El primero es el más común, la biomasa está expuesta a condiciones medioambientales y consiste en estanques o lagunas poco profundos (25 a 40 cm) que poseen agitadores mecánicos tipo paleta rotatoria para homogeneizar y evitar la sedimentación. Sus ventajas radican en su facilidad de construcción, operación, mantenimiento y bajo coste de inversión, pero se debe tener en cuenta que estos sistemas también poseen baja productividad por unidad de área y los parámetros fisicoquímicos son poco o nulamente controlables (Salgueiro Fernández, 2019).

Por otro lado, los sistemas cerrados o también conocidos como “fotobiorreactores” (PBR) producen microorganismos fotosintéticos con mínimo o nulo contacto con la atmósfera, por lo que reducen el riesgo de contaminación y permiten mayor control de las condiciones de cultivo. Dentro de los diseños más empleados están los de placa delgada y los tubulares (**Figura 3**). Su empleo es importante para estudios de fitorremediación únicamente, ya que aún no se puede realizar a gran escala por la necesidad de grandes volúmenes (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

Figura 3.

Cultivo de microalgas en sistema cerrado (fotobiorreactor del tipo placa plana y tubular).



Nota: Adaptado de *Cultivo de microalgas en aguas residuales y aprovechamiento energético de la biomasa algal* (p. 22), por J. Salgueiro Fernández, 2019, Universidad de Vigo.

1.3.1. Tipos de medios de cultivo.

Las microalgas crecen en medios que poseen concentraciones variables de nitratos, fosfatos, sales de hierro, calcio, cobalto, zinc, manganeso, magnesio, cobre, molibdeno, borato y EDTA (Leal et al., 2001). Los medios Wright (WC; principalmente para *Chlorella vulgaris*) y Guillard "F/2" son empleados para microalgas de agua dulce y marinas, mientras que los medios Algal y Blue-Green 11 (BG11) son específicos de cianobacterias del suelo y agua dulce (UTEX, 2023).

1.4. Tratamientos Pre-extractivos:

En las microalgas, algunos componentes como la hemicelulosa y las glucoproteínas forman una estructura robusta donde los lípidos se encuentran encerrados dentro de monocapas de fosfolípidos y proteínas. Los tratamientos pre-extractivos son indispensables, pues al permitir la desintegración de la membrana celular la extracción de compuestos lipídicos se facilita y mejora la penetración de solventes a través de ella (Bux, 2013).

Estos tratamientos determinan la obtención de los compuestos bioactivos de las microalgas, siendo fundamental la ruptura de la membrana celular para la posterior captación y análisis de estos (Bux, 2013).

1.4.1. Liofilización.

La liofilización es un método de secado que permite remover los solventes presentes en una matriz húmeda por medio de sublimación del solvente natural de las células algales (Assegehegn et al., 2019). Evita la degradación de los compuestos bioactivos al reducir la disponibilidad de agua en la matriz celular, permitiendo su preservación al inactivar las enzimas y evitar la proliferación microbiana. También debilita la pared celular, favoreciendo el proceso extractivo y mantiene la calidad nutricional en comparación a un secado a temperatura alta, que puede degradar los componentes termolábiles (Obeid et al., 2018).

1.4.2. Micronización.

La micronización es un método físico de ruptura que reduce el tamaño de las partículas a rangos entre 1 - 15 μm por las fuertes colisiones entre las células y perlas de vidrio u otros materiales, se emplea con el objetivo de romper la pared celular de la microalga para facilitar la extracción y aumentar la superficie de contacto con el solvente (Castillo, 2010).

1.5. *Compuestos de interés: ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's)*

1.5.1. Origen o síntesis en microalgas.

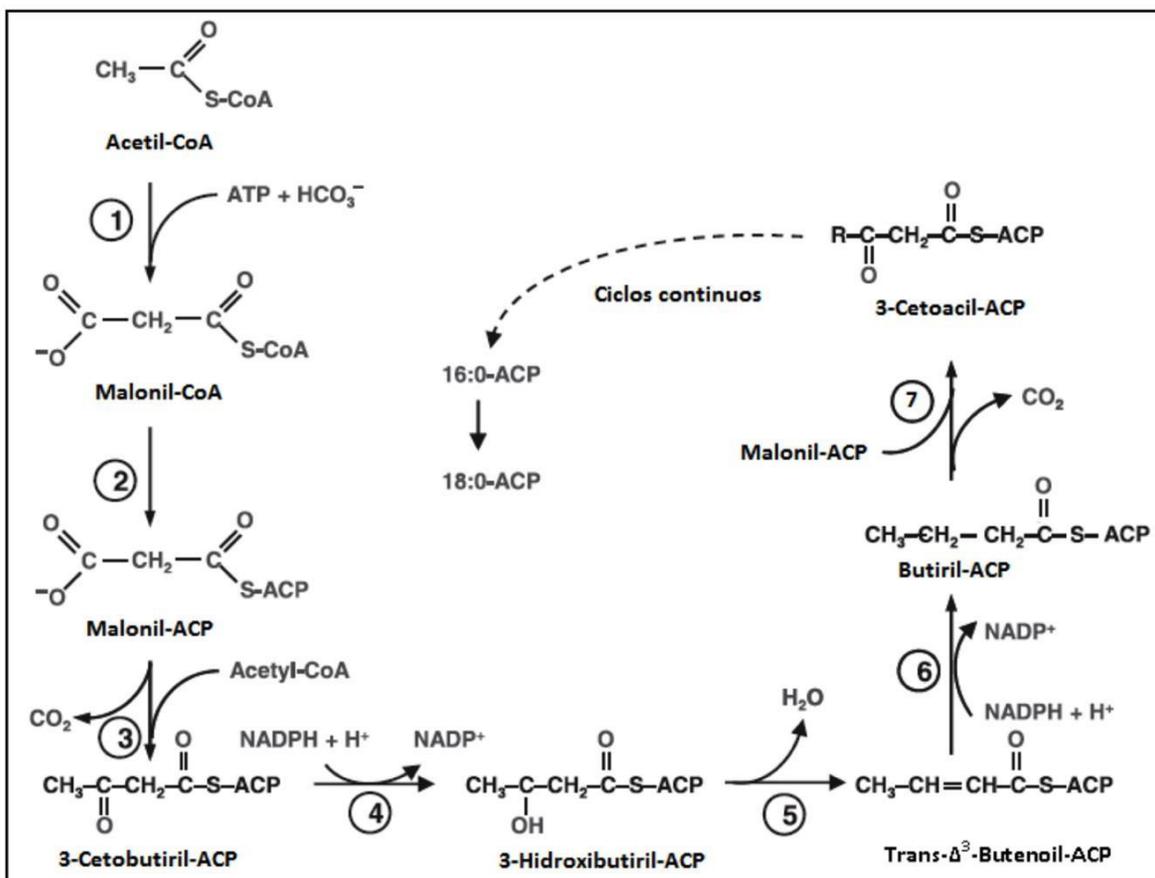
Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son ácidos grasos de cadena larga (más de 18 carbonos) que provienen de plantas y microalgas autótrofas. Su biosíntesis empieza en el ciclo de los poliacetatos con el ingreso de acetilcoenzima A (Acetil-CoA) como sustrato de la enzima Acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) para obtener la molécula de malonil coenzima A (Malonil-CoA) que actúa como donadora de carbonos para la síntesis de nuevos ácidos grasos. La Malonil-CoA es catalizada a Malonil-ACP (ACP: proteína portadora de acilos) a través de la Malonil-CoA: ACP transferasa, esta nueva molécula realiza la descarboxilación de Malonil-CoA e interviene en una serie de reacciones de condensación con los aceptores acil-ACP y acetil-CoA, para luego realizar un ciclo de elongación donde se repite todo el ciclo desde la obtención de Malonil-ACP. Para el término del ciclo de biosíntesis, el grupo acil es removido del sitio ACP por una acil-ACP tioesterasa y el resultado son ácidos grasos saturados de 16 o 18 carbonos, o ambos (Castillo et al., 2017).

