

# Desarrollo de un procedimiento para la extracción de $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.* en la salina Las Cumaraguas

*Development of a Procedure for the Extraction of  $\beta$ -Carotene and Glycerol from the Microalga *Dunaliella Sp.* at Las Cumaraguas Saltworks*

MSc. Noel J. Acacio-Chirino<sup>1</sup>; Dra. Lourdes M. Zumalacárregui-de-Cárdenas<sup>2</sup>; Ing. Johemar C. Almera-Medina<sup>1</sup>; Ing. Dilia M. Barreno-Medina<sup>1</sup>; Ing. Rosa A. Betancourt-Betancourt<sup>1</sup>; Ing. Rafmery L. Colina-Luchón<sup>1</sup>;

Lic. José A. Araujo-Blanco<sup>3</sup>

[noel\\_acacio@hotmail.com](mailto:noel_acacio@hotmail.com); [johemarmalmera@gmail.com](mailto:johemarmalmera@gmail.com); [dmarybarreno@hotmail.com](mailto:dmarybarreno@hotmail.com); [rosabetancourt\\_2@hotmail.com](mailto:rosabetancourt_2@hotmail.com); [rafmery19@gmail.com](mailto:rafmery19@gmail.com); [umeunefm@gmail.com](mailto:umeunefm@gmail.com); [lourdes@quimica.cujae.edu.cu](mailto:lourdes@quimica.cujae.edu.cu)

<sup>1</sup>Universidad de Camagüey "Ignacio Agramonte Loynaz", Camagüey, Cuba; <sup>2</sup>Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría", Habana, Cuba; <sup>3</sup>Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", U.N.E.F.M., Venezuela

## ● Resumen

El objetivo de la presente investigación consiste en el desarrollo de un procedimiento para la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.* en la salina Las Cumaraguas, con la finalidad de aplicar tecnologías que apunten a la generación de un producto con interés farmacéutico, alimenticio y cosmético a partir de cultivos de microalgas. Para lograr la extracción de estos componentes se establecen las condiciones fisicoquímicas de desarrollo de la microalga *Dunaliella sp.*, evaluar la cinética de reacción de producción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.*, establecer el flujo tecnológico del proceso y evaluar la factibilidad económica a partir del esquema tecnológico propuesto. La revisión bibliográfica permitió establecer los métodos de extracción y la caracterización de las muestras se realizó mediante técnicas cromatográficas que permitieron identificar la presencia de  $\beta$ -caroteno, obteniendo un porcentaje de rendimiento de 45,18 %.

Palabras clave: extracción,  $\beta$ -caroteno, glicerol, *Dunaliella sp.*, tecnologías.

## ● Abstract

The purpose of this research is to develop a process for the extraction of  $\beta$ -carotene and glycerol from the *Dunaliella sp.* microalga at Las Cumaraguas saltworks, in order to apply technologies aimed to generate a product with pharmaceutical, food and cosmetics purposes sustained with microalgae cultivation. To achieve the extraction of these components some phases are established: Establish physicochemical conditions of growth of the *Dunaliella sp.* microalga. Assess the kinetic of production reaction of  $\beta$ -carotene and glycerol from the *Dunaliella sp.* microalga. Establish technological flow of the process and evaluate the economical feasibility from the technological scheme aimed. The literature review allowed to establish the extraction methods and characterization of the samples was performed by chromatographic techniques which allowed to identify the presence of  $\beta$ -carotene, obtaining a 45,18 % yield percentage.

Keywords: extraction,  $\beta$ -carotene, glycerol, *Dunaliella sp.*, technologies.

## ● Introducción

Uno de los flagelos que se ha apoderado de gran parte de la humanidad en este siglo es, sin duda alguna, el hambre. En África mueren millones de personas desnutridas anualmente y sobre todo niños que no llegan a la edad de la adolescencia. A esto se suma el surgimiento de enfermedades producto de la no ingesta de ciertos alimentos necesarios para la vida humana. Además, dentro de los alimentos están también diferentes compuestos que pueden ser empleados en la industria farmacéutica, para luchar contra penosas enfermedades.

En consecuencia, en el mundo se creó, desde 1945, un organismo de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, conocida como FAO (por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization of the United Nations), al que se adhirió Venezuela en julio de 1992, cuando apareció publicada en la Gaceta Oficial N° 35.003 la ley aprobatoria del acuerdo entre la República de Venezuela y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) relativo al establecimiento de la representación de la FAO en el país. Sin embargo, es en el gobierno bolivariano, donde más se ha contribuido con este organismo.

El presidente Hugo Chávez concibió una estrategia para fomentar la soberanía del país en este rubro, y recientemente explicó que: "Nos habían impuesto el modelo monoprodutor petrolero" y recordó con insistencia los millones de hectáreas abandonadas por administraciones anteriores y recuperadas para producir alimentos destinados al pueblo, explicó que hemos avanzado, pero aún falta más /1/.

En Venezuela fueron registradas, para finales de 2009, 89,875 personas con VIH/Sida, con una prevalencia de 161,510 casos de VIH/Sida, y por consiguiente hace falta no solo acciones de prevención y promoción, sino también medicamentos y una dieta alimentaria efectiva /2/.

Estas exigencias del gobierno bolivariano conducen a la búsqueda de vías para aportar a la solución de tan importante problema, y una de ellas es la producción de compuestos para la industria farmacéutica a partir de alimentos, como puede ser la provitamina A, a partir de carotenoides.

Los pigmentos carotenoides son compuestos responsables de la coloración de gran número de alimentos vegetales y animales, como zanahorias, zumo de naranja, tomates, salmón y yema del huevo. Desde hace muchos años, se sabe que algunos de estos compuestos, como  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, así como la  $\beta$ -criptoxantina, son provitaminas A. No obstante, estudios recientes han puesto de manifiesto las propiedades antioxidantes de estos pigmentos, así como su eficacia en la prevención de ciertas enfermedades del ser humano, como la aterosclerosis o incluso el cáncer. Todo ello ha hecho que desde un punto de vista nutricional, el interés por estos pigmentos se haya incrementado notoriamente /3/.

La vitamina A es esencial para la visión nocturna y necesaria para mantener sanos la piel y los tejidos superficiales. Puede aportarse como tal vitamina, llamada retinol, como algunos análogos menos activos, o como sus precursores, los carotenoides. El retinol es un alcohol cíclico, insaturado, de veinte átomos de carbono, compuesto por un núcleo de  $\beta$ -ionona y una cadena lateral insaturada. En la molécula de retinol existen cinco dobles enlaces conjugados, incluido el doble enlace del anillo de  $\beta$ -ionona que está conjugado con los de la cadena lateral. Este suplemento es esencial para el buen estado no solo de la piel, cabello, mucosas y ojos, sino también del sistema inmunológico.

Desde hace tiempo se viene postulando que los carotenoides actúan como potenciadores positivos de la respuesta inmune. En este sentido, parece ser que elevadas dosis de  $\beta$ -caroteno aumentan el ratio entre los linfocitos CD4 y CD8, que es muy bajo en enfermos de VIH /4/.

Sin embargo, el hecho de que los carotenoides estén suscitando últimamente un gran interés se debe a una serie de estudios que demuestran su actividad antioxidante. Desde un punto de vista nutricional, se puede definir un antioxidante como aquella sustancia presente en los alimentos que disminuyen significativamente los efectos adversos de especies reactivas como las del oxígeno y el nitrógeno, en condiciones fisiológicas normales en humanos /5/.

