

CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA TOTAL EN EL EXTRACTO ETANÓLICO, PROCEDENTE DE *CHLORELLA* SP. CULTIVADA EN EFLUENTES DE LA INDUSTRIA PESQUERA

TERESITA DE J. ROMERO LÓPEZ ¹ Y
HAYDEE ECHEVERRÍA LAZO ²

¹ Centro de Investigaciones Pesqueras, MIP, Barlovento,
Santa Fe, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

² Facultad de Biología, Universidad de La Habana,
Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN.- Se desarrolló una tecnología de extracción de pigmentos (clorofila a, b y carotenos totales) procedentes de *Chlorella* sp. cultivada en efluentes de la industria pesquera, utilizando etanol como solvente orgánico. No se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el método de extracción de pigmentos con etanol y el método tradicional con acetona. El punto de inflexión para la pasta fresca, sin congelar, se obtuvo en un volumen de 304 ml (equivalente a 1.4 g de pasta), a una concentración de clorofila total de 2.7 %; y para la pasta congelada (por más de seis meses), se presentó en un peso equivalente a 2.65 g, a una concentración de clorofila total de 3.14 %. En ambos casos se emplearon 10 ml de etanol. Se demostró que existe un uso excesivo de solvente asociado a la técnica de extracción de clorofila que reporta la UNESCO. Según este método, por cada kg de pasta producida se gastan 100 L de etanol, mientras que en este estudio sólo 3.3 L, equivalente a un ahorro de 96.7 % de etanol. Si el precio actual del etanol es \$ 0.3075/L, se calcula un ahorro de \$ 0.29/L. *Recibido:* 04 Septiembre 1998, *aceptado:* 20 Noviembre 1998.

Palabras claves: Cultivo de microalgas, *Chlorella*, clorofila; extracto etanólico; concentración de clorofila, efluentes de industria pesquera, Cuba.

CONCENTRATION OF TOTAL CHLOROPHYLL IN AN ETHANOLIC EXTRACT OF *CHLORELLA* SP. CULTIVATED IN FISHING INDUSTRY EFFLUENT

ABSTRACT.- We developed a pigment extraction technology (chlorophyll a, b, and total carotenes) from *Chlorella* sp. cultivated in fishing industry effluent, using ethanol as an organic solvent. There was no significant difference ($P < 0.05$) between the pigment extraction method using ethanol versus the traditional method with acetone. The inflection point for fresh, unfrozen algal paste was obtained at a volume of 304 ml (equivalent to 1.4 g of paste), with a total chlorophyll concentration of 2.7 %. For frozen paste (more than six months old) the inflection point was obtained at 2.65 g, and with a total chlorophyll concentration of 3.14 %. In both cases, 10 ml of ethanol was used. There is an excessive use of solvent associated with the chlorophyll extraction method reported by UNESCO. In their technique, 100 L of ethanol are used for each kg of paste produced, but in our technique only 3.3 L are used. This represents a savings in ethanol of 96.7 %, or \$ 0.29/L (based on a current price of \$ 0.3075/L). *Received:* 04 September 1998, *accepted:* 20 November 1998.

Key words: Cultivation of microalgae, *Chlorella*, chlorophyll, ethanol extract, chlorophyll concentration, fishing industry effluent, Cuba.

INTRODUCCIÓN

Las primeras perspectivas en el cultivo de microalgas se concentraron en especies de agua dulce tales como *Chlorella vulgaris*, la cual se considera la microalga pionera en este tipo de estudios. Esta célula inmóvil pertenece a la clase Chlorophyceae, orden Chlorococcales.

El cultivo masivo de *Chlorella* se fundamenta en su composición química, que puede variar en función de las condiciones de crecimiento, temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes, entre

otros (Parsons y Takahashi 1973). Además de su elevado contenido proteico, también es rica en carbohidratos, vitaminas, carotenoides, clorofila, enzimas y aceites esenciales. El uso más probable es como parte de un sistema de multiuso integrado, en el cual la biomasa obtenida durante el tratamiento de aguas negras, es utilizada en la producción de alimento animal y humano, de compuestos químicos y bioquímicos, enriquecimiento de Oxígeno a la atmósfera como fijadora de Nitrógeno, en la obtención de productos de alto valor agregado, así como de diferentes gases (Soeder 1980, Becker 1981, Venkataraman y Becker 1985, Borowitzka y Borowitzka 1988).

Por lo anteriormente expuesto, nos hemos propuesto llevar a cabo el cultivo intensivo de *Chlorella* sp. en lagunas de alta velocidad, con el doble fin de depurar residuales y obtener biomasa algal, así como pigmentos de amplio uso en la industria farmacéutica. Este sistema, espectacularmente rentable y económico, resulta de probada efectividad, pues el costo del medio de cultivo (residual orgánico) es nulo y de características excepcionales.

El objetivo del presente trabajo es determinar la concentración de clorofila total en el extracto etanólico procedente de pasta congelada y sin congelar de *Chlorella* sp. cultivada en efluentes de la industria pesquera, así como el punto de inflexión de la curva de clorofila en ambas pastas. Además, se compara el método de extracción de pigmentos utilizando etanol como solvente orgánico con el método tradicional de extracción con acetona.

MATERIALES Y MÉTODOS

El cultivo de la microalga *Chlorella* sp. se desarrolló en lagunas de alta velocidad ubicada en la Empresa Pesquera INDAL, utilizando como medio de cultivo el residual líquido proveniente del proceso de descongelación, viscerado y cocción de túnidos.

Cuando el cultivo de la microalga alcanza su fase exponencial, se realiza su separación por centrifugación y se cuantifica la productividad en peso húmedo y seco. Después de este período no es

aconsejable ni económico su extracción, producto de la escasez de nutrientes que comienza a manifestarse en el medio.

Con la pasta algal, se procedió a la extracción de la clorofila con acetona extra pura y etanol al 95 % con el objetivo de valorar la posibilidad de emplear uno u otro solvente en la extracción del pigmento. Para fines farmacológicos, la acetona posee contraindicaciones para el organismo humano, resultando aconsejable su sustitución por el etanol.

La metodología utilizada para la remoción de la clorofila fue la descrita por la UNESCO (1966), y las fórmulas a la que responde su cálculo son las siguientes:

Extracto acetónico (según UNESCO 1966): $Ca = 11.64 (A_{663} - A_{750}) - 2.16 (A_{645} - A_{750}) + 0.1 (A_{630} - A_{750}) = \text{mg/L}$; $Cb = 20.97 (A_{645} - A_{750}) - 3.94 (A_{663} - A_{750}) - 3.66(A_{630} - A_{750}) = \text{mg/L}$; $Ct = Ca + Cb = \text{mg/L}$.

Extracto etanólico (según Harmutk 1987): $Ca = 13.36 (A_{664}) - 5.19 (A_{649}) = \text{mg/L}$; $Cb = 27.43 (A_{649}) - 8.12 (A_{664}) = \text{mg/L}$; $Ca + Cb = 5.24 (A_{664}) + 22.24 (A_{649}) = \text{mg/L}$.

Se efectuó un análisis de varianza al 95 % de confiabilidad con las concentraciones de clorofila total obtenidas, con el propósito de recomendar el empleo de uno u otro solvente.

El punto de inflexión de la curva de clorofila, que no es más que el punto donde se logra la mayor concentración de clorofila con la menor cantidad de solvente posible, se establece por la relación entre el volumen de cultivo o el peso de la pasta algal refrigerada y la concentración de clorofila total de la muestra. Se determinó de forma práctica y teórica, con los datos recopilados de los diferentes ensayos realizados en el laboratorio y mediante un polinomio de grado 3, respectivamente. Para ello se utilizaron dos variantes:

Pasta sin congelar.- La pasta que se obtiene de forma inmediata a la centrifugación del cultivo. Para esta variante se

tomaron diferentes volúmenes de cultivo, enmarcados en un rango entre 10 y 800 ml, los cuales fueron tratados con 10 ml de etanol. Una vez centrifugada cada muestra por un período de 5 min a 4500 rpm, se procedió a la extracción del pigmento, y se cuantificó el peso húmedo después de desechado el sobrenadante.

Pasta congelada.- Preservada por más de seis meses a -10°C . Para esta segunda variante, se tomaron diferentes muestras, oscilando los pesos de la pasta entre 0.1 y 5 gramos y se procedió a la extracción del pigmento, según la metodología ya descrita.

Se determinaron los puntos de inflexión de la clorofila a, b y carotenos totales tanto de las concentraciones de pigmentos obtenidas a partir del cultivo, como de la pasta congelada, y se calcularon los coeficientes de determinación " r^2 " para cada caso.

Para comparar la eficiencia en el uso del etanol asociado a la técnica realizada en estos experimentos, que responde a la metodología descrita por la UNESCO (1966), se diseñó una serie experimental que consistió en recolectar 12 muestras de pasta algal a razón de 0.1 g cada una. Seis de ellas fueron tratadas con 10 ml de etanol (que se corresponde con el volumen de solvente que propone la UNESCO en la técnica) y las seis restantes fueron tratadas con el volumen de etanol correspondiente al punto de inflexión (0.33 ml). Luego se procedió a la extracción del pigmento por la técnica anteriormente citada.

Para valorar si existían diferencias significativas entre las concentraciones de clorofila total extraídas por ambos volúmenes de solvente, se utilizó una prueba T.

Finalmente, se hizo una breve reseña de la cantidad de extracto que podría producirse a partir del tratamiento de las aguas residuales de la industria pesquera, considerando los datos arrojados por la investigación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

COMPARACIÓN ENTRE LA EXTRACCIÓN DEL PIGMENTO CON ACETONA Y ETANOL

Una vez realizadas las 24 extracciones de clorofila con acetona y etanol (Tabla 1), se observó que no existían diferencias significativas entre ambos tratamientos, avalado por un ANOVA de un factor, donde la F calculada (0.02) se reportó por debajo de la F tabulada (4.30).

TABLA 1. Concentraciones de clorofila total (mg/L) de la pasta de microalgas, extraídas con acetona y etanol.

Acetona		Etanol	
281.23	65.93	276.89	69.73
308.02	74.86	283.86	79.18
265.24	66.51	261.33	78.52
85.52	131.51	72.99	142.18
87.82	128.46	127.32	129.83
95.74	128.99	129.83	128.99
$\bar{x} = 143.32 (65.93-308.02)$		$\bar{x} = 148.39 (69.73-283.86)$	

La inexistencia de diferencias estadísticas, ofrece la posibilidad de elegir cualesquiera de los dos solventes para los fines de extracción del pigmento, logrando concentraciones semejantes de clorofila total con ambas variantes. Para las expectativas futuras que se persiguen con esta investigación, procede elegir el etanol por las diversas ventajas que ofrece. Una de ellas versa sobre el aspecto económico, ya que el precio del etanol es menor en comparación a la acetona, lo cual repercute en los costos del producto.

Otra ventaja que brinda la elección del etanol, es que no presenta las contraindicaciones que posee la acetona para el consumo humano. Diversos científicos prefieren prescindir de este solvente, debido a las alteraciones funcionales y/o estructurales que suelen provocar en el organismo humano, después de su ingestión

(Borowitzka y Venkataraman 1994, Comun. Pers; Cifuentes 1998, Comun. Pers.).

PUNTO DE INFLEXIÓN DE LA CURVA DE CLOROFILA

Pasta sin congelar.- Como se observa en la Figura 1, tomado del conjunto de valores de los siete ensayos realizados con diferentes volúmenes de cultivo, y la interpretación efectuada a raíz de la información arrojada por el polinomio de grado 3 (Tabla 2), el punto de inflexión de la curva se corresponde con 304 ml de cultivo tratados con 10 ml de etanol, para lograr una concentración de clorofila en el extracto del 2.7 %. En la misma tabla se presentan los distintos coeficientes encontrados al realizar la regresión de orden 3, así como la " r^2 " que fue a razón de 0.945.

Este volumen de microalga es equivalente a 1.4 g de pasta, valor promedio tomado de los datos de producción de las lagunas piloto ubicadas en INDAL y los resultados experimentales, con una humedad relativa del 70 %.

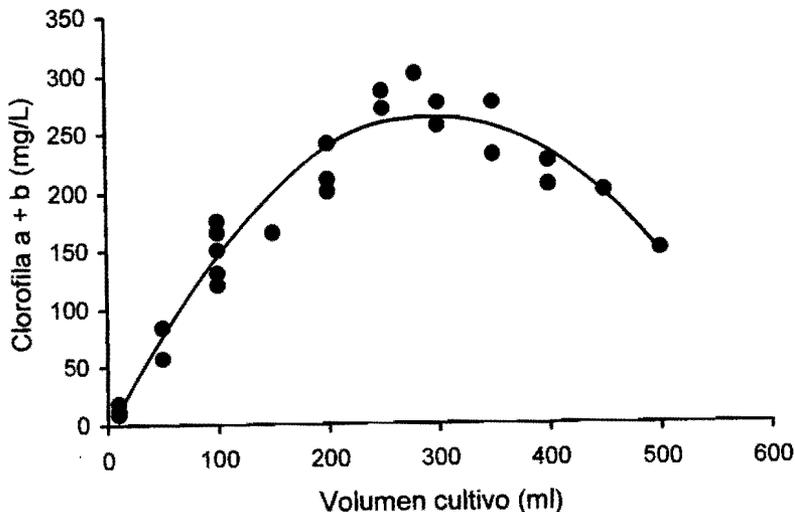


FIGURA 1. Punto de inflexión de la curva de clorofila utilizando la pasta sin congelar.

TABLA 2. Estadísticos derivados de los diferentes polinomios de grado 3, así como los puntos de inflexión para cada caso estudiado y la concentración de clorofila que se alcanza en cada uno de ellos.

PIGMENTO	b (0)	b (1)	b (2)	b (3)	r ²	P.I.	[Clorof]
PASTA SIN CONGELAR (VOLUMEN)						(ml)	(mg/L)
Clor a+b	-6.90	1.79	-2.83	-3.32	0.945	304	266.97
Clor a	-11.00	1.27	-1.82	-5.73	0.907	304	190.25
Clor b	1.06	0.29	-2.41	-4.69	0.765	314	54.76
Carot. Tot.	-2.55	0.63	-1.14	2.93	0.797	314	90.81
PASTA CONGELADA (PESO)						(g)	(mg/L)
Clor a+b	-4.77	289.17	-82.66	7.18	0.908	2.65	314.59
Clor a	-6.14	214.08	-64.86	5.94	0.923	2.55	216.59
Clor b	-3.16	66.19	-19.56	1.70	0.833	2.55	66.68
Carot. Tot.	0.23	146.08	-44.26	3.93	0.929	2.45	150.35

El rango de variabilidad entre los diferentes puntos de inflexión, para la totalidad de los ensayos, se enmarcó entre 200 y 400 ml de cultivo, tal y como se señala en la Figura 2, resultados vinculados con los valores prácticos. La fluctuación puede obedecer a la concentración celular del cultivo que no siempre es la misma, al igual que sus dimensiones, las cuales pueden influir en el contenido de pigmento.

El "r²" estuvo por encima de 0.9 excepto en el primer ensayo que fue exploratorio. A partir del segundo experimento, los valores se acotaron debido a que el punto de inflexión mantuvo cierta correspondencia con un volumen de cultivo no superior a los 400 ml y no inferior a los 100 ml.

En la misma tabla se presentan los estadísticos de referencia para la clorofila a, b y carotenos totales. Como era de esperar, los puntos de inflexión de las curvas prácticamente coincidieron con el de la clorofila total, y en cuanto a concentración, la clorofila b al

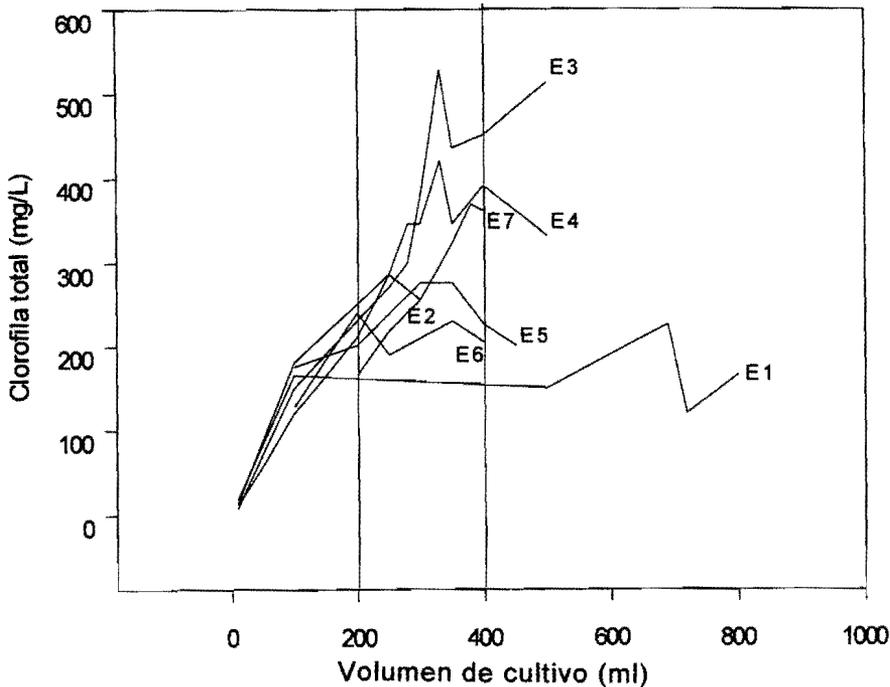


FIGURA 2. Concentración de clorofila total para los siete ensayos realizados en dependencia del volumen de cultivo.

igual que los carotenos, fueron inferiores a la clorofila a, hecho que no resulta sorprendente en las algas verdes (Venkataraman y Becker 1985, Romero *et al.* 1994).

Pasta congelada.- En la Figura 3 se observa que al tratar con etanol la pasta de microalga conservada por un período mayor de seis meses, para los dos primeros ensayos los puntos de inflexión se ubican por encima de 2g de pasta tratada con los 10 ml de solvente. A partir del tercer experimento, donde se precisó más el rango de trabajo, todos estos puntos se reportaron por encima de 2 g y por debajo de 4 g de pasta.

Esto se corroboró con el polinomio de grado 3 realizado con los datos teóricos (Fig. 4), logrando el punto de inflexión en 2.65 g de pasta y a una concentración de 314.59 mg/L de clorofila total (Tabla 2).

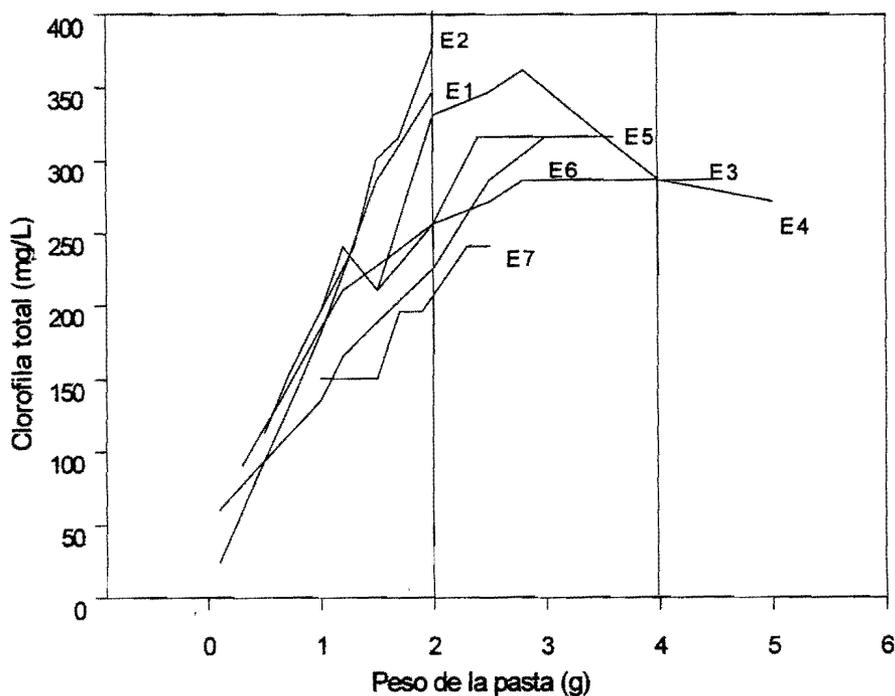


FIGURA 3. Concentración de clorofila total para los siete ensayos realizados en dependencia del peso de la pasta.

El coeficiente de determinación de 0.908 demuestra la calidad del ajuste, producto de la regresión establecida con los valores teóricos de la curva. Al igual que en el caso anterior, la concentración de clorofila b y carotenos fueron inferiores a la clorofila a, aunque los puntos de inflexión para todos los casos fueron muy semejantes entre sí (Tabla 2).

El fenómeno de la no coincidencia entre la cantidad de pasta en el punto de inflexión entre las muestras frescas y congeladas, con valores de 1.4 g para el primer caso (correspondiente a 304 ml de cultivo) y 2.65 g para el segundo, se debe precisamente al grado de humedad de la muestra.

La pasta tratada inmediatamente después de su separación del medio de cultivo, tiene una humedad relativa promedio del 70 %; sin

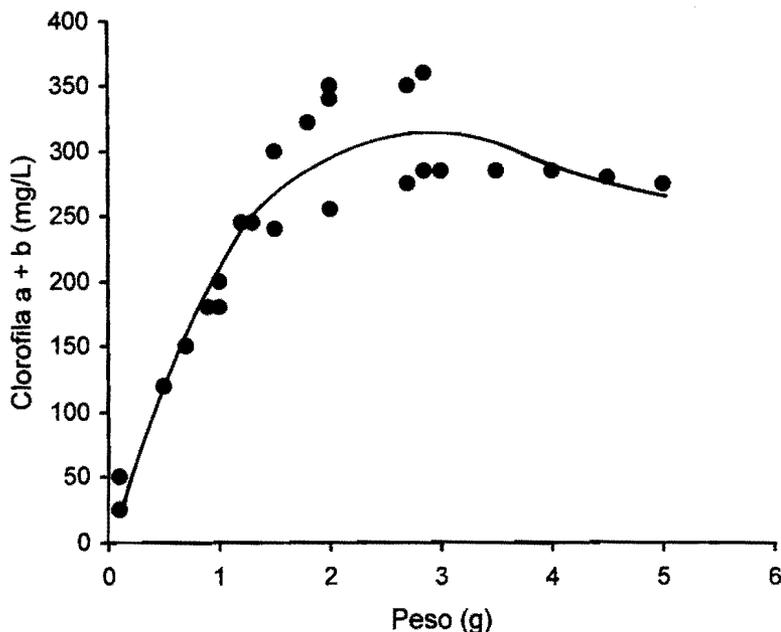


FIGURA 4. Punto de inflexión de la curva de clorofila utilizando la pasta congelada.

embargo, cuando se mantiene por un período prolongado en refrigeración, el producto se hidrata hasta alcanzar una humedad del orden del 80 %. Esto ocasiona que en estas condiciones se requiera una cantidad superior de pasta para alcanzar el punto de inflexión, aunque al tratarla con un volumen de etanol equivalente al caso anterior, la concentración de clorofila total para ambos tratamientos es del 3 %. Desde el punto de vista de concentración de clorofila en las condiciones experimentales utilizadas, no se observaron diferencias al realizar la extracción partiendo de un producto fresco o congelado.

No obstante, es más aconsejable por un problema de manejo, proceder al tratamiento de la pasta una vez efectuada la centrifugación, ya que se requiere de instalaciones más pequeñas para el procesamiento de la muestra con el solvente. Es obvio que por cada litro de extracto con una concentración de clorofila total de 3 % extraído de la pasta húmeda, se necesiten 125 g más de pasta

que si la extracción se realizara con pasta fresca, o lo que es lo mismo, 125 kg de pasta por cada m^3 de extracto.

Otra razón sería el grado de humedad de la muestra, que no siempre es el mismo. El caso estudiado se refiere a la conservación de la pasta en refrigeración por un período de seis meses, lo cual puede variar su humedad en mayor o menor grado dependiendo del tiempo de permanencia en las cámaras refrigeradas, lo que puede influir, aunque no significativamente, en el punto de inflexión.

Un tercer aspecto que debe tomarse en cuenta para la decisión de mantener por períodos prolongados la pasta en congelación, es la calidad del pigmento. No se conoce por nuestras propias experiencias si se altera o no la composición o disponibilidad de la clorofila, ya que sólo se realizaron las investigaciones con muestras congeladas, por lo que esta incógnita queda momentáneamente sin una respuesta concluyente.

USO EXCESIVO DEL ETANOL EN LA TÉCNICA DE LA UNESCO (1966)

Los resultados de la prueba Mann-Whitney con los valores obtenidos al utilizar diferentes volúmenes de solvente para la extracción del pigmento de la pasta refrigerada, demostró que no existen diferencias significativas al 95 % de confianza entre ambos tratamientos, con una F calculada de 0.29 y una F tabla de 4.96, lo que significa que existe un uso excesivo de solvente asociado a esta técnica, para finalmente lograr la misma concentración de clorofila total. Este aspecto es muy importante a la hora de valorar el empleo del reactivo en términos comerciales, donde se extraen cantidades considerables de pigmentos para usos diversos, aumentando por consiguiente el costo de producción del extracto en cuestión.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

La cantidad de pasta que se puede obtener al cabo de los siete días de permanencia de las microalgas en el medio de cultivo, antes de su extracción, es de aproximadamente 4.5 kg/m^3 (Romero 1996) y por cada 1.4 g de pasta se obtienen 10 ml de extracto alcohólico

con una concentración de clorofila de 3 %. Esto representa un total de 32 litros de extracto por cada m³ de cultivo, los cuales coinciden también con lo señalado anteriormente, considerando el volumen de microalga utilizado para los mismos fines. Por cada 304 ml de cultivo se obtienen 10 ml de extracto al 3 % de concentración de clorofila total.

A partir de esta información, se facilita el cálculo a priori de la productividad que puede lograrse en un sistema productivo de cualquier volumen, siempre que se respeten las normas de construcción de los estanques y el manejo por parte del personal entrenado para estos fines, tal como lo señala Romero (1996) en su trabajo sobre cultivo y aprovechamiento de *Chlorella* sp.

Asociado a la técnica de extracción que propone la UNESCO (1966) y analizando la información recopilada en estas investigaciones referente a la cantidad de solvente requerida para la mayor extracción de clorofila de las microalgas, se calculó un ahorro de \$ 0.0029 con relación al volumen de etanol que plantea la UNESCO, o lo que es lo mismo, \$ 0.29/L de etanol utilizado al 95 % de pureza, conociendo que el precio de este solvente está en el orden de \$ 0.3075/L.

CONCLUSIONES

- 1) El contenido de clorofila total no difiere al realizar su extracción con etanol en comparación con la acetona.
- 2) El punto de inflexión teórico de la curva de clorofila de la pasta congelada se encontró utilizando 1.25 g más de pasta que la empleada al tratar la pasta sin congelar.
- 3) La concentración de clorofila total fue prácticamente igual en el punto de inflexión para la pasta congelada y sin congelar.
- 4) Según la técnica reportada por la UNESCO (1966), existe un uso excesivo de etanol para realizar la extracción del pigmento, comparado a los resultados obtenidos en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Se le agradece al biólogo Gerardo Suárez su activa participación en este trabajo, brindando toda su experiencia y sabiduría, así como a los técnicos Dolín Hernández y Amauri Fernández. También a la Empresa INDAL donde se desarrollaron las investigaciones.

LITERATURA CITADA

- BECKER, E. W. 1981. Algae mass cultivation, production and utilization. *Process Biochemistry*. aug/sept: 10-15.
- BOROWITZKA, M. A. Y L. J. BOROWITZKA. 1988. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge Univ. Press, New York, 477 pp.
- HARMUTK, L. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*. Vol 148(34): 350-382. Academic Press.
- PARSONS, T. R. Y M. TAKAHASHI. 1973. *Biological Oceanographic Processes*. Pergamon Press, New York, 220 pp.
- ROMERO, L. T., A. D. ALFARO Y G. SUÁREZ. 1994. Efecto del techado de las lagunas de cultivo en la producción mixotrófica de *Chlorella vulgaris* al aire libre. Tesis de Grado, Univ. La Habana, 16 pp.
- ROMERO, L. T. 1998. Tecnología de cultivo de *Chlorella vulgaris* en los efluentes líquidos de la industria pesquera y subproductos derivados. Anais dos IV Congr. Latino-americano de Ficología, II Reuniao Ibero-americana de Ficología e VII Reuniao Brasileira de Ficología, Soc. de Ficologica da America Latina e Caribe, pp. 475-495.
- SOEDER, L. J. 1980. The scope of microalgae for food and feed. *En G. Shelef y C. J. Soeder (Eds.), Algae Biomass. Production and*

Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 9-20.

UNESCO. 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea water. Monograph on Oceanographic Methodology, 69 pp.

VENKATARAMAN, L. V. Y E. W. BECKER. 1985. Biotechnology and utilization of algae. The Indian Experience. New Delhi, India, 257 pp.