

ESTABILIDAD DE LA CUPROCLOROFILA EXTRAÍDA DE *Chlorella* sp. CULTIVADA EN RESIDUALES PESQUEROS

Teresita Romero¹ y Dolín Hernández²

¹Centro de Investigaciones Pesqueras. 5ta Avenida y Calle 1ª, Barlovento,
Santa Fe, Playa. C. Habana, Cuba. E-mail: terges@mixmail.com

²OEE INDAL, Asociación INDIPES. Calle Hacendados, e/ Ave del Puerto
y Línea del Ferrocarril, H. Vieja. C. Habana, Cuba

Resumen. A la microalga *Chlorella* sp. cultivada en el residual procedente de las labores industriales del proceso de mariscos y pescados, se le extrajo la clorofila, la que posteriormente fue transformada en cuproclorofila. El licor resultante fue envasado en frascos plásticos de color verde oscuro y transparente. Después de conservados los frascos por un período de 12 meses en la oscuridad y a una temperatura de 25 a 30°C; a la luz y la misma temperatura que los anteriores y en refrigeración a 4°C, se analizó el licor mediante mediciones mensuales de la concentración y el pH, para llegar a la conclusión de que la cuproclorofila conservada en frío y sin preferencia de envase, disminuyó su concentración en un 36% al final del ensayo, muy inferior a los restantes tratamientos, donde se apreció un decremento del 75% como promedio. Los pH no sufrieron variación, manteniéndose las características ácidas del producto. Se recomendó conservar el extracto en refrigeración, aunque lo ideal sería su utilización inmediata después de realizada la extracción, evitando así alteraciones en la calidad del producto.

Palabras clave: *Chlorella* sp., cuproclorofila, residual pesquero.

Recibido: 08 Junio 2001 / Aceptado: 24 Marzo 2002
Received: 08 June 2001 / Accepted: 24 March 2002

THE STABILITY OF CUPROCHLOROPHYLL EXTRACTED FROM *Chlorella* sp. CULTIVATED IN FISHING INDUSTRY EFFLUENTS

Abstract. Chlorophyll extracted from the micro-algae *Chlorella* sp. cultivated in effluents from the processing of fish and seafood, was later transformed into cuprochlorophyll. The resulting liquor was bottled in dark green and transparent plastic containers. After storing some bottles in the darkness for 12 months at a temperature of 25 to 30°C, others in the light and at the same temperature as the former, and others refrigerated at 4°C, the liquor was analyzed using monthly measurements of the concentration and pH. Conclusions reached were that the cuprochlorophyll kept in a cold temperature regardless of the container, diminished in concentration by 36% at the end of the experiment, a much lower percentage than with the other treatments, which showed an average decrease of 75%. The pH did not vary, but maintained the acidic characteristics of the product. We recommend conserving the extract under refrigeration, although the ideal situation is to use it immediately after extraction.

Key words: *Chlorella* sp., cuprochlorophyll, fishing effluents.

INTRODUCCIÓN

Los estudios referidos al cultivo de microalgas se han ido intensificando en los últimos años en países tanto del primer como el tercer mundo.

Australia, Estados Unidos de América, Japón, Checoslovaquia, Israel, India, México y Chile, son países con elevada tradición en las investigaciones referentes a estos microorganismos, las que aportan amplios beneficios al hombre, a la biota en general y al ambiente (Beneman *et al.* 1977, Soeder 1980, Becker 1981, Venkataraman y Becker 1985, Borowitzka y Borowitzka 1988, Álvarez y Gallardo 1989).

En Cuba se ha destacado su función en las redes tróficas así como su aplicación terapéutica en padecimientos tan severos como úlceras, gastritis y tumores cancerígenos (Takemi *et al.* 1980, Iwai *et al.* 1990 y Yuchi *et al.* 1985).

La clorofila, así como uno de sus derivados extraídos de *Chlorella* sp. ha demostrado ser un producto con propiedades excepcionales para el tratamiento de bacterias y hongos patógenos (Romero y Pérez 1999) motivo por el cual se hace imprescindible determinar el tiempo de vida útil del licor y las condiciones más favorables y económicas de almacenamiento. Motivo por el cual el objetivo de estas investigaciones se centró en determinar la estabilidad de la Cuproclorofila extraída de *Chlorella* sp. cultivada en residuales pesqueros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se extrajo la clorofila de la microalga *Chlorella* sp. cultivada en lagunas piloto, en la Empresa Industrial de Alimentos (INDAL) situada en Ciudad de la Habana, Cuba. Las microalgas tienen como fertilizante, las aguas procedentes del proceso de cocción, descongelado y viscerado de los recursos pesqueros marinos y dulceacuático del bonito (*Katsuwonus pelamis* y *Sarda sarda*), atún (*Thunnus thynnus thynnus*, *Thunnus albacares* y *Thunnus atlanticus*), calamar (*Loligo pealeii*) y tenca (*Tinca tinca*) entre otras.

