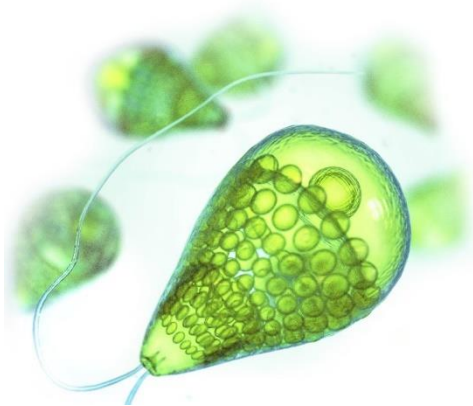


Búsqueda de ingredientes sostenibles para la alimentación de especies con interés acuícola

Exploring sustainable ingredients for feeding species of aquaculture interest



Trabajo de Fin de Grado

Ivette de León Calzadilla

Tutorizado por José Antonio Pérez Pérez y Diana Filipa Botelho Reis

Grado en Biología. Julio 2024

Índice

1.	Resumen.....	1
2.	Introducción	2
2.1.	<i>Tetraselmis striata</i>	6
2.2.	<i>Chlorella vulgaris</i>	6
2.3.	<i>Dunaliella salina</i>	6
2.4.	<i>Arthrospira platensis</i>	7
3.	Objetivos	7
4.	Material y métodos.....	8
4.1.1	Diseño experimental.....	8
4.1.2	<i>Tetraselmis striata</i>	8
4.1.3	<i>Chlorella vulgaris</i>	8
4.1.4	<i>Dunaliella salina</i>	9
4.1.5	<i>Arthrospira platensis</i>	9
4.2	Análisis de la composición lipídica.....	9
4.2.1	Contenido lipídico	9
4.2.2	Determinación de la composición de clases lipídicas	10
4.2.3	Determinación del perfil de ácidos grasos	11
4.2.4	Análisis estadístico	12
5.	Resultados	13
5.1	Contenido lipídico y composición de clases lipídicas.....	13
5.2	Perfil de ácidos grasos.....	16
6.	Discusión.....	22
7.	Conclusiones	27
8.	Bibliografía	28

1. Resumen

El presente trabajo estudió el contenido lipídico y el perfil de clases lipídicas y ácidos grasos de cuatro especies de microalgas (*Tetraselmis striata*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* y *Arthrospira platensis*) producidas en diferentes sistemas de cultivo con el fin de encontrar protocolos más rentables y/o sostenibles para su producción comercial. El sistema de cultivo no afectó al contenido lipídico de las especies. Sin embargo, al cultivar *T. striata* en un medio recircular (reaprovechamiento del agua de cultivo) se incrementó considerablemente el contenido en ácidos grasos omega-3 (AG ω -3). Por otro lado, el aumento de la salinidad del medio promovió la biosíntesis de ácido eicosapentaenoico (20:5n-3; EPA) y de ácido docosahexaenoico (22:6n-3; DHA) en *C. vulgaris*. *D. salina* presentó perfiles lipídicos distintos entre su fase de cultivo verde y naranja, destacando el alto contenido en AG ω -3 en su fase verde. El aumento de salinidad del medio disminuyó el contenido en AG ω -3 de *A. platensis* perjudicando su perfil lipídico de cara a la nutrición acuícola.

Palabras clave: Ácidos grasos; Clases lipídicas; Nutrición acuícola; Microalgas

1. Abstract

The present work studied the lipid content and the lipid classes and fatty acids profiles of four species of microalgae (*Tetraselmis striata*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* and *Arthrospira platensis*) produced under different cultivation methods in order to establish more profitable and/or sustainable protocols for their commercial production. The culture system did not affect the lipid content of the species. However, when rearing *T. striata* in a recirculating system (reuse of culture media) a considerable increase in the content of omega-3 fatty acids (ω -3 FA) was observed. On the other hand, increasing salinity promoted the biosynthesis of eicosapentaenoic acid (20:5n-3; EPA) and docosahexaenoic acid (22:6n-3; DHA) in *C. vulgaris*. *D. salina* presented different lipid profiles between its green and orange culture phases, standing out by its high content of ω -3 FA in its green phase. The increase in salinity reduced the content of ω -3 FA in *A. platensis*, impairing its lipid profile for aquaculture nutrition.

Keywords: Fatty acids; Lipid classes; Aquaculture nutrition; Microalgae.

2. Introducción

La población mundial ha experimentado un crecimiento de más del triple desde mediados del siglo XX. En noviembre de 2022, la cifra global alcanzó los 8.000 millones de personas y se prevé que en 2050 alcance los 9.700 millones de personas (ONU). Por ello, la producción de alimentos compite cada vez más con la disponibilidad de recursos. En este sentido, la acuicultura se perfila como una solución a la escasez y al deterioro de los recursos marinos. En el siglo XXI, los sectores de la pesca y la acuicultura son cada vez más valorados debido a su contribución crucial en la seguridad alimentaria y nutrición mundial. En 2020, la producción pesquera y acuícola alcanzó un récord de 214 millones de toneladas (Figura 1), debido principalmente al crecimiento de la acuicultura (FAO, 2022). La producción acuícola mundial ha experimentado un notable aumento desde 1980, aunque debido al impacto del COVID-19 y problemas políticos en China este crecimiento se ha ralentizado.

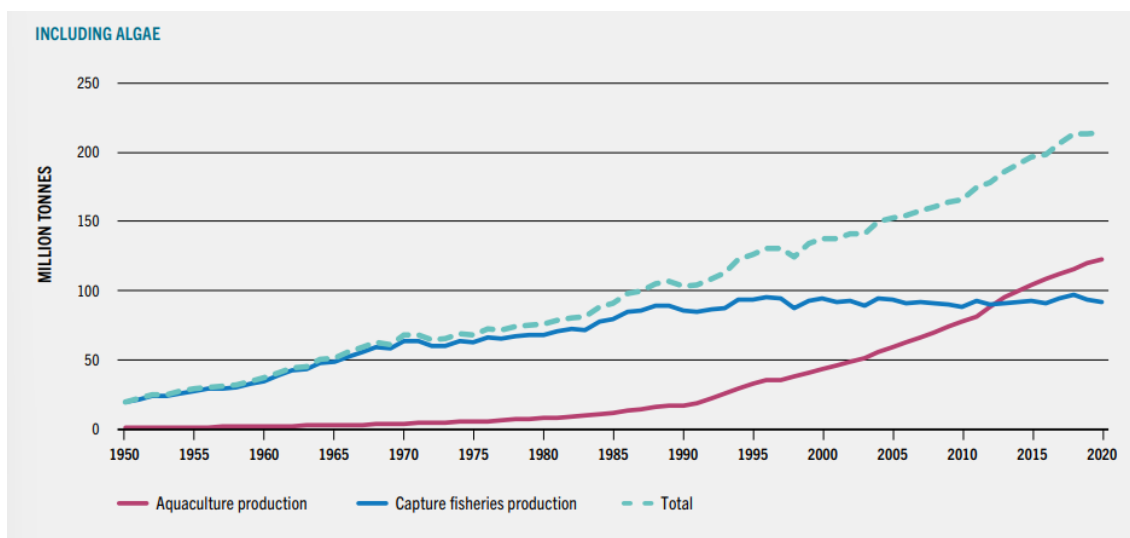


Figura 1 - Producción mundial (pesca + acuicultura) de organismos acuáticos, incluyendo las algas y excluyendo mamíferos, cocodrilos, caimanes y aligátors (fuente: FAO, 2022).

Aunque la producción pesquera y acuícola se destina principalmente para consumo humano, cerca de 20 millones de toneladas, siguen siendo utilizadas para fines no alimentarios. De estos, un 80% se utiliza en la producción de aceites y harinas de pescado, y el resto para fines tan diversos como peces ornamentales, carnada para la pesca, alimento de mascotas, alimento directo (sin transformar) para acuicultura y ganadería, o para usos farmacéuticos (FAO, 2022). El alto consumo de aceites y harinas de pescado

por parte de la industria acuícola, genera un impacto ambiental en los océanos (Naylor et al., 2000). En este sentido, la acuicultura representa una posible solución, siendo a su vez, la principal causante del agotamiento de los recursos marinos. Bajo estas circunstancias, resulta crucial un desarrollo sostenible de la actividad acuícola.

Los piensos elaborados a partir de aceites y harinas de pescado se consideran apropiados ya que contienen proteínas de alta calidad y ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga (ω -3 LC-PUFA). Sin embargo, se trata de un recurso agotable e insostenible, ya que depende directamente de la actividad pesquera. Actualmente, se buscan alternativas para la producción de piensos, como el uso de ingredientes vegetales convencionales. Estos ofrecen ventajas como buenas tasas de crecimiento, pero presentan baja digestibilidad o deficiencia de aminoácidos esenciales, y globalmente disminuyen la calidad nutricional del pescado. Por ello, una sustitución completa de los piensos basados en productos vegetales se consideraría inviable para gran parte de las especies, dado que estas alternativas son altamente ricas en ácidos grasos (AG) ω -6, pero no en AG ω -3, los cuales son esenciales para el correcto desarrollo de los ejemplares y la calidad nutricional del producto final (Turchini et al., 2011).

Las algas, reconocidas por su carácter sostenible, desempeñan un papel fundamental en la cadena alimenticia acuática al servir como fuente de energía y nutrientes esenciales como vitaminas, ω -3 LC-PUFA (EPA y DHA) y pigmentos (Glencross, 2009). Las algas abarcan un grupo diverso de organismos eucariotas fotosintéticos, desde diminutas células microscópicas, conocidas como microalgas, hasta formas multicelulares, llamadas macroalgas. Presentan gran biodiversidad, y elevada variedad de morfologías y funciones metabólicas. Residen en diferentes entornos y son capaces de adaptarse a una amplia gama de ecosistemas, desempeñando un papel crucial en el equilibrio ecológico (Fernández et al., 2013). Las algas resultan indispensables en la regulación del ciclo del carbono, al absorber dióxido de carbono a través de la fotosíntesis, contribuyendo significativamente a la producción de oxígeno y a la mitigación del cambio climático. Por consiguiente, el cultivo de microalgas junto a las centrales de combustión adquiere una importancia estratégica, ya que tienen la capacidad de capturar el dióxido de carbono y convertirlo posteriormente en aceites, para la fabricación de biocombustibles, la alimentación animal, la acuicultura, la producción de tintes y la síntesis de productos farmacéuticos entre otros (Ghirardi et al., 2000; Safi et al., 2014).