En el país se espera que el desarrollo industrial esté enfocado en proyectos vinculados a la infraestructura de servicios conexos para todas las empresas; al financiamiento, a la articulación y a las gestiones que deben hacerse ante instancias del Gobierno; se pretende que guarden relación con las mejoras que habrá que hacer a los servicios. Por otra parte se está tratando de que la distribución territorial de las empresas esté asociada a la zona, es decir, que las empresas que se instalen se adecuen a las potencialidades del lugar /6/.

El estado Falcón no escapa de esta situación, y ello se evidencia en el gran auge industrial que existe en la Península de Paraguaná, donde, aparte de la actividad petrolera, ha surgido una gran cantidad de fábricas que le han dado importancia económica al estado; se destaca el aprovechamiento de los recursos de que se dispone en las cercanías de las comunidades que hacen vida en la región.

La comunidad de Las Cumaraguas, ubicada al noreste de la Península, específicamente en el municipio Falcón, posee un sitio natural tipo salina, el cual es un gran atractivo turístico, donde se desarrolla la microalga *Dunaliella sp.*

*Dunaliella salina* es un alga clorofita predominante en ambientes hipersalinos, caracterizada por acumular grandes cantidades de carotenoides, llegando hasta 14 % de su masa seca, lo que la convierte en una fuente potencial de  $\beta$ -caroteno natural de importancia para el uso en las industrias alimenticias y farmacéuticas, así como una herramienta útil para estudios bioquímicos relacionados con biosíntesis de pigmentos y mecanismos de regulación ante ambientes extremos. Diversos estudios han demostrado que la producción de carotenoides en *Dunaliella salina* puede optimizarse mediante variaciones de las condiciones de cultivo, las cuales incluyen aumento de la salinidad, intensidad luminosa y temperatura /7/.

Otros estudios abarcan el aprovechamiento de esta microalga con la finalidad de producir  $\beta$ -caroteno natural y glicerol que es utilizado como materia prima en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica, tal como lo demuestran Ben-Amotz, Borowitzka, Raja *et al.* (Abu-Rezq *et al.*, 2010), (Hejazi,

Andrysiewicz, Tramper & Wijffels, 2003), (Hernández, Quintana & Morris, 2000), (Romero, Guevara, D'Armas & Lodeiros, 2008), (Tovar, Yegres & Yegres, 2007), entre otros, donde establecen las diversas condiciones de desarrollo de la microalga, así como algunos métodos de obtención de estos compuestos de alto valor para la industria nacional.

Existen muchas investigaciones referidas al estudio del comportamiento de *Dunaliella sp.*, dentro de las cuales están diversos métodos de extracción de  $\beta$ -caroteno a escala de laboratorio, sin embargo existen pocos enfoques respecto a la proyección de la posibilidad de su producción a escala industrial al momento del desarrollo de esquemas tecnológicos para tal fin.

El objetivo de la presente investigación, la cual constituye un proyecto en desarrollo, es desarrollar un procedimiento para la extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.* en la salina Las Cumaraguas. Para lograr la extracción de estos componentes se crean como fases: establecer las condiciones fisicoquímicas de desarrollo de la microalga *Dunaliella sp.*, evaluar la cinética de reacción de producción de  $\beta$ -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.*, establecer el flujo tecnológico del proceso y evaluar la factibilidad económica a partir del esquema tecnológico propuesto.

## Fundamentación teórica

Algunos investigadores han destacado la importancia para su uso en la industria de las microalgas, las cuales de acuerdo al medio y las condiciones en que se desarrollan, producen compuestos específicos de interés, tal como lo explica (Gómez, 1997)/8/.

### *Utilización de las microalgas en la Industria Médico-Farmacéutica y Cosmética*

La mayoría de las drogas útiles para el hombre son de origen natural. Hasta hace algunos años, la fuente primaria eran las plantas terrestres. Sin embargo, aproximadamente el 70 % del planeta está cubierto por agua, por lo que muchos organismos acuáticos han sido objeto de estudio y explotación comercial, fundamentalmente las macroalgas, mientras que

numerosas especies de microalgas representan hoy un recurso natural no explotado.

Una de las aplicaciones más interesantes de las microalgas es la relacionada con las sustancias de interés químico-farmacéutico, debida a la utilidad práctica que estas encuentran en biomedicina, farmacología, fitocosmética y en la industria alimentaria.

A partir de diferentes especies de microalgas se extraen sustancias como vitaminas, pigmentos, alcoholes, aminoácidos, polisacáridos sulfatados, glicerol, ácidos grasos poliinsaturados, enzimas, extractos acuosos reguladores del crecimiento, ceras, biosurfactantes, fosfolípidos, lecitinas, betaínas y precursores de prostaglandinas, dependiendo de las que sean capaces de sintetizar, así como sustancias con efectos terapéuticos como: cicatrizantes, inmunorreguladores, anticancerígenos, tensorreguladores, antiinflamatorios, hipocolesterolémicos, entre otros.

La extracción de sustancias de interés químico-farmacéutico a partir de microalgas se remonta a los trabajos de Von Esenbeck en 1836, quien extrajo ficocianina de una cianobacteria; desde entonces los avances en este campo han sido numerosos.

*Dunaliella salina* y *Dunaliella bardauril* son muy valiosas por su alto contenido en  $\beta$ -caroteno, además de ser fuentes de glicerol y proteína; aunque estos son los tres productos de mayor interés comercial en estas microalgas, pueden incluirse, además, vitaminas, enzimas, como la glicerol deshidrogenasa, ácidos grasos y reguladores del crecimiento.

Finalmente el autor destaca que estas han sido algunas de las especies más citadas por sus beneficios bien establecidos y el desarrollo alcanzado en sus tecnologías de cultivo, por lo que su explotación comercial ha sido posible; sin embargo, hay muchas otras especies valiosas de microalgas, fuentes de productos útiles para el hombre.

### **Sustancias de interés químico-farmacéutico obtenidas a partir de microalgas**

#### *Pigmentos: distribución y aplicaciones*

Gómez (1997) explica que los pigmentos son moléculas orgánicas de mucha utilidad en la industria alimentaria, química y farmacéutica, así como en

biomedicina, cosmetología y acuicultura. Las algas contienen los tres grupos de pigmentos fotosintéticos mayoritarios: clorofilas, que absorben luz azul y roja; carotenoides, que absorben en la región del verde y el azul; y ficobilinas, que absorben luz verde, amarilla y anaranjada. Por medio de estos pigmentos, que aparecen asociados a proteínas en el cloroplasto, se lleva a cabo la absorción de la luz en toda la zona del espectro visible y gracias a ellos se realiza la fotosíntesis.

Además de la importancia fisiológica y el papel que juegan los pigmentos en la vida de los organismos fotosintéticos, estos constituyen valiosos productos al servicio de las necesidades del hombre. Se pueden citar autores que explican la utilización de las ficoeritrinas como colorante fluorescente en inmunoensayos, de las ficocianinas en fitocosmética, además de su amplio uso como moduladores de la respuesta inmune, otros destacan el uso de diferentes carotenoides como colorantes alimentarios, implicados en la calidad de productos de origen animal, así como la utilización de derivados de la clorofila en la conservación de alimentos y como aditivos en diferentes preparaciones farmacéuticas y cosméticas.

#### **Carotenos y xantofilas**

Respecto a los carotenos, Gómez (1997) resalta que los carotenoides son pigmentos isoprenoides poliénicos muy hidrofóbicos, derivados del licopeno. En contraste con las plantas superiores, numerosas especies de algas, exceptuando la mayoría de las clorofíceas, acumulan en el cloroplasto una gran variedad de carotenoides, característicos e inusuales.

Las xantofilas, son también muy diversas y sus características dependen de la naturaleza del caroteno que les de origen (epoxi, ceto o hidroxilo), ya que no son más que derivados oxigenados de estos pigmentos. Las Chlorophyta generalmente contienen los mismos carotenoides mayoritarios que las plantas superiores:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína, neoxantina y los componentes del ciclo de las xantofilas; sin embargo, algunas especies acumulan xantofilas inusuales como la loroxantina o pyrenoxantina.

También se explica que bajo condiciones de estrés, especialmente déficit de nitrógeno, muchas especies de algas verdes se tornan rojas o anaranjadas debido

a la formación de grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno o combinaciones de sus cetoderivados: equinenona, hidroxiequinenona, cantaxantina, hidroxicantaxantina y astaxantina. Estos carotenoides secundarios se acumulan fuera del cloroplasto en forma de gotas (glóbulos) liposolubles, o bien en la pared celular, asociados con la esporopolenina, un polímero estructural del cual pudieran ser precursores.

### **Efectos de las condiciones ambientales sobre los cultivos de microalgas**

En el cultivo de microalgas, el rendimiento depende de factores como la viabilidad y concentración celular, el suministro de nutrientes, el control de parámetros físico-químicos como el pH, la salinidad y la temperatura; las condiciones de iluminación y la disponibilidad de la luz; esta constituye un factor fundamental tanto por sus efectos como por sus interacciones con otros parámetros.

### **Producción de $\beta$ -caroteno**

*Dunaliella sp.* es un organismo fotosintético capaz de generar una variedad de productos con interés industrial; de aquí deriva el interés científico y socioeconómico que estas pequeñas plantas acuáticas presentan para ramas como la biotecnología. Entre los compuestos de gran interés comercial a partir de *Dunaliella sp.* los carotenoides sobresalen precisamente y de estos es el  $\beta$ -caroteno el caroteno que en mayor cantidad se presenta en las cepas de *Dunaliella sp.* (García *et al.*, 2005) /9/.

También García (2005) precisa que la obtención de  $\beta$ -caroteno como compuesto de alta pureza está relacionada con una serie de reacciones de síntesis química clásica, en procesos que hoy en día son objeto de polémica al considerarse que vías alternativas partiendo de fuentes de origen natural vía fermentación, o productos naturales unidos a procesos de extracción empleando solventes y condiciones de reacción menos problemáticas, pero que son factibles.

Está demostrado que los carotenoides y demás componentes terpénicos derivados en general y específicamente el  $\beta$ -caroteno, en particular, pueden obtenerse a partir de diferentes fuentes naturales, vegetales, algas, hongos, entre otros. Con esto se

buscan métodos de extracción seguros, que puedan extraer con eficiencia y pureza los debidos carotenoides.

En lo que se refiere a la extracción de  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella sp.*, Mojaat y colaboradores presentan una nueva estrategia de selección de disolvente proporcionando información experimental nueva para la selección de disolventes orgánicos adecuados para la extracción de  $\beta$ -caroteno de *Dunaliella salina*, donde el  $\beta$ -caroteno se extrae en disolventes orgánicos o aceites comestibles, directamente y después las células se rompen por osmosis o shock mecánico lo que lleva a una disminución significativa de la cantidad de trabajo experimental requerida /10/.

El investigador presenta varios métodos de extracción de  $\beta$ -caroteno a partir de algas con los métodos adecuados a cada solvente, un biodisolvente orgánico compatible está en contacto con la fase acuosa donde las células están llevando a cabo la bioconversión; el producto se extrae de forma continua en la fase orgánica debido a un efecto de la permeabilidad del disolvente en la celda membrana.

Sólo los disolventes que tienen un valor de coeficiente de partición, indicador de su hidrofobicidad, mayor que 5 o una masa molar superior a 150 g/mol, son aplicables para la extracción biocompatible de  $\beta$ -caroteno a partir de *Dunaliella salina*. Sin embargo, para la selección más racional de los solventes, compuestos de éter, cetona y alcohol se calculó aplicando el modelo de Osborne, donde la predicción de la toxicidad de cualquier disolvente dado en dos fases líquidas del sistema utilizando *Dunaliella salina* fue posible hasta cierto punto la inducción y la extracción de  $\beta$ -caroteno.

La prueba de la eficacia de la extracción de mezclas de disolventes puso de manifiesto que la mezcla de un disolvente altamente apolar (por ejemplo, decano) con un uno más polar ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MEK) combina la propiedades deseables de cada uno: unos pocos volúmenes de disolvente polar tiene permitido una mejor extracción de  $\beta$ -caroteno, mientras el solvente orgánico polar es biocompatible cuando se añade el solvente biocompatible (decano). Sin embargo, la selección de disolvente polar es complicada. Esta investigación puede dar una idea de

los diferentes solventes que permiten realizar una mejor cuantificación de  $\beta$ -caroteno a partir de la microalga y que, dependiendo de los solventes disponibles, podrían utilizarse compuestos similares en las muestras de *Dunaliella* de la salina Las Cumaraguas.

En el estudio de la inducción y extracción de  $\beta$ -caroteno en muestras de *Dunaliella salina* en dos localidades: la primera, un área de aguas estancadas en Bubiyan Island, una localidad aislada de Kuwait, la segunda, una muestra traída desde Perth en Australia, se mantuvieron y produjeron cultivos puros /11/.

Un conjunto de experimentos se llevó a cabo para estudiar y evaluar los factores de estrés ambientales requeridos para la inducción de  $\beta$ -caroteno en el laboratorio simulando las condiciones en el mar, en tanques de  $200 \cdot 65 \cdot 25 \text{ cm}^3$  y con cantidades de sal establecidas por recomendaciones de expertos. Las extracciones de carotenoides se realizaron a escala de laboratorio por análisis espectrofotométrico y la determinación cualitativa de  $\beta$ -caroteno por cromatografía en columna (HPLC).

Los resultados mostraron que las dos muestras de *D. salina* tendían a cambiar de color, de verde a amarillo o marrón bajo las siguientes condiciones de cultivo: salinidad alta (200 a 250 unidades prácticas de salinidad) y temperatura elevada ( $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), alta intensidad de luz ( $55 \cdot 10^3 \text{ lux}$ ) y bajas concentraciones de medios de cultivo, es decir, en el 25 % de cualquiera de los dos medios de cultivos comerciales de algas.

Otro conjunto de ensayos se llevó a cabo para extraer  $\beta$ -caroteno utilizando el método de extracción de fluidos a presión. Los resultados obtenidos mostraron que las muestras de *D. salina* contenían cantidades relativamente buenas de  $\beta$ -caroteno  $33,8\text{-}96,5 \text{ pg. célula}^{-1}$ . Debido al éxito y alentadores resultados obtenidos en este estudio, se recomienda que se lleve a cabo una producción a escala piloto de *Dunaliella salina* cultivada utilizando canalizaciones exteriores de poca profundidad.

Casal B. (2010) /12/ en su tesis doctoral "Caracterización de la Radiación Ultravioleta en la Provincia de Huelva e Incidencia en la Productividad y el Valor Biotecnológico de Cultivos de Interés

Comercial", destaca que el interés por conocer los efectos de la radiación solar ultravioleta (UV) recibida a nivel superficial sobre la Biosfera ha aumentado considerablemente en los últimos años. Sin embargo, el análisis de los efectos de los niveles naturales de radiación UV sobre especies individuales despierta menos interés en la comunidad científica. A lo largo de su trabajo se caracterizaron los niveles de radiación ultravioleta (dosis total, UV-A y UV-B) y fotosintéticamente activa (PAR) que se reciben en la costa occidental de la provincia de Huelva. Para ello, se llevó a cabo un análisis correspondiente al período 2004-2006, empleando las bases de datos existentes en la Estación de Sondeos Atmosféricos (ESAt) del Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial, INTA.

Este estudio ha permitido evaluar el riesgo al que estaría sometida la población expuesta a la radiación ultravioleta, especialmente en verano, y conocer cómo se distribuye temporalmente la radiación solar en las bandas espectrales citadas. Además, se han analizado los índices de claridad para la región visible del espectro con la intención de valorar la transparencia de la atmósfera y la estabilidad meteorológica mensual en nuestra región. Seguidamente, se analizó la influencia de la radiación UV sobre dos cultivos vegetales de valor comercial: la microalga *Dunaliella salina* y la fresa.

Se destaca la importancia del cultivo de microalgas como actividad biotecnológica moderna con fines de tratamiento y para producción de biomasa. Estas actividades se desarrollaron en las últimas décadas en previsión de la escasez y encarecimiento de los productos derivados del petróleo.

Esta investigación resalta la tecnología del cultivo de *Dunaliella*, la cual puede hacerse mediante cultivos a gran escala: cultivo extensivo, desarrollado sin agitación, con un control mínimo de las condiciones ambientales; cultivo intensivo, usando una alta tecnología para controlar los factores que afectan el crecimiento y bioquímica del alga; y cultivo muy intensivo, el cual se realiza en fotobiorreactores cerrados (PRRs), los cuales permiten establecer los medios más apropiados para la obtención de cantidades de  $\beta$ -caroteno.

El autor destaca que dentro de los factores que estimulan la acumulación de carotenoides están las variables ambientales: calidad e intensidad de luz y temperatura y los factores nutricionales: compuestos químicos, sales y limitación de nutrientes.

Tras obtener una caracterización descriptiva de los niveles de radiación UV y PAR, se han estudiado tres cepas de *Dunaliella* en cultivos bajo condiciones controladas de laboratorio para decidir cuál de ellas podría ser más apropiada para el cultivo exterior. En esta parte de los trabajos se analiza el efecto de radiaciones UV-A y UV-B sobre la productividad y valor biotecnológico de cultivos de microalgas, constatando el valor potencial de la radiación ultravioleta (UV), fundamentalmente la menos energética, UV-A, en la estimulación de la acumulación de carotenoides sin pérdida de viabilidad.

Asimismo, se ha confirmado el papel esencial de la radiación UV-B en la acumulación de  $\beta$ -caroteno y en detrimento de la viabilidad celular de los cultivos, después de cortos períodos de iluminación con una alta relación UVB/PAR. La cepa de *Dunaliella* que resultó más adecuada para continuar con la investigación en cultivos exteriores fue el mutante obtenido por el grupo (*Dunaliella* EMS). La mencionada microalga mostró un crecimiento rápido, una buena capacidad de adaptación a las condiciones exteriores y niveles cuantitativamente comparables al de otras cepas del género (*Dunaliella bardawil*) el cual es de un 15 % mayor en cuanto a la acumulación de carotenoides.

*Dunaliella* EMS ha sido ensayada en condiciones exteriores de cultivo para analizar la influencia de la radiación ultravioleta sobre su productividad y la acumulación de carotenoides. Igual, se han desarrollado estudios acerca de la estrategia más conveniente modificando la calidad de luz en el rango visible (PAR) a la hora de producir cultivos de *Dunaliella*. Para cerrar los trabajos realizados con microalgas, se ha llevado a cabo, a escala piloto, una experiencia de cultivo exterior en sistemas de mayor volumen en tanques de 300 L.

Por otra parte, dada la importancia socioeconómica del sector de la fresa en la provincia de Huelva, se ha evaluado el efecto de la radiación ultravioleta sobre

cultivos de las variedades "Camarosa" y "Ventana" desde el punto de vista tanto de la productividad del fruto como de su calidad nutricional. Los resultados obtenidos manifiestan que la productividad de los cultivos se ve incrementada en ausencia de radiación ultravioleta.

Esta investigación es de mucha importancia, ya que refleja la importancia de la utilización de cultivos de microalgas con diversos fines y las condiciones ambientales a las que se deben cultivar dichas especies para obtener rendimientos de  $\beta$ -caroteno. Por otra parte el trabajo destaca que el cultivo de esta microalga se puede realizar bajo diversas formas dependiendo de los recursos que se tengan al alcance, lo cual es de provecho para esta investigación ya que es un factor clave a la hora de realizar esquemas tecnológicos y evaluar factibilidades económicas al realizar la proyección a escala industrial.

En Venezuela, las investigaciones relacionadas con el cultivo y extracción de carotenoides a partir de *Dunaliella sp.* se refieren en el trabajo "Cuantificación de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno en dos cepas de *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Volvocales) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela" (Romero, *et al.*, 2008) /13/. El objetivo principal de esta investigación fue separar e identificar los carotenoides totales y en especial el  $\beta$ -caroteno. La identificación y cuantificación del  $\beta$ -caroteno en este estudio se realizó mediante una Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC), haciendo uso de un patrón comercial o estándar. Se probaron diferentes mezclas de solventes: acetona/agua, acetona/metanol y tetrahidrofurano/etanol, en tres proporciones cada una, 50/50, 70/30 y 90/10 V/V para obtener la mayor cantidad de estos carotenoides. Esta investigación contribuye con la metodología utilizada para la extracción de carotenoides totales y en especial  $\beta$ -carotenos a partir de cepas de *Dunaliella sp.* a partir de diversos solventes en particular, lo cual permite establecer un método de extracción dependiendo de la disponibilidad de estos en el laboratorio.

Por otra parte Tovar y col. 2007 /14/ en el trabajo "Análisis físico-químico y estudio de microalgas y hongos de las aguas de la salina «Las Cumaraguas» en Paraguaná, Estado Falcón", se describieron

microalgas y hongos, al mismo tiempo que se descartó la presencia de *Escherichia coli*. Este trabajo se caracterizó por la metodología dentro de la cual se analizó parte de las condiciones fisicoquímicas de la salmuera en Las Cumaraguas.

Para cumplir con los objetivos, en el trabajo se tomaron cinco (5) muestras semanales en un período de cinco (5) semanas entre marzo y abril. Los análisis fueron realizados en los laboratorios de la UNEFM según la metodología descrita en la American Public Health Association (1989). Mediante la observación directa a microscopio de luz se identificó la microalga *Dunaliella sp*; además de esto se hicieron pruebas de tolerancia a diferentes niveles de salinidad. Este trabajo sirve como orientación durante la caracterización físico-química y microbiológica de las microalgas, así como también para el desarrollo de cada uno de los métodos empleados para los parámetros determinados como pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad eléctrica, entre otros, que proporcionarían conocimientos sobre los valores que esta microalga en particular puede tener y que sirven para tener una idea de los parámetros en la zona de estudio.

En ese mismo sentido, Araujo J., Chirinos J., & Vegas (2012) realizaron una investigación titulada "Obtención de  $\beta$ -carotenos con fines industriales a partir de biofactorías fotosintéticas de *Dunaliella sp*. del sector Las Cumaraguas, municipio Falcón, estado Falcón", la cual consistió en la obtención de  $\beta$ -carotenos a partir de biofactorías fotosintéticas de *Dunaliella sp*, para su posible uso industrial, obtenidas en el sector Las Cumaraguas, Municipio Falcón, Estado Falcón, a través de una investigación de tipo descriptiva y de campo /15/. Se tomaron muestras de 10 estaciones por triplicado, luego se caracterizó la presencia de *Dunaliella sp*, a través de un estudio por microscopía óptica. Se determinaron las condiciones fisicoquímicas de la microalga, obteniéndose un rango de valores de pH (de 6,82 a 7,69); oxígeno disuelto (OD) (1,833 a 2,80 mg/L); nitrógeno total (2,720 y 5,467 ppm); conductividad eléctrica (0,582 a 0,580 S/cm); salinidad (0,265 a 0,378 S/cm), en lo que respecta al fósforo total, cantidad mínima detectable. Se aplicaron ensayos de factibilidad donde el método más efectivo fue el método manual con un rendimiento de 68,68 %

reflejando que la vibración ocasionada por la centrifugación (61,8 %) y la sonicación (47,29 %) originan cambios en las moléculas y probablemente esto se deba a efectos en la disrupción molecular y aumento de la temperatura. Se utilizaron solventes con alta solubilidad sobre los carotenos, la acetona para la extracción de los pigmentos totales y hexano en la obtención de  $\beta$ -caroteno.

La caracterización de las muestras se realizó mediante técnicas cromatográficas que permitieron identificar la presencia de  $\beta$ -caroteno con un patrón de referencia, el cual fue solidificado para su posible uso industrial, obteniendo un porcentaje de rendimiento de  $\beta$ -carotenos extraído respecto a los pigmentos totales y los carotenos totales de 45,18 % y 76,14 %, respectivamente.

Este trabajo representa el punto de partida, ya que son datos obtenidos en la misma zona de estudio y bajo procedimientos de laboratorio similares, también influirá en la propuesta del esquema tecnológico, ya que a partir de estos valores de rendimientos de  $\beta$ -carotenos se pretenden realizar análisis que permitan evaluar la mejora en los rendimientos, sin embargo se pueden hacer otras extracciones a partir de otros métodos de laboratorio y con los materiales disponibles a fin de poder establecer diferencias entre los métodos utilizados.

Respecto a las extracciones de glicerol a partir de *Dunaliella sp*., Hernández y col. (2000) /16/, en su trabajo "Obtención de glicerol a partir de la microalga *Dunaliella salina*", investigaron las posibilidades de obtención de glicerol como un subproducto del proceso de extracción de  $\beta$ -carotenos a partir de cultivos de *Dunaliella salina*, desarrollados bajo régimen autotrófico, con el objetivo fundamental de producir  $\beta$ -caroteno (provitamina A). Se investigaron como una posible fuente de glicerol en calidad de subproducto de la corriente tecnológica principal.

Para llevar a cabo la investigación, la biomasa resultante del cultivo de *Dunaliella salina*, desarrollado a cielo abierto en una instalación experimental de 12 m<sup>2</sup>, fue tratada con hidróxido de calcio (0,3 g de Ca(OH)<sub>2</sub>/g de biomasa) en atmósfera de nitrógeno y una temperatura de 100 °C durante dos horas, en condiciones de agitación. Después de enfriar a 50 °C, la mezcla resultante fue filtrada por succión

con la adición de una pequeña cantidad de agua, de donde se obtuvo un producto claro verde-amarillento. Se procedió a la extracción del  $\beta$ -caroteno con un disolvente insoluble en agua y acto seguido se neutralizó el filtrado hasta un pH de 6-7, con ácido sulfúrico al 50 %.

La disolución obtenida después de filtrado el  $\text{CaSO}_4$  precipitado, se evaporó al vacío hasta lograr una sustancia viscosa amarillenta, que fue agitada durante varias horas con 3 mL de isopropanol. Se filtró la sal no disuelta, se evaporó el filtrado y se repitió este procedimiento con 2 mL de isopropanol. Esta técnica de extracción se empleó para cinco réplicas. Como un criterio preliminar de la pureza del producto obtenido se determinó el punto de fusión del tribenzoato de glicerilo, sintetizado por benzoilación del glicerol en presencia de piridina.

El procedimiento propuesto para la obtención de glicerol mediante el uso de la microalga *Dunaliella salina* como materia prima, rindió como promedio 0,23 g de producto bruto a partir de muestras de 5 g de biomasa, el cual presentó un color amarillo pálido. El rendimiento alcanzado, en todos los casos, resultó ser del 4 al 5 % (g/100 g de biomasa, base húmeda). El punto de fusión del tribenzoato de glicerilo, derivado sintetizado para la determinación de esta constante física como criterio de pureza, fue de  $68 \pm 1^\circ\text{C}$ , ligeramente inferior al informado en la literatura ( $72^\circ\text{C}$ ).

El método propuesto en el presente trabajo es relativamente sencillo, no necesita reactivos ni equipos especiales y garantizó un rendimiento del 4 al 5 %; valores que pueden ser incluso incrementados con la inducción metabólica de los cultivos.

El punto de fusión se encuentra moderadamente deprimido en relación con el referido en la literatura para el derivado sintetizado en cuestión, lo cual indica que el glicerol obtenido presenta impurezas propias de la biomasa algal como componentes minoritarios, no eliminados con la técnica diseñada. Estos resultados sugieren continuar trabajando en función de la purificación del glicerol, con el propósito de lograr que sea aplicado en la formulación de diferentes formas farmacéuticas.

Esta investigación contiene información relevante respecto a los procedimientos a establecer para

lograr la separación de estos metabolitos de gran utilidad a escala de laboratorio, sin embargo el procedimiento permitió lograr una obtención de glicerol que si bien no presenta todas las características cercanas a los valores reportados en la bibliografía, se pueden considerar un punto de partida para posteriores investigaciones que permitan mejorar dichos rendimientos bajo las mismas condiciones o modificando los procedimientos.

Kacka A., (2008) /17/ en su investigación "Aislamiento de *Dunaliella spp.* de un lago hipersalino y su capacidad para acumular glicerol", destaca que el género *Dunaliella* contiene especies halófilas que poseen la capacidad para acumular grandes cantidades de glicerol como compuesto compatible, en respuesta a la presión osmótica extracelular, dependiendo de la concentración de la sal en el medio de crecimiento y que más del 50 % del peso seco de *Dunaliella* puede ser glicerol como producto secundario. Para ello realizaron un aislamiento e identificación en muestras del Lago Tuz, en Turquía, en medios de cultivo incubados bajo iluminación continua, un pH ajustado de 7,5 y purificando el contenido de las placas de agar con NaCl al 20 %.

En la determinación de la producción de glicerol se obtuvo en 15 % (p/v) de NaCl, se ajustó el pH a 6, 7, 8 y 9, y se cultivaron en soluciones de 10 %, 15 %, 20 % y 25 % de NaCl durante 60 días y por triplicado.

En la determinación de la biomasa, el crecimiento de algas fue determinado por la turbidez, el recuento de células, peso seco, y clorofila para cualquier conjunto de condiciones de crecimiento. La turbidez se midió a 680 nm con un espectrofotómetro.

El recuento celular se realizó en una cámara de recuento (hemocitómetro Thoma de 0,1 mm de profundidad). El peso seco se determinó por centrifugación del caldo de cultivo a 5 000 rpm durante 10 min, lavando los sedimentos con agua destilada y secados a  $80^\circ\text{C}$  durante la noche. La concentración de clorofila ( $a + b$ ) en el medio se determinó registrando la absorción óptica a 646,6 y 663,6 nm.

La extracción de glicerol se realizó como lo describen Ben-Amotz y Avron (1973). Las determinaciones químicas de glicerol se llevaron a

cabo de acuerdo con el método descrito por Esturi3n y colaboradores a una longitud de onda de 570 nm. Las mediciones de absorbancia se realizaron por espectrofotometr3a.

Los resultados de esta investigaci3n indican que las cuatro cepas aisladas y purificadas de algas se identificaron como especies *Dunaliella* mediante examen morfol3gico en un microscopio basado en las formas celulares (elipsoide u ovoide). La capacidad de acumulaci3n de glicerol de estas cepas fue investigada en un sistema por lotes a diferentes valores de pH, concentraciones de NaCl y cantidad de c3lulas iniciales. Los resultados se dan como el n3mero de c3lulas por mL (c3lulas/mL), el contenido de clorofila ( $\mu\text{g/mL}$ ) y concentraci3n de glicerol calculado sobre  $10^6$  c3lulas de base ( $\mu\text{g}/10^6$  c3lulas =  $\text{pg/c3lulas}$ ), por mL de cultivo en caldo ( $\mu\text{g/mL}$ ) o por mg de peso seco ( $\mu\text{g/mg}$ ).

Los resultados arrojan que las diferentes especies del g3nero *Dunaliella* acumulan m3s glicerol cuando se cultivan en medios que contienen altas concentraciones de sal bajo luz de alta intensidad. La limitaci3n de nutrientes no afect3 significativamente la acumulaci3n de glicerol en las c3lulas de *Dunaliella*. En este estudio, *Dunaliella spp.* (una especie de *Dunaliella* salina) aument3 el total de c3lulas de glicerol despu3s de un aumento en la salinidad del medio y la densidad inicial de c3lulas afect3 la productividad celular. El m3s alto crecimiento de algas se obtuvo a una concentraci3n de NaCl 20 %. En los experimentos con 20 % de NaCl, la producci3n de biomasa por la cepa fue significativamente mayor que el de las otras cepas durante los d3as de estudio, es decir, 452,57  $\mu\text{g/mL}$  o  $\text{mg/L}$  de caldo de cultivo.

Hoy en d3a, los costos de la producci3n de glicerol por procesos microbianos son muy altos. Para resolver este problema, los estudios anteriores se han centrado principalmente en la selecci3n de cepas y la optimizaci3n de las condiciones de cultivo. Otros estudios se han llevado a cabo utilizando levaduras tales como *Candida spp.* y *Saccharomyces spp.* que son candidatos potenciales para la producci3n de glicerol (Chen *et al.*, 2006; Taherzadeh *et al.*, 2002). Aunque t3cnicamente la producci3n de glicerol a partir de especies de *Dunaliella* se demostr3 que es posible, la viabilidad econ3mica de hoy es demasiado baja (Oren, 2005). Este estudio muestra que las cepas aisladas se pueden utilizar para la producci3n de glicerol debido a su alta productividad.

Este trabajo permite conocer que la microalga objeto de estudio puede acumular glicerol a partir de condiciones controladas que se pueden manejar en el laboratorio y que, aunque su productividad es consideraba baja, se pueden seguir investigaciones que permitan establecer nuevas condiciones o m3todos para obtener mayores cantidades de glicerol.

### • Materiales y m3todos

Se debe recurrir a una fase experimental en donde se eval3an las condiciones ambientales de crecimiento de la microalga para mantener las condiciones controladas a escala de laboratorio como nutrientes, salinidad, temperatura, intensidad de luz (radiaci3n solar), a trav3s de las condiciones fisicoqu3micas de pH, radiaci3n, temperatura, ox3geno disuelto, conductividad el3ctrica, nitr3geno total, salinidad, tales m3todos est3n dispuestos en la American Public Health Asociation (APHA, 1989) /18/, y que se resumen en la tabla 1.

TABLA 1. T3CNICAS DE AN3LISIS QU3MICO EMPLEADAS EN EL LABORATORIO

Determinaci3n	S3mbolo	M3todo utilizado
pH	pH	M3todo electrom3trico (N3 4500-H+B, APHA, AWWA, WPCF).
Ox3geno disuelto	OD	M3todo Winkler Modificado. (Norma APHA, WPCF, AWWA).
Nitr3geno total	NT	M3todo Kjeldahl. (Norma APHA, WPCF, AWWA).
Determinaci3n de f3sforo total	PT	M3todo del cloruro esta3ioso (Norma APHA, WPCF, AWWA).
Conductividad el3ctrica	CE	M3todo electrom3trico: (N3 2510A, APHA, AWWA, WPCF).
Salinidad	$\mu\text{s/cm}$	M3todo electrom3trico: (N3 2520A, APHA, AWWA, WPCF).

**Determinación de pH por el método electrométrico (N° 4500-H+B, APHA, AWWA, WPCF)**

Descripción del método: Se basa en la medida de la actividad de los iones hidrógenos por medición potenciométrica utilizando un electrodo patrón de hidrógeno y otro de referencia.

**Determinación de oxígeno disuelto. "Método Winkler Modificado" (Norma APHA, WPCF, AWWA)**

Descripción del método: Es el procedimiento titulométrico más exacto y fiable para analizar OD. Se basa en la adición de soluciones de manganeso divalente, seguido de álcali fuerte, a la muestra contenida en un frasco con tapón de vidrio. OD oxida rápidamente una cantidad equivalente del precipitado disperso de hidróxido manganeso divalente a hidróxidos con mayor estado de oxidación. En presencia de iones yoduro, en solución ácida, el manganeso oxidado revierte al estado divalente con liberación de yodo equivalente al contenido original de OD. Entonces se valora el yodo con una solución patrón de tiosulfato de sodio. El punto final de la titulación se puede detectar visualmente con un indicador de almidón, o electrométricamente, con técnicas potenciométricas.

**Determinación de nitrógeno total. "Método Kjeldahl" (Norma APHA, WPCF, AWWA)**

Descripción del método: El método Kjeldahl determina el nitrógeno de número de oxidación -3. En presencia de ácido sulfúrico el nitrógeno amino se transforma en sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoniaco, el cual se destila en un medio alcalino y se absorbe en ácido bórico o sulfúrico.

**Determinación de fósforo total (PT): "Método del cloruro estañoso" (Norma APHA, WPCF, AWWA)**

Descripción del método: Se basa en la formación de ácido molibdofosfórico que se reduce con cloruro estañoso a azul de molibdeno de color intenso.

**Determinación de conductividad eléctrica por el método electrométrico: (N°2510A, APHA, AWWA, WPCF)**

Descripción del método: Es una expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones y de su concentración total, de su movilidad, valencia y concentraciones relativas, así como de la temperatura de la medición.

**Determinación de la salinidad por el método electrométrico: (N°2520A, APHA, AWWA, WPCF)**

Descripción del método: Para determinar la salinidad suelen utilizarse métodos indirectos que incluyen la medida de una propiedad física como lo es la conductividad. Partiendo de una relación empírica entre la salinidad y la propiedad física determinada para una solución estándar, se hace posible calcular aquella.

Por las condiciones controladas se presentan, en la siguiente tabla, las variables del proceso con la finalidad de hacer el experimento de cinética de crecimiento de la microalga *Dunaliella sp.* A partir de esta clasificación de las variables, se realiza el diseño del experimento con la ayuda del software Statgraphics, con un diseño multifactorial de 3 niveles.

TABLA 2. VARIABLES DEL PROCESO

Variables independientes	Variables fijas	Variables dependientes
Oxígeno disuelto	Temperatura	Crecimiento (células/mL)
		% Carotenos totales
Nutrientes	pH	% β-caroteno
Salinidad	Radiación solar	% glicerol

**Atributos de Diseño Factorial Multinivel**

Clase de diseño: Factorial Multilevel

Nombre del archivo: &lt;condicionescrecimiento&gt;

**Diseño Base**

Número de factores experimentales: 3

Número de bloques: 1

Número de respuestas: 1

Número de corridas: 27

Grados de libertad para el error: 17

Aleatorizar: Sí

TABLA 3. ATRIBUTOS DE DISEÑO FACTORIAL MULTINIVEL

<i>Factores</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Niveles</i>	<i>Unidades</i>
Nutrientes	2,0	6,0	3	ppm Nitrógeno
Oxígeno Disuelto	1,0	3,0	3	mg/L
Salinidad	250000,	400000,	3	μs/cm
<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>			
crecimiento	células/mL			

De esta forma se evalúa la cinética de crecimiento de la microalga en el período estudiado, lo cual permite establecer en qué tiempo la *Dunaliella sp.* desarrolla a su máximo crecimiento, que se traduce al final en un mejor rendimiento de los compuestos de interés.

### **Metodología para la extracción de carotenoides totales y la determinación cuantitativa de β-caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella sp.***

De acuerdo con lo reportado por (Araujo J., *et al.*, 2012) en las determinaciones de β-caroteno a escala de laboratorio, los procedimientos establecidos por el autor a partir de la revisión de la bibliografía se describen a continuación. Se nota que para esta fase no es necesario realizar un diseño de experimentos, debido a que no se realizará ninguna manipulación de variables, puesto que se parte de un procedimiento establecido por el autor mencionado.

#### ***Determinación de la concentración de carotenos totales***

- Colocar en un embudo de separación 50 mL de muestra y 50 mL de acetona.

- Agitar, decantar y agregar más acetona para realizar una extracción. Repetir el proceso hasta extraer completamente los pigmentos.

- Llevar al rotaevaporador hasta lograr concentrar la solución.

- Pesar la muestra para obtener el valor de peso de los pigmentos totales.

- Agregar 15 mL de hexano.

- Agregar una pequeña cantidad de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Dejar la solución con el agente desecante unos 15 min. Agitar ocasionalmente.

- Transferir cuantitativamente la solución que contiene el hexano a un matraz aforado de 100 mL y completar hasta el aforo con hexano.

- Tomar aproximadamente 2mL de esta solución con una pipeta y transferir a un tubo de ensayo.

- Agregar 8 mL de hexano y medir la absorbancia a 490 nm.

- Llevar al rotaevaporador la solución que contiene hexano.

- Pesar la muestra para obtener el peso de los carotenos totales.

- Calcular la concentración de los carotenos con la ecuación:

$$\mu\text{g} = \frac{A_{490} * VF * 10^4}{2592 * PM} \quad (1)$$

donde

$A_{490}$ : Absorbancia medida a 490 nm.

$10^4$ = Constante de conversión de unidades  $\mu\text{g/g}$ .

VF: Volumen final (mL).

2592: Coeficiente de extinción molar de  $\beta$ -caroteno en hexano.

PM: Peso de la muestra (g).

### **Determinación de la concentración de las fracciones de $\beta$ -caroteno por cromatografía de columna**

Descripción del método: Se basa en la afinidad diferencial de los distintos compuestos por la fase móvil (eluyente) o la fase estacionaria (adsorbente).

#### **Procedimiento experimental:**

- Empacar la columna y sujetarla en el soporte de las pinzas.
- Engrasar la llave y mantenerla en posición de cerrado.
- Tomar una pequeña porción de algodón y dejarla caer en la columna con ayuda de una varilla de vidrio.
- Agregar 8 mL de hexano y presionar el algodón para que quede bien colocado.
- Preparar una suspensión de 10 gramos de sílica gel en 40 mL de hexano y agitar durante 5 min en un vaso precipitado de 100 mL.
- Añadir a través de un embudo sobre el eluyente (hexano) que se encuentra en la columna.
- Abrir la llave para eliminar el exceso de eluyente (hexano) teniendo cuidado de no dejar secar la sílica gel.
- Añadir pequeñas porciones de eluyente (hexano) a medida que desciende el mismo.

- Colocar una pequeña porción de algodón de aproximadamente 1 cm de altura sobre el adsorbente (sílica gel).

- Añadir 15 mL de la muestra problema en la parte superior del adsorbente (sílica gel) con ayuda de una pipeta y el aspirador teniendo cuidado de no salpicar las paredes.

- Abrir la llave, dejando que la muestra penetre en la sílica gel.

- Cerrar cuando la mezcla de colorantes alcance la interfase entre el algodón y la parte superior del adsorbente (sílica gel).

- Añadir una porción del eluyente (hexano) igual al volumen de la muestra.

- Abrir la llave dejando que el nivel descienda nuevamente hasta la interfase algodón-adsorbente (sílica gel).

- Repetir la operación añadiendo pequeñas porciones tres o cuatro veces hasta asegurarse que la muestra quede adsorbida en el interior de la columna.

- Colectar las fracciones en frascos viales de 5 mL y controlar la separación haciendo cromatografía en papel a cada una de fracciones ante una muestra testigo (patrón de  $\beta$ -caroteno).

Se evaluará el porcentaje de rendimiento de la cantidad de  $\beta$ -caroteno obtenido de las fracciones en cromatografía en columna, respecto a la cantidad de pigmentos totales y los carotenos totales con la finalidad de estimar las cantidades de  $\beta$ -caroteno en gramos que se puede recuperar a partir de la *Dunaliella sp.*

### **Metodología para estimar la cantidad de glicerol**

De acuerdo con lo reportado por (Hernández, *et al.*, 2000), la biomasa resultante del cultivo de *Dunaliella salina* se trata con hidróxido de calcio (0,3 g de  $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$  de biomasa) en atmósfera de nitrógeno y una temperatura de 100 °C durante 2 horas, en condiciones de agitación.

Después de enfriar a 50 °C, la mezcla resultante fue filtrada por succión con la adición de una pequeña cantidad de agua, de donde se obtuvo un producto claro verde-amarillento.

Se procedió a la extracción del  $\beta$ -caroteno con un disolvente insoluble en agua y acto seguido se neutralizó el filtrado hasta un pH de 6-7, con ácido sulfúrico al 50 %.

La disolución obtenida después de filtrado el  $\text{CaSO}_4$  precipitado se evaporó al vacío hasta lograr una sustancia viscosa amarillenta, que fue agitada durante varias horas con 3 mL de isopropanol.

Se filtró la sal no disuelta, se evaporó el filtrado y se repitió este procedimiento con 2 mL de isopropanol.

## Descripción del proceso

Una vez determinados los valores de  $\beta$ -caroteno y glicerol presentes en la microalga se procede a efectuar los balances de materia que permitan establecer las condiciones del esquema tecnológico a proponer. Estableciendo los flujos de entrada y salida de los principales equipos, a partir de la revisión bibliográfica y de los resultados obtenidos en el laboratorio. Un esquema preliminar del proceso de extracción se puede observar en la figura 1.

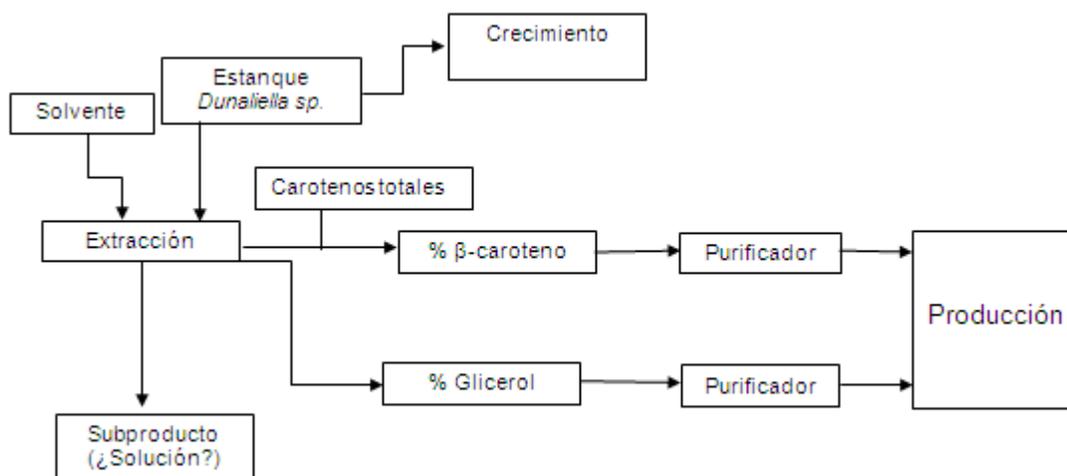


Fig. 1: Descripción del proceso de extracción de  $\beta$ -caroteno y glicerol.

La figura 1 permite comprender las fases de extracción de los principales componentes, teniendo en cuenta que una vez extraídos los componentes principales en el proceso se tiene un subproducto, el cual abre nuevas posibilidades en cuanto a si existen pigmentos o sustancias de interés industrial que podrían darle mayor valor agregado a esta investigación.

### ● Resultados y discusión

Debido a que la investigación forma parte de un proyecto en ejecución, los avances obtenidos están relacionados con los rendimientos de extracción de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella sp.* ya que hasta el momento sólo se limitó a tomar las muestras y se evaluaron las condiciones donde fueron obtenidas dichas microalgas, por lo tanto, en ningún momento se controlaron los niveles de pH, temperatura, ni radiación solar, solo se observaron y evaluaron estos parámetros sin ninguna

manipulación o control sobre ellos, en todo caso, la manipulación de las condiciones fue precisamente en la extracción y cuantificación del  $\beta$ -caroteno de las cepas de *Dunaliella sp.* provenientes de las salinas de Las Cumaraguas del Estado Falcón. Los análisis de laboratorio permitieron recuperar un 45,18 % de  $\beta$ -caroteno de los pigmentos extraídos con acetona y el 54,82 % restante es de los otros pigmentos presentes en la *Dunaliella sp.* Cabe destacar que en estudios realizados anteriormente, como Romero, *et al.*, 2008, se realizaron análisis de rendimientos pero en función de los carotenos totales, sin embargo es de mucha importancia para este estudio estimar la cantidad de  $\beta$ -caroteno obtenido por microalga tratada porque con este rendimiento de recuperación se pueden estimar grandes cantidades de materia prima para su uso industrial.

Puesto que dentro de los carotenos se encuentran  $\alpha$ -Caroteno,  $\beta$ -Caroteno  $\epsilon$ -Caroteno,  $\delta$ -Caroteno, debido a esto se buscó estimar la cantidad de  $\beta$ -caroteno recuperado respecto a los otros carotenos presentes, obteniendo un porcentaje de rendimiento de 76,14 %, al compararlo con Romero, *et al.*, 2008, se obtuvo un rendimiento de 54,3 %, utilizando solventes como acetona/metanol, mientras que en este estudio se usó como solvente hexano, el cual muestra mejores propiedades para la extracción de carotenos especialmente el  $\beta$ -caroteno.



## Bibliografía

1. ABU-REZQ, T., *et al.* "Induction and extraction of  $\beta$ -carotene from the locally isolated *Dunaliella salina*". *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2010, 1, 4, p. 58-83.
2. APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 16th edition. 1989.
3. ARAUJO, J.; CHIRINOS, J.; VEGAS, K. *Obtención de  $\beta$ -carotenos con fines industriales a partir de biofactorías fotosintéticas de *Dunaliella sp.* del sector Las Cumaraguas, Municipio Falcón, Estado Falcón*. Programa de Ingeniería Química. UNEFM.
4. CASAL, B. C. "Caracterización de la Radiación Ultravioleta en la Provincia de Huelva e Incidencia en la Productividad y el Valor Biotecnológico de Cultivos de Interés Comercial". Tesis Doctoral en Ciencias Ambientales. Universidad de Huelva, Huelva, España, 2010.
5. CHÁVEZ, H. *Soberanía Alimentaria*. [Vídeo] Telesur, Venezuela, 17 de julio de 2012.
6. DPVIH/SIDA. *Informe nacional de avances en la implementación de la declaración de compromisos sobre VIH/SIDA (2001) y la declaración política sobre VIH/SIDA (2006 y 2011)*. 2012, 214.
7. GARCÍA, M., *et al.* Desarrollo y evaluación de la producción de Beta-caroteno por *Dunaliella salina* en la bahía de Cádiz. Centro de Investigación y Cultivo de Especies Marinas de «El Toruño». Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Cádiz. España. 2 p.
8. GÓMEZ, L. "Cultivo y Aplicación de las Microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba". Tesis Doctoral en Biología. Universidade Da Coruña, A Coruña, 1997.
9. GUEVARA, M., *et al.* "Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella sp.* (Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela". *Revista de biología tropical*. 2005, 53, 3-4, p. 331-337.
10. HERNÁNDEZ, L.; QUINTANA, M. M.; MORRIS, H. J. "Obtención de glicerol a partir de la Microalga *Dunaliella Salina*". *Revista Cubana de Farmacia*. 2000, 34, 2, p. 134-137.
11. IMUSA.; ANTIOXIDANTS; I. o. M. P. o. D.; COMPOUNDS, R. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids: A Report of the Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine*. Washington D.C.: National Academies Press, 2000.
12. KACKA, A. D. G. "Isolation of *Dunaliella spp.* from a hypersaline lake and their ability to accumulate glycerol". *Bioresource Technology*. 2008, 99, p. 8348-8352.
13. MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; FRANCISCO, J. H. "Importancia Nutricional de los Pigmentos Carotenoides". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2004, 54, 2, p. 149-155.
13. MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA CIENCIA, T. e. I. M. *Zona Franca de Paraguaná: espacio para el desarrollo industrial* [en línea]. Disponible en Internet: <<http://www.mcti.gob.ve/Noticias/3527>> [Consulta: 22 de junio de 2012].
14. MOJAAT, M.; FOUCAULT, A.; PRUVOST J. "Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of  $\beta$ -carotene from *Dunaliella salina*". *Journal of Biotechnology*. 2008, 133, p. 433-441.
15. OLSON, J. A. "Carotenoids and Human Health". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 1999, 49, 1-S, p. 7-11.
16. ROMERO, L.; GUEVARA, M.; D' ARMAS, H.; LODEIROS, L. Cuantificación de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno en dos cepas de *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Volvocales) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. 2008.
17. TOVAR, I.; YEGRES, F., YEGRES, R. "Salina «Las Cumaraguas»: Análisis Físico-Químico y Estudio De Microalgas y Hongos, Paraguaná, Estado Falcón". En: VII Jornadas de Investigación en el marco del 30 Aniversario UNEFM. UNEFM, 2007.