Existen dos rutas metabólicas para la obtención de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), pero primero se da la desaturación del ácido oleico (C18:1n-9) a ácido linoleico

(C18:2). En la ruta omega-3 el ácido linoleico es desaturado hacia el ácido α -linolénico para enseguida ser nuevamente desaturado a ácido estearidónico, y luego elongarse a ácido eicosatetraenoico para finalmente producir ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3). La otra ruta es la ruta omega-6, que desatura ácido linoleico a ácido γ -linolénico que después es elongado y desaturado para producir ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) y finalmente EPA (Fernandes & Cordeiro, 2021). Los ácidos grasos mayormente sintetizados por microalgas son el DHA, el EPA, el ARA y el ácido linoleico, de los cuales los más relevantes son el ácido docosahexaenoico y el eicosapentaenoico (Sánchez et al., 2020).

Figura 4.

Esquematzación de la síntesis de lípidos por microalgas.



Nota: Adaptado de *Producción de biodiésel a partir de microalgas: avances y perspectivas biotecnológicas* (p. 340), por Castillo et al., 2017, Hidrobiológica.

1.5.2. Funciones orgánicas en seres humanos.

Los suplementos de EPA y DHA en la dieta conducen a una mayor incorporación de PUFA's en los fosfolípidos de la membrana celular, lo que permite modificar y mejorar su fluidez. Asimismo, el EPA compite directamente con el ácido araquidónico como sustrato de la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LOX) y conduce a la síntesis de prostaglandinas de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5, que poseen actividad antiinflamatoria, anticoagulantes y vasodilatadoras. Igualmente, se ha observado que el DHA tiene capacidad restauradora de la actividad de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, permitiendo mantener el equilibrio entre los mecanismos oxidantes y antioxidantes (Stupin et al., 2019).

1.5.3. Beneficios fisiológicos y aplicaciones.

El estudio de los LC-PUFA, en particular EPA, DHA, y ARA, y su transformación en mediadores lipídicos bioactivos determina la disminución del riesgo de cáncer de mama, próstata, colon y riñón; además de su actividad como mediadores de lípidos en los procesos inflamatorios, compuestos para el crecimiento, reducción de la agregación plaquetaria y reducción del riesgo de artritis y enfermedades cardiovasculares por su actividad hipolipemiante y cardioprotector (Zárate et al., 2017).

El DHA, un ácido graso esencial poliinsaturado de la serie omega-3, enriquece la leche humana, el plasma y el esperma si se emplea en una dieta balanceada (Fernandes & Cordeiro, 2021). Junto con el EPA, contribuyen a la elaboración de preparados infantiles para lactantes, suplementos nutricionales, alimentos funcionales y productos farmacéuticos (Sánchez et al., 2020).

1.6. Técnicas de extracción a partir de biomasa de microalgas

1.6.1. Fluidos supercríticos.

Un fluido supercrítico ("SCF" por sus siglas en inglés) es una sustancia que se encuentra por encima de su temperatura y presión críticas, es decir, no se licua con el aumento de presión, ni se vaporiza con el aumento de temperatura, llegando a un estado de equilibrio donde no hay diferencias entre las fases líquida y gaseosa configurando una sola fase. La densidad del fluido

supercrítico le permite comportarse como un solvente potente dependiente del aumento de presión, temperatura, o ambos (Román Páez et al., 2016).

La extracción por SCF es útil para la separación de compuestos bioactivos específicos de una muestra mediante el empleo de solventes en estado supercrítico, lo que promueve su difusión como un gas a través de una matriz sólida para la disolución de compuestos extraíbles que se transportan a un separador de mezclas, donde el solvente y el extracto se separan por reducción de presión y/o aumento de temperatura. Se puede realizar de dos maneras, estática, dinámica o combinadas. Para la extracción dinámica el solvente fluye constantemente a través de la columna de extracción, mientras que para la extracción estática el fluido supercrítico es absorbido por la muestra (Uwineza & Waśkiewicz, 2020).

Representa una técnica con bajo impacto ambiental, debido al uso dióxido de carbono como solvente de mayor elección por ser químicamente inactivo, económico, de baja toxicidad, temperatura crítica moderada (31,2°C) y presión de 72,9 atm; además, permite que los extractos se preserven aun si están expuestos al aire protegiéndolo de reacciones oxidativas y se considera un solvente de grado alimenticio aprobado (Da Silva et al., 2016; Wrona et al., 2017).

Sin embargo, para moléculas grandes y compuestos polares surge la necesidad de un cosolvente que mejore el rendimiento de la extracción dada la naturaleza apolar del solvente, este puede ser etanol, metanol o agua donde los dos primeros se emplean en concentraciones de hasta el 10%, tomando en cuenta además que el etanol es menos tóxico que el metanol (Uwineza & Waśkiewicz, 2020).

La extracción por SCF se considera una de las mejores técnicas de extracción por su corto tiempo de procesamiento, gran selectividad procesamiento y extracción de metabolitos termolábiles y volátiles, menor uso de solventes y protección al medio ambiente. Estos fluidos presentan baja viscosidad y mayor difusión relativa lo que brindan la ventaja de penetración sobre las matrices (Gonzalez et al., 2009).

1.6.2. Maceración.

Método de extracción sólido-líquido que consiste en humedecer la biomasa de la microalga con cantidad suficiente de líquido de extracción por un tiempo determinado y bajo frecuente agitación, con el objetivo de que el solvente ingrese a la célula y extraiga los compuestos de interés para su posterior recuperación (Benenaula Duchi, 2021). Se debe tener especial cuidado con la

biocompatibilidad entre solventes y analitos, ya que se puede ver afectada por la presencia de una pared celular y/o partes hidrofílicas de la membrana externa, creando dificultades para la extracción (Hejazi & Wijffels, 2004).

1.6.3. Ultrasonido.

Esta técnica consiste en la exposición de una matriz de microalgas a ondas acústicas de baja y alta frecuencia generadas por la transmisión continua de corriente eléctrica a un sistema mecánico. La extracción se hace en un medio líquido donde se producen millones de burbujas microscópicas que se expanden y chocan con las células de la matriz (fenómeno conocido como cavitación), causando la ruptura de la pared celular. Como desventaja, la técnica produce una gran elevación de calor y la posible generación de radicales libres (Sánchez et al., 2020). Por otro lado, reduce el volumen de solvente y el tiempo de extracción (Macías-Sánchez et al., 2009).

1.6.4. Extracción por solventes.

Es un proceso químico que permite la obtención de aceites en matrices que contienen baja cantidad de lípidos. Consiste en poner en contacto a la microalga con los solventes de forma que libere su contenido, así solvatar los lípidos en el solvente y separar los aceites de las micelas por destilación del solvente (Bux, 2013). Existen dos métodos que permiten su aplicación, Soxhlet y el método Bligh & Dyer, ambos diferenciados por el uso de solventes, hexano y metanol-cloroformo, respectivamente (Galanakis, 2021).