La clorofila extraída se trató con una sal de Cobre, para su transformación en Cuproclorofila (Romero 2000) se empezaron seis tratamientos, estos consistieron en el mantenimiento del pigmento en el transcurso de 12 meses en botellas plásticas transparentes y verdes sometidas a la oscuridad, a una temperatura de 25-30°C; a la iluminación continua con una intensidad de 300-500 lux y temperatura de 25-30°C y en refrigeración a 4°C.

Se empleó la nomenclatura siguiente:

Botella verde sometida a la claridad = VC; Botella transparente sometida a la claridad = TC; Botella verde sometida a la oscuridad = VO; Botella transparente sometida a la oscuridad = TO; Botella verde sometida al frío = VF; Botella transparente sometida al frío = TF.

Se determinó la variación de la concentración de la Cuproclorofila mensualmente siguiendo la metodología de Romero (2000).

Para comparar estadísticamente los tratamientos estudiados, se utilizaron pruebas tales como ANAVA de clasificación simple ($p < 0,05$) y pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis. Debido a la existencia de diferencias estadísticas significativas también se utilizó el método de comparación múltiple de Student-Newman-Keub, que finalmente detectó los tratamientos que diferían entre sí.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Haciendo una interpretación de los resultados plasmados en la Figura 1, se deduce que con el transcurso del tiempo, la concentración del licor de cuproclorofila va disminuyendo en mayor o menor grado, en dependencia del color del envase, la temperatura del medio o la iluminación a que fueron sometidos los mismos.

Nótese en el mismo orden en que aparecen los tratamientos en la figura, que los descensos en las concentraciones fueron del orden de los 77,2% para VC; 35,8% para VF; 71,6% para VO; 73,5% para TC; 36,0% para TF y 71,3% para TO.

Se aprecia claramente que el licor se mantiene con mayor estabilidad en los recipientes conservados en frío, aunque en los tres primeros meses de iniciado el ensayo el decremento de la concentración

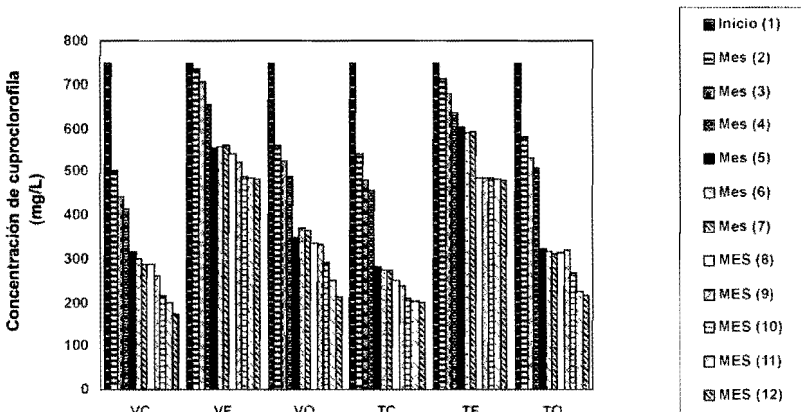


FIGURA 1. Variación de la concentración de cuproclorofila para las muestras analizadas con una frecuencia mensual, según el tratamiento realizado.

TABLA 1. Significación de los análisis de varianza de clasificación simple, según los tratamientos analizados.

Combinación de Tratamientos	F calculada	F tabla	Significación
VC/TC	4,0373	4,3009	NS
VO/TO	0,0503	4,3009	NS
VF/TF	0,0145	4,3009	NS
VC/VO/VF	9,6669	3,2849	*
TC/TO/TF	8,5191	3,2849	*

no superó el 15% comparado con el 36% para todo el período de análisis. A partir de este mes, donde se produce un cambio más significativo en cuanto a la concentración, el descenso continuó muy paulatinamente en ambos tratamientos.

Entre VF y TF no se presentaron diferencias estadísticas significativas después de aplicado un ANAVA de clasificación simple (Tabla 1), lo que demuestra que el color del recipiente no interfiere en la estabilidad del licor.

Los licores mantenidos en la oscuridad, presentaron disminuciones muy bruscas de sus concentraciones desde que se registraron los primeros valores, es decir, al cabo de los 30 días de exposición a estas condiciones; la caída de concentración estuvo en el orden de los 25 y 23% para VO y TO respectivamente, valores muy superiores a los encontrados en los tratamientos anteriores al cabo del tercer mes.

En las condiciones de oscuridad y a la temperatura entre 25 y 30°C, el comportamiento de ambos licores al tercer mes se igualó al de las muestras mantenidas en frío al cabo de todo el período de experimentación, con disminuciones del orden de los 35 y 32% para VO y TO respectivamente.

Entre VO y TO no se encontraron diferencias estadísticas significativas después de realizado el ANAVA de clasificación simple entre sus medias, hecho que corrobora que el color del envase no es

de tomar en consideración para seleccionar el medio más adecuado para el almacenaje de las muestras.

Finalmente, al interpretar el comportamiento de la cuproclorofila en las condiciones de luz permanente y temperatura constante de 25 y 30°C, se aprecia que existe un patrón similar a las muestras mantenidas en la oscuridad. La disminución de la concentración a los 30 días de evaluado el licor fue de 33 y 28% para VC y TC respectivamente, con valores de 45 y 39% al tercer mes.

Aunque las concentraciones de TC fueron inferiores a VC, no se diferenciaron estadísticamente, hecho que se corroboró al realizar el ANAVA de clasificación simple entre ambos tratamientos. Los estadísticos para todos los casos expuestos se presentan en la Tabla 1 y la relación entre cada tratamiento se esquematiza en la Figura 2 para su mejor y más rápida comprensión.

La similitud entre los licores expuestos a condiciones iguales se aprecia más claramente por las gráficas de las Figuras 3a, 3b y 3c, además de la tendencia a la disminución de la concentración. Estas líneas de tendencia presentaron un R^2 superior a 0,9 o coeficientes muy próximos a él, lo que asevera el ajuste bueno de los datos.

Entre los tratamientos VF, VO y VC, así como TF, TO y TC se encontraron diferencias estadísticas significativas, al aplicar un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis.

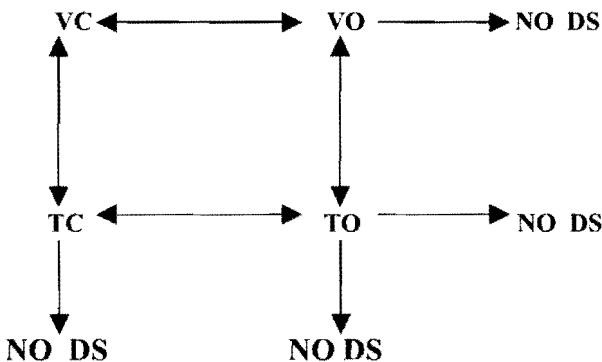


FIGURA 2. Esquemización de los estadísticos para los distintos tratamientos.

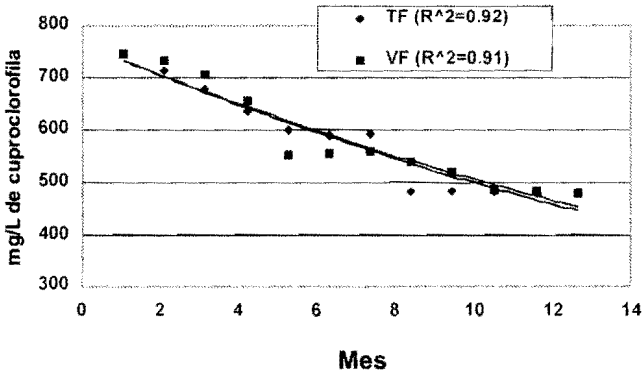


FIGURA 3a. Líneas de tendencia con los valores de concentración de cuproclorofila de los tratamientos VF y TF, en función del tiempo.

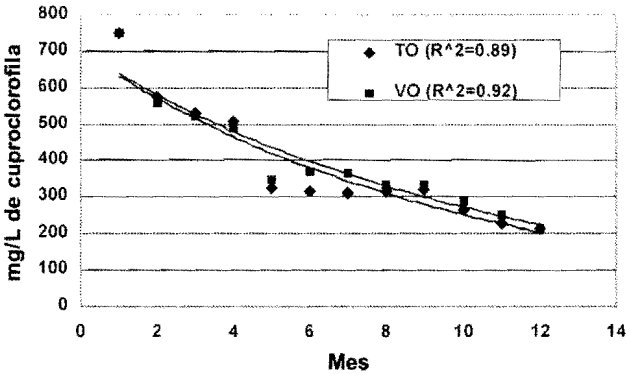


FIGURA 3b. Líneas de tendencia con los valores de concentración de cuproclorofila de los tratamientos VO y TO, en función del tiempo.

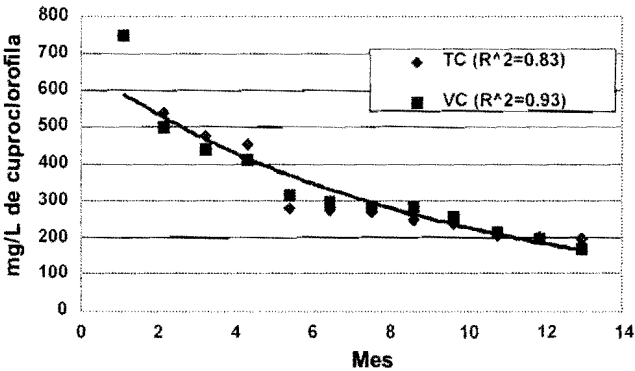


FIGURA 3c. Líneas de tendencia con los valores de concentración de cuproclorofila de los tratamientos VC y TC, en función del tiempo.

Con la comparación múltiple de Student-Newman-Keub, se demostró que VF y TF diferían de los restantes tratamientos, corroborando así que el factor que influye en la estabilidad del licor de cuproclorofila fue la temperatura. En las gráficas de las Figuras 4a y 4b se presentan las concentraciones correspondientes a cada caso, de donde se interpreta cómo en el transcurso del tiempo, los valores de los licores de VF y TF siempre estuvieron muy por encima de los restantes.

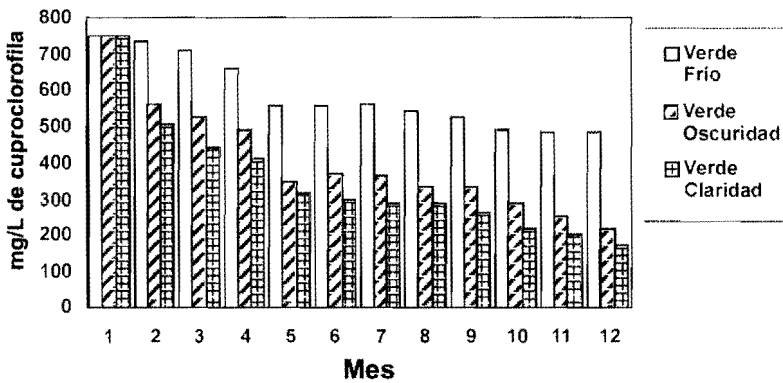


FIGURA 4a. Comportamiento de la concentración de cuproclorofila mantenida en botellas verdes en condiciones de refrigeración, en la oscuridad y en la claridad.

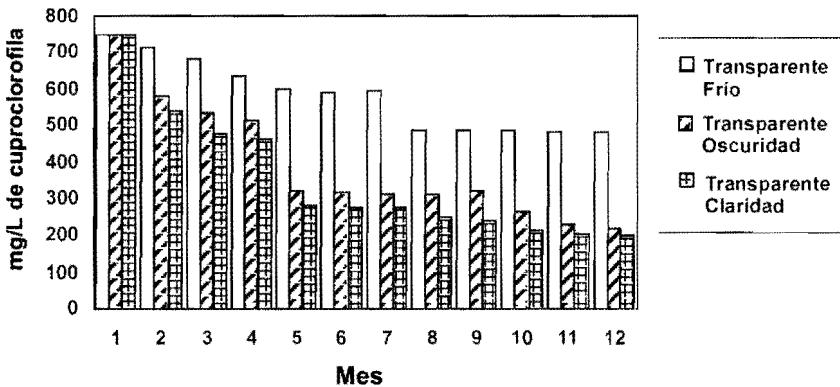


FIGURA 4b. Comportamiento de la concentración de cuproclorofila mantenida en botellas transparentes en condiciones de refrigeración, en la oscuridad y en la claridad.

TABLA 2. Valores de pH del licor de cuproclorofila mantenidos en condiciones diferentes de almacenamiento.

Lectura	VC	TC	VO	TO	VF	TF
Inicio	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17
Final	1,82	1,88	1,90	1,93	2,19	2,17

El por qué se alteran en menor grado las concentraciones iniciales de la porfirina objeto de estudio a 4°C, en comparación con las restantes muestras, puede estar dado por la sensibilidad de las proteasas, que no son más que enzimas degradadoras, a temperaturas elevadas con las que se destruyen determinadas proteínas. En el caso de estudio, al conservar la cuproclorofila en condiciones de refrigeración, muchos procesos enzimáticos se inhiben o disminuyen, alterándose por lo tanto más lentamente la concentración del pigmento, lo que no sucedió a la temperatura predominante en el laboratorio, considerada como óptima para el funcionamiento de dichas enzimas.

Respecto al pH del licor, la variación no fue muy significativa en las muestras analizadas. Nótese por los valores de la Tabla 2 que la cuproclorofila siempre se mantuvo ácida, independientemente de las condiciones en que se almacenaron los frascos. Según Romero (2000), el pH de este pigmento oscila entre 2,0 y 2,5 una vez realizada la extracción a la microalga.

Para estos bioensayos, al término de la investigación, el pH de las muestras mantenidas en frío no sufrió alteración alguna, reportándose valores de 2,19 y 2,17 para VF y TF respectivamente, comparados con los 2,17 al comienzo del ensayo. VO, TO, VC y TC sólo ofrecieron ligeras disminuciones con respecto al primer día, del 11 al 15% como promedio.

CONCLUSIONES

El licor de cuproclorofila sufre disminución en su concentración en el transcurso del tiempo.

La cuproclorofila mantiene más estable su concentración cuando se conserva en refrigeración, no así cuando se mantiene a temperatura ambiente expuesta a la luz o en la oscuridad.

El color del recipiente no afecta la concentración del licor de cuproclorofila.

El pH se mantiene ácido independientemente de las condiciones de conservación del licor.

RECOMENDACIONES

Mantener el pigmento en condiciones de refrigeración una vez se proceda a su extracción, aunque lo más aconsejable sería utilizar el licor lo más rápido posible, para evitar así degradaciones en su concentración.

Realizar estudios microbiológicos a las muestras con el objetivo de determinar cualesquier otra causa de la degradación del producto u otros estudios similares que atestigüen este proceso inhibitorio y su naturaleza, así como estudios de electroforesis.

LITERATURA CITADA

- ÁLVAREZ, C. M. y T. GALLARDO. 1989: Una revisión sobre la biotecnología de las algas. Bot. Complutensis No 15 Ed. Univ. Complutense. pp. 9-60.
- BECKER, E. W. 1981: Algae mass cultivation, production and utilization. Process Biochemistry. aug/sept. pp: 10-15.
- BENEMAN, J. R, J.C. WEISSMAN, B. L. KOOPMAN y W. J. OSWALD 1997: Energy production by microbial photosynthesis. Nature 268: 19-23.
- BOROWITZKA, M. A. y L. J. BOROWITZKA. 1988: Microalgal Biotecnology. Cambridge Univ. Press. 477 pp.
- IWAI, M, I KODA, O. INOUE, Y. NARITA, Y. y K. YOKOYAMA. 1990: Remedy for gastritis. PN: JP.02149522-19900608.

- ROMERO, L. T. 1998: Tecnología de cultivo de *Chlorella vulgaris* en los efluentes líquidos de la industria pesquera y subproductos derivados. Anais dos IV Congresso Latino-americano de Ficologia, II Reuniao Ibero-americana de Ficología e VII Reuniao Brasileira de Ficologia, Sociada de Ficologica da America Latina e Caribe, pp: 475-495.
- ROMERO, T. y M. PEREZ. 1999: Grado de sensibilidad de organismos patógenas a la cuproclorofila. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Vol. 33 (1): 18-27.
- ROMERO, L. T. 2000: Procedimiento de obtención de cuproclorofila, formulaciones de productos a partir del principio activo y método de tratamiento. Instancia de Registro de Invenciones. No de solicitud: 2000-0099. OCPI. República de Cuba. 13 pp.
- SOEDER, L. J. 1980: The scope of microalgae for food and feed. En: "Algae Biomass. Production and Use ". G. Shelef y C. J. Soeder Eds. Elsevier /North Holland Biomedical Press. pp: 9-20.
- TAKEMI, T., M. FUKUSHIMA y S. MORISUE. 1980: Curing and preventive agent for digestive ulcer. PN: JP.55133315-19801017.
- YUCHI, S., T. TAKEMOTO y Y. UCHIDA. 1985: Antitumor agent. PN: JP.60105627-19850611.
- VENKATARAMAN, L. V. y E. W. BECKER. 1985: Biotecnology and utilization of algae. The Indian Experience. New Delhi, India. 257 pp.