

GRADO DE PUREZA DEL EXTRACTO CLOROFÍLICO OBTENIDO DE *CHLORELLA* SP.

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

¹ Centro de Investigaciones Pesqueras, MIP, Barlovento, Santa Fe,
Playa, C. Habana, Cuba

² Facultad de Biología, Universidad de la Habana,
Vedado, C. Habana, Cuba

RESUMEN.- En este trabajo se hace un estudio del grado de pureza del extracto de clorofila a partir de *Chlorella* sp. Además de la clorofila, un gran porcentaje del extracto está conformado también, por elementos solubles en etanol, como carotenos totales, carbohidratos, polisacáridos, proteínas y lípidos. Toda esta información se precisa para definir su uso industrial. Se encontró que la clorofila total se presenta entre un 2.3 y 3 % en etanol y acetona respectivamente (diferencia no significativa); los carotenos en 0.8 y 1.2 %; los carbohidratos en 1.6 y 1.3 %; los polisacáridos en 18.8 y 12.4 %; las proteínas en 0.16 y 0.20 % y los lípidos en 17.0 y 14.4 %. Como conclusión fundamental se cita que la clorofila disuelta en etanol o acetona comparte su grado de pureza con otros compuestos que coexisten junto a ella, que lejos de perjudicar la calidad del producto, coadyuvan su obtención con un alto valor agregado. *Recibido:* 22 Septiembre 1998, *aceptado:* 19 Marzo 1999.

Palabras claves: Extracto de clorofila, *Chlorella*, microalgas, pureza, acetona, etanol, solubilidad, Cuba.

PURITY OF A CHLOROPHYLL EXTRACT OBTAINED FROM *CHLORELLA* SP.

ABSTRACT.- We studied the degree of purity of a chlorophyll extract obtained from *Chlorella* sp. In addition to chlorophyll, a large percentage of the extract may also contain other elements soluble in ethanol, such as carotene,

carbohydrates, polysaccharides, proteins, and lipids; and information about these elements is needed to better define the industrial use of the extract. Total chlorophyll was 2.3 % and 3 % (difference not significant), carotene was 0.8 % and 1.2 %, carbohydrates were 1.6 % and 1.3 %, polysaccharides 18.8 % and 12.4 %, proteins 0.16 % and 0.20 %, and lipids were 17.0 % and 14.4 % in ethanol and acetone, respectively. Although chlorophyll extracts (dissolved in ethanol or acetone) may be impure, and contain several other compounds, we think these compounds enhance the product, making its industrial use more valuable. *Received:* 22 September 1998, *accepted:* 19 March 1999.

Key words: Chlorophyll extract, *Chlorella*, microalgae, purity, acetone, ethanol, solubility, Cuba.

INTRODUCCIÓN

Aunque el creciente interés por las microalgas es hoy un hecho irrefutable, no podemos negar que ya a finales de 1800, se consideraba que contar con cultivos puros de las mismas, era un instrumento importante para profundizar e indagar en la fisiología y microbiología de las algas. Es bueno destacar que las primeras perspectivas se concentraron en las microalgas de agua dulce, siendo *Chlorella vulgaris* la microalga pionera. Esta célula pertenece a la clase Chlorophyceae, orden Chlorococcales y tal vez su omnipresencia en este medio fue la causa de su selección.

Además de contener proteínas, *Chlorella* presenta también lípidos ricos en ácidos grasos insaturados, carbohidratos, vitaminas hidro y liposolubles y otras moléculas útiles como carotenoides, clorofilas, enzimas, aceites esenciales, hidrocarburos y aminos (Herrero 1985).

Chlorella es una de las mayores exponentes en cuanto a producción de clorofila. Este pigmento natural puede ser utilizado para favorecer la presencia de los alimentos y artículos de poca demanda, así como en la industria del cosmético, para sustituir pigmentos sintéticos usados corrientemente y con potencial cancerígeno, y en la industria médico-farmacéutica.

Es importante conocer el grado de pureza del extracto que se obtiene producto del aislamiento de la clorofila, porque además de la clorofila, es obvio que un gran porcentaje del extracto esté conformado por otros elementos solubles en etanol, según lo demuestran las técnicas reportadas para la extracción de carotenos totales, carbohidratos, polisacáridos, proteínas y lípidos (Vonshak y Borowitzka 1991, Kochert 1978, Jones y Albersheim 1972, Lowry *et al.* 1951, Bligh y Dyer 1959).