Las desventajas de estos métodos son su gran toxicidad, el costo de los solventes, su empleo en grandes cantidades, su inflamabilidad, un tiempo prolongado de procesamiento, y uso limitado en algunas especies de microalgas, hace que no sea un método de elección (Jacob-Lopes et al., 2020).

1.7. Métodos analíticos de cuantificación

1.7.1. Cuantificación de PUFA's por GC-FID.

1.7.1.1. Derivatización de ácidos grasos.

A nivel celular los ácidos grasos se encuentran como compuestos más complejos, como ésteres, unidos a glicerol, colesterol o alcoholes alifáticos de cadena larga para mejorar su acción en procesos metabólicos del organismo (ej.: almacenamiento de energía), de manera que se debe

llevar a cabo un proceso de transmetilación/metilación para obtener metil-ésteres de ácidos grasos (FAME's), que son compuestos de mayor volatilidad y estabilidad química que facilitan la conservación de la muestra y su separación por cromatografía de gases (Yanguas, 2015).

Los autores Pajuelo & Bárbara (2021) plantean que la transmetilación/metilación "general" se realiza mediante una catálisis básica y/o ácida de la muestra seca, de preferencia ambas combinadas para mejorar el resultado cuantitativo por GC.

1.7.1.2. Cromatografía de Gases-Detección de Ionización a la Llama (GC-FID).

Técnica analítica que permite la separación de compuestos volátiles y estables térmicamente. Requiere del uso de una fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria inmóvil presente en una columna, a través de las cuales los componentes de la muestra se distribuirán de formas diferentes en base a su naturaleza, y podrán ser identificados cuali o cuantitativamente. El método se basa en la inyección de una pequeña cantidad de muestra, la cual fluye a través de una corriente de un solvente gaseoso inerte (gas portador) a alta temperatura. La separación de los componentes es detectada a través del detector, el cual amplía la señal analítica (Al-Bukhaiti et al., 2017).

El gas portador es químicamente inerte y no reacciona con los analitos; los más comunes son helio, nitrógeno e hidrógeno, siendo el helio el de mayor sensibilidad y resolución (Vega et al., 2017).

Los detectores de ionización a la llama (FID) deben tener una buena sensibilidad, reproducibilidad y robustez. Emplean hidrógeno y aire para realizar el proceso de combustión en presencia de una llama, donde los analitos se ionizan formando iones/electrones y a la vez produciendo una corriente eléctrica que es detectada por un ánodo y un cátodo, señal que es dirigida a un amplificador (Chijcheapaza Flores, 2018).

Capítulo II

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales y reactivos

Los reactivos empleados para la preparación de medios de cultivo fueron CaCl_2 , NaNO_3 , NaHCO_3 , y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ provenientes de la marca Merck® (Darmstadt, Alemania); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ proveniente de J.T. Baker® (Pensilvania, Estados Unidos); K_2HPO_4 de VWR® (Pensilvania, Estados Unidos); Biotina de AMRESCO® (Ohio, Estados Unidos); Tiamina y $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ de Sigma Aldrich® (Darmstadt, Alemania); Cianocobalamina de Research Organics® (Ohio, Estados Unidos); y una solución traza de metales, los cuales se trabajaron de forma aseptica.

Los gases empleados para la extracción y concentración de extractos fueron dióxido de carbono marca Linde (Linde, Alemania) grado alimenticio y nitrógeno gaseoso grado 3 marca Vidasa (Cuenca, Ecuador), de pureza del 99,99% ambos.

La microalga de origen comercial fue una *Chlorella sp.* de la marca CHAKRA SEEDS (Imbabura, Ecuador), obtenida en tienda naturista La Chakra.

2.2. Equipos

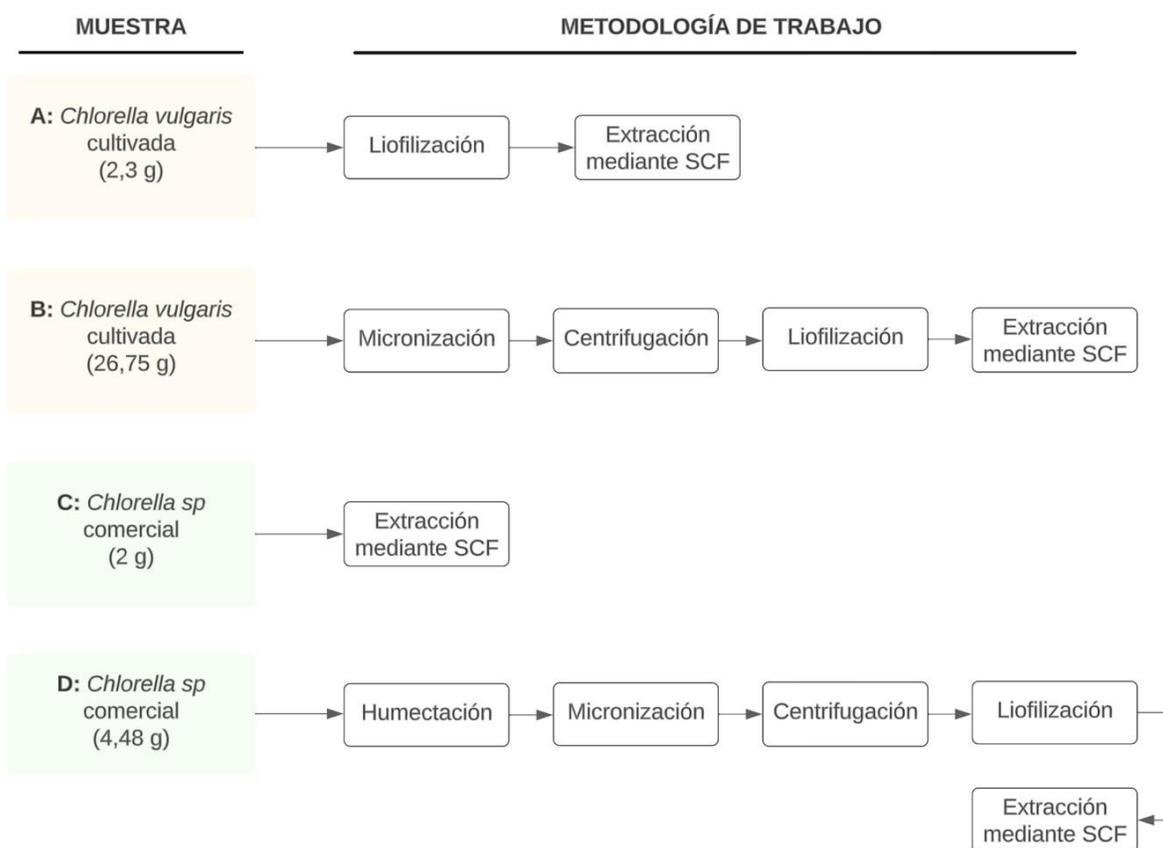
El cultivo se realizó en cabina de flujo laminar Clase II A2 (LABCONCO N° Serie 110441349C, Estados Unidos). Para la obtención de biomasa se empleó la centrífuga modelo 2-6 (SIGMA®, Darmstadt, Alemania). Para el pesaje se utilizó la balanza modelo PB 1502-L (METTLER TOLEDO®, Switzerland). La micronización se realizó en el Bead Beater modelo HBB909 de BioSpec (Shanghái, China). Para el proceso de liofilización se empleó el Biofreezer Fisher Scientific R134A (Estados Unidos, Carolina del Norte), liofilizador FreeZone 2.5 de LABCONCO® (Estados Unidos) y el Biofreezer marca POL-EKO modelo ZLN (Polonia). Para la extracción se usó el equipo Waters® modelo MV10 (Estados Unidos). Finalmente, para la determinación se empleó el cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies modelo 6890n G 1530 N (Santa Clara, Estados Unidos) donde se usó una columna capilar CP-Sil 88 (60 m x 250 μm x 0.20 μm ; Chrompack, Varian Inc., Walnut Creek, CA, Estados Unidos).

2.3. Métodos

Para el análisis de ácidos grasos poliinsaturados se fraccionaron las muestras, tanto la comercial como la cultivada, en cuatro submuestras denominadas como A, B, C, D, cuya metodología de trabajo se esquematiza a detalle en la **Figura 5**.

Figura 5.

Esquema de trabajo para el procesamiento de las muestras A, B, C y D.



2.3.1. Etapa I: Etapa de cultivo.

2.3.1.1. Cultivo de microalga.

La microalga de la especie *Chlorella vulgaris* se cultivó en el medio WC, cuya composición y preparación se describen a detalle en la **Tabla 1**. La siembra se realizó en frascos estériles de vidrio de uno y dos litros de capacidad, herméticamente cerrados y a una temperatura entre 26

a 28 °C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y 1500 lux (**Figura 6**). Se mantuvo bajo agitación y aireación mecánica constante.

Para obtener una mayor proporción de biomasa en un menor tiempo se trabajó bajo una modificación del PNT OG 003.1 Procedimiento Normalizado para la Preparación de la Solución de Trabajo WC para Microalgas en donde las vitaminas biotina, tiamina y cianocobalamina se prepararon según la **Tabla 1**, con el objetivo de acelerar el crecimiento de la microalga. Se realizaron resiembras semanales en frascos de dos litros, bajo cabina de flujo laminar para evitar contaminación del medio de cultivo bajo dirección del PNT OG 006 Procedimiento Normalizado de Trabajo para la Transferencia de Cultivos de Medio líquido a Medio líquido.

Tabla 1.

Preparación del medio de cultivo WC modificado

Componentes	Solución stock para 500 ml en agua destilada (g)
NaNO ₃	42,505
CaCl ₂ • 2H ₂ O	18,38
MgSO ₄ • 7H ₂ O	18,485
NaHCO ₃	6,3
Na ₂ SiO ₃ • 9H ₂ O	14,21
K ₂ HPO ₄	4,355
Componentes	Solución stock para 1000 ml en agua destilada (g)
Biotina	1
Tiamina	0,1
Cianocobalamina	1

Figura 6.

Cultivos de la microalga de especie *Chlorella vulgaris*.



2.3.1.2. Obtención de biomasa.

La primera biomasa se obtuvo al cabo de 5 semanas posterior a la primera siembra. Esta se recolectó mediante centrifugación donde se dispuso cuatro tubos de plástico de 100 ml cada uno, siendo 60 ml el volumen máximo de centrifugación de biomasa por cada tubo, a una velocidad de 1500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó y se realizaron tres ciclos de lavado con agua destilada para eliminar el medio de cultivo residual. Finalmente, la biomasa húmeda se separó y almacenó en tubos falcon de 50 ml de capacidad, que fueron pesados vacíos y con la biomasa húmeda en la balanza para determinar el contenido de biomasa húmeda obtenida. Por último, fueron llevados a refrigeración para su conservación. El proceso se realizó según el PNT OG 012 Procedimiento Normalizado de Trabajo para obtención de biomasa de microalgas.

2.3.1.3. Micronización de biomasa.

Se empleó el equipo Bead Beater para romper la pared celular de la microalga y obtener un mayor perfil de PUFA's. La micronización se realizó utilizando perlas de vidrio de 0,2 μm de diámetro previamente refrigerados (mínimo 24 horas), la muestra y solvente (agua destilada), todos colocados en el contenedor. Se trabajó con la biomasa húmeda y la biomasa comercial reconstituida con agua destilada tipo 2 como solvente (muestras B y D, respectivamente). Luego se montó el contenedor del equipo, sobre el cual se colocaron cubos de hielo y agua para evitar el sobrecalentamiento del equipo y deterioro de la muestra, como se observa en la **Figura 7**.

Para la ruptura se trabajó con ciclos de 2,5 min de funcionamiento (rotor encendido) y 5 min de espera/descanso (rotor apagado). Al finalizar, las muestras se decantaron por aproximadamente 24 a 48 horas, se centrifugaron y se recolectó la biomasa micronizada de cada uno en tubos falcon de 50 ml de capacidad que fueron llevados a refrigeración para su conservación, esta etapa se realizó según el PNT OG 014 Procedimiento Normalizado de Trabajo para Micronización.

Figura 7.

Micronización para ruptura de la pared celular.



2.3.1.4. Liofilización de biomasa.

Las muestras se manejaron mediante dos pasos. En el primero, las muestras de biomasa húmeda se congelaron en el Biofreezer Fisher Scientific a una temperatura de -80°C por un mínimo de 3 horas. Para esto se colocaron 20 ml de biomasa en el tubo liofilizador previamente pesado junto con una tapa de caucho para distribuirlos uniformemente alrededor de las paredes del tubo y evitar acumulaciones de biomasa (**Figura 8a**).

El segundo paso se realizó en el liofilizador. Primero se verificaron las condiciones apropiadas del equipo, que son aproximadamente 0,370 mBar y -51°C , luego se cargaron las muestras previamente congeladas por un lapso de 24 horas (**Figura 8b**). Después, las muestras fueron pesadas y recolectadas en un tubo falcon de 50 ml, el cual fue pesado antes y después de la obtención de la muestra seca para el cálculo del rendimiento. Los tubos fueron llevados al

Biofreezer marca POL-EKO a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para almacenarlos hasta su extracción. El proceso se realizó según el PNT OG 006 Procedimiento Normalizado de Trabajo para liofilizar extractos.

Figura 8.

Proceso de liofilización.



Nota. Figura a (izquierda): Elaboración de congelados. Figura b (derecha): Liofilización de la biomasa húmeda extraída.

2.3.2. Etapa II: Etapa de extracción.

2.3.2.1. Fluidos Supercríticos.

Se empleó etanol absoluto al 5% como cosolvente y se trabajó a una temperatura de 40°C y presión de 300 Bar. Para alcanzar la presión requerida se trabajó bajo 3 etapas consecutivas:

1. Un ciclo dinámico-estático-dinámico de 1 min, 0,5 min y 1 min. Flujo de CO_2 de 9,5ml/min y cosolvente de 0,5 ml/min.
2. Un ciclo dinámico-estático-dinámico de 1 min, 0,5 min y 1 min. Flujo de CO_2 de 7,60 ml/min y cosolvente de 0,40 ml/min.
3. Cinco ciclos dinámico-estático-dinámico de 3 min, 6 min y 3 min. Flujo de CO_2 de 5,67 ml/min y cosolvente de 0,33 ml/min.

Para las muestras C y D se pesaron 2 g de biomasa de cada una en el cartucho de extracción, mientras que para la muestra A se pesaron 1,37 g y para la muestra B se pesaron 0,66 g debido a que en el proceso de micronización y posterior liofilización se perdió gran cantidad de muestra.

Como resultado se obtuvieron aproximadamente 3 ml de cada extracto (A, B, C y D) que posteriormente se concentraron con gas nitrógeno (**Figura 10**) hasta llegar a un peso final de 95,2 mg; 105,2 mg; 88,5 mg; 117 mg de las muestras A, B, C y D, respectivamente.

