

Caracterización de pigmentos lipofílicos en *Chlorella vulgaris* utilizando espectrometría de
masas MALDI TOF

Stefanny Yajaive Claro Trillos

Trabajo de Grado para Optar al Título de Química

Director

Marianny Yajaira Combariza Montañez

Química, Ph.D.

Codirector

Luis Miguel Díaz Sánchez

Químico, M.Sc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

A mi madre Viancy, quien siempre me apoyo en todo este proceso de crecimiento académico y personal.

Agradecimientos

A mi apreciada Universidad Industrial de Santander.

A mi directora de trabajo de grado Marianny Y. Combariza y mi codirector Luis Miguel Díaz, por su acompañamiento, guía y recomendaciones para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A mi papá Saúl y mi hermanito Cristian, por su apoyo y comprensión.

A mi familia, por todo el apoyo brindando en esta etapa de mi vida.

A mis compañeros y amigos, quienes me aportaron a nivel académico y personal a lo largo de este proceso.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Objetivos	17
1.1 Objetivo General	17
1.2 Objetivos Específicos.....	17
2. Marco referencial	18
2.1 Marco teórico	18
2.1.1 Lípidos (Ácidos grasos y carotenoides).....	21
2.1.2 Técnicas utilizadas para la extracción de lípidos y carotenoides.....	29
2.1.2.1 Extracción asistida con radiación ultrasónica.	29
2.1.2.2 Extracción con Fluidos supercríticos.....	30
2.1.2.3. Extracción Soxhlet.....	32
2.1.3. Caracterización química.....	33
2.1.3.1. Espectroscopia UV-Vis.....	33
2.1.3.2. MALDI-TOF.....	34
2.1.4. Antecedentes	37
3. Materiales y métodos	42
3. 1 Materiales y reactivos	42
3.1.1 Medio de cultivo para el crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	42
3.2 Extracción de pigmentos a partir de la microalga <i>C. vulgaris</i>	44
3.2.1. Extracción de pigmentos asistida por radiación de ultrasonido (EAU).....	45
3.2.2. Extracción de pigmentos utilizando fluido supercrítico (SFE).....	45

3.2.3 Extracción de pigmentos utilizando Soxhlet.....	45
3.3. Identificación de pigmentos a partir de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	46
3.3.1. Caracterización UV-Vis de extractos de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	46
3.3.2. Caracterización MALDI de extractos de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	46
4.Resultados y discusión.....	48
4.1 Cultivo de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	48
4.2. Rendimiento de extracción de pigmentos a partir de la microalga <i>C. vulgaris</i>	51
4.3. Caracterización de extractos de <i>C. vulgaris</i> mediante espectroscopia UV-Vis.....	54
4.4. Caracterización de extractos de <i>C. vulgaris</i> mediante MALDI MS	58
5.Conclusiones	72
6.Recomendaciones	73
Referencias Bibliográficas	74
Apéndices.....	92

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1	23
<i>Nombres numéricos, sistemáticos, comunes y su respectiva abreviación de algunos ácidos grasos principales</i>	23
Tabla 2 <i>Composición del medio de cultivo, Medio Basal de Bold (MBB), utilizado para el crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i></i>	42
Tabla 3	60
<i>Pigmentos tipo clorofila, carotenoides y lípidos identificados en extracto obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), a partir de biomasa seca de <i>Chlorella vulgaris</i>. La tabla muestra el nombre del compuesto correspondiente, la masa teórica, la exactitud de masa relativa (Δ ppm), la relación señal ruido (S/N) y la fórmula propuesta</i>	60
Tabla 4	63
<i>Pigmentos tipo clorofila, carotenoides y lípidos identificados en extracto obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE), a partir de biomasa seca de <i>Chlorella vulgaris</i>. La tabla muestra el nombre del compuesto correspondiente, la masa teórica, la exactitud de masa relativa (Δ ppm), la relación señal ruido (S/N) y la fórmula propuesta</i>	63
Tabla 5	66
<i>Pigmentos tipo clorofila, carotenoides y lípidos identificados en extracto obtenido mediante extracción Soxhlet a partir de biomasa seca de <i>Chlorella vulgaris</i>. La tabla muestra el nombre del compuesto correspondiente, la masa teórica, la exactitud de masa relativa (Δ ppm), la relación señal ruido (S/N) y la fórmula propuesta</i>	66
Tabla 6	69