En este trabajo se hace un estudio de los componentes químicos de la clorofila extraída con etanol que para los fines farmacéuticos a que se aspira introducir, es el de mayor interés, así como el de la clorofila extraída con acetona a modo de comparación, para así tener un estimado de la pureza de los pigmentos en ambos solventes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con la pasta algal, se procedió a la extracción del pigmento fotosintético "clorofila" con los solventes acetona extrapura y etanol al 95 %, con el objetivo de valorar la pureza de ambos extractos.

La metodología utilizada para la extracción del pigmento fue la descrita por UNESCO (1966). Antes de determinar la composición de ambos extractos, se realizó un estudio de la capacidad de los solventes de remover la clorofila de la microalga, comparándolos entre sí con un ANOVA simple al 95 % de confiabilidad.

Para establecer el porcentaje de clorofila presente en cada extracto, que responde en cierto grado a su pureza, se tomaron 12 muestras de pasta algal de seis cultivos diferentes. Cada muestra fue dividida en dos submuestras. Una de ellas se secó a 80 °C durante 24 h para determinar el peso seco, y la otra se trató con el volumen de solvente correspondiente al punto de inflexión estudiado por Romero y Echeverría (1998). Seguidamente la muestra se trituro y agitó bien y se halló la concentración por el cálculo de los sólidos no solubles.

Posteriormente se determinaron los sólidos totales (sólidos solubles en el extracto) que responden a la diferencia entre el peso seco del alga y el peso seco del pellet producto de la extracción del pigmento.

Una vez realizada la extracción del pigmento fotosintético, se determinó la clorofila total con el auxilio de las ecuaciones propuesta por la UNESCO (1966) y por Harmutk (1987).

Paralelamente se definieron en el extracto los carotenos totales, carbohidratos, polisacáridos, proteínas y lípidos según las técnicas reportadas por los autores señalados anteriormente.

Se realizaron espectros de absorción a los licores de clorofila extraídos con acetona y etanol y a ambos solventes por separados, para valorar la posible interferencia en la pureza de los extractos debido a impurezas de los reactivos u otras sustancias que no leen en la zona visible del espectro.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según el trabajo de Romero y Echeverría (1998), se demostró la alternativa de elegir cualesquiera de los dos solventes con fines de extracción de la clorofila. Este trabajo está dirigido fundamentalmente al estudio de la calidad del extracto una vez se remueva el pigmento con etanol, por las múltiples ventajas que ofrece, entre las que cabe citar lo benigno que resulta el producto en el campo de la industria médico-farmacéutica, además de las posibilidades en cuanto a suministro de etanol que brinda el país por su tradición azucarera.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los componentes químicos que conforman ambos licores.

Como se observa, la clorofila total representa sólo el 2.25 % en el extracto etanólico y 3.01 % en el acetónico, valores similares a los encontrados al aplicar el polinomio de grado 3 a los valores teóricos

TABLA 1. Valores medios de concentración (%) de algunos compuestos presentes en el extracto etanólico y acetónico, máximos y mínimos.

EST.	ETANOL						ACETONA					
	Clor. T.	Car.	Carb.	Pol.	Prot.	Lip.	Clor.t	Car.	Carb.	Pol.	Prot.	Lip.
MED.	2.25	0.83	1.58	18.8	0.16	17.2	3.01	1.17	1.34	12.4	0.20	14.4
MAX.	3.44	1.21	2.33	31.2	0.27	21.7	3.65	1.25	1.25	12.4	0.23	16.4
MIN.	1.16	0.4	1.02	13.5	0.08	8.0	2.38	1.10	1.02	12.4	0.16	12.5

Clor. T. = clorofila total, Car. = carotenos, Carb. = carbohidratos, Pol. = polisacáridos, Prot. = proteínas, Lip. = lípidos.

de concentración de clorofila total de los diferentes ensayos realizados con la pasta algal refrigerada y sin refrigerar, que fueron de 3.0 y 2.7 % respectivamente (Romero y Echeverría, 1998). Estos valores están dentro del rango de 2.4 y 5.2 % de clorofila en las células jóvenes de *C. pyrenoidosa* a los que Kamiya y Miyachi (1982) hacen referencia en su trabajo sobre características generales de las microalgas verdes.