El proceso se realizó según el PNT FUN 020 Procedimiento Normalizado de Funcionamiento para el Sistema de Extracción de Fluidos Supercríticos (MV-10 ASFE).

Figura 9.

Equipo de extracción de compuestos bioactivos por medio de fluidos supercríticos, específicamente CO₂.



Figura 10.

Concentración de los extractos a través de nitrógeno gaseoso



2.3.3. Etapa III: Etapa de determinación de ácidos grasos poliinsaturados.

2.3.3.1. Derivatización de ácidos grasos poliinsaturados.

El proceso se realizó en base a las metodologías optimizadas por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias donde las muestras A, B, C y D se derivatizaron a FAME's a partir de 20 mg de cada extracto. Se añadieron 0,7 ml de hidróxido de potasio 10 M y 5,3 ml de metanol. Luego se incubaron a 55°C en baño maría por 1.5 horas, con agitación en vórtex de 5 segundos cada 20 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se enfriaron hasta temperatura ambiente. Se añadieron 0,58 ml de ácido sulfúrico 12 M y se observó la aparición de un precipitado. Nuevamente, la muestra se incubó a 55°C por 1,5 horas, con agitación de 5 segundos cada 20 min, y enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadieron 3 ml de hexano y se mezclaron por 5 min con un vórtex. La mezcla de las diferentes muestras se centrifugaron por 10 min a 3500 rpm. Se separaron las fases orgánicas (sobrenadantes) y se colocaron en tubos etiquetados que contenían sulfato de sodio anhidro. Se dejaron reposar las mezclas por 10 min y se separaron las fases orgánicas que se usaron para la inyección en el cromatógrafo de gases.

2.3.3.2. Cromatografía de Gases con Detector de Ionización a la Llama.

Se inyectó 1 µL de cada muestra derivatizada de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sp.* en el cromatógrafo de gases acoplado a detector a la llama (GC-FID) a 220°C con un Split de 1:5. La separación de los compuestos se realizó en una columna capilar CP-Sil 88 (60 m x 250 µm x 0.20 µm) con un flujo de 2 ml/min de Helio como gas portador. En el horno se programó una rampa de temperatura que inició a 100°C que se incrementó a 180°C a 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. El proceso se realizó en base a las metodologías optimizadas por el Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Departamento de Biociencias.

Figura 11.

Cromatógrafo de gases acoplado a un detector con ionización a la llama.



2.3.3.3. Cuantificación de ácidos grasos presentes en la muestra.

Para la cuantificación de ácidos grasos (AG) se emplearon curvas de calibración que relacionan las áreas de los picos y los tiempos de retención calculados por el equipo, de las cuales se realizaron varios cálculos para obtener la concentración de AG. Los patrones disponibles para la identificación fueron proporcionados por el Grupo de Alimentación, Nutrición y Salud del Departamento de Biociencias, estos se observan a continuación en la **Tabla 2**.

Tabla 2.

*Patrones empleados para la identificación de ácidos grasos en *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sp.**

Nombre común	Nomenclatura taquigráfica	Saturación
Ácido cáprico	C 10:0	Saturado
Ácido láurico	C 12:0	Saturado
Ácido mirístico	C 14:0	Saturado
Ácido palmítico	C 16:0	Saturado
Ácido palmitoleico	C 16:1	Monoinsaturado
Ácido esteárico	C 18:0	Saturado
Ácido oleico	C 18:1	Monoinsaturado
Ácido linoleico (omega 6)	C 18:2	Poliinsaturado
Ácido linolénico (omega 3)	C 18:3	Poliinsaturado
Ácido araquidónico	C 20:4	Poliinsaturado

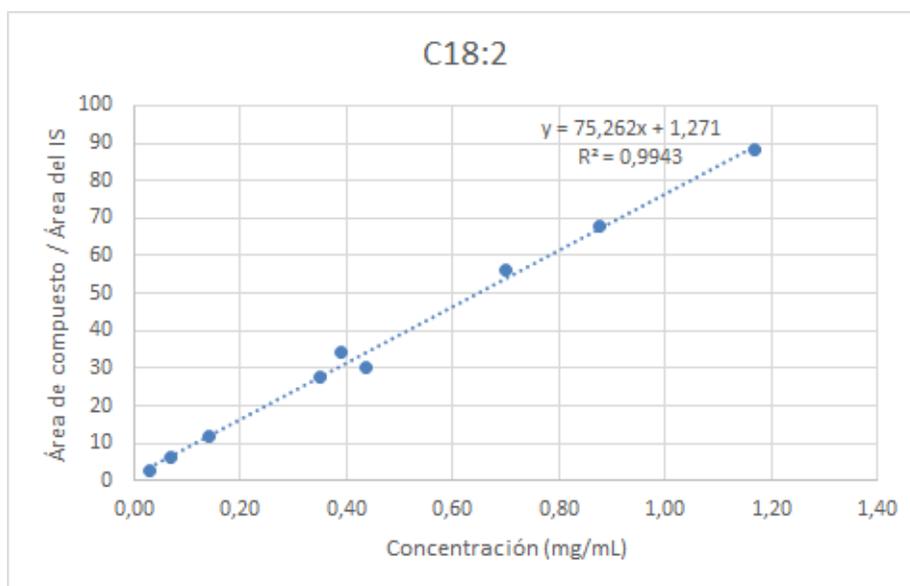
Nota. Autoría: Grupo de Alimentación, Nutrición y Salud del Departamento de Biociencias.

A manera de ejemplo se ilustra el cálculo realizado para el ácido linoleico (C 18:2):

En primer lugar, a partir de los datos obtenidos de los patrones internos proporcionados se obtuvo una ventana del tiempo de retención (para nuestras muestras fue $\pm 0,1$) y se realizó el cálculo del límite de detección y cuantificación (LOD y LOQ, respectivamente). En la **Figura 12** se observa la curva de calibración para el ácido linoleico, a partir de esta se emplea la ecuación de la recta para determinar la concentración del AG, representada por “x”, la cual se despeja reemplazando “y” con el área bajo la curva proporcionada por el equipo para cada una de las muestras.

Figura 12.

Curva de calibración del estándar del ácido graso C 18:2 (ácido linoleico).



Nota. Adaptado de Grupo de Alimentación, Nutrición y Salud del Departamento de Biociencias, 2022.

Con la ecuación de la recta en términos de “x” se obtiene una concentración en mg/ml de la muestra C, ilustrado a continuación:

$$\square = \frac{92,5321121 - 1,271}{75,262}$$

$$\square = 1,21257939 \frac{\square\square}{\square\square}$$

Una vez obtenida la concentración se realiza un análisis cualitativo y un cuantitativo. En el primero se corrobora que los valores se encuentren dentro del tiempo de retención y para el análisis cuantitativo se verifica que los valores se encuentren por encima del LOQ para categorizarse como “cuantificables”.

Posteriormente, se debe calcular los miligramos de AG/mg de extracto seco. Para esto se debe tener en cuenta que al finalizar la derivatización la concentración del extracto en relación a los mililitros de solvente derivatizado es de 6,67 ya que se partieron de 20 mg de extracto seco (obtenido por fluidos supercríticos y concentrado con nitrógeno gaseoso) y 3 ml de hexano (solvente) en donde se encuentran los AG derivatizados. Este valor de 6,67 (para este caso) se constituye en un factor de conversión.