Abundancia relativa calculada y experimental de algunos compuestos tipo clorofila, carotenoide y lípido identificados en extracto obtenido mediante extracción Ultrasonido a partir de biomasa seca de Chlorella vulgaris. 69

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Representación de una célula de la <i>Chlorella vulgaris</i>	20
Figura 2	21
Clasificación general de los lípidos,	21
Figura 3	24
Nomenclatura de carotenos y espectro UV-Vis.....	24
Figura 4	25
Nomenclatura de xantofilas y espectro UV-Vis.	25
Figura 5	27
Diagrama de ruta biosintética de la formación de carotenoides.	27
Figura 6	28
Representación esquemática del efecto fotoprotector de los carotenoides.....	28
Figura 7	31
Diagrama de fases (PT: Punto triple, PC: Punto crítico, Pc: Presión crítica, Tc: temperatura crítica).	31
Figura 8	36
Esquema de la fuente de ionización MALDI.....	36
Figura 9	38
Publicaciones de artículos científicos en el periodo 2011-2022.....	38

Figura 10	49
Esquema del cultivo de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> ..	49
Figura 11	50
Imagen de microscopía óptica del cultivo de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	50
Figura 12	51
Imagen de los extractos obtenidos mediante: radiación asistida por ultrasonido (EAU), extracción con CO ₂ supercrítico (SFE), y extracción Soxhlet.....	51
Figura 13	52
Representación gráfica de los rendimientos de extracción obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción con CO ₂ supercrítico (SFE), y extracción Soxhlet.....	52
Figura 14	55
Espectros UV-Vis medidos a los extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción Soxhlet a partir de biomasa seca de <i>Chlorella vulgaris</i>	55
Figura 15	60
Espectro de masas MALDI del extracto obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU) a partir de biomasa liofilizada de <i>Chlorella vulgaris</i> . Utilizando DCTB como matriz ET MALDI, relación molar matriz(M): analito(A) 100:1 (M:A).....	60
Figura 16	63
Espectro de masas MALDI del extracto obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE), a partir de biomasa liofilizada de <i>Chlorella vulgaris</i> . Utilizando DCTB como matriz ET MALDI, proporciones molares matriz(M): analito(A) 100:1 (M:A).....	63
Figura 17	65

Espectro de masas MALDI del extracto obtenido mediante extracción Soxhlet a partir de biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris*. Utilizando DCTB como matriz ET MALDI, proporciones molares matriz(M): analito(A) 100:1 (M:A)..... 65

Glosario

ACN	Acetonitrilo
Cer	Ceramida
DCTB	<i>trans-2-[3-(4-tert-butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene] malononitrile</i> (matriz MALDI 2-[(2E)-3-(4-terc-butilfenil)-2-metilprop-2-eniliden] malonitrilo)
DG	Diglicérido
EAU	Extracción asistida por radiación de ultrasonido
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionización electrónica)
E _i	Energía de ionización
ET	<i>Electronic transfer</i> (Transferencia electrónica)
GIFTEX	Grupo de Investigación en Físicoquímica Teórica y Experimental
GP	Glicerofosfolípidos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficacia)
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Ionización/desorción con láser asistida por matriz)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
Nd: YAG	<i>Neodymium-Doped Yttrium Aluminum Garnet Laser</i>
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilserina
PS	Fosfatidilserina
SFE	<i>Supercritic-Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
TAG	Triacilglicéridos
TG	Triglicérido
TOF	<i>Time-of-flight</i> (Tiempo de vuelo)
UAE	<i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> (Extracción con solvente asistida por ultrasonido)
UV-Vis	<i>Ultraviolet Visible Spectroscopy</i> (Espectroscopía Ultravioleta-Visible)

Resumen

Título: Caracterización de pigmentos lipofílicos en *Chlorella vulgaris* utilizando espectrometría de masas MALDI TOF*

Autor: Stefanny Yajaive Claro Trillos**

Palabras Clave: Pigmentos, *Chlorella vulgaris*, EAU, SFE, Soxhlet, Espectrometría de masas MALDI, Transferencia electrónica.