A pesar de ser la clorofila el pigmento esencial y que se presenta en mayor concentración en las células Chlorococcales, también se encuentran otros pigmentos como los caratenoides, con concentraciones de 0.83 % y 1.17 %, como valores medios en ambos extractos, que resultaron muy semejantes al reportado por Kamiya y Miyachi (1982).

Independientemente de que los polisacáridos corresponden a una de las clases en que se agrupan los carbohidratos, se justifica su alta concentración, debido a que esas moléculas de elevado peso molecular, son fundamentalmente solubles en etanol y no así los mono- y disacáridos, que son más solubles en agua que en solventes orgánicos y de ahí su bajo nivel en el extracto estudiado.

Tal es el caso de la manosa, xilosa, glucosa y galactosa entre otros, los que fueron detectados al estudiar la composición química de la misma cepa en los laboratorios del Instituto de Biotecnología de Kamaishi, Japón (Romero 1995).

Otro motivo por el cual los polisacáridos se presentaron con mayor concentración que los carbohidratos de referencia se debe a que ellos aparecen en la naturaleza en proporciones mayores que los mono y disacáridos (Haurowitz 1966).

Otro constituyente de los extractos de referencia lo componen las proteínas, que en presencia de estos solventes se desnaturalizan y precipitan, aunque alguna fracción puede pasar al solvente de acuerdo a su estructura y composición. Este fenómeno explica las concentraciones tan bajas en el extracto etanólico, del orden de 0.16

% como promedio, y en el extracto acetónico de 0.20 % si se compara con el contenido de proteína de la microalga sobre la base de peso seco que oscila entre 50 y 65 % (Romero 1998).

A su vez, la presencia de proteína en el extracto se explica, entre otros, por la existencia de las lipoproteínas en la célula, fundamentalmente en el aparato fotosintético, que son solubles en solventes orgánicos y que por consiguiente logran incorporarse a dichos extractos.

Como se observa en la Tabla 1, las concentraciones de lípidos son bastante elevadas, comportándose en el rango que reportan diferentes autores como concentraciones normales en algunas especies de microalgas (Materassi *et al.* 1980, Romero 1998) puntualizando a su vez que los lípidos son solubles en solventes orgánicos, de manera que existe correspondencia entre las concentraciones aquí halladas y la reportada para la masa algal.

El estudio de la calidad de ambos extractos demostró que al tratar el alga con cualesquiera de los dos solventes se obtiene, además de clorofila, otros compuestos que proporcionan al producto un alto valor agregado, y por lo tanto, su uso en cualesquiera de las industrias mencionadas va más allá de lo planificado en un inicio.

Haciendo una comparación entre los espectros de absorción de las Figuras 1 (extracto etanólico) y 2 (extracto acetónico) en el rango entre 200 y 1100 nm se comprende que los espectros en la zona visible son semejantes, y esto avala la similitud en la composición de los elementos esenciales encontrados con los análisis químicos reportados anteriormente. Las líneas que se presentan en la zona del ultravioleta de la Figura 1 corresponden bien a las impurezas del etanol reactivo o a otras sustancias que son solubles en él y sólo leen en ese rango.

Toda esta interpretación fue avalada por los espectros de la Figura 3 realizados a los solventes utilizados en las extracciones, donde se puede observar que en la zona del ultravioleta existen otras sustancias que pasan a formar parte del extracto etanólico.

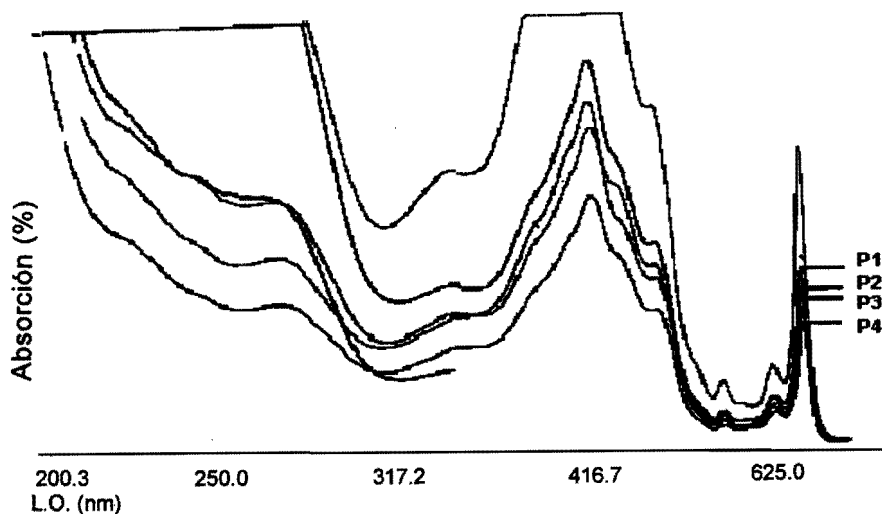


FIGURA 1. Espectros de absorción del extracto etanólico de cuatro pastas microalgales (P1, P2, P3, P4) en un rango de 200 - 1100 nm.

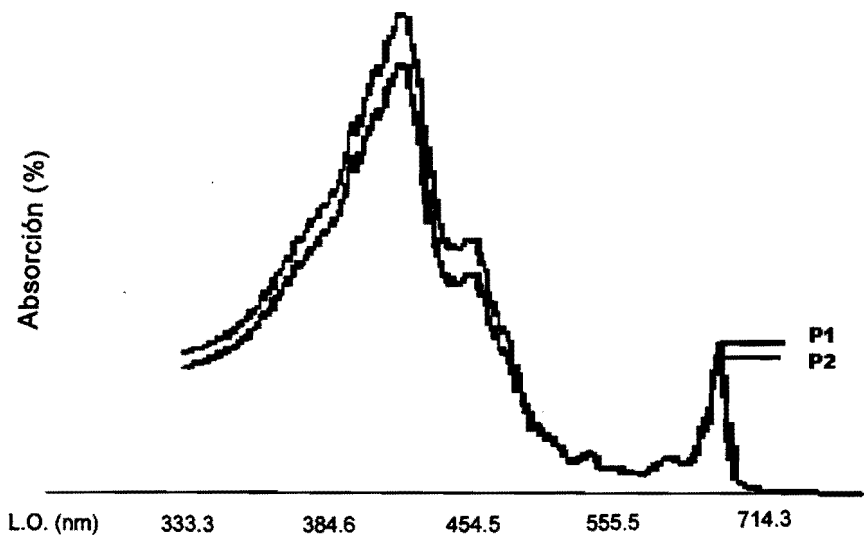


FIGURA 2. Espectros de absorción de dos pastas microalgales diferentes (P1, P2) en un rango de 200-1100 nm.

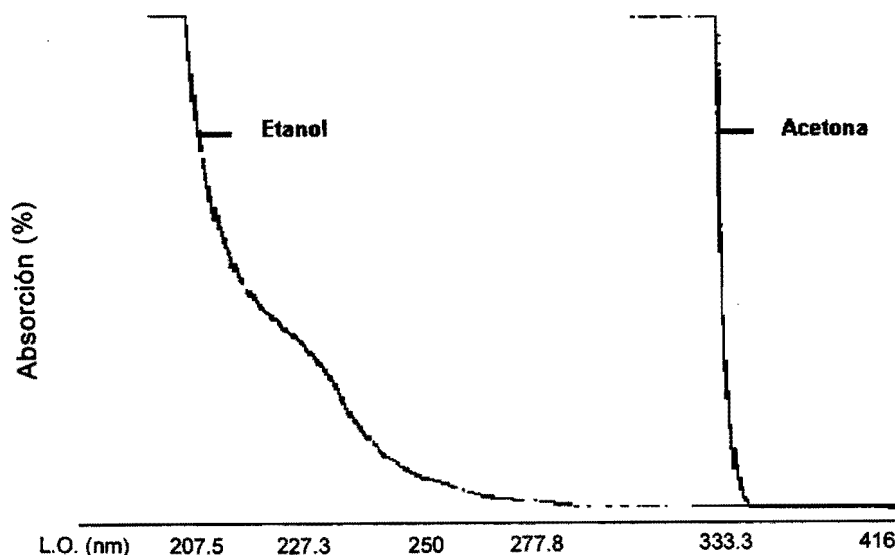


FIGURA 3. Espectros de absorción de los solventes utilizados en los diferentes ensayos (acetona y etanol) en un rango de 200-1100 nm.