La producción mundial de algas en 2020 fue de 36 millones de toneladas, siendo los países asiáticos, especialmente China, los principales productores, representando el 70% de la producción pesquera y acuícola. La producción europea representa el 10% de la producción mundial, destacando España (0,80%) y Dinamarca (0,73%) (FAO, 2022). Dentro de España, en Andalucía se produjeron 1,2 toneladas de microalgas, concretamente de *Nannochloropsis gaditana*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana* y *Phaeodactylum tricornutum* (Apromar, 2023).

El cultivo de microalgas es una tecnología de rápido crecimiento dada su versatilidad. Sus ventajas sobre plantas terrestres radican en su alta eficiencia fotosintética, capacidad y velocidad de proliferación (Peralta et al., 2021). Además, son resistentes a contaminantes y pueden ser empleadas en tecnologías ambientales como el tratamiento de aguas residuales, la neutralización de desechos, la captura del carbono y la limpieza de gases de combustión (Nagarajan et al., 2020). Los medios empleados para el cultivo de microalgas deben proveer todos los elementos necesarios para el desarrollo y sustento del organismo. Los parámetros óptimos y el rango tolerado son específicos de cada especie, y cada uno debe ser determinado individualmente. Todos estos factores afectan a la productividad de la biomasa celular, la fotosíntesis y la actividad del metabolismo celular, repercutiendo en la composición celular. Los cultivos se pueden clasificar en dos grandes grupos: sistemas cerrados y abiertos (Hernández Pérez & Labbé, 2014). En el sistema cerrado, se cultiva al organismo sin estar en contacto con el ambiente externo, evitando así la interferencia de factores y la contaminación; sin embargo, los sistemas abiertos dependen de factores ambientales como la calidad y cantidad de nutrientes, la luz, el CO₂, la temperatura, el pH y la turbulencia y salinidad del medio en el exterior (Sukla et al., 2015).

La aplicación de las microalgas en acuicultura abarca tanto el suministro directo en la alimentación de moluscos bivalvos, crustáceos y larvas de peces, como la integración indirecta en el enriquecimiento del zooplankton, componente crucial en la dieta de larvas de muchos organismos acuáticos (Halima, 2017). Recientemente, las microalgas han ganado atención como potencial componente predominante en los piensos gracias a su calidad nutricional y sostenibilidad, pero su viabilidad se ve limitada por el alto costo asociado a su producción, incluyendo la inversión inicial, mantenimiento y consumo energético. Además, se enfrentan a desafíos como la baja digestibilidad de ciertas especies y el riesgo de contaminación en el proceso de cultivo (Santos et al., 2014).

Las microalgas poseen, además, el potencial de enriquecer el valor nutricional de los alimentos tradicionales, lo que repercute positivamente en la salud, tanto en animales como en humanos. Su alto contenido proteico las convierte en una fuente alternativa valiosa de este importante macronutriente, además de poseer polisacáridos, carotenoides y AG con propiedades antibióticas, antioxidantes y antienvjecimiento (Galindo et al., 2024). El contenido lipídico de las microalgas puede variar entre el 1% y el 70% del peso seco, llegando incluso al 90% bajo ciertas condiciones (Spolaore et al., 2006). Entre los fosfolípidos, el monogalactosil diacilglicerol (MGDG), el digalactosil diacilglicerol (DGDG) y el sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG), se han identificado como agentes antiinflamatorios y antitrombóticos. Entre los lípidos neutros, los fitoesteroles también tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antilipídémicas, disminuyendo el contenido de colesterol y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en humanos (Galindo et al., 2024).

Los lípidos, compuestos principalmente por AG, constituyen una parte fundamental de la dieta de los peces. Estos AG varían en longitud de cadena y grado de saturación, pudiendo ser saturados (SFA; del inglés *Saturated Fatty Acids*), monoinsaturados (MUFA; del inglés *Unsaturated Fatty Acids*) o poliinsaturados (PUFA; del inglés *Polyunsaturated Fatty Acids*), y pueden formar parte de la serie ω -3 (n-3), ω -6 (n-6), ω -9 (n-9), etc., dependiendo de la ubicación del doble enlace más cercano al extremo metilo de la cadena. Entre los LC-PUFA, el ácido docosahexaenoico (22:6n-3; DHA), el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3; EPA) y el ácido araquidónico (20:4n-6; ARA) destacan por su importancia en diversos procesos fisiológicos esenciales para los peces (Glencross, 2009), participando activamente en la integridad y fluidez de la membrana lipídica, la respuesta inmune e inflamatoria, la regulación homeostática y la función orgánica y modulación génica (Pérez et al., 2014). También previenen diversas patologías humanas como el cáncer de colon y de mama, así como trastornos inflamatorios y neurodegenerativos (Galindo et al., 2024). El requerimiento y por tanto la esencialidad de estos AG varía según la especie y el estado de desarrollo de la misma, siendo más evidente en organismos marinos, que carecen de la capacidad de sintetizar LC-PUFA a partir de precursores de 18 átomos de carbono, debido a la falta o a la inactividad de enzimas clave en el proceso (Glencross, 2009).

2.1. *Tetraselmis striata*

Tetraselmis striata es una Chlorophyta, conocidas como algas verdes, y se caracteriza por presentar flagelos y tener paredes celulares individuales, llamadas tecas. Se trata de una microalga eurihalina y se encuentra en salinas y ambientes marinos, también es capaz de sobrevivir a diferentes temperaturas, aunque su composición se vea afectada (Boopathy et al., 2020). A pesar de que destaca por su rica composición en ácidos grasos ω -3, todavía no se ha aprobado para el consumo humano. Sin embargo, *T. chui*, es una de las pocas especies de microalgas actualmente aprobada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), ampliamente usada en la nutrición animal como la acuicultura. Además, presenta un alto contenido en AG esenciales, como el ácido linolénico (18:3n-3; ALA) y EPA, por lo que representa una alternativa interesante al pescado (Conde et al., 2023).

2.2. *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris se descubrió en 1890 por Martinus Willem, y ha estado presente en la Tierra desde hace 2.500 millones de años, manteniendo su genética sin cambios. Morfológicamente es una célula esférica, unicelular, sin flagelo y dulceacuícola. Contiene una pared celular protectora contra invasores, que otorga rigidez e integridad a la célula. En su citoplasma alberga mitocondrias, un núcleo, vacuolas, además de otros orgánulos. Tiene un solo cloroplasto donde almacena los pigmentos dominantes, la clorofila a y b (Safi et al., 2014). Es considerada una microalga termotolerante, y normalmente incluye 14-22% de lípidos, 51-58% de proteínas, 12-17% de carbohidratos y 4-5% de ácidos nucleicos (Kim et al., 2010). *Chlorella* ha sido ampliamente utilizada en distintos campos como en la nutrición humana y animal, salud, aditivos de alimentación, biocombustibles, depuración de aguas residuales y cosméticos (Santos et al., 2014). Tiene alta capacidad de producción de carotenoides con múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria y sanitaria. Actualmente, Japón es el país con mayor consumo de *Chlorella*, siendo uno de sus usos el tratamiento médico al tener propiedades anticancerígenas e inmunoreguladoras (Justo et al., 2001).

2.3. *Dunaliella salina*

Dunaliella salina es una Chlorophyta unicelular y biflagelada que carece de pared celular y contiene un único cloroplasto donde acumula grandes cantidades de pigmentos, principalmente β -caroteno, que acumula hasta el 14% de su peso seco. Este pigmento parece actuar como un fotoprotector para proteger el ADN celular y la clorofila de la alta

irradiancia que caracteriza el hábitat normal. El β -caroteno tiene una alta demanda y variedad de aplicaciones en el mercado, se aplica como colorante en industrias alimentarias, en la industria farmacéutica, cosméticos y alimentos saludables. También contiene esteroides de creciente interés, ya que la presencia de dichos compuestos naturales determina sus valores alimenticios (Francavilla et al., 2010).

2.4. *Arthrospira platensis*

También conocida como Spirulina, *Arthrospira platensis* es una cianobacteria fotosintética, filamentosa y multicelular. Se trata de una especie comestible con alto valor nutricional (Markou et al., 2023). Sus células poseen una membrana plasmática rodeada por una pared multiestratificada separada por septos. Esta pared está envuelta por una cápsula de polisacáridos, y en su interior contiene gránulos de glucógeno, principal fuente de carbono y energía. Es una excelente fuente de proteínas, vitaminas, PUFA (especialmente omega-6), carbohidratos, minerales, ácidos nucleicos y pigmentos (principalmente ficocianina). *A. platensis* contiene micronutrientes y macronutrientes de gran valor que el ser humano no puede sintetizar. Todavía no se ha demostrado su aparición natural en hábitats marinos, aunque se ha informado que es capaz de adaptarse a una amplia gama de ambientes acuáticos como agua dulce, salobre o de mar (Markou et al., 2023). Habitualmente crece en aguas alcalinas y eso le atribuye la limitación de contaminación por otros microorganismos; contiene una pared delgada sin celulosa, lo que facilita su digestión; y al cosecharla no se requieren grandes esfuerzos. Destaca por sus propiedades nutricionales y farmacológicas, mostrando beneficios para la salud, y siendo usada como suplemento alimenticio en humanos y animales (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006).

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es determinar el efecto del tipo de cultivo en el perfil lipídico de 4 especies de microalgas: *T. striata*, *C. vulgaris*, *D. salina* y *A. platensis*.

Para abordar este objetivo se general, se estableció el contenido lipídico, el perfil de clases lipídicas y de ácidos grasos de las especies de estudio.

4. Material y métodos

4.1. Diseño experimental

Dentro del contexto del proyecto ThinkInAzul “Estrategia Conjunta de Investigación e innovación en Ciencias Marinas para abordar de forma sostenible los nuevos desafíos en la Monitorización y Observación Marino-Marítimas, el Cambio Climático, la Acuicultura y otros Sectores de la Economía Azul” se han producido microalgas utilizando diversos métodos de cultivo con el fin de encontrar protocolos más rentables y/o sostenibles para su producción. Todas las microalgas analizadas en el presente trabajo fueron cultivadas en el Instituto Tecnológico de Canarias (ITC) en Pozo Izquierdo, Las Palmas de Gran Canaria, por técnicos e investigadores del propio centro.

4.1.1 *Tetraselmis striata*

Para disminuir el consumo de agua durante el cultivo de *T. striata* se ha testado la recirculación de parte del agua de cultivo. Para ello, después de la cosecha y su centrifugado para la separación de las fases sólido-líquido donde un 80-85% corresponde a la biomasa de microalgas, el 10-15% restante compuesto por agua, se añadió nuevamente al sistema de cultivo. El agua reciclada, contiene una alta concentración de materia orgánica, que por la capacidad mixotrófica de esta especie puede ser asimilada por la misma durante los periodos de ausencia de luz. Este método de producción presenta una alta demanda energética, pero es altamente productivo y presenta una alta eficiencia hídrica. Se estableció el perfil lipídico de *T. striata* cultivada sin recirculación/reaprovechamiento del agua de cultivo (**Medio Sin Recircular**; tratamiento control) y con reaprovechamiento del agua (**Medio Recirculado**; tratamiento experimental).

4.1.2 *Chlorella vulgaris*

Microalga dulceacuícola que presenta una destacada capacidad de adaptación a un aumento de salinidad (Ramos & Pizarro, 2018). En este sentido, y de cara a hacer su cultivo más sostenible y menos dependiente de fuentes de agua dulce, y por lo tanto, disminuyendo su competitividad con cultivos agrícolas, se testó su aclimatación a un aumento de salinidad de un 10% (3,65 PSU). Se analizaron muestras de *C. vulgaris* cultivada en **Agua Dulce** (tratamiento control) y en **10% de Agua de Mar** (tratamiento experimental).

4.1.3 *Dunaliella salina*

Alga verde que en situaciones de estrés, como déficit de nitrógeno, aumento de salinidad o irradiación, cambian su coloración a un anaranjado/rojizo debido a la acumulación de carotenos. La fase verde se caracteriza por ser de máximo crecimiento ya que las condiciones ambientales y las de cultivo son óptimas para el mismo. En esta fase carece de pared celular, contiene solo la membrana de sus células mientras que en la fase naranja hay una acumulación de carotenos, de los que aproximadamente el 98-99% son β -carotenos, siendo una fase interesante para la industria neuro-farmacéutica y cosmética. En este caso, se analizó *D. salina* en **Fase Verde** (tratamiento control) y en **Fase Naranja** (tratamiento experimental).

4.1.4 *Arthrospira platensis*

Es una cianobacteria dulceacuícola con una elevada tolerancia al aumento de salinidad. Fue aclimatada a 10% de agua de mar (3,65 PSU) y a un 100% de agua de mar (36,5 PSU). Se analizaron muestras de *A. platensis* cultivada en **Agua Dulce** (tratamiento control), en **10% de Agua de Mar** (tratamiento experimental 1) y en **Agua de Mar** (tratamiento experimental 2).

Todas las muestras fueron sujetas a un proceso de atomización, un método de secado por aspersión, el cual implica convertir un fluido en un material sólido, atomizándolo en partículas minúsculas hasta convertirlo en polvo. Este proceso reduce la densidad y el tamaño de la biomasa de las algas al deshidratarla, lo que facilita su manejo y preserva el producto al reducir la actividad de agua y la humedad, lo que detiene el crecimiento microbiano y ralentiza las reacciones químicas (Fabiola & Morón, 2017).

4.2 Análisis de la composición lipídica

Todos los análisis bioquímicos de las microalgas fueron llevados a cabo por triplicado en los laboratorios del grupo de investigación NUTRAHLIPIDS (Fisiología de los Lípidos y sus Derivados en la Nutrición Animal y Humana) del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna.

4.2.1 Contenido lipídico

Para determinar el contenido lipídico de las microalgas, se empleó el método de Folch et al. (1957), descrito por Christie (2003). Con el objetivo de minimizar posibles alteraciones en el perfil lipídico, siempre que fue posible se llevó a cabo la extracción en condiciones de frío y oscuridad. Se pesaron entre 500 y 600 mg de cada muestra en sus

respectivos tubos de ensayo, se les añadió 8 mL de cloroformo:metanol (CL:Met; 2:1 v/v) y se homogeneizó con vortex. Se añadieron 2 mL de cloruro potásico (KCl; 0,88% w/v) al tubo de ensayo para la separación entre la fase liposoluble (fase inferior) e hidrosoluble (fase superior). Se volvió a homogeneizar con el vortex y luego se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos en centrífuga (Beckman Coulter Allegra 25R, IN, USA). Posteriormente, se recuperó la fase liposoluble, la cual fue trasvasada a través de un embudo con un filtro (lavado previamente con CL:Met; 2:1 v/v) a otro tubo de ensayo nuevo. Finalmente, las muestras se evaporaron en atmósfera de nitrógeno, el extracto seco se redisolvió en 1 mL de CL:Met (2:1 v/v) para arrastrar todo el lípido, y se introdujo en un vial de cristal previamente pesado. Se evaporó el solvente en atmósfera de nitrógeno y se dejaron toda la noche en un desecador en condiciones de oscuridad y vacío para eliminar cualquier residuo de solventes. Al día siguiente se pesaron los viales y la cantidad total de lípido de cada una de las muestras se obtuvo por diferencia de pesada empleando la ecuación (1). Se volvió a resuspender el extracto lipídico a una concentración de 20 mg/mL de CL:Met (2:1 v/v) con 0,01% BHT, se sellaron los botitos con nitrógeno para evitar la degradación de los lípidos por el oxígeno. Todas las muestras se almacenaron a -20°C para su conservación hasta los siguientes procedimientos.

$$(1) \% \text{ Lípido} = \frac{(\text{Peso frasco+lípido (mg)})-(\text{frasco vacío (mg)})}{\text{Peso muestra (mg)}} \times 100$$

4.2.2 Determinación de la composición de clases lipídicas

La separación de clases lipídicas (CL) se ejecutó por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, del inglés *High Performance Thin Layer Chromatography*), de doble desarrollo unidireccional, en placas de sílica gel de 10 cm x 10 cm x 0,15 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), según el método de Olsen y Henderson (1989). Las placas se lavaron con dietiléter para arrastrar todas las impurezas, después se activaron en estufa a 110°C durante 30 minutos para quemar esas impurezas. Se guardaron en el desecador en oscuridad hasta el momento de su uso. En las placas se pincharon 3 µL de extracto lipídico de las diferentes microalgas y dos estándares de composición conocida (estándar de huevo de bacalao y de mezcla de SQDG, DGDG y MGDG). Con el propósito de separar los lípidos polares (LP), se preparó una solución de 5 mL de isopropanol, 5 mL de cloroformo, 5 mL de metilacetato, 2 mL de metanol y 1,8 mL KCl al 0,25%. Ya desarrollada la placa hasta la mitad, se sacó de la cubeta y se dejó secar en

la campana extractora. Posteriormente, se preparó la solución para la separación de lípidos neutros (LN), que contenía 20 mL de hexano, 5 mL de éter y 0,5 mL de ácido acético. La placa se metió en la cubeta y se dejó que se desarrollara completamente (hasta 0,5 mm del borde superior). Una vez desarrolladas las placas, y secas bajo campana, se pulverizaron con una solución de acetato cúprico al 3% y ácido ortofosfórico en metanol al 8%, y se colocaron en estufa a 160°C durante 15 minutos. Seguidamente, las placas se escanearon en el CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza) a través del software winCATS versión 1.4.1, el cual determina las bandas de las diferentes clases lipídicas por densitometría. Para obtener la proporción de cada clase lipídica de cada muestra, las imágenes se procesaron mediante el software VideoScan versión 1.02.

4.2.3 Determinación del perfil de ácidos grasos

Para determinar el perfil de los ácidos grasos de las distintas muestras por cromatografía de gases (Christie, 2003) y, más tarde, identificarlos y cuantificarlos, se llevó a cabo una transmetilación ácida de los extractos lipídicos. Este proceso implica la ruptura de los enlaces éster que unen los AG a los esqueletos hidrocarbonados, lo que resulta en la formación de ácidos grasos libres. Estos últimos se unen posteriormente a un grupo metilo (-CH₃), lo que da como resultado ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, del inglés *Fatty Acid Methyl Esters*), otorgándoles la propiedad de ser volátiles y, por lo tanto, susceptibles de análisis mediante cromatografía de gases. Para llevar a cabo este proceso, se tomaron 50 µL (1 mg) de extracto de lípido total y se le añadió 50 µL de estándar interno (19:0), y después fueron evaporadas bajo atmósfera de nitrógeno. A las muestras ya evaporadas, se les añadió 1 mL de tolueno y 2 mL de ácido sulfúrico al 1% en metanol (v/v), agitándolas en el vortex. A continuación, los tubos de ensayo se sellaron con sus tapas y se introdujeron en un bloque calefactor a 50°C, en oscuridad y en atmósfera de nitrógeno, durante 16-18 horas. Al día siguiente se le añadieron 2 mL de bicarbonato potásico (KHCO₃) al 2% (w/v) y 5 mL de hexano:éter (1:1, v/v) con BHT al 0,01%, se agitaron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos.

Se transfirió la fase orgánica (superior), la cual contiene los FAMEs, a otro tubo, y para garantizar la recuperación de estos, se repitió este paso nuevamente. Las dos fases orgánicas superiores se evaporaron completamente bajo atmósfera de nitrógeno, y se resuspendieron de nuevo en 100 µL de hexano para llevar a cabo su purificación. Para purificar los FAME, se realizó una cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) con placas de sílica gel de 20 cm x 20 cm x 0,25 mm (Macherey-Nagel,

Düren, Alemania). En cada placa se pincharon con la jeringa Hamilton, las muestras de extractos de microalgas, y un estándar externo de composición conocida para poder identificar la posición de los FAME. Para desarrollarlas, se metieron en una cubeta con 90 mL de hexano, 10 mL de éter y 1 mL de ácido acético. Una vez desarrolladas, se tiñó con iodina (1% yodo en CHCl_3) el lateral, donde se ubica el estándar externo, y la parte superior, donde se espera que esté la mancha de BHT, protegiendo con vidrio las muestras para evitar su contaminación. Esto facilita la identificación y delimitación de la zona donde se ubican los FAMES de cada muestra sin impregnarla de yodo. A continuación, se rasparon las áreas correspondientes de sílice en tubos de ensayo, a los cuales se añadió 10 mL de hexano:éter (2 mL con BHT + 8 mL sin BHT). Posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, y se trasvasó la fase superior, la cual contiene los FAMES purificados, a otro tubo y se evaporó totalmente bajo una atmósfera de nitrógeno.

Para finalizar, las muestras se volvieron a suspender en 900 μL de hexano (de tres veces), se trasvasaron a viales de cristal en atmósfera de nitrógeno, y se almacenaron en un congelador a -20°C hasta su posterior análisis mediante cromatografía de gases. La cromatografía de gases se realizó con un cromatógrafo de gases (TRACE-GC, Thermo Scientific, Milán, Italia) equipado con inyección en columna y detector de ionización de llama FID (del inglés, *Flame Ionization Detector*), el cual separa los ácidos grasos según su peso molecular. La identificación de cada ácido graso se llevó a cabo utilizando un estándar con tiempos de retención conocidos. El contenido de cada ácido graso se expresó como el porcentaje del total de ácidos grasos presentes en la muestra. Además, la inclusión del ácido graso 19:0 en el proceso de transmetilación permitió establecer el contenido absoluto de AG en las muestras.