Descripción: El fitoplancton cumple funciones relevantes en diferentes niveles de las cadenas tróficas en nuestro planeta. En este estudio, se obtuvieron fracciones no polares de pigmentos de microorganismos fitoplanctónicos *Chlorella vulgaris* utilizando radiación ultrasónica, SFE y Soxhlet. Así, mediante ET en MS MALDI-TOF, nos acercamos a una identificación integral de pigmentos lipofílicos.

La microalga *Chlorella vulgaris* fue cultivada bajo condiciones controladas, usando BBM, bajo periodos de luz/oscuridad intermitente. Los rendimientos de extracción más altos se obtuvieron utilizando extracción asistida por radiación ultrasonido $56 \pm 7\%$, en comparación con Soxhlet $45 \pm 3\%$, y SFE $11 \pm 8\%$. Los espectros medidos utilizando espectroscopia UV-Vis presentaron señales características atribuidas a la presencia de carotenoides y clorofilas en los extractos de *C. vulgaris* ($\lambda = 400-500$ nm y $\lambda = 600-700$ nm). Lo anterior, fue corroborado mediante los análisis por MS MALDI-TOF, donde se identificó mezclas de pigmentos de diferentes polaridades e.g, luteína ($C_{40}H_{56}O_2$), β -caroteno ($C_{40}H_{56}$), clorofila a ($C_{55}H_{72}MgN_4O_5$), clorofila b ($C_{55}H_{70}MgN_4O_6$) y sus derivados. Asimismo, empleando una matriz comercial MALDI -DCTB (8,5 eV) en los extractos, también se logró identificar una variada composición lipídica, entre esos, triacilglicéridos, glicerofosfolípidos, vitamina D3, entre otros.

Finalmente, los resultados de esta investigación sugieren que la combinación de la técnica de extracción con SFE y el uso de espectrometría de masas MALDI-TOF ofrece un enfoque eficaz para la caracterización de pigmentos lipofílicos en la microalga *C. vulgaris*.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Química. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez. Química, Ph.D. Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez. Químico, M.Sc.

Abstract

Title: Characterization of lipophilic pigments in *Chlorella vulgaris* using MALDI TOF mass spectrometry.*

Author: Stefanny Yajaira Claro Trillos**

Key Words: Pigments, *Chlorella vulgaris*, UAE, SFE, Soxhlet, MALDI mass spectrometry, Electron transfer.

Description: Phytoplankton play relevant roles at different levels of food chains on our planet. In this study, non-polar pigment fractions were obtained from phytoplanktonic microorganisms *Chlorella vulgaris* using ultrasonic radiation, SFE and Soxhlet. Thus, by means of ET in MALDI-TOF MS, we approached a comprehensive identification of lipophilic pigments.

The microalga *Chlorella vulgaris* was grown under controlled conditions, using BBM, under intermittent light/dark periods. The highest extraction yields were obtained using ultrasonic radiation assisted extraction $56 \pm 7\%$, compared to Soxhlet $45 \pm 3\%$, and SFE $11 \pm 8\%$. Spectra measured using UV-Vis spectroscopy presented characteristic signals attributed to the presence of carotenoids and chlorophylls in *C. vulgaris* extracts ($\lambda = 400-500$ nm and $\lambda = 600-700$ nm). This was corroborated by MALDI-TOF MS analysis, where mixtures of pigments of different polarities were identified, e.g., lutein ($C_{40}H_{56}O_2$), β -carotene ($C_{40}H_{56}$), chlorophyll a ($C_{55}H_{72}MgN_4O_5$), chlorophyll b ($C_{55}H_{70}MgN_4O_6$) and their derivatives. Likewise, using a commercial MALDI - DCTB matrix (8.5 eV) in the extracts, it was also possible to identify a varied lipid composition, including triacylglycerides, glycerophospholipids, vitamin D3, among others.

Finally, the results of this research suggest that the combination of the SFE extraction technique and the use of MALDI-TOF mass spectrometry offers an effective approach for the characterization of lipophilic pigments in the microalgae *C. vulgaris*.

* Degree Work

** Sciences Faculty. Chemistry School. Chemistry. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez. Química, Ph.D. Codirector: Luis Miguel Díaz Sánchez. Químico, M.Sc.

Introducción

El 97,5% del agua en el planeta se encuentra en océanos con alta concentración de sales, mientras que el 2,5% restante es agua dulce, de la cual solo el 0,26% pertenece a reservas en lagos y ríos (Shiklomanov et al., 1998). El fitoplancton, compuesto por un conjunto de especies de autótrofos primarios, microalgas como cianobacterias, dinoflagelados y diatomeas, es la base de la pirámide alimentaria en los ecosistemas acuíferos (Santhanam et al., 2018).

La concentración de fitoplancton está relacionada con parámetros físicos (intensidad lumínica, turbulencia) y químicos (composición) de las aguas donde viven (Graham & Wilcox, 2000). Además, debido a su capacidad de fotosíntesis, el fitoplancton fija dióxido de carbono y produce oxígeno, contribuyendo hasta con el 70% del oxígeno atmosférico total (Fernando et al., 2012). Debido a su papel fundamental en el proceso del ciclo del carbono oceánico, al fitoplancton se le conoce como una “bomba biológica”, con una productividad neta primaria similar a la de las plantas vasculares en tierra firme (Barletta et al., 2015). Como organismos vivos, contienen grasas, proteínas, carbohidratos y minerales, además de una alta diversidad de pigmentos como las clorofilas y los carotenoides. Estos dos últimos grupos se usan como biomarcadores para determinar el estado del ecosistema (Zapata & Garrido, 2000).

La microalga *Chlorella vulgaris* fue una de las primeras en ser cultivadas en el laboratorio, gracias al trabajo del botánico holandés Martinus Willem Beijerinck en 1890 (Beyerinick, 1890). Además de su uso industrial para producir biodiesel, esta especie también se utiliza en bioensayos, biorremediación, agroalimentación y biomonitoreo de contaminantes tóxicos como pesticidas, metales pesados y fármacos (Santhanam et al., 2018). Entre los pigmentos presentes en la microalga *C. vulgaris*, se encuentran los carotenoides o pigmentos antena que contribuyen con la

captación de luz para el proceso de la fotosíntesis, entre otras importantes funciones a nivel celular (Safi et al., 2014a). Además, estos pigmentos se asocian con la clorofila para evitar procesos de oxidación asociados con la degradación de clorofila (Gille et al., 2016a). Por otro lado, en *Chlorella vulgaris* se encuentran los lípidos, que son sintetizados por el cloroplasto y también, se pueden ubicar en la membrana de los orgánulos y la pared celular (Safi et al., 2014a). Estos compuestos cumplen diferentes funciones como almacenamiento de energía, protección, señales químicas o vitaminas, también hacen parte de la estructura de las membranas celulares (McKee T & McKee J.R., 2016).

Según lo reportado por la literatura, la extracción de pigmentos tipo carotenoide y clorofila a partir de *Chlorella vulgaris* típicamente se realiza con solventes individuales o mezclas y asistencia mecánica de microondas o ultrasonido (Su et al., 2017). Asimismo, para los carotenoides en particular, se reporta el uso de SFE (extracción con fluidos supercríticos) utilizando como solvente CO₂ supercrítico (Kitada et al., 2009a). SFE permite obtener extractos en poco tiempo, con bajo gasto de reactivos, siendo una metodología amigable con el medio ambiente. Por otra parte, el análisis de pigmentos en microalgas involucra diversas técnicas separación e identificación como HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), espectroscopia de Raman, espectrometría de masas, espectroscopia UV-Vis y cromatografía en capa fina (TLC), entre otras. En este trabajo se extrajeron pigmentos a partir de microorganismos fotosintéticos (*Chlorella vulgaris*) y se caracterizaron utilizando la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF.

La microalga *Chlorella vulgaris* se cultivó bajo condiciones controladas de luz-oscuridad y aireación empleando medio basal de Bold (BBM). A partir de la biomasa cultivada se obtuvieron fracciones ricas en pigmentos mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción

Soxhlet y extracción asistida con radiación de ultrasonido (EAU). El análisis de las fracciones se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF utilizando matrices de transferencia electrónica (ET). Los resultados de esta investigación se divulgaron en modalidad póster en el CLAQ (Congreso Latinoamericano de Química 2021, Cartagena, Colombia) y en el foro virtual LatinXChem 2021.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Extraer e identificar pigmentos tipo carotenoide presentes en *Chlorella vulgaris*, utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF.

1.2 Objetivos Específicos

Obtener fracciones de pigmentos del microorganismo *Chlorella vulgaris* utilizando extracción con CO₂ supercrítico, extracción asistida con radