

Evaluación del perfil de ácidos grasos de *Isochrysis galbana* mediante el uso de métodos ácidos y alcalinos de transesterificación

Fatty acid profile evaluation of *Isochrysis galbana* through the use of acid and alkaline transesterification methods

Elena Medina-Pérez¹
 María Ruíz-Domínguez²
 Juan Morales-Espinoza³
 Pedro Cerezal-Mezquita⁴

¹ Universidad de Antofagasta (Chile); correo: e-b-medina@hotmail.com;
 ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3289-0522>

² Universidad de Antofagasta (Chile); correo: maria.ruiz@uantof.cl;
 ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6520-7940>

³ Universidad de Antofagasta (Chile); correo: juan.morales@uantof.cl

⁴ Universidad de Antofagasta (Chile); correo: pedro.cerezal@uantof.cl;
 ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0822-0844>

Recibido: 01-07-2018 Aceptado: 12-03-2019

Cómo citar:

Medina, Elena; Ruíz-Domínguez, María; Morales, Juan; Cerezal, Pedro (2019). Evaluación del perfil de ácidos grasos de *Isochrysis galbana* mediante el uso de métodos ácidos y alcalinos de transesterificación. *Informador Técnico*, 83(1), 66-75.
 doi: <https://doi.org/10.23850/22565035.1574>

Resumen

Isochrysis galbana es una microalga marina destacada por contener una gran diversidad de biomoléculas de interés antioxidante. Su alto contenido en lípidos permite su uso en acuicultura o como fuente de biocombustible, por su perfil de ácidos grasos rico en poliinsaturados como Ácido Docosahexaenoico (DHA) o por su alto contenido en fucoxantina (carotenoide). Desde hace un siglo esta microalga es conocida como alimento para bivalvos, larvas de peces y/o moluscos. Por otra parte, la transesterificación es la reacción necesaria para poder derivatizar los ácidos grasos en Ácidos Grasos Metilados (AGM) y poder identificarlos y cuantificarlos; este es un paso clave para optimizar y conocer la mejora del perfil de ácidos grasos obtenido desde la biomasa de estudio. Por consiguiente, este trabajo presentó la diferencia significativa del perfil de ácidos grasos y contenido de los mismos de *I. galbana* a partir de 8 Métodos de Transesterificación Directa e Indirecta (MTD y MTI, respectivamente), además del uso de catalizadores ácidos y alcalinos (AC1, AC2 y AL1 y AL2). Los resultados arrojaron mejores contenidos de ácidos grasos metilados respecto a la biomasa seca en el método MTD-AL1 con un ~6 % y de una abundancia relativa de DHA del ~12 % en el método MTI-AL2. Asimismo, el perfil de ácidos grasos más abundante presente en la microalga se destacó en MTD-AL2 con un 57,66 % en poliinsaturado. Por otro lado, la adición de un patrón interno en las experiencias llevadas a cabo, pudo identificar que los métodos MTD-AL1 y MTI-AC1 obtuvieron mayor eficiencia en la transesterificación con un ~93 % y ~87 %, respectivamente. Por consiguiente, el método que se seleccione para la lectura correcta de ácidos grasos presentes en cualquier biomasa es relevante para observar un perfil más rico en insaturaciones como se ha comprobado con la microalga *I. galbana*.

Palabras clave: lípidos; ácidos grasos; ácido docosahexaenoico; ácidos grasos poliinsaturados; ingredientes funcionales; antioxidantes.

Abstract

Isochrysis galbana is a marine microalga which highlights by containing a great diversity of antioxidant biomolecules. It shows a high content of lipids that can be used in aquaculture and biofuel, its high polyunsaturated fatty acid profile such as DHA (docosahexaenoic acid) or for having high fucoxanthin content (carotenoid group). For a century, this microalga is very well known as feed for bivalves, larva of fish, crustaceans, and mollusks. Transesterification is the necessary reaction to be able to derivative the fatty acids in methylated fatty acids (AGM) and thus be able to identify and quantify them. It is a key step to optimize and therefore know the improvement of the obtained fatty acid profile of study biomass. Hence, this work presents the significant difference of eight methods for obtaining fatty acids from the direct and indirect transesterification reaction (MTD and MTI, respectively). Moreover, acidic and alkaline catalysts were also used (AC1, AC2 and AL1 and AL2). The results presented better contents of AGMs (methylated fatty acids) respecting dry biomass in the MTD-AL1 method with ~ 6% and a relative abundance of DHA of ~ 12 % in MTI-AL2. In addition, the most abundant fatty acid profile was MTD-AL2 with 57.66 % in polyunsaturated. On the other hand, thanks to the addition of an internal standard in the experiences, it was possible to identify that the MTD-AL1 and MTI-AC1 methods were the most efficient in the transesterification obtained with ~ 93 % and ~ 87 % , respectively. Therefore, the method that is selected for the correct reading of fatty acids present in any biomass is relevant to detect a profile with more unsaturation as has been purchased with the microalga *I. galbana*.

Keywords: lipids; fatty acids; docosahexaenoic acid (DHA); PUFAs; functional ingredients; antioxidants.

Introducción

En los últimos años, el interés por producir alimentos funcionales ha aumentado en la industria de comestibles. Este término se introdujo desde los años 80 en Japón, donde se muestra la capacidad que presentan ciertos alimentos de minimizar la incidencia de enfermedades crónicas a partir de una dieta determinada (Aronson, 2017). Así, se han descrito mejoras del sistema inmune, sistema endocrino, nervioso, circulatorio y/o digestivo (Arai, 1996; Aronson, 2017). La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos ha crecido en los últimos años por la creciente demanda de interés de los consumidores. En particular, los Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPI) son una de las familias definidas como compuestos de interés y/o compuestos bioactivos, que han tomado más relevancia en el área de alimentos (Molino *et al.*, 2019). Esto debido a que se ha demostrado sus múltiples beneficios para la salud humana, como la regulación de la presión sanguínea, prevención de trombosis y/o regulación de la glucosa en pacientes con diabetes (Lemahieu *et al.*, 2015; Shahidi; Ambigaipalan, 2018). Dentro de esta familia de AGPI, se encuentra el Ácido Docosahexaenoico (DHA) descrito por sus propiedades bioactivas como por su capacidad de potenciar el desarrollo de la memoria y aprendizaje en niños, además de reducir en personas mayores problemas cardiovasculares (Kuda *et al.*, 2016; Tang; Qin; Wang; Li; Tian, 2011).

La fuente tradicional de DHA es el aceite de pescado, pero puede ser insuficiente para la producción alimentaria que demanda el mercado (Sprague; Dick; Tocher, 2016; Tang *et al.*, 2011). Es por esto, que se han buscado otras fuentes alternativas como lo son las microalgas, descritas entre otras, por llegar a contener intracelularmente entre un 20 a un 50 % de su peso seco de lípidos. Incluso, bajo condiciones de estrés pueden llegar a alcanzar hasta el 85 % de producción de estos mismos (Chisti, 2007; Santos-Sánchez *et al.*, 2016). Se describe en algunas especies que entre el 37 al 45 % de su peso puede ser contenido exclusivo de DHA (Santos-Sanchez *et al.*, 2016). De esta manera, las microalgas en los últimos años han sido motivo de estudio por sus propiedades bioactivas y sus potenciales aplicaciones biotecnológicas (Mendes, Reis, Vasconcelos; Guerra; da Silva, 2009). La especie microalgas *Isochrysis galbana*, se conoce por poseer diversas propiedades positivas para la salud humana (Kim; Kang; Kwon; Chung; Pan, 2012), además de ser una especie utilizada ampliamente como alimento en acuicultura, precisamente por su potencial antioxidante (Mishra; Mishra, 2018). Recientes estudios demuestran el posible uso de *I. galbana* como fuente de varias biomoléculas importantes, como polisacáridos, ácidos grasos, carotenoides, vitaminas, entre otros, que mejoran el valor nutricional, no solo en los piensos usados en acuicultura, sino destinados al consumo humano (Guedes; Amaro; Malcata, 2011; Mishra; Mishra, 2018), como por ejemplo en la producción de DHA (Molina; Sánchez; García; Fernández; Ación, 1994; Qi *et al.*, 2002). Particularmente, para poder realizar la extracción y cuantificación de los Ácidos Grasos (AG) se lleva a cabo una reacción de transesterificación de los mismos. Este procedimiento es muy

específico y costoso, especialmente en aquellos destinados para la producción de biodiesel, la transesterificación es el proceso más importante (Chen; Lee, 2018). En la Figura 1 se observa el diagrama general donde se utilizan solventes orgánicos (alcoholes) y catalizadores tanto ácidos como básicos, que mejoran la extracción de los AG desde la biomasa (aceites) (Fukuda; Kondo; Noda, 2001; Sung; Han, 2016). Finalmente, se producen los llamados Ácidos Grasos Metilados AGM pudiendo ser cuantificados por cromatografía de gases (Sung; Han, 2016), más un residuo que es glicerol como coproducto. En el caso de la transesterificación ácida, los reactivos mayormente descritos son el ácido sulfúrico, fosfórico y clorhídrico, los cuales describen una catálisis más lenta, pero más conveniente para los gliceroles que presentan AG libres y con mayor contenido acuoso (Chen; Lee, 2018; Fukuda *et al.*, 2001; Silitonga; Masjuki; Ong; Mahlia; Kusumo, 2017). Sin embargo, en la transesterificación básica se utilizan comúnmente carbonatos, hidróxidos de sodio y potasio, donde la catálisis puede llegar a ser hasta 4000 veces más rápida que la ácida, aunque los gliceroles y alcoholes deben ser anhidros, para evitar la saponificación y reducir la eficiencia de la transesterificación (Fukuda *et al.*, 2001; González; Gallego, 2011).



Figura 1. Reacción del proceso de Transesterificación
Fuente: elaboración propia

Por otro lado, la transesterificación puede clasificarse como directa o indirecta (Figura 2), donde la principal diferencia se presenta en que la primera trabaja con la biomasa directamente (bien húmeda o seca), y la segunda desde una extracción lipídica de la biomasa (González; Gallego, 2011; Silitonga *et al.*, 2017).

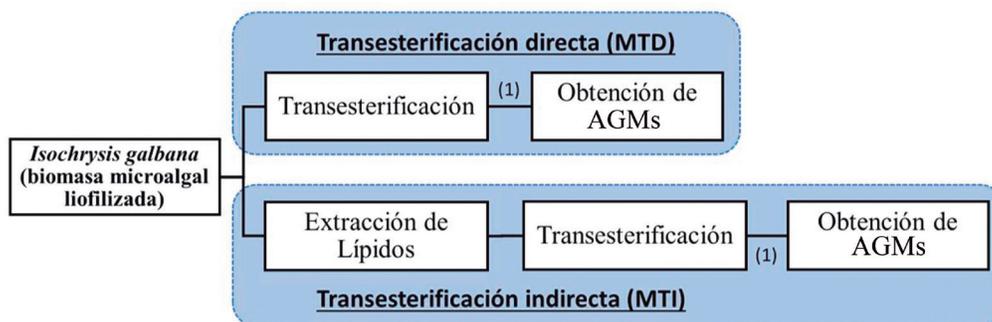


Figura 2. Comparación de los métodos de extracción de ácidos grasos directo e indirecto llevados a cabo desde la microalga *I. galbana*. (1) glicerol y agua
Fuente: elaboración propia

De este modo, el trabajo presentó una comparativa de los diversos perfiles de ácidos grasos resultantes desde *I. galbana* a partir de una selección de 8 métodos de transesterificación descritos en materiales y métodos. Esta experiencia se llevó a cabo en dos grupos que se engloban como métodos directos e indirectos llamados MTD y MTI, respectivamente, y a su vez con cuatro tipos de catalizadores agrupados como ácidos y alcalinos (AC1 - AC2 y AL1 - AL2, respectivamente) para así poder determinar la influencia en el perfil de ácidos grasos y particularmente en el porcentaje obtenido de DHA, según la metodología usada de *I. galbana*.

Materiales y Métodos

Material y reactivos de estudio

La biomasa utilizada en este estudio fue la microalga *Isochrysis galbana*, obtenida desde la colección de microalgas del Laboratorio de Microalgas y Compuestos Bioactivos (Universidad de Antofagasta, Chile). En todos los casos, la microalga

fue cosechada en su fase exponencial de crecimiento y liofilizada en un sistema de congelado en seco (Labconco Freezone 2.5L Benchtop Freeze Dry System, USA). Los reactivos usados para todos los ensayos fueron de calidad cromatográfica. Finalmente, el patrón externo usado en el equipo de cromatografía de gases GC – FID (Shimadzu 2010, Japón) fue AGM Mix C4-C24 estándar de SUPELCO y el patrón interno C15:0 (TAG, tripentadecanoico >99 %, NU-CHEK PRE, INC), usando una concentración por muestra de 10 ppm.

Extracción y cuantificación de lípidos totales

La extracción de lípidos totales se realizó a partir de aproximadamente 20 mg de biomasa liofilizada de *I. galbana*, de acuerdo al método de extracción cloroformo: metanol (2:1, v/v) modificado por Axelsson y Gentili (2014), con agitación continua. La cuantificación de los lípidos totales se realizó gravimétricamente mediante la siguiente fórmula 1:

$$L (\%) = [(P2-P1)/(Biomasa)] \times 100 \quad (1)$$

Donde L es el porcentaje de lípidos totales, P2 es el peso en gramos del vial más el residuo de lípidos obtenidos desde la extracción de biomasa liofilizada de *I. galbana* por el método descrito anteriormente, P1 es el peso en gramos del vial seco sin muestra y Biomasa es la biomasa liofilizada utilizada en gramos de *I. galbana*, por cada extracción. Posteriormente, desde el residuo obtenido de lípidos se conservaron bajo atmósfera rica en N₂ y bajo oscuridad para continuar con el proceso de extracción de ácidos grasos denominado transesterificación indirecta.

Extracción de ácidos grasos

La extracción de ácidos grasos se llevó a cabo desde la biomasa liofilizada de *I. galbana*, (Transesterificación Directa, MTD) o desde la fracción de lípidos explicada en el apartado anterior (Transesterificación Indirecta, MTI). Además, en ambos casos se hizo una comparativa utilizando un catalizador ácido o alcalino/básico (AC y AL, respectivamente), presentándose los diversos métodos resumidos en la Figura 3 junto con sus referencias. En todos los casos, los AGM fueron recuperados en n-hexano para proceder con el análisis de los mismos por cromatografía de gases – GC-FID.

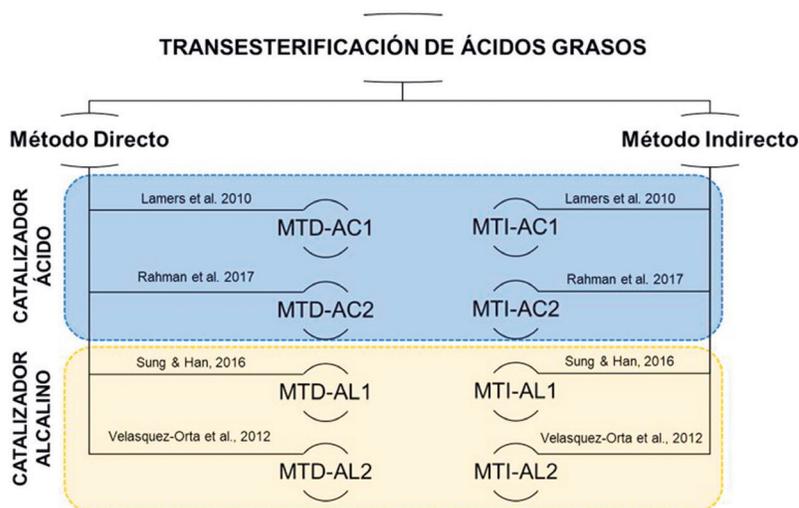


Figura 3. Resumen de los métodos utilizados para la transesterificación de AG a partir de biomasa liofilizada de *Isochrysis galbana*
Métodos de Transesterificación Directos (MTD): MTD- AC1 (catalizador 10% H₂SO₄ : MeOH* (v/v), (Lamers *et al.*, 2010)), MTD-AC2 (catalizador 1 % H₂SO₄ : MeOH (v/v) (Rahman; Aziz; Al-khulaidi; Sakib; Islam, 2017)), MTD-AL1 (catalizador 2,5 M NaOH en MeOH, (Sung; Han, 2016)) y MTD-AL2 (1 % K₂CO₃ : MeOH (p/v) (Velásquez-Orta; Lee; Harvey, 2012)).
Métodos de Transesterificación Indirectos (MTI): MTI- AC1 (catalizador 10 % H₂SO₄ : MeOH (v/v) (Lamers *et al.*, 2010)), MTI-AC2 (catalizador 1 % H₂SO₄ : MeOH (v/v) (Rahman *et al.*, 2017)), MTI-AL1 (catalizador 2,5 M NaOH en MeOH, (Sung; Han, 2016)) y MTI-AL2 (1 % K₂CO₃ : MeOH (p/v) (Velásquez-Orta *et al.*, 2012)
 *MeOH: metanol.

Fuente: elaboración propia

Cuantificación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa – GC-FID

Cuantificación de AGMs: El cromatógrafo de gas (GC Shimadzu 2010, Japón) equipado con un Detector de Ionización de Llama (DIL) y con un inyector “split/splitless”, fue usado para analizar la composición de AGMs. En todos los casos, las muestras fueron inyectadas en una columna capilar RESTEK (30 m, 0,32 mm i.d., 0,25 µm espesor). La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C en modo split, con una relación de 4.5:1 y el gas portador fue nitrógeno a un flujo constante de 11,25 mL•min⁻¹. La temperatura del horno fue de 80 °C por 5 min, posteriormente se incrementó a 165 °C a 4 °C•min⁻¹ por 2 min, se continuó incrementando a 180 °C a 2 °C•min⁻¹ por 5 min. Se calentó con un gradiente de 2 °C•min⁻¹ a 200 °C por 2 min. Luego, nuevamente se calentó con una velocidad de 4 °C•min⁻¹ a 230 °C por 2 min y finalmente esa temperatura se mantuvo por 2 min, alcanzando 250 °C a 2 °C•min⁻¹, mientras que la temperatura del detector fue de 280 °C. De forma individual, los AGMs fueron identificados mediante la comparación de su tiempo de retención con la mezcla del AGM estándar (AGM Mix C4-C24, Supelco Analytical) y fueron cuantificados, de acuerdo a la comparación del área arrojada debajo de los picos del mix establecido mediante el software LabSolutions versión 5 compatible con Windows.

Eficiencia de la transesterificación: para conocer la eficiencia en la reacción de transesterificación de cada uno de los métodos utilizados, se añadió desde el comienzo de la reacción una cantidad de patrón interno de 100 ppm por muestra (Tripentadecanoico >99%, NU-CHEK PRE, INC), donde se calculó la eficiencia de la transesterificación mediante la siguiente fórmula 2:

$$\eta_{TR}, (\%) = (IS2 / (IS1) \times 100 \quad (2)$$

Donde η_{TR} es la eficiencia de la transesterificación en porcentaje, IS2 es la concentración del patrón interno calculada en cromatógrafo de gases (GC-FID) y IS1 es la concentración real añadida por muestra del patrón interno (~100 ppm).

Análisis estadístico

Todas las muestras se realizaron por triplicado y, además, en el caso de patrón interno para cálculos de eficiencia de la transesterificación se añadió una muestra más sin biomasa, tan solo con el patrón. Los criterios de aceptación de cada uno de los parámetros de validación se calcularon mediante el software STATGRAPHICS Centurion XVI, versión 16.1.18.

Resultados y Discusión

El perfil de ácidos grasos mayoritarios presentes en *I. galbana* se muestran en la Tabla 1, según el método de transesterificación ácida y alcalina utilizado. Se observa que, entre métodos de extracción directos e indirectos, estos últimos logran extraer un perfil más variado de AG. La extracción de lípidos fue llevada a cabo con la mezcla de solventes descritas anteriormente, cloroformo:metanol, 2:1 (v/v) (Axelsson; Gentili, 2014), la cual fue demostrada en varios estudios como la mezcla de solventes más eficientes en la extracción de lípidos (D'Oca *et al.*, 2011; Sheng; Vannela; Rittmann, 2011). Por otro lado, se puede constatar que, entre las catálisis ácida y alcalina, esta última fue la más efectiva en la obtención de AGPI, pero no de Ácidos Grasos Monoinsaturados (AGMI), los cuales tienen un alto interés para la fabricación de alimentos funcionales (Xu; Qian, 2014). Cabe destacar que, ambas catálisis presentan como más abundantes el ácido palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), oleico (C18:1), y ácido linolénico (C18:3). Según Velásquez *et al.*, (2012), un AG exclusivo de la catálisis alcalina es el ácido linolénico (C18:3), y para la catálisis ácida el ácido mirístico (C14:0) y ácido miristoleico (C14:1), los cuales también fueron observados en el perfil de *I. galbana*.

Tabla 1.
Métodos de transesterificación

Ácidos grasos	Método Directo (MTD)				Método Indirecto (MTI)			
	AC1	AC2	AL1	AL2	AC1	AC2	AL1	AL2
C4:0	-	-	-	5,37	1,27	0,23	1,39	8,43
C14:0	20,44	18,73	13,76	2,17	20,68	20,51	19,16	19,41
C16:0	33,22	35,42	21,99	4,94	41,91	38,37	27,45	-
C18:0	-	-	-	-	0,81	2,97	-	-
Σ Saturados	53,66	54,15	35,75	12,48	64,67	62,08	48	27,84
C14:1	1,37	-	-	-	-	-	2,85	-
C16:1	11,25	9,43	9,78	2,15	-	9,17	9,61	-
C18:1	33,08	35,13	34,19	-	3,95	25,46	23,40	12,17
C24:1	-	-	-	-	-	-	-	4,25
Σ Monoinsaturados	45,7	44,56	43,97	2,15	3,95	34,63	35,86	16,42
C18:2	-	-	-	12,24	3,38	-	-	-
C18:3	-	-	15,80	40,28	0,97	-	13,99	10,62
C20:4	-	-	-	-	-	0,83	-	10,11
C20:3	-	-	-	5,04	-	1,35	-	-
DHA (C22:6)	0,64	1,29	0,60	0,10	2,20	1,11	2,15	12,32
Σ Poliinsaturados	0,64	1,29	16,4	57,66	6,55	3,29	16,14	33,05
Otros	-	-	3,88	27,71	24,82	-	-	22,69

Perfil de ácidos grasos mayoritarios presentes en *I. galbana*, según los métodos de transesterificación usados (% área, n=3, ±SD no fue representada en la tabla, pero fue menor a 5 %)

Fuente: elaboración propia

Respecto a la abundancia obtenida de DHA, en la Tabla 1 se muestra que una mayor cantidad obtenida fue a través del método MTI-AL2 (12,32 %) seguido por MTI-AC1 (2,20 %), lo que reafirma lo descrito anteriormente donde la fase lipídica que involucra la extracción indirecta potenciaría la obtención de DHA a partir de la microalga, para así generar alimentos funcionales con múltiples beneficios para la salud humana (Kim *et al.*, 2012).

En la Figura 4 se observa el contenido de AGMs obtenido a partir de la microalga *I. galbana*, de acuerdo al método de transesterificación utilizado respecto a biomasa y a la cuantificación de lípidos. El método MTD-AL1 fue el que mayor contenido de AGM respecto a biomasa y lípidos arrojó 59,60 y 124,15 mg/g, respectivamente, lo que permite establecer que la fase lipídica realizada en la extracción indirecta, no tiene mayor influencia en el contenido obtenido como AGM total. Estos resultados demuestran que al ser la extracción directa la más efectiva para extraer mayor cantidad de AG desde la microalga, el proceso es más rápido y económico en cuanto a la utilización de solventes. Sin embargo, de acuerdo a lo descrito por Fukuda *et al.*, (2001); Santos-Sánchez *et al.*, (2016), la transesterificación alcalina es más rápida que la ácida. Sin embargo, los métodos MTD-AL2 y MTI-AL2 fueron los que menos concentraciones de AGM alcanzaron, aunque la proporción de DHA fue del 12 % en el caso de MTI-AL2. Aunque fue el caso con mayor abundancia de todos no implicó el hecho de que fuera el que mayor cantidad obtuviera, puesto que hubo un 0,28 % de AGM respecto a biomasa seca. De esta manera, el método MTD-AL1 fue no solo el que mejor resultado obtuvo de AGM, sino también el mejor con respecto a la abundancia relativa de DHA, siendo inferior a lo descrito por Santos-Sánchez *et al.* (2016), llegando a alcanzar 5,9 % de DHA.

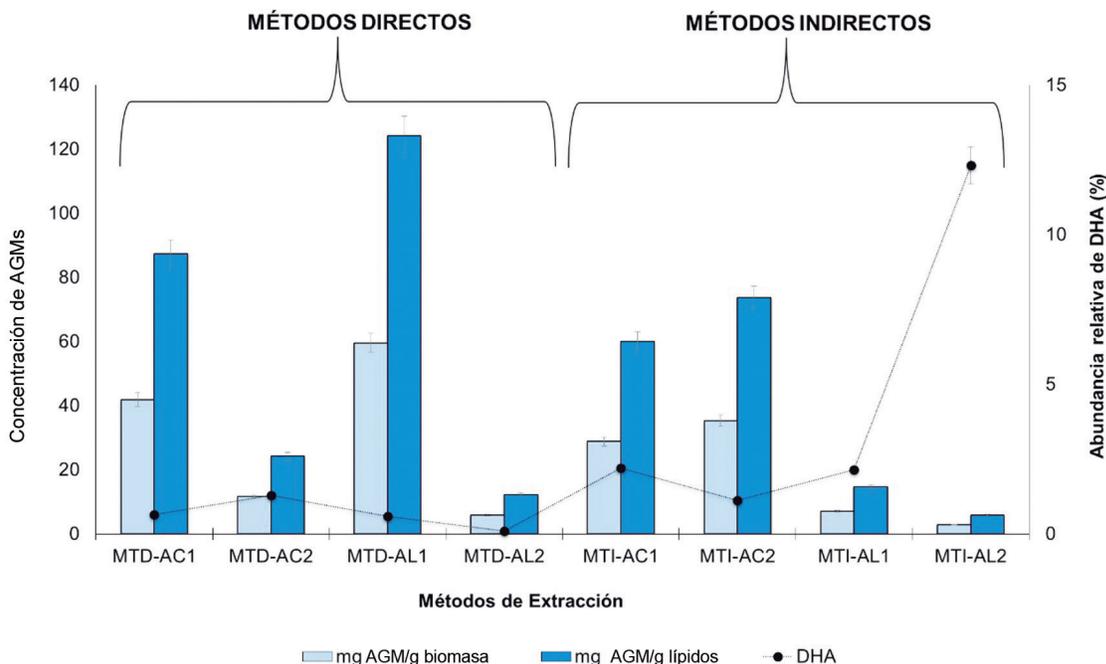


Figura 4. Contenido de AGMs respecto a biomasa y lípidos de la microalga *I. galbana* y abundancia relativa de DHA (%) Fuente: elaboración propia

La Figura 5 presenta la eficacia de cada método de transesterificación calculado a partir del patrón interno añadido desde el comienzo de la reacción.

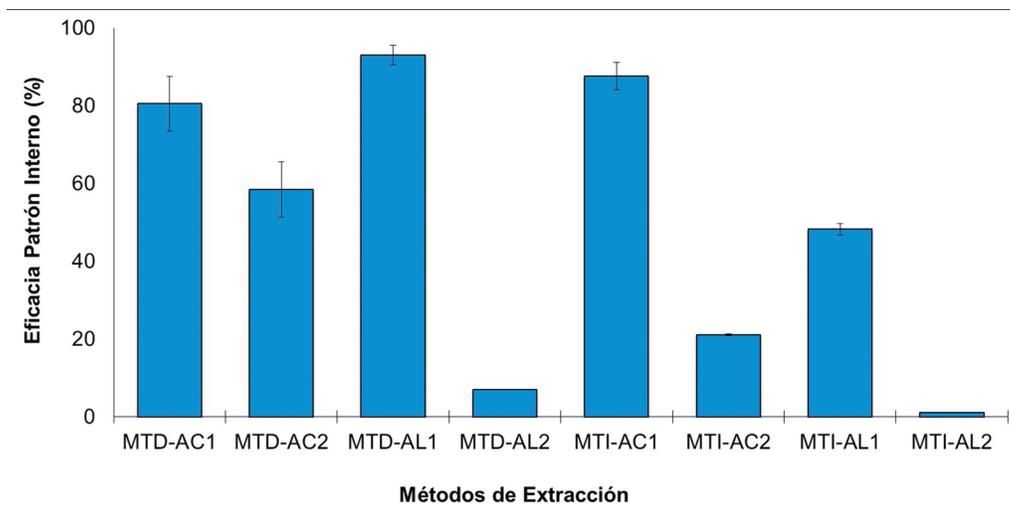


Figura 5. Eficacia de los métodos de transesterificación directos e indirectos Fuente: elaboración propia

El método MTD-AL1 presentó la mayor eficacia con un 93,03 % seguido por MTI-AC1 con un 87,61 %. Sin embargo, el método MTI-AC2 fue uno de los más bajos (~21 %), siendo el que en la Figura 4 se presenta con un contenido promedio de AGM respecto a biomasa (35,33 mg/g), esto, de acuerdo a otros autores, podría haber ocurrido porque en sí la catálisis ácida es lenta, y podrían haberse degradado una cantidad de ácidos grasos presentes en la biomasa (Fukuda *et al.*, 2001). Por último, los métodos MTI-AL2 y MTD-AL2 son los que menos eficiencia tuvieron (~1,0-7,0 %), coincidiendo con que fueron los que menores concentraciones de AGM respecto a biomasa y lípidos presentaron (Figura 4). Estos resultados coinciden en parte con lo descrito por Chen y Lee (2018), en el estudio de optimización de transesterificación de ácidos

grasos de la microalga *Monoraphidium* sp como métodos directos. El trabajo concluye con una mejora del rendimiento de AGM, usando transesterificación ácida en vez de alcalina tanto desde la biomasa húmeda como seca. Además, propone una transesterificación continua de catalizadores, ácidos y básicos dando lugar a mejores resultados una combinación de ambas, lo cual podría ser planteado para próximas investigaciones. Similares resultados se observaron en el trabajo desarrollado por Chamola, Khan, Raj, Verma y Jain (2019), a partir de un diseño Box Behnken (Narula; Thakur; Uniyal; Kalra; Jain, 2017), cuyos factores fueron el porcentaje de metanol, de catalizador (ácido o alcalino) y la concentración de los mismos. Su estudio refleja una mejora en el rendimiento de AGM bajo catálisis ácida, la cual presenta datos muy seguidos con la alcalina (89,5 y 87,4 % de rendimiento de AGM, respectivamente). Aunque nuestro estudio destaca MTD-AL1 (catalizador alcalino 2,5M NaOH), es el único caso, pues de forma general tanto en métodos directos como indirectos resultaron más eficientes las reacciones con catalizadores ácidos (H_2SO_4) y en mayor porcentaje (10 % v/v).

Conclusiones

Entre los ocho métodos de extracción utilizados, el más eficiente para la extracción de DHA fue MTI-AL2 con más del 12 % en abundancia relativa de DHA. Sin embargo, debido al poco contenido de ácidos grasos la productividad de DHA no es consistente. Por otro lado, MTD-AL1 fue el proceso con el perfil más rico en mono y poliinsaturado (43,97 % y 16,4 %, respectivamente, además de contener mayor contenido de AGM respecto biomasa del ~6 %, lo que implica aproximadamente el 12,4 % del contenido de lípidos de *I. galbana*. Si realizamos una comparación entre los métodos de extracción directos e indirectos, los métodos directos lograron extraer mayor cantidad de DHA que los indirectos, por lo que el proceso de extracción se realizó de forma más rápida, lo que impide que algún AG se degrade. Finalmente, se observó en todos los casos que la microalga *I. galbana* es una microalga marina con un perfil rico en ácidos grasos útiles en aplicaciones alimentarias, además de contener DHA, importante ingrediente funcional, lo que hace *I. galbana* puede ser una potencial candidata como fuente natural de compuestos bioactivos.

Referencias

- Arai, S. (1996). Studies on functional foods in Japan—state of the art. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(1), 9-15.
<https://doi.org/10.1271/bbb.60.9>
- Aronson, J. K. (2017). Defining 'nutraceuticals': neither nutritious nor pharmaceutical. *British journal of clinical pharmacology*, 83(1), 8-19.
<https://doi.org/10.1111/bcp.12935>
- Axelsson, M.; Gentili, F. (2014). A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PloS one*, 9(2), e89643.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089643>
- Chamola, R.; Khan, M. F.; Raj, A.; Verma, M.; Jain, S. (2019). Response surface methodology based optimization of in situ transesterification of dry algae with methanol, H_2SO_4 and NaOH. *Fuel*, 239, 511-520.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.11.038>
- Chen, J.-J.; Lee, Y.-R. (2018). Optimization of the transesterification reaction of microalgal *Monoraphidium* sp. *Renewable Energy*, 129, Part B, 717-723.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.012>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

- D'Oca, M. G. M.; Viêgas, C. V.; Lemoes, J. S.; Miyasaki, E. K.; Morón-Villarreyes, J. A.; Primel, E. G.; Abreu, P. C. (2011). Production of AGMs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and bioenergy*, 35(4), 1533-1538. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.047>
- Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(5), 405-416. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80288-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80288-7)
- González, A. R.; Gallego, E. G. (2011). Variables de operación en el proceso de transesterificación de grasas animales: una revisión. *Ingeniería y Universidad*, 15(1), 197-218. Recuperado de <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/iyu/article/view/1143>
- Guedes, A. C.; Amaro, H. M.; Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work. *Biotechnology progress*, 27(3), 597-613. <https://doi.org/10.1002/btpr.575>
- Kim, S. M.; Kang, S.-W.; Kwon, O.-N.; Chung, D.; Pan, C.-H. (2012). Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis* aff. *galbana*: Characterization of extraction for commercial application. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55(4), 477-483. <https://doi.org/10.1007/s13765-012-2108-3>
- Kuda, O.; Brezinova, M.; Rombaldova, M.; Slavikova, B.; Posta, M.; Beier, P.; Kopecky, J. (2016). Docosahexaenoic Acid-Derived Fatty Acid Esters of Hydroxy Fatty Acids (FAHFAs) With Anti-inflammatory Properties. *Diabetes*, 65(9), 2580-2590. <https://doi.org/10.2337/db16-0385>
- Lamers, P. P.; van de Laak, C. C.; Kaasenbrood, P. S.; Lorier, J.; Janssen, M.; De Vos, R. C.; Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and bioengineering*, 106(4), 638-648. <https://doi.org/10.1002/bit.22725>
- Lemahieu, C.; Bruneel, C.; Ryckebosch, E.; Muylaert, K.; Buyse, J.; Foubert, I. (2015). Impact of different omega-3 polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFA) sources (flaxseed, *Isochrysis galbana*, fish oil and DHA Gold) on n-3 LC-PUFA enrichment (efficiency) in the egg yolk. *Journal of functional foods*, 19, part B, 821-827. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.021>
- Mendes, A.; Reis, A.; Vasconcelos, R.; Guerra, P.; da Silva, T. L. (2009). *Cryptocodinium cohnii* with emphasis on DHA production: a review. *Journal of applied phycology*, 21(2), 199-214. <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9351-3>
- Mishra, N.; Mishra, N. (2018). Exploring the biologically active metabolites of *Isochrysis galbana* in pharmaceutical interest: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(6), 2162-2174.
- Molina Grima, E.; Sánchez Pérez, J. A.; García Camacho, F.; Fernández Sevilla, J. M.; Acien Fernández, F. G. (1994). Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 41(1), 23-27. <https://doi.org/10.1007/BF00166076>
- Molino, A.; Larocca, V.; Di Sanzo, G.; Martino, M.; Casella, P.; Marino, T.; Musmarra, D. (2019). Extraction of Bioactive Compounds Using Supercritical Carbon Dioxide. *Molecules*, 24(4), 782. <https://doi.org/10.3390/molecules24040782>

- Narula, V.; Thakur, A.; Uniyal, A.; Kalra, S.; Jain, S. (2017). Process parameter optimization of low temperature transesterification of algae-Jatropha Curcas oil blend. *Energy*, 119, 983-988. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.11.043>
- Qi, B.; Beaudoin, F.; Fraser, T.; Stobart, A. K.; Napier, J. A.; Lazarus, C. M. (2002). Identification of a cDNA encoding a novel C18- Δ 9 polyunsaturated fatty acid-specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. *FEBS letters*, 510(3), 159-165. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03247-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03247-1)
- Rahman, M.; Aziz, M.; Al-khulaidi, R. A.; Sakib, N.; Islam, M. (2017). Biodiesel production from microalgae *Spirulina maxima* by two step process: Optimization of process variable. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 10(2), 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2017.02.004>
- Santos-Sánchez, N.; Valadez-Blanco, R.; Hernández-Carlos, B.; Torres-Arino, A.; Guadarrama-Mendoza, P.; Salas-Coronado, R. (2016). Lipids rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(20), 8667-8684. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7818-8>
- Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual review of food science and technology*, 9, 345-381. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>
- Sheng, J.; Vannela, R.; Rittmann, B. E. (2011). Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. *Bioresource technology*, 102(2), 1697-1703. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.007>
- Silitonga, A.; Masjuki, H.; Ong, H. C.; Mahlia, T.; Kusumo, F. (2017). Optimization of extraction of lipid from *Isochrysis galbana* microalgae species for biodiesel synthesis. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 39(11), 1167-1175. <https://doi.org/10.1080/15567036.2017.1310957>
- Sprague, M.; Dick, J. R.; Tocher, D. R. (2016). Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon, 2006–2015. *Scientific Reports*, 6, 21892. <https://doi.org/10.1038/srep21892>
- Sung, M.; Han, J.-I. (2016). Alkaline in situ transesterification of *Aurantiochytrium* sp. KRS 101 using potassium carbonate. *Bioresource technology*, 205, 250-253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.089>
- Tang, S.; Qin, C.; Wang, H.; Li, S.; Tian, S. (2011). Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. *The Journal of Supercritical Fluids*, 57(1), 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.01.010>
- Velásquez-Orta, S.; Lee, J.; Harvey, A. (2012). Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. *Fuel*, 94, 544-550. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.11.045>
- Xu, Y.; Qian, S. Y. (2014). Anti-cancer activities of ω -6 polyunsaturated fatty acids. *Biomedical journal*, 37(3), 112-119.