4.2.4 Análisis estadístico

La comprobación de la normalidad y homocedasticidad de cada uno de los datos se llevó a cabo a través del test Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente. De no cumplirse alguno de estos dos supuestos, se transformaron los datos calculando el valor inverso, el logaritmo en base 10, o bien el arcoseno de la raíz cuadrada. Tras confirmar la normalidad y la homocedasticidad de los datos, se realizó un ANOVA de una vía, para comprobar si los distintos tratamientos de *A. platensis* influyeron en las variables estudiadas, y un test post-hoc de Turkey para localizar las diferencias significativas entre tratamientos. Cuando la conversión de los datos no fue suficiente para corroborar la normalidad y la homocedasticidad de los mismos, se analizó la varianza mediante pruebas

no paramétricas de Welch y de Brown-Forsythe, y para las comparaciones múltiples se aplicó el estadístico T3 de Dunnet. En las microalgas restantes, se realizó una t de Student para tratamientos independientes. Para ello, se verificó la igualdad de varianzas utilizando la prueba de Levene. Posteriormente, basándonos en la suposición de igualdad o no de varianzas, se procedió a realizar la prueba t para la igualdad de medias para localizar los distintos tratamientos con diferencia significativa. Todos los resultados son expresados como media \pm desviación estándar (n=3), considerando las diferencias significativas para $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa IBM SPSS Statistics versión 23.0 para Windows.9.

5. Resultados

5.1 Contenido lipídico y composición de clases lipídicas

El contenido lipídico de *T. striata* fue similar en condiciones de cultivo control y tras la recirculación/reaprovechamiento del agua de cultivo (~3% peso fresco; Tabla 1). Sin embargo, el tratamiento experimental aumentó el contenido total de LN, siendo mayor para todas las fracciones lipídicas neutras, con la excepción de los fitoesteroles que aun presentando un contenido algo superior, no fue estadísticamente significativo. Por el contrario, los LP mostraron el comportamiento opuesto. Entre los LP, cabe destacar el elevado contenido en MGDG + Pigmentos (Tabla 1). Por su posición en la placa, fue imposible separar los pigmentos del MGDG en esta microalga, por lo que el alto valor observado podría ser consecuencia de su elevada proporción de pigmentos.

El aumento de la salinidad en el medio de cultivo de *C. vulgaris* (10% agua de mar; Tabla 2), no varió el contenido lipídico total. Pese a ello, la composición del lípido sí se vio modificada, observándose un aumento en el contenido de LP, destacando la fosfalitilcolina (PC; $4,53 \pm 0,96\%$ del LT), el SQDG ($4,83 \pm 0,08\%$) y el DGDG ($3,63 \pm 0,13\%$) en el tratamiento experimental. Dentro de la fracción neutra, cabe destacar la elevada proporción de fitoesteroles tras el aumento de la salinidad, representando más del 10% de su contenido lipídico. La proporción de ésteres de esterol también incrementó significativamente con la salinidad (Tabla 2).

Tabla 1. Contenido lipídico (% en peso fresco) y composición de clases lipídicas (% de lípido total) de *Tetraselmis striata* cultivada en diferentes medios de cultivo.

	Medio sin Recircular	Medio Recirculado	
Lípido total	3,33 ± 0,79	3,14 ± 0,34	
Fosfatidilcolina	1,73 ± 0,29	1,21 ± 0,17	*
SQDG	3,75 ± 0,36	2,35 ± 0,18	*
DGDG	2,16 ± 0,65	1,22 ± 0,05	
MGDG + Pigmentos	31,52 ± 1,22	25,62 ± 0,46	*
Σ lípido polar	39,15 ± 0,74	30,40 ± 0,80	*
Lípido neutro desconocido	6,82 ± 0,69	9,76 ± 2,19	*
Fitoesteroles	6,55 ± 0,12	8,63 ± 2,36	
Ácidos grasos libres	28,63 ± 2,37	33,16 ± 1,47	*
Triglicéridos	1,47 ± 0,16	3,92 ± 0,31	*
Ésteres de esteroles	6,06 ± 0,45	8,93 ± 0,28	*
Σ lípido neutro	49,52 ± 2,42	64,40 ± 0,52	*
Σ Pigmentos	11,23 ± 2,33	5,20 ± 0,36	*

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n=3). El asterisco (*) señala diferencias significativas entre ambos tratamientos (p<0,05). SQDG: sulfoquinovosil diacilglicerol. DGDG: digalactosil diacilglicerol. MGDG: monogalactosil diacilglicerol.

Tabla 2. Contenido lipídico (% en peso fresco) y composición de clases lipídicas (% de LT) de *Chlorella vulgaris* cultivada a diferentes salinidades.

	Agua dulce	10% Agua de mar	
Lípido total	4,37 ± 0,09	4,57 ± 0,20	
Fosfatidilcolina	0,65 ± 0,36	4,53 ± 0,96	*
Fosfatidilglicerol	0,27 ± 0,16	1,56 ± 0,44	*
SQDG	0,45 ± 0,12	4,83 ± 0,08	*
DGDG	0,26 ± 0,06	3,63 ± 0,13	*
MGDG + Pigmentos	34,86 ± 3,95	30,47 ± 2,57	
Σ lípido polar	36,49 ± 3,36	45,03 ± 1,80	*
Lípido neutro desconocido	15,38 ± 2,86	9,52 ± 1,37	*
Fitoesteroles	nd	10,64 ± 1,24	
Ácidos grasos libres	39,06 ± 0,11	18,43 ± 0,47	*
Triglicéridos	3,09 ± 0,20	2,14 ± 0,43	*
Ésteres de esteroles	5,75 ± 0,38	13,53 ± 0,78	*
Σ lípido neutro	63,28 ± 3,32	54,27 ± 1,77	*
Σ Pigmentos	0,23 ± 0,07	0,70 ± 0,15	*

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n=3). El asterisco (*) señala diferencias significativas entre ambos tratamientos (p<0,05). SQDG: sulfoquinovosil diacilglicerol. DGDG: digalactosil diacilglicerol. MGDG: monogalactosil diacilglicerol. nd: no detectado.

Las dos fases de desarrollo de *D. salina* analizadas en la presente memoria mostraron una composición lipídica muy distinta, aunque un contenido lipídico similar (Tabla 3). Mientras la fase verde presentó un mayor porcentaje de pigmentos ($18,83 \pm 2,62\%$ del LT), SQDG ($4,79 \pm 0,19\%$), DGDG ($4,76 \pm 0,05\%$) y ácidos grasos libres ($22,29 \pm 0,54\%$), la fase naranja se caracterizó por una mayor proporción de ésteres de esterol ($32,34 \pm 4,77\%$) y triglicéridos (TAG; $18,56 \pm 1,87\%$).

Tabla 3. Contenido lipídico (% en peso fresco) y composición de clases lipídicas (% de LT) de *Dunaliella salina* cultivada en diferentes fases de desarrollo.

	Fase verde	Fase naranja	
Lípido total	4,94 ± 1,05	4,23 ± 0,48	
Fosfatidilcolina	1,65 ± 0,25	1,52 ± 0,13	
Fosfatidilglicerol	2,20 ± 0,22	1,10 ± 0,17	*
SQDG	4,79 ± 0,19	1,93 ± 0,27	*
DGDG	4,76 ± 0,05	1,58 ± 0,27	*
MGDG + Pigmentos	29,60 ± 3,08	33,38 ± 3,56	
Lípido polar desconocido	0,30 ± 0,08	Nd	
∑ lípido polar	43,30 ± 3,67	39,51 ± 4,00	
Ácidos grasos libres	22,29 ± 0,54	2,15 ± 1,24	*
Triglicéridos	1,42 ± 0,25	18,56 ± 1,87	*
Ésteres de esterol	14,17 ± 3,64	32,34 ± 4,77	*
∑ lípido neutro	37,87 ± 3,39	53,05 ± 2,67	*
∑ Pigmentos	18,83 ± 2,62	7,44 ± 2,48	*

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n=3). El asterisco (*) señala diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p < 0,05$). SQDG: sulfoquinovosil diacilglicerol. DGDG: digalactosil diacilglicerol. MGDG: monogalactosil diacilglicerol. nd, no detectado.

El contenido lipídico de *A. platensis* no varió con el aumento de salinidad (Tabla 4). Sin embargo, se observó que al cultivar la microalga con un 10% de agua de mar, la proporción de LP disminuyó ($16,06 \pm 1,11\%$ del LT), subiendo esta cuando fueron cultivadas en agua de mar ($33,53 \pm 2,04\%$). Este aumento tuvo lugar por el aumento de todas las clases lipídicas individuales polares, con la excepción de la PC, que no fue detectada en este tratamiento. Dentro de los LN, destaca el aumento en TAG y ésteres de esterol, y el reducido valor de ácidos grasos libres ($2,29 \pm 0,34\%$) observado en *A. platensis* al ser cultivada en agua de mar, frente a los otros tratamientos ($p < 0,05$).

Tabla 4. Contenido lipídico (% en peso fresco) y composición de clases lipídicas (% de LT) de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades.

	Agua dulce	10% Agua de mar	100% Agua de mar
Lípido total	5,95 ± 0,40	5,45 ± 0,56	4,88 ± 0,67
Fosfatidilcolina	0,35 ± 0,18	1,08 ± 0,24	nd
SQDG	5,85 ± 0,37 b	4,36 ± 0,12 a	10,38 ± 0,30 c
DGDG	3,33 ± 0,07 b	2,70 ± 0,05 a	4,80 ± 0,23 c
MGDG + Pigmentos	12,10 ± 0,73 b	7,92 ± 1,03 a	18,35 ± 1,57 c
Lípido polar desconocido	4,60 ± 0,33 a	7,76 ± 0,29 b	6,85 ± 0,98 ab
Σ lípido polar	21,63 ± 1,15 b	16,06 ± 1,11 a	33,53 ± 2,04 c
Fitoesteroles + Pigmentos	15,07 ± 2,55	13,88 ± 0,60	11,18 ± 0,85
Ácidos grasos libres	25,04 ± 0,45 b	30,35 ± 0,44 c	2,29 ± 0,34 a
Triglicéridos	2,95 ± 0,34 a	4,04 ± 0,61 a	6,15 ± 0,83 b
Ésteres de esteroles	10,00 ± 0,32	7,92 ± 0,89	19,29 ± 6,47
Lípido neutro desconocido	1,34 ± 0,35	0,56 ± 0,17	0,79 ± 0,43
Σ lípido neutro	59,00 ± 1,61 b	64,51 ± 1,28 b	46,55 ± 4,21 a
Σ Pigmentos	19,37 ± 0,63	19,43 ± 0,57	19,92 ± 2,19

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n=3). Las letras a,b,c señalan diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05). SQDG: sulfoquinovosil diacilglicerol. DGDG: digalactosil diacilglicerol. MGDG: monogalactosil diacilglicerol. nd: no detectado

5.2 Perfil de ácidos grasos

El perfil de AG de *T. striata* producida bajo diferentes sistemas de cultivo (con o sin recirculación del agua) reveló un mayor contenido de SFA en el sistema sin recirculación del medio, por los altos valores de todos los AG del grupo, principalmente el ácido palmítico (16:0) que representó más del 75% del total de SFA en ambos casos (Tabla 5). De igual manera, el contenido total de MUFA fue mayor en el medio sin recircular (42,87 ± 1,22%), especialmente por el alto nivel del ácido palmitoleico (16:1n-7). Con la recirculación del medio de cultivo, se observó un incremento de los PUFA, destacando los valores de ácido linoleico (18:2n-6, LA) y ALA, que triplicaron su presencia, mientras que el EPA fue casi el doble (18,02 ± 0,18% del total de AG).

La Tabla 6 muestra como *C. vulgaris* cultivada en agua dulce presentó un alto contenido de ácidos grasos de 18C precursores de LC-PUFA (LA y ALA), pero ausencia de ARA, EPA y DHA. Por el contrario, en presencia de un 10% de agua salada, se detectaron proporciones de EPA (0,23 ± 0,01%), DHA (0,25 ± 0,03%) y ARA (0,81 ± 0,10%) y un mayor contenido del precursor ω-3 C18 (11,97 ± 0,28 frente a 9,25 ± 0,46%).

Como consecuencia, el contenido de ácidos grasos ω -3 totales tras el aumento de salinidad se incrementó ($9,36 \pm 0,46$ vs $12,90 \pm 0,30\%$).

D. salina cultivada en su fase verde en la que maximiza su crecimiento, mostró proporciones entre 5 y 6 veces más elevadas de ALA ($25,45 \pm 5,47\%$) y del total de ácidos grasos ω -3 que en fase naranja ($26,23 \pm 5,49$ vs $5,00 \pm 0,44\%$), aunque no se detectó la presencia de EPA ni de ácido docosapentaenoico ($22:5n-3$, DPA; Tabla 7). Las proporciones de DHA permanecieron bajas y constantes ($<0,3\%$) independientemente de la fase en la que se desarrolló el cultivo. Por el contrario, en la fase naranja, *D. salina* casi duplicó su contenido de ácido palmítico 16:0 ($44,44 \pm 0,48$ frente a $28,25 \pm 8,02\%$), mientras que el de 18:1n-9 fue aproximadamente 4 veces superior ($20,33 \pm 0,28\%$).

La salinidad del medio afectó notablemente el perfil de AG de *A. platensis* (Tabla 8). En general, la microalga aumentó el contenido de MUFAs, disminuyó el de SFA y de ω -3 PUFA, y mantuvo las proporciones de ω -6 PUFA con el incremento de la salinidad del medio. Independientemente de la salinidad, esta microalga se caracterizó por elevados valores de LA (17-19% del total de AG) y bajos de ARA, que está presente únicamente en el tratamiento de 100% de agua de mar ($0,11 \pm 0,01\%$). Asimismo, el 18:3n-3 sólo fue detectado cuando el cultivo se llevó a cabo en agua dulce ($0,52 \pm 0,03\%$), aunque el DHA se ausenta en este mismo tratamiento. También cabe destacar que esta microalga no contiene EPA y que presenta valores muy reducidos de DHA (0,14%) en presencia de agua salada.

Tabla 5. Contenido total de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) y perfil de ácidos grasos (% del total de AG) de *Tetraselmis striata* cultivada en diferentes medios de cultivo.

Ácidos grasos	Sin Recircular	Recirculado	
	15,06 ± 3,49	14,11 ± 1,75	
14:0	5,77 ± 0,54	2,22 ± 0,02	*
15:0	1,02 ± 0,09	0,44 ± 0,02	*
16:0	28,68 ± 1,28	23,19 ± 0,24	*
17:0	0,47 ± 0,14	1,02 ± 0,00	*
18:0	0,72 ± 0,03	0,95 ± 0,10	*
24:0	0,36 ± 0,01	0,26 ± 0,03	*
ΣSFA	37,01 ± 1,76	28,08 ± 0,19	*
16:1 n-11	4,62 ± 0,39	6,95 ± 0,19	*
16:1 n-9	1,42 ± 0,13	2,86 ± 0,06	*
16:1 n-7	25,91 ± 1,49	9,00 ± 0,30	*
16:1 n-5	0,42 ± 0,02	0,23 ± 0,02	*
17:1 n-7	0,21 ± 0,04	0,58 ± 0,01	*
18:1 n-9	7,95 ± 0,61	15,29 ± 0,15	*
18:1 n-7	1,77 ± 0,13	2,65 ± 0,05	*
20:1 n-11	nd	0,20 ± 0,01	
20:1 n-9	0,58 ± 0,06	1,52 ± 0,02	*
ΣMUFA	42,87 ± 1,22	39,28 ± 0,06	*
18:2 n-6 (LA)	2,55 ± 0,25	3,78 ± 0,03	*
18:3 n-6	0,78 ± 0,08	0,63 ± 0,02	*
20:4 n-6 (ARA)	1,18 ± 0,17	1,51 ± 0,11	*
Σ PUFA n-6	4,50 ± 0,50	5,92 ± 0,11	*
16:2 n-4	1,27 ± 0,07	0,53 ± 0,02	*
16:3 n-4	0,91 ± 0,06	0,42 ± 0,01	*
Σ PUFA n-4	2,18 ± 0,12	0,95 ± 0,04	*
18:3 n-3 (ALA)	3,41 ± 0,63	10,13 ± 0,05	*
18:4 n-3	1,04 ± 0,26	3,32 ± 0,06	*
20:4 n-3	nd	0,23 ± 0,01	
20:5 n-3 (EPA)	2,28 ± 0,52	4,04 ± 0,14	*
22:6 n-3 (DHA)	0,26 ± 0,45	0,29 ± 0,02	
Σ PUFA n-3	6,99 ± 1,79	18,02 ± 0,18	*
Σ PUFA	13,67 ± 2,39	24,89 ± 0,32	*
n-3 LC-PUFA	2,54 ± 0,97	4,57 ± 0,15	*
n-3/n-6	1,54 ± 0,23	3,04 ± 0,03	*
ARA/EPA	0,52 ± 0,04	0,37 ± 0,02	*
DHA/EPA	0,09 ± 0,16	0,07 ± 0,01	

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (n=3). El asterisco (*) señala diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p < 0,05$). SFA: ácidos grasos saturados. MUFA: ácidos grasos monoinsaturados. PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. LC-PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, n-3: serie ω -3, n-6: serie ω -6, LA: ácido linoleico, ARA: ácido araquidónico, ALA: ácido α -linolénico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico. Nd: no detectado.

Tabla 6. Contenido total de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) y perfil de ácidos grasos (% del total de AG) de *Chlorella vulgaris* cultivada a diferentes salinidades.

Ácidos grasos	Agua dulce	10% Agua de mar	
	15,83 ± 2,88	14,92 ± 0,44	
14:0	0,46 ± 0,02	0,94 ± 0,08	*
15:0	0,26 ± 0,01	0,42 ± 0,02	*
16:0	29,05 ± 1,30	16,55 ± 0,85	*
17:0	nd	0,53 ± 0,01	
18:0	0,45 ± 0,02	1,15 ± 0,05	*
22:0	nd	0,24 ± 0,04	
ΣSFA	30,21 ± 1,35	19,83 ± 0,98	*
14:1 n-5	0,90 ± 0,02	nd	
15:1 n-5	0,25 ± 0,01	nd	
16:1 n-11	nd	6,64 ± 1,28	
16:1 n-9	3,91 ± 0,03	3,06 ± 0,11	*
16:1 n-7	1,15 ± 0,01	2,74 ± 0,04	*
17:1 n-7	4,63 ± 0,28	5,26 ± 0,13	*
18:1 n-9	7,54 ± 0,07	8,55 ± 0,19	*
18:1 n-7	1,79 ± 0,02	6,49 ± 0,20	*
20:1 n-9	nd	0,16 ± 0,14	
22:1 n-11	nd	0,25 ± 0,14	
22:1 n-9	nd	0,26 ± 0,06	
ΣMUFA	20,16 ± 0,15	33,42 ± 1,64	*
18:2 n-6 (LA)	17,56 ± 0,47	17,86 ± 0,44	
18:3 n-6	nd	0,28 ± 0,01	
20:2 n-6	nd	0,08 ± 0,13	
20:4 n-6 (ARA)	nd	0,81 ± 0,10	
22:4 n-6	0,24 ± 0,01	0,57 ± 0,07	*
22:5 n-6	nd	1,45 ± 0,13	
Σ PUFA n-6	17,80 ± 0,46	21,04 ± 0,66	*
16:3 n-4	0,55 ± 0,01	nd	
Σ PUFA n-4	0,55 ± 0,01	nd	
18:3 n-3 (ALA)	9,25 ± 0,46	11,97 ± 0,28	*
18:4 n-3	0,11 ± 0,01	0,45 ± 0,03	*
20:5 n-3 (EPA)	nd	0,23 ± 0,01	
22:6 n-3 (DHA)	nd	0,25 ± 0,03	
Σ PUFA n-3	9,36 ± 0,46	12,90 ± 0,30	*
Σ PUFA	27,87 ± 0,92	33,95 ± 0,94	*
n-3 LC-PUFA	nd	0,48 ± 0,03	
n-3/n-6	0,53 ± 0,01	0,61 ± 0,01	*
ARA/EPA	---	3,55 ± 0,52	
DHA/EPA	---	1,10 ± 0,10	

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n=3). El asterisco (*) señala diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p < 0,05$). SFA: ácidos grasos saturados. MUFA: ácidos grasos monoinsaturados. PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. LC-PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, n-3: serie ω -3, n-6: serie ω -6, LA: ácido linoleico, ARA: ácido araquidónico, ALA: ácido α -linolénico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico. Nd: no detectado.

Tabla 7. Contenido total de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) y perfil de ácidos grasos (% del total de AG) de *Dunaliella salina* cultivada en diferentes fases de desarrollo.

Ácidos grasos	Fase Verde	Fase Naranja	
	16,21 \pm 6,93	14,53 \pm 1,63	
14:0	0,80 \pm 0,18	3,42 \pm 0,07	*
15:0	0,31 \pm 0,06	0,40 \pm 0,01	*
16:0	28,25 \pm 8,02	44,44 \pm 0,48	*
17:0	0,30 \pm 0,19	nd	
18:0	0,79 \pm 0,35	2,41 \pm 0,22	*
20:0	0,22 \pm 0,06	1,04 \pm 0,03	*
22:0	0,40 \pm 0,17	0,84 \pm 0,05	*
24:0	0,21 \pm 0,03	0,26 \pm 0,04	
ΣSFA	31,28 \pm 9,01	52,80 \pm 0,33	*
16:1 n-11	8,44 \pm 2,19	0,54 \pm 0,06	*
16:1 n-9	0,59 \pm 0,10	1,15 \pm 0,03	*
16:1 n-7	0,77 \pm 0,09	9,37 \pm 0,23	*
17:1 n-7	1,37 \pm 0,30	0,59 \pm 0,03	*
18:1 n-9	4,85 \pm 0,45	20,33 \pm 0,28	*
18:1 n-7	2,68 \pm 0,25	1,85 \pm 0,11	*
20:1 n-11 + n-9	nd	0,33 \pm 0,03	
22:1 n-11	0,11 \pm 0,10	nd	
ΣMUFA	18,80 \pm 1,85	34,23 \pm 0,20	*
18:2 n-6 (LA)	4,59 \pm 0,36	5,09 \pm 0,14	*
18:3 n-6	1,54 \pm 0,33	nd	
20:2 n-6	0,20 \pm 0,02	nd	
20:4 n-6 (ARA)	nd	0,21 \pm 0,01	
22:5 n-6	nd	0,11 \pm 0,19	
Σ PUFA n-6	6,34 \pm 0,68	5,41 \pm 0,28	
16:2 n-4	0,55 \pm 0,30	0,20 \pm 0,02	
Σ PUFA n-4	0,48 \pm 0,42	0,20 \pm 0,02	
18:3 n-3 (ALA)	25,45 \pm 5,47	4,31 \pm 0,10	*
18:4 n-3	0,51 \pm 0,05	nd	
20:4 n-3	nd	0,11 \pm 0,20	
20:5 n-3 (EPA)	nd	0,18 \pm 0,02	
22:5 n-3	nd	0,18 \pm 0,07	
22:6 n-3 (DHA)	0,27 \pm 0,04	0,23 \pm 0,13	
Σ PUFA n-3	26,23 \pm 5,49	5,00 \pm 0,44	*
Σ PUFA	32,12 \pm 6,47	10,62 \pm 0,40	*
n-3 LC-PUFA	0,27 \pm 0,04	0,70 \pm 0,34	
n-3/n-6	4,10 \pm 0,45	0,93 \pm 0,11	*
ARA/EPA	---	1,22 \pm 0,23	
DHA/EPA	---	1,24 \pm 0,67	

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (n=3). El asterisco (*) señala diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p < 0,05$). SFA: ácidos grasos saturados. MUFA: ácidos grasos monoinsaturados. PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. LC-PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, n-3: serie ω -3, n-6: serie ω -6, LA: ácido linoleico, ARA: ácido araquidónico, ALA: ácido α -linolénico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico. Nd: no detectado.

Tabla 8. Contenido total de ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) y perfil de ácidos grasos (% del total de AG) de *Arthrospira platensis* cultivada a diferentes salinidades.

	Agua dulce	10% Agua de mar	100% Agua de mar
Ácidos grasos	36,21 \pm 3,19	30,40 \pm 4,06	27,10 \pm 4,31
14:0	0,14 \pm 0,01	0,08 \pm 0,07	0,12 \pm 0,01
15:0	0,15 \pm 0,02 a	0,22 \pm 0,02 b	0,19 \pm 0,02 ab
16:0	40,84 \pm 0,33 b	41,19 \pm 0,51 b	36,72 \pm 0,39 a
17:0	0,28 \pm 0,01 b	0,27 \pm 0,01 b	0,23 \pm 0,01 a
18:0	0,99 \pm 0,02 b	1,33 \pm 0,03 c	0,88 \pm 0,04 a
ΣSFA	42,40 \pm 0,33 b	43,09 \pm 0,60 b	38,14 \pm 0,39 a
16:1 n-11	5,31 \pm 0,31 b	4,80 \pm 0,10 a	6,44 \pm 0,08 c
16:1 n-9	1,73 \pm 0,03 a	2,06 \pm 0,00 b	2,14 \pm 0,05 b
16:1 n-7	4,55 \pm 0,06 a	5,96 \pm 0,04 b	6,02 \pm 0,17 b
17:1 n-7	0,14 \pm 0,02 a	0,33 \pm 0,01 b	0,51 \pm 0,01 c
18:1 n-11	0,15 \pm 0,01	nd	nd
18:1 n-9	1,87 \pm 0,03 b	1,74 \pm 0,02 a	4,12 \pm 0,02 c
18:1 n-7	0,70 \pm 0,03 c	0,32 \pm 0,01 a	0,48 \pm 0,01 b
ΣMUFA	14,45 \pm 0,34 a	15,22 \pm 0,10 b	19,71 \pm 0,13 c
18:2 n-6 (LA)	18,81 \pm 0,10 b	19,30 \pm 0,16 c	17,15 \pm 0,29 a
18:3 n-6	18,94 \pm 0,06 b	17,85 \pm 0,37 a	19,97 \pm 0,18 c
20:2 n-6	0,27 \pm 0,06	0,27 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02
20:3 n-6	0,22 \pm 0,03 a	0,27 \pm 0,02 a	0,36 \pm 0,02 b
20:4 n-6 (ARA)	nd	nd	0,11 \pm 0,01
Σ PUFA n-6	38,24 \pm 0,11	37,69 \pm 0,53	37,86 \pm 0,43
16:2 n-4	0,40 \pm 0,01 b	0,40 \pm 0,02 b	0,28 \pm 0,03 a
18:3 n-4	0,18 \pm 0,00 a	0,22 \pm 0,00 b	0,18 \pm 0,01 ab
Σ PUFA n-4	0,57 \pm 0,01 b	0,62 \pm 0,02 c	0,46 \pm 0,02 a
18:3 n-3 (ALA)	0,52 \pm 0,03	nd	nd
18:4 n-3	0,19 \pm 0,03 ab	0,17 \pm 0,02 b	0,10 \pm 0,01 a
20:4 n-3	0,14 \pm 0,06	nd	nd
22:6 n-3 (DHA)	nd	0,14 \pm 0,01	0,14 \pm 0,03
Σ PUFA n-3	0,85 \pm 0,11 b	0,32 \pm 0,02 a	0,24 \pm 0,03 a
Σ PUFA	39,99 \pm 0,22	38,92 \pm 0,52	38,84 \pm 0,45
n-3 LC-PUFA	0,14 \pm 0,06	0,14 \pm 0,01	0,14 \pm 0,03
n-3/n-6	0,02 \pm 0,00 b	0,01 \pm 0,00 a	0,01 \pm 0,00 a

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar ($n=3$). Las letras a,b,c señalan diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$). SFA: ácidos grasos saturados. MUFA: ácidos grasos monoinsaturados. PUFA: ácidos grasos poliinsaturados. LC-PUFA: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, n-3: serie ω -3, n-6: serie ω -6, LA: ácido linoleico, ARA: ácido araquidónico, ALA: ácido α -linolénico, DHA: ácido docosahexaenico. Nd, no detectado.

6. Discusión

Uno de los desafíos actuales de la acuicultura mundial es la búsqueda de nuevas especies de microalgas para su utilización en los sistemas de producción, identificando protocolos de cultivo y estrategias óptimas que puedan ser implementadas a gran escala. En el presente trabajo se ha llevado a cabo la caracterización detallada del perfil lipídico de cuatro especies de microalgas (*T. striata*, *C. vulgaris*, *D. salina* y *A. platensis*) con potencial interés para el sector acuícola, que pueden ser producidas con medios efectivos y sostenibles, contribuyendo de esta manera al futuro desarrollo de la acuicultura. Una parte importante de investigaciones recientes se centran en el incremento de las tasas de producción de biomasa algal y en la fiabilidad de los sistemas de cultivo, intentando mejorar al mismo tiempo su perfil nutricional (Boopathy et al., 2020).

En el presente estudio, se observa que cambios efectuados en los sistemas de producción, no afectaron al contenido lipídico de las microalgas estudiadas, que mostraron valores estables y similares, oscilando entre 4,2 y 5,9% del peso seco de la biomasa producida, salvo *T. striata* (Chlorophyta), que presentó valores algo inferiores (3,2% del peso fresco aproximadamente). La cantidad de lípido acumulada por las microalgas puede variar entre el 1% y el 70% de su peso seco, llegando incluso al 90% bajo ciertas condiciones (Spolaore et al., 2006). Esta variación depende no solo de la especie, sino también de factores ambientales como luz, temperatura, salinidad, etc., además de la composición del medio de cultivo (Cheng et al., 2011). Sin embargo, cabe destacar que las micro y macroalgas de la división Chlorophyta se caracterizan por un bajo contenido lipídico (Galindo et al., 2022).

El contenido de LP y LN en las microalgas analizadas osciló entre el 30 y el 45%, y entre el 38 y el 65% del LT, respectivamente. Dentro de los LP de las microalgas se encuentran fosfolípidos, glicolípidos y esfingolípidos. Los fosfolípidos desempeñan un papel crucial en la integridad estructural de las membranas celulares y son fundamentales en diversos procesos fisiológicos como la absorción, digestión y transporte de lípidos desde el intestino al resto del organismo (Lund et al., 2018). Dada la incapacidad de las larvas de peces marinos para biosintetizar fosfolípidos, su presencia en la dieta es de suma importancia (Lund et al., 2018). En este contexto, debe destacarse el 4,53% de PC en *C. vulgaris* cultivada con 10% de agua de mar. Esta proporción es importante ya que es un fosfolípido que juega un relevante papel en el funcionamiento cerebral (Sargent et al., 1999) y una fuente interesante de lecitina marina rica en LC-PUFA con gran interés para

los sectores farmacéutico, alimentario y cosmético (Galindo et al., 2024). Dentro de los LP también se encuentran los glicolípidos (SQDG, DGDG y MGDG), componentes de las membranas fotosintéticas de las plantas terrestres y de las algas, que desempeñan roles cruciales en la fotosíntesis y en la adaptación de las células a condiciones de estrés (Patrinou et al., 2022). El MGDG es abundante en las membranas de los tilacoides, permite tener una disposición ordenada de las membranas, siendo esencial para la captura de la luz y la transferencia de energía en la fotosíntesis (Bolik et al., 2022). Aunque en las muestras analizadas en la presente memoria se desarrolla conjuntamente con pigmentos, destaca por su alto contenido en todas las especies. DGDG y el SQDG desempeñan un papel adaptativo ante la falta o escasez de fosfato, ya que, bajo estas condiciones, las plantas ajustan su metabolismo para utilizar menos fosfato, lo cual es crítico para su supervivencia, y aumentan la producción de DGDG, que no requiere fosfato (Bolik et al., 2022). Todas las microalgas de este trabajo presentaron bajo contenido de DGDG a excepción de *D. salina* con 4,76% en su fase verde, y *A. platensis* con 4,80% en agua de mar.

Los LN desempeñan funciones esenciales en el almacenamiento de energía y estructuración de las membranas celulares, y se caracterizan por una baja actividad metabólica (Solovchenko, 2012). Los TAG participan en procesos catabólicos, facilitando la producción de energía para las células y se acumulan como cuerpos oleosos en el citoplasma cuando las microalgas están expuestas a factores de estrés. Durante su fase naranja (obtenida tras la inducción de condiciones de estrés), *D. salina*, presentó altos valores de TAG (18%), siendo esta una respuesta a condiciones desfavorables como la escasez de nutrientes, radiación, salinidad, etc. Igualmente, se observó un aumento del contenido de TAG en *A. platensis* cultivada en agua de mar, pero no en un medio con 10% de agua marina, siendo este resultado similar al obtenido con *C. vulgaris*. Por tanto, parece que un 10% de agua de mar, no induce un estrés significativo en las microalgas que conlleve la acumulación de TAG. Los fitoesteroles son componentes cruciales para la vida eucariota, ya que regulan la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares (He et al., 2022). El consumo de fitoesteroles en humanos puede reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, ya que conduce a una menor absorción intestinal de colesterol, resultando en un menor nivel de colesterol sérico (Vega, 2017). Por otro lado, en la nutrición de los peces producidos por acuicultura, la suplementación con fitoesteroles podría reducir eficazmente la alteración del metabolismo de los lípidos causada por dietas altamente ricas en lípidos, relacionándose con el aumento de la

capacidad antioxidante y la regulación beneficiosa de los genes relacionados con el metabolismo lipídico. Sin embargo, un exceso de fitoesteroles en la dieta podría reducir el efecto paliativo sobre el hígado, siendo necesario determinar el suplemento óptimo para cada especie y fase de desarrollo (He et al., 2022). De las especies estudiadas, *D. salina*, y *C. vulgaris* cultivada en agua dulce, carecen de fitoesteroles, mientras que *T. striata* y *A. platensis* contienen valores considerables, destacando *C. vulgaris* cultivada en 10% de agua de mar ($10,64 \pm 1,24\%$). Los ésteres de esteroles se encuentran en todos los tejidos vegetales, variando en contenido según el órgano, tejido y factores ambientales y de desarrollo. Desempeñan un papel esencial en la homeostasis de esteroides en las membranas, equilibrando su formación e hidrólisis y actúan como reserva de los mismos, asegurando niveles adecuados en la membrana plasmática durante el crecimiento y desarrollo (Burciaga-Monge, 2019). Todas las especies analizadas en este trabajo contenían altos valores de estos compuestos, destacando su alto contenido en la fase naranja de *D. salina* ($32,34 \pm 4,77\%$).

Un cambio en el perfil lipídico de la dieta de los organismos marinos influye en la composición de AG de sus tejidos (Naylor et al., 2000). Esto no solo puede afectar a su salud, sino también la salud de los consumidores, dado que los productos marinos son la principal fuente de ω -3 LC-PUFA. La escasez o desequilibrio de estos AG en la dieta humana está relacionada con el desarrollo de diversas patologías, tales como enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, así como trastornos psiquiátricos y neurodegenerativos (Pérez et al., 2014; Zárate et al., 2017). Los PUFA de 18C como LA y ALA son esenciales para los vertebrados, ya que no pueden ser sintetizados *de novo*, lo que hace necesario obtenerlos a través de la dieta, incluyendo también los ω -3 LC-PUFA imprescindibles para mantener la salud y bienestar general de los vertebrados (Naylor et al., 2000).

La microalga *T. striata* cultivada en medio recirculado (con reaprovechamiento del agua de cultivo) presentó un alto contenido de ω -3 PUFA (18,02% del total de AG), con un 10,1% de ALA, un 4% de EPA y un 0,3% de DHA. Además, presentó proporciones considerables de ácido estearidónico (SDA, 18:4n-3; $3,32 \pm 0,06\%$), AG involucrado en la prevención de procesos relacionados con la angiogénesis tumoral, la reducción de la expresión de genes inflamatorios y la inhibición de la agregación plaquetaria, siendo en esta última más efectivo incluso que el EPA y el DHA (Kaur et al., 2011). El aumento del contenido en estos AG, lleva a pensar que al reciclar un 10-15% del contenido hídrico, podría haber una mayor carga microbiana y concentración orgánica, la cual favorece la

absorción/formación de AG. Sin embargo, sería interesante analizar el agua de cultivo excedente antes de devolverla al sistema de cultivo de las microalgas, de cara a determinar los posibles factores implicados. Por el contrario, *T. striata* en el medio sin recircular presentó las cantidades más bajas de PUFA de todas las microalgas de este estudio, especialmente de los precursores LA y ALA. Sin embargo, en ambos sistemas de producción, mostró una proporción ω -3/ ω -6 muy favorable (1,5 y 3,0). En las dietas de la población occidental, el dominio del consumo de ω -6 supera al consumo de ω -3, lo que ha contribuido al incremento de enfermedades crónicas relacionadas con la dieta. Por ello, mantener una proporción equilibrada de ω -3/ ω -6, idealmente cercana a 1:4 es crucial para regular la homeostasis del cuerpo y mitigar los efectos patológicos asociados con desequilibrios de estos AG (Mariamenatu & Abdu, 2021).

La composición nutricional de las algas se ve afectada por distintos factores ambientales, como la temperatura, la disponibilidad de CO₂, la exposición a rayos UV, la falta de nutrientes y la salinidad (Salama et al., 2013), siendo estos últimos los más cambiantes en los sistemas de cultivo de cara a la alteración del perfil lipídico (He et al., 2022). El aumento de la salinidad en el cultivo de *C. vulgaris*, no afectó su contenido lipídico, ni la acumulación de TAG, sin embargo, se observó una activación de la biosíntesis de LC-PUFA, tras su cultivo con 10% de agua de mar; destacándose la presencia de ARA, EPA, DHA y 22:5n-6, que no fueron detectados cuando *C. vulgaris*, fue cultivada en agua dulce. Estos resultados, son muy esperanzadores de cara a la mejora del perfil lipídico de esta microalga y su uso como fuente de AG ω -3 para el cultivo de especies acuícolas.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos que reciben cada vez más atención por sus potenciales beneficios para la salud y su papel crucial en la prevención de enfermedades cardiovasculares, degeneración macular y diversos tipos de cáncer. Estos compuestos son considerados antioxidantes naturales, ayudando a mantener la estabilidad y la coloración de los alimentos (Gong & Bassi, 2016). Entre los carotenoides, destaca el β -caroteno que se encuentra en diversas fuentes naturales, siendo *D. salina* la principal pudiendo contener hasta un 16% de este compuesto en materia seca, al estar expuesta a condiciones de estrés (fase naranja; Ben-Amotz et al., 2009). Estas condiciones de estrés modificaron también el perfil de AG de esta microalga, observándose un incremento de SFA (52,80%) y MUFA (34,23%) en la fase naranja. Estudios previos señalan que la acumulación de β -caroteno en células de *D. salina* se correlaciona positivamente con la producción de ciertos ácidos grasos, como el 16:0 y el 18:1 (Lamers et al., 2010, 2012).

De igual forma, nuestros análisis detectaron un incremento del contenido de 16:0 y 18:1n-9 en la fase naranja con respecto a la fase verde (44,4 vs 28,3% y 20,3 vs 4,9%, respectivamente). Tal y como se ha observado en nuestro estudio, este aumento suele ir acompañado por una disminución de los PUFA ya que son particularmente sensibles a la oxidación, especialmente el 18:3n-3 (Lamers et al., 2010, 2012). A pesar de esto, cabe destacar la presencia de EPA, 20:4n-3 y 22:5n-3 en la fase naranja, AGs que no fueron detectados en la fase verde.

A. platensis es ampliamente usada como suplemento alimenticio dado su alto contenido proteico (hasta el 70% del peso seco), vitaminas y minerales como el hierro (Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006). A pesar de ser una especie de agua dulce, esta microalga es capaz de adaptarse a elevada salinidad y su cultivo en agua de mar es de gran interés especialmente en regiones costeras (donde el agua dulce suele estar menos disponible) favoreciendo así un cultivo más sostenible (Markou et al., 2023). Sin embargo, este aumento de salinidad, puede derivar en condiciones de estrés para la microalga alterando su perfil lipídico. Comparando el perfil de *A. platensis* cultivada en agua dulce o agua de mar, observamos una disminución de SFA y un aumento en MUFA, con la salinidad. Estos resultados son similares a los publicados por Markou et al. (2023) quienes observaron una disminución de la ratio SFA/AG insaturados, tras el aumento de la salinidad. Esta parece ser una respuesta adaptativa de las células al aumento de la salinidad, que actúa como un mecanismo para mantener la fluidez y funcionalidad de la membrana, ante una presión osmótica aumentada (Cui et al., 2020). Por otro lado, los AG insaturados son de alto interés para el sector alimentario, ya que tienen un valor nutricional mayor que los SFA. No obstante, el contenido en de esta especie en ω -3 PUFA es muy reducido (entre 0,24% y 0,85% de total de AG) siendo los más bajos obtenidos tras el aumento de la salinidad, mientras los valores de ω -6 PUFA son superiores a 37% en todos los tratamientos. Considerando la importancia del consumo de ω -3 LC-PUFA, para el correcto desarrollo de los organismos marinos, la composición nutricional de esta microalga parece ser desbalanceada.

7. Conclusiones

1. Desde una perspectiva de calidad nutricional, la microalga *Tetraselmis striata* cultivada en recirculación parece ser la más adecuada para su uso en acuicultura y para consumo humano, debido a su alto contenido en ácidos grasos ω -3 LC-PUFA, EPA y DHA.
2. *Chlorella vulgaris* presenta mejor perfil lipídico al ser cultivada con un 10% de agua de mar, al incrementar sus cantidades de EPA y DHA, y de ácidos grasos ω -3 totales, además de presentar altos valores de ALA y LA.
3. Para la industria alimentaria humana y animal, destaca *Dunaliella salina* en su fase verde dado su alto contenido en ALA y su saludable ratio ω -3/ ω -6 de 4,1:1.
4. A pesar de su utilización en la alimentación humana, *Arthrospira platensis*, no contiene un perfil de ácidos grasos nutricionalmente destacado, ya que presenta los valores más altos de ω -6 (~38% del total de AG) y baja proporción de ω -3 (<1%), lo que se traduce en una ingesta con efecto potencialmente proinflamatorio para los humanos.

7. Conclusions

1. From a nutritional perspective, the microalgae *Tetraselmis striata* cultured under a recirculation system, seems to be the most suitable for use in aquaculture and human consumption, due to its high content in ω -3 LC-PUFA, EPA and DHA.
2. *Chlorella vulgaris* shows a better lipid profile in the treatment with 10% seawater, increasing its amounts of EPA and DHA, and total ω -3 fatty acids, in addition to having high values of ALA and LA.
3. For the human and animal food industry, *Dunaliella salina* stands out in its green phase due to its high ALA content and its enriching ω -6/ ω -3 ratio of 4,1:1.
4. Despite its use in human food, *Arthrospira platensis*, does not have a nutritionally outstanding fatty acid profile, as it has the highest values of ω -6 (~38% of total AG) and low proportion of ω -3 (~1%), which translates into an intake with pro-inflammatory effects for humans.

8. Bibliografía

- Apromar 2023. La acuicultura en España.
- Ben-Amotz, A., Polle, J.E., & Rao, D. S. (2009) The alga *Dunaliella*: Biodiversity, physiology, genomics and biotechnology. CRC Press. ISBN 9780429061639
- Bolik, S., Albrieux, C., Schneck, E., Demé, B., & Jouhet, J. (2022). Sulfoquinovosyldiacylglycerol and phosphatidylglycerol bilayers share biophysical properties and are good mutual substitutes in photosynthetic membranes. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1864(12), 184037. DOI: 10.1016/j.bbamem.2022.184037
- Boopathy, A. B., Jayakumar, T., Chinnasamy, S., Rajaram, M. G., Mohan, N., Nagaraj, S., Rengasamy, R., Manubolu, M., Sheu, J. R., & Chang, C. C. (2020). Biomass and lipid production potential of an Indian marine algal isolate *Tetraselmis striata* BBRR1. *Energies*, 13(2), 341. DOI: 10.3390/en13020341
- Burciaga-Monge, A. D. (2019). Metabolismo de esteroides esterificados en plantas: Implicación en el desarrollo y la respuesta a estrés. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. 188 pp.
- Chen, C.Y.; Yeh, K.L.; Aisyah, R.; Lee, D.J.; Chang, J.S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 71–81.
- Christie, W.W. (2003). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, (Bridgwater, England).
- Conde, T., Aveiro, S., Melo, T., Santos, T., Neves, B., Domingues, P., Varela, J., Pereira, H., & Domingues, M. R. (2023). Cross-stress lipid response of *Tetraselmis striata* CTP4 to temperature and salinity variation. *Algal Research*, 74, 103218. DOI: 10.1016/j.algal.2023.103218
- Cui, J., Sun, T., Chen, L., & Zhang, W. (2020). Engineering salt tolerance of photosynthetic cyanobacteria for seawater utilization. *Biotechnology Advances*, 43, 107578. DOI : 10.1016/j.biotechadv.2020.107578
- Fabiola, M., & Morón, F. (2017). Secado por aspersión. En Espinosa, H., García-Márquez, A., & García-Márquez, E. *Tecnologías De Nano-Microencapsulación De Compuestos Bioactivos*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. ISBN: 978-607-97548-3-9
- FAO 2022. The state of world fisheries and aquaculture. Towards blue transformation.
- Fernández, D. R., Chica, C., & Parra, M. (2013). Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación. *Elementos Bogotá*, 3(3). DOI: 10.15765/e.v3i3.418
- Folch J., Lees, M. & Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biology Chemistry*, 226, 497-509.
- Francavilla, M., Trotta, P., & Luque, R. (2010). Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. *Bioresource Technology*, 101(11), 4144–4150. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.139
- Galindo, A., García, C. del M., Pérez, J. A., Abdul-Jalbar, B., Venuleo, M., Acosta, N. G., Marrero, M., & Rodríguez, C. (2024). Lipid characterization of beach-cast seaweeds from Gran Canaria Island: Potential use in human and animal nutrition. *Journal of Marine Science and Engineering*, 12(6), 942. DOI: 10.3390/jmse12060942
- Galindo, A., Reis, D. B., Rodríguez, I., Pérez, J. A., Abdul-Jalbar, B., Zárata, R., Nunes, N., Pinheiro De Carvalho, M. A. A., Acosta, N. G., & Rodríguez, C. (2022). Lipid characterization of 14 macroalgal species from Madeira Archipelago: Implications for animal and human nutrition. *Botanica Marina*, 65(1), 51–67. DOI: 10.1515/bot-2021-0024
- Ghirardi, M., W. Lee, J., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., & Melis, A. (2000). Microalgae a green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*, 18(12), 506-511. DOI: 10.1016/s0167-7799(00)01511-0.
- Glencross, B. D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Aquaculture Research*, 1(2), 71-124. DOI: 10.1111/J.1753-5131.2009.01006.X.

- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396-1412. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.10.005
- Halima, N. B. (2017). Why is it important to use algae in aquaculture. *Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1(1), 11-13.
- He, Y., Tang, Y., Xu, N., Yao, C., Gong, Y., Yin, Z., Li, Q., Zhang, Y., Lai, W., Liu, Y., Cao, X., Mai, K., & Ai, Q. (2022). Effects of supplemental phytosterol on growth performance, body composition, serum biochemical indexes and lipid metabolism of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed with high lipid diet. *Aquaculture*, 551, 737889. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.737889
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. DOI: 10.4067/S0718-19572014000200001
- Justo, G. Z., Silva, M. R., & Queiroz, M. L. S. (2001). Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 23(1), 119–132. DOI: 10.1081/IPH-100102573
- Kaur, G., Cameron-Smith, D., Garg, M., & Sinclair, A. J. (2011). Docosapentaenoic acid (22:5n-3): A review of its biological effects. *Progress in Lipid Research*, 50(1), 28-34. DOI: 10.1016/j.plipres.2010.07.004
- Kim, J., Lingaraju, B. P., Rheame, R., Lee, J.-Y., & Siddiqui, K. F. (2010). Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science and Technology*, 15(4), 391–396. DOI: 10.1016/S1007-0214(10)70078-X
- Lamers, P. P., Van de Laak, C. C., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2010). Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology And Bioengineering*, 106(4), 638-648. DOI: 10.1002/bit.22725
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*, 162(1), 21-27. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.018
- Lund, I., El Kertaoui, N., Izquierdo, M. S., Dominguez, D., Hansen, B. W., & Kestemont, P. (2018). The importance of phospholipids combined with long-chain PUFA in formulated diets for pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *British Journal of Nutrition*, 120(6), 628-644. DOI: 10.1017/S0007114518001794
- Mariamenatu, A. H., & Abdu, E. M. (2021). Overconsumption of omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) versus deficiency of omega-3 PUFAs in modern-day diets: The disturbing factor for their “balanced antagonistic metabolic functions” in the human body. *Journal of Lipids*, 2021, 1–15. DOI: 10.1155/2021/8848161
- Markou, G., Kougia, E., Arapoglou, D., Chentir, I., Andreou, V., & Tzovenis, I. (2023). Production of *Arthrospira platensis*: Effects on growth and biochemical composition of Long-Term Acclimatization at Different Salinities. *Bioengineering*, 10(2), 233. DOI: 10.3390/bioengineering10020233
- Nagarajan, D., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2020). Pretreatment of microalgal biomass for efficient biohydrogen production – Recent insights and future perspectives. *Bioresource Technology*, 302, 122871. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122871
- Naylor, R. L., Goldburg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., & Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017-1024. DOI: 10.1038/35016500
- Olsen, R.E. & Henderson, R.J. (1989). The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129(2), 189-197.
- Patrinou, V., Daskalaki, A., Kampantais, D., Kanakis, D. C., Economou, C. N., Bokas, D., Kotzamanis, Y., Aggelis, G., Vayenas, D. V., & Tekerlekopoulou, A. G. (2022). Optimization of cultivation conditions for *Tetraselmis striata* and biomass quality evaluation for fish feed production. *Water*, 14(19). DOI: 10.3390/w14193162
- Peralta, R., Montoya, H., Tarazona, D. T. (2021). Microalgas y cianobacterias: Importancia de sus roles funcionales en los ecosistemas acuáticos y su aprovechamiento sostenible 14-32.
- Pérez, J. A., Rodríguez, C., Bolaños, A., Cejas, J. R., & Lorenzo, A. (2014). Beef tallow as an alternative to fish oil in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Effects on fish performance, tissue

- fatty acid composition, health and flesh nutritional value. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(5), 571–583. DOI: 10.1002/ejlt.201300457
- Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*, 31(9), 657-663
- Ramos, R., & Pizarro, R. (2018). Growth and bioremediation capacity of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivated in wastewater generated in the fish farming of the yellowtail amberjack *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(1), 75–86. DOI: 10.4067/s0718-19572018000100075
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278. DOI:10.1016/j.rser.2014.04.007
- Salama, E. S., Kim, H. C., Abou-Shanab, R. A. I., Ji, M. K., Oh, Y. K., Kim, S. H., & Jeon, B. H. (2013). Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(6), 827–833. DOI: 10.1007/s00449-013-0919-1
- Santos, A. M., González Arechavala, Y., & Martín Sastre, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales de Mecánica y Electricidad*. 25(1), 20–28.
- Sargent, J., Mcevoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., & Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: Current status and future directions. *Aquaculture*, 179(1-4), 217-229. DOI: 10.1016/s0044-8486(99)00191-x.
- Solovchenko, A. E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 167–176. DOI: 10.1134/S1021443712020161
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. DOI: 10.1263/jbb.101.87
- Sukla, L. B., Pradhan, N., Panda, S., & Mishra, B. K. (2015). Environmental microbial biotechnology. *Soil Biology*. DOI: 10.1007/978-3-319-19018-1
- Turchini, G. M., Francis, D. S., Senadheera, S. P. S. D., Thanuthong, T., & De Silva, S. S. (2011). Fish oil replacement with different vegetable oils in Murray cod: Evidence of an “omega-3 sparing effect” by other dietary fatty acids. *Aquaculture*, 315(3–4), 250–259. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.02.016
- Vega, B. O. A. (2017). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, 2, 96-110.
- Zárate. R., Jaber-Vazdekis. N., Tejera. N., Pérez. J., Rodríguez. C., (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and Translational Medicine*, 6, 25. DOI : 10.1186/s40169-017-0153-6