Teniendo en cuenta esto, los ml de solvente derivatizado corresponden a los ml de extracto del compuesto de manera que se puede hacer una relación que permita expresar los resultados en mg Ag/mg extracto seco:

$$\frac{\frac{\text{mg AG}}{\text{mg extracto seco}}}{6,67 \frac{\text{ml solvente}}{\text{ml extracto seco}}} = \frac{\text{mg AG}}{\text{ml solvente}} \text{ sec}$$

Siendo así la concentración de mg AG obtenido a partir de la ecuación de la recta tendrá que dividirse para el factor de conversión:

$$\frac{1,2125 \text{ mg AG}}{6,67 \frac{\text{ml solvente}}{\text{ml extracto seco}}} = \frac{1,2125 \text{ mg AG}}{6,67 \text{ ml solvente}} \text{ sec}$$

La concentración de C 18:2 en la muestra C es de 0,1819 mg AG/mg extracto seco ó 181,9 µg AG/mg de extracto seco. Este procedimiento se realizó para cada una de las muestras.

Capítulo III

3. Resultados y Discusión

La identificación de los ácidos grasos presentes en las muestras de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sp.* se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a detector a la llama. Se obtuvieron diferentes cromatogramas correspondientes a las muestras: A, B, C y D, recordando que A y B corresponden a *Chlorella vulgaris* cultivada a escala de laboratorio siendo la muestra B la micronizada; así mismo las muestras C y D corresponden a *Chlorella sp.* obtenida comercialmente, de las cuales la muestra D fue reconstituida y micronizada. Partiendo del tiempo de retención y áreas bajo la curva detectados por el equipo se caracterizaron los ácidos grasos poliinsaturados: ácido linoleico (18:2) y ácido linolénico (18:3); además de otros ácidos grasos saturados y monoinsaturados, todos detectados en base a las curvas de calibración estándar.

Para A se detectaron 9 picos, entendiéndose que cada pico en el cromatograma es representado por un ácido graso presente en la muestra, como se puede observar en la **Tabla 3**. En contraste, para B se detectaron 19 picos (**Tabla 4**). Las muestras C y D demostraron 13 picos y 19 picos respectivamente, según las **Tablas 5 y 6** observadas a continuación. En base a esto, se presume que la muestra comercial posee una mayor variedad de ácidos grasos en relación a la microalga cultivada.

Tabla 3.

Datos obtenidos del cromatograma para la muestra A.

Muestra A			
# PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA	ÁCIDO GRASO
1	9,68	1,94	NI
2	11,59	2,37	NI
3	11,95	9,40	C 16:0
4	12,64	2,35	C 16:1
5	15,39	7,65	C 18:1
6	16,28	5,01	C 19:0
7	17,10	3,87	C 18:2
8	19,54	17,31	C 18:3
9	28,64	4,74	C 24:0

Nota. NI: No identificado. Autoría propia.

Tabla 4.

Datos obtenidos del cromatograma para la muestra B.

Muestra B			
# PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA	ÁCIDO GRASO
1	8,75	1,27	NI
2	9,68	15,08	NI
3	10,02	1,12	C 14:0
4	10,94	1,01	NI
5	11,21	2,57	NI
6	11,60	15,50	NI
7	11,96	83,18	C 16:0
8	12,63	12,55	NI
9	12,69	7,56	C 16:1
10	14,44	2,90	C 18:0
11	15,39	26,36	NI
12	15,53	4,56	NI
13	15,73	1,69	C 18:1
14	19,53	2,78	NI
15	23,21	2,30	C 22:0
16	27,02	5,19	NI
17	27,79	4,63	NI
18	31,46	8,28	NI
19	36,34	3,97	NI

Nota. NI: No identificado. Autoría propia.

Tabla 5.

Datos obtenidos del cromatograma para la muestra C.

Muestra C			
# PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA	ÁCIDO GRASO
1	9,66	6,33	NI
2	10,01	1,72	C 14:0

3	11,20	1,00	NI
4	11,58	6,18	NI
5	11,94	64,04	C 16:0
6	12,62	17,20	NI
7	12,72	9,65	C 16:1
8	13,77	43,02	NI
9	14,43	9,00	C 18:0
10	15,40	70,64	NI
11	15,52	4,94	C 18:1
12	17,09	92,53	C 18:2
13	19,53	119,97	NI

Nota. NI: No identificado. Autoría propia.

Tabla 6.

Datos obtenidos del cromatograma para la muestra D.

Muestra D			
# PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA	ÁCIDO GRASO
1	8,73	0,94	NI
2	9,67	13,03	NI
3	10,01	3,77	C 14:0
4	10,46	1,11	NI
5	10,92	1,29	NI
6	11,21	1,91	NI
7	11,59	12,40	NI
8	11,95	140,17	C 16:0
9	12,63	44,66	NI
10	12,72	22,71	NI
11	13,08	1,70	C 16:1
12	13,77	88,73	NI
13	13,92	1,53	NI
14	14,43	16,80	C 18:0
15	15,41	146,92	NI

16	15,52	11,67	C 18:1
17	16,25	2,64	C 19:0
18	17,10	193,05	C 18:2
19	19,55	242,55	C 18:3

Nota. NI: No identificado. Autoría propia.

Los autores Moradi-kheibari & Ahmadzadeh (2017) emplean una metodología similar con 37 patrones para la identificación de FAME presentes en *Chlorella vulgaris* con tiempos de retención aproximados. Basándonos en el autor, se puede comparar el siguiente orden de elución de algunos compuestos presentes en sus resultados: ácido mirístico, ácido cis-10-pentadecanóico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico. En este análisis, el orden de elución fue coincidente: ácido mirístico, el ácido palmítico, el ácido esteárico, el ácido oleico, y el ácido linoleico. Si bien, no se contaba con el estándar interno para C19:0, C22:0 y C24:0 se puede comparar la disposición de los mismos frente al estándar empleado por los autores, esperando demostrar la presencia de estos ácidos grasos, bajo el mismo orden de elución. No obstante, teniendo en cuenta las diferencias metodológicas tanto para cultivo como para extracción tanto del autor como del presente trabajo, se puede justificar la variación de resultados obtenidos.

La naturaleza de la pared celular de las microalgas se considera un factor limitante para la extracción de metabolitos. Morioka et al. (2014) prueba la sonicación como técnica de pretratamiento con posterior extracción por fluidos supercríticos con CO₂ y detección por CG-FID en la especie *Chlorella sp.*, obteniendo un mejor perfil de ácidos grasos poliinsaturados (18:2, 18:3, 20:2) a diferencia del método sin pretratamiento donde identificó únicamente el ácido C 18:2. Asimismo, Nitsos et al. (2020) indica que la micronización es una técnica de pretratamiento eficaz ya que puede mejorar el perfil de las moléculas de alto valor encontradas en las microalgas. Siendo así, referente a la **Tabla 7** se puede corroborar la eficiencia de esta técnica mediante una comparación de resultados entre las muestras A y B, donde la muestra B posee un perfil más amplio en relación a la muestra A; y las muestras C y D, donde la muestra D perfil más amplio en relación a la muestra C. De esta manera, se puede ratificar que los pretratamientos son técnicas que mejoran la eficiencia en los procesos de extracción y optimizan la caracterización de compuestos de interés.

Si bien es cierto el presente análisis tuvo como objetivo la identificación de PUFA's, se obtuvo los ácidos grasos saturados C14:0, C16:0, C18:0, C19:0, C22:0, C24:0, los ácidos grasos monoinsaturados C16:1, C18:1 para complementar el estudio y los ácidos grasos poliinsaturados

C18:2 y C18:3. Las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ de extracto seco de cada uno de ellos se exponen en la **Tabla 7**.

Tabla 7.

Resultados obtenidos de la concentración de cada uno de los ácidos grasos identificados y cuantificados mediante GC-FID.

$\mu\text{g AG / mg extracto seco}$										
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C19:0	C22:0	C24:0
Muestra A		3,97	1,44		3,61	5,18	106,7			
Muestra B	0,60	53,61	4,69	1,94	0,60					
Muestra C	0,95	40,73	5,99	6,30	2,24	181,9				
Muestra D	2,13	91,96	1,03	11,88	5,64	382,2	1566,6			

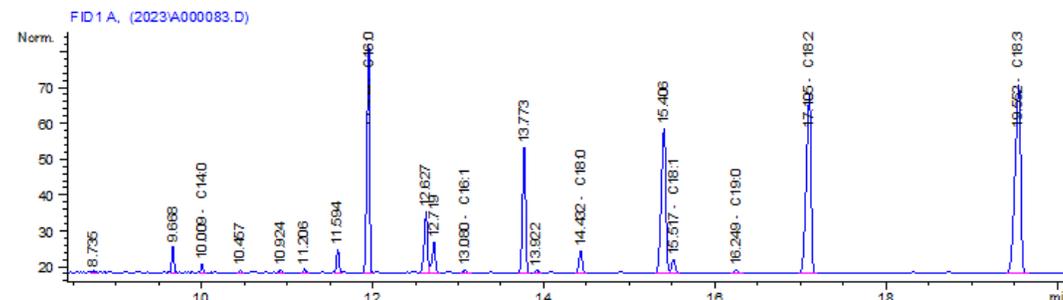
Nota: Autoría propia

Los resultados obtenidos en el análisis de las fracciones lipídicas presentaron una variación que puede atender a diferentes limitaciones. Una de ellas es la evidente la necesidad de obtener una mayor variedad de patrones internos para un estudio más extenso de ácidos grasos poliinsaturados ya que se cuenta únicamente con C 18:2, C 18:3 y C 20:4, como ejemplo de ello, en el cromatograma de la muestra D, que se ilustra en la **Figura 13** y sus datos correspondientes en la **Tabla 6**, se observan picos que no fueron identificados. Otra limitante podría ser la proporción de muestra colocada durante el proceso de extracción, ya que debido a la falta de tiempo no se logró obtener una cantidad significativa de biomasa cultivada para el análisis de cada muestra en comparación con la biomasa liofilizada de origen comercial, de la cual si se contó con suficiente muestra para el análisis (2g). Por otro lado, es importante realizar una estandarización del método de cultivo para esta especie, ya que existen diversos factores que afectan en la composición de la misma (tipo de cultivo, intensidad de luz, ciclo luz/oscuridad, cantidad de nutrientes, temperatura, tiempo entre resiembras, etc.) que pueden provocar una variación en los resultados. Finalmente, se puede observar que la muestra comercial presenta un mejor perfil de ácidos grasos que la cultivada; sin embargo, se debe tener en cuenta que *Chlorella sp.* obtenida en tienda naturista no posee únicamente la especie de interés, como se puede ilustrar en la **Figura 14**, por lo que otras especies presentes en la muestra podrían interferir y/o enmascarar la presencia/ausencia de ácidos grasos correspondientes a *Chlorella vulgaris*. Bajo esta premisa, las condiciones de cultivo y procesamiento de *Chlorella* comercial son desconocidas, lo que puede evidenciar la ausencia de una Normativa Técnica que estandarice

el correcto cultivo, manipulación, y procesamiento y control de calidad de suplementos alimenticios naturales, como las microalgas.

Figura 13.

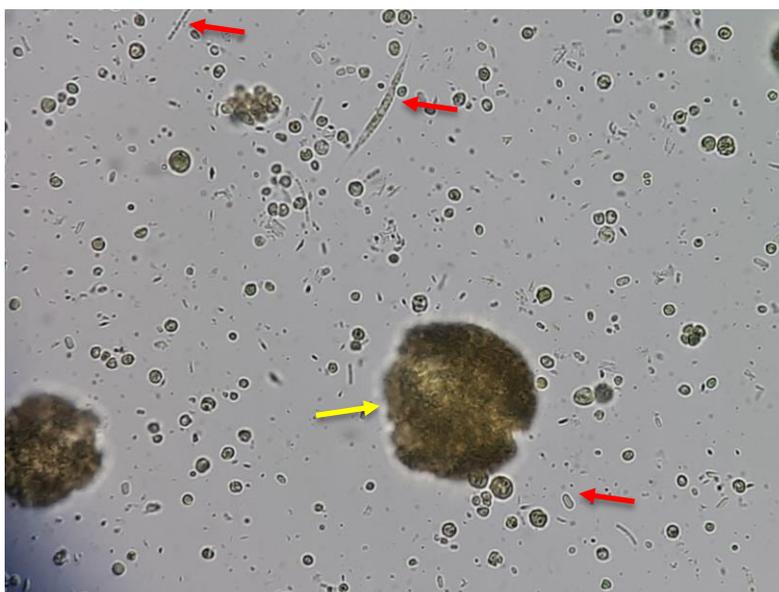
Cromatograma correspondiente a la muestra D (reconstituida y micronizada).



No se puede aseverar que una microalga comercial tiene mejores características que una cultivada a escala de laboratorio ya que los análisis no se realizaron por duplicado debido a las dificultades de cultivo y tiempo de crecimiento de la microalga. Paralelamente, se realizó una aproximación inicial para demostrar eficiencia de metodologías pre-extractivas para ácidos grasos poliinsaturados, en cultivos de *Chlorella vulgaris* obteniendo como resultado una mayor eficiencia de la microalga comercial.

Figura 14.

Microalga *Chlorella* sp., de origen comercial, observada al microscopio con lente 40x.



Nota: Se identifican especies diferentes a la de interés (Flecha roja) y aglomeraciones de la microalga comercial (Flecha amarilla)

Capítulo IV

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1. Conclusiones

Se puede concluir que,

La técnica de micronización como metodología empleada para el rompimiento de la pared celular y optimización de la extracción de ácidos grasos pertenecientes a *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sp.* permite conseguir un perfil más eficiente de ácidos grasos tanto saturados como insaturados para las muestras B y D micronizadas en relación a muestras no micronizadas.

La muestra cultivada a escala de laboratorio presenta un perfil de ácidos grasos poliinsaturados comparable con la muestra comercial en cuanto a su composición, pero, no se puede afirmar cual es mejor. No obstante, el cultivo de microalgas representa una alternativa saludable para contribuir con la seguridad alimentaria en cuanto a su aporte en la síntesis de compuestos de alto valor necesarios para cubrir las carencias nutricionales, ejerciendo un papel como una fuente suplementaria.

4.2. Recomendaciones

- Elaborar nuevas curvas de calibración a partir de estándares internos de una mayor variedad de ácidos grasos poliinsaturados para posteriores investigaciones dada la diversidad existente de estos en las microalgas.
- Comparar el perfil de ácidos grasos poliinsaturados que se obtiene a partir de una muestra micronizada modificando las condiciones de presión y temperatura para la extracción por fluidos supercríticos.
- Evaluar la presencia de ácidos grasos polinsaturados en diferentes especies de microalgas para estimar su valor en la nutrición humana.

Referencias

Al-Bukhaiti, W. Q., Noman, A., Qasim, A. S., & Al-Farga, A. (2017). Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 6(1), 123-128.