Este análisis es muy importante a la hora de valorar la calidad del solvente a utilizar, ya que por los espectros aquí presentados se demuestra claramente que el etanol contenía cierto grado de impurezas que puede interferir en la calidad del producto final. Por tales motivos, se debe tener mucha precaución a la hora de seleccionar el reactivo, que debe estar en relación directa con el destino final del licor. No obstante, quedó demostrado que según los espectros en la zona visible, el licor con acetona, al igual que el licor con etanol poseen la calidad requerida para su utilización en diferentes esferas de la industria, aunque debido a las contraindicaciones que posee del primero para la confección de determinados medicamentos, se propone el etanol para usos semejantes u otros donde la acetona no debe estar presente.

CONCLUSIONES

La clorofila disuelta en etanol o acetona comparte su grado de pureza con otros compuestos que coexisten junto a ella, tales como

carotenos, carbohidratos, polisacáridos, proteínas y lípidos entre otros, que lejos de perjudicar la calidad del producto, coadyuvan su obtención con un alto valor agregado, pudiendo ser utilizado dentro de la biotecnología farmacéutica y la industria del cosmético.

RECOMENDACIONES

- 1) Utilizar etanol para fines de extracción de clorofila por sus ventajas sobre la acetona.
- 2) Valorar, en dependencia de los otros productos que se solubilizan junto a la clorofila, los numerosos usos a que puede ser destinada la solución.
- 3) En lo posible, usar etanol de alta calidad para evitar impurezas en la muestra, o de lo contrario, redestilar el solvente.
- 4) Continuar con el estudio de otras sustancias que intervienen en la composición del extracto.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los técnicos Dolin Hernández y Amauri Fernández el brillante trabajo desplegado a través de toda la investigación y al ICIDCA, instituto donde se efectuaron los espectros de absorción a las muestras de clorofila.

LITERATURA CITADA

- BLIGH, F. G. Y W. J. DYERN. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- HARMUTK, L. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology* 148(34): 350-382. Academic Press.

- HAUROWITZ, F. 1966. Introducción a la bioquímica. Ed. Revolucionaria, C. Habana, Cuba. 487 pp.
- HERRERO, C. 1985. Las microalgas marinas como fuente de proteínas, vitaminas y minerales. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, 100 pp.
- JONES, T. M. Y P. ALBERSHEIM. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49: 926-936.
- KAMIYA, A. Y S. MIYACHI. 1982. General characteristics of green microalgae *Chlorella*. En A. Misui y C. Black (eds.), CRC handbook of biosolar resources 1(2): 25-32.
- KOCHERT, A. G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulphuric acid method. Pp. 95-97, en J. A. Hellebant y J. S. Craigh (eds.), Handbook of phycological methods, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- LOWRY, O. H., H. J. ROSEBROUGH, A. L. FARN Y R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MATERASSI, R., W. BALLONI Y G. FLUORENZANO. 1980. Some considerations on the production of lipid substance by microalgae and cyanobacteria. Pp. 619-626, en G. Shelef y C. J. Soeder (eds.), Algae biomass-production and use. Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 852 pp.
- ROMERO L., T. 1995. Informe de viaje de estudio realizado en el Centro de Investigaciones para la Utilización Industrial de Organismos Marinos en Kamaishi (IBM), Japón. Informe FAO, 29 pp.
- ROMERO L., T. 1998. Tecnología de cultivo de *Chlorella vulgaris* en los efluentes líquidos de la industria pesquera y

subproductos derivados. Anais dos 4 Congr. Latino-americano de Ficología, 2 Reuniao Ibero-americana de Ficología e 7 Reuniao Brasileira de Ficología, Soc. de Ficologica da America Latina e Caribe, pp. 475-495.

ROMERO L., T. Y L. H. ECHEVERRÍA. 1998. Concentración de clorofila total en el extracto etanólico procedente de *Chlorella* sp. cultivada en efluentes de la industria pesquera. Bol. Centro Invest. Biol. 32: 153-178. Maracaibo, Venezuela.

UNESCO. 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea water. Monograph on oceanographic methodology, 69 pp.

VONSHAK, A. Y M. BOROWITZKA. 1991. Laboratory manual. Research seminar and workshop on mass cultures of microalgae, Silpakoan Univ., 41 pp.