Assegehegn, G., Brito-de la Fuente, E., Franco, J. M., & Gallegos, C. (2019). The Importance of Understanding the Freezing Step and Its Impact on Freeze-Drying Process Performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(4), 1378-1395. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>

Beltrán-Cediel, Y. K., Quiñones-García, A. M., & Vargas, J. (2017). *Sistema De Automatización Para El Control De Las Condiciones Ambientales En Cultivo De Microalga Chlorella*.

Benenaula Duchi, T. V. (2021). *Comparación de eficiencia en los métodos de fraccionamiento para microalgas y/o cianobacterias a través de la evaluación de actividad antioxidante* [Bachelor Thesis, Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/36067>

Bux, F. (Ed.). (2013). Lipid Identification and Extraction Techniques. En *Biotechnological Applications of Microalga: Biodiesel and valuable Products* (pp. 89-101). CRC Press: Taylor & Francis Group.

Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., Rodríguez-Núñez, J. R., Castillo, O. S., Torres-Badajoz, S. G., Núñez-Colín, C. A., Peña-Caballero, V., Herrera Méndez, C. H., & Rodríguez-Núñez, J. R. (2017). Producción de biodiésel a partir de microalgas: Avances y perspectivas biotecnológicas. *Hidrobiológica*, 27(3), 337-352.

Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. da G. G., & Parrish, C. C. (2013). Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. *Aquatic Toxicology*, 128-129, 171-182. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.004>

Chijcheapaza Flores, H. R. (2018). Validación de una Técnica para la Determinación de Metanol y Congéneres por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Llama (FID) en Piscos –Arequipa 2018. *Universidad Católica de Santa María*. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20500.12920/8138>

Da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction

of bioactive compounds. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 76(1), 40-51. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>

DietiNatura. (2017). *Chlorella*. Dieti Natura. <https://www.dieti-natura.es/plantas-y-activos/chlorella.html>

Fernandes, T., & Cordeiro, N. (2021). Microalgae as Sustainable Biofactories to Produce High-Value Lipids: Biodiversity, Exploitation, and Biotechnological Applications. *Marine Drugs*, 19(10), 573. <https://doi.org/10.3390/md19100573>

Galanakis, C. (Ed.). (2021). Edible bio-oil production from microalgae and application of nanotechnology. En *Microalgae: Cultivation, Recovery of Compounds and Applications* (pp. 94-98). Elsevier: Academic Press.

García-Romeral, J., Pavía-Gómez, M., Sanz, T. G., Chirivella-Martorell, J., & Serrano-Aroca, Á. (2017). Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: Importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation.*, 9, Article 9.

Guamán, M. C., & Gonzalez, N. (2016). *Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador* (1era ed.). Corporacion para la investigación energética, Laboratorio de Tecnología Energética.

Hejazi, M. A., & Wijffels, R. H. (2004). Milking of microalgae. *Trends in Biotechnology*, 22(4), 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.02.009>

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014a). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014b). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>

Infocampo. (2020, septiembre 8). *Ante el interés mundial, la Facultad de Agronomía construyó el cepario de microalgas más grande del país*. Infocampo. <https://www.infocampo.com.ar/ante-el-interes-mundial-la-facultad-de-agronomia-construyo-el-cepario-de-microalgas-mas-grande-del-pais/>

Jacob-Lopes, E., Maroneze, M. M., Queiroz, M. I., & Queiroz, L. (Eds.). (2020). Extraction of biomolecules from microalgae. En *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (pp. 291-292). Elsevier: Academic Press.

Leal, M., Ortiz, N., Mora, R., Ruiz, G., & Perona, E. (2001). Caracterización de la Cianobacteria *Pseudanabaena galeata* a diferentes condiciones de cultivo. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 35(3), Article 3. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/3965>

Moradi-kheibari, N., & Ahmadzadeh, H. (2017). Supercritical carbon dioxide extraction and analysis of lipids from *Chlorella vulgaris* using gas chromatography. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 14(11), 2427-2436. <https://doi.org/10.1007/s13738-017-1177-y>

Morioka, L. R. I., Matos, Â. P., Olivo, G., & Sant'Anna, E. S. (2014). Floculação de *Chlorella* sp. Produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. *Química Nova*, 37, 44-49. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422014000100009>

Nitsos, C., Filali, R., Taidi, B., & Lemaire, J. (2020). Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. *Biotechnology Advances*, 45, 107650. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107650>

Obeid, S., Beaufile, N., Camy, S., Takache, H., Ismail, A., & Pontalier, P. Y. (2018). Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of lipids from freeze-dried microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 34, 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.003>

Olguin, E. J. (2012). Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1031-1046. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001>

Pajuelo, S., & Bárbara, G. (2021). *Estudio sobre la aplicación metal-orgánicos de ácidos grasos para la determinación en alimentos*. <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/117664>

Román Páez, M. A., Rivera Narváez, C. M., Cardona Bermúdez, L. M., Muñoz, L. M., Gómez, D. D., Passaro Carvalho, C., & Quiceno Rico, J. M. (2016). *Guía de extracción por fluidos supercríticos: Fundamentos y aplicaciones*. <https://repositorio.sena.edu.co/handle/11404/4698>

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology,

composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Salgueiro Fernández, J. L. (2019). *Cultivo de microalgas en aguas residuales y aprovechamiento energético de la biomasa algal* [Doctoral Thesis, Enxeñaría química]. <http://www.preinvestigo.biblioteca.uvigo.es/xmlui/handle/11093/1158>

Sánchez, J., Loaña, J., Agualongo, M., & Espinoza, K. (2020). Técnicas de cultivo y métodos de extracción de ácidos grasos a base de microalgas en beneficio de la humanidad. *Agroindustrial Science*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2020.03.15>

Stupin, M., Kibel, A., Stupin, A., Selthofer-Relatić, K., Matic, A., Mihalj, M., Mihaljević, Z., Jukić, I., & Drenjančević, I. (2019). The Physiological Effect of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (n-3 PUFAs) Intake and Exercise on Hemorheology, Microvascular Function, and Physical Performance in Health and Cardiovascular Diseases; Is There an Interaction of Exercise and Dietary n-3 PUFA Intake? *Frontiers in Physiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01129>

UTEX, C. C. of algae. (2023). *WC Medium*. UTEX Culture Collection of Algae. <https://utex.org/products/wc-medium>

Uwineza, P. A., & Waśkiewicz, A. (2020). Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. *Molecules*, 25(17), 3847. <https://doi.org/10.3390/molecules25173847>

Vega, B. O. A., Voltolina, D., Savín, T. Z., Montoya, M. A., & Anduro, G. A. G. (2017). Determinación de ácidos grasos y esteroides por cromatografía de gases espectrometría de masas. En *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal* (Número September).

Weber, S., Grande, P. M., Blank, L. M., & Klose, H. (2022). Insights into cell wall disintegration of *Chlorella vulgaris*. *PLoS ONE*, 17(1), 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262500>

Wrona, O., Rafińska, K., Możejki, C., & Buszewski, B. (2017). Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials. *Journal of AOAC International*, 100(6), 1624-1635. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0232>

Yanguas, R. F. (2015). *IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ISÓMEROS*

POSICIONALES DEL ÁCIDO PALMITOLEICO (16:1n-7) EN MUESTRAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS. Universidad de Valladolid.

Yarmohammadi, S., Hosseini-Ghatar, R., Foshati, S., Moradi, M., Hemati, N., Moradi, S., Kermani, M. A. H., Farzaei, M. H., & Khan, H. (2021). Effect of *Chlorella vulgaris* on Liver Function Biomarkers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Nutrition Research*, 10(1), 83. <https://doi.org/10.7762/cnr.2021.10.1.83>

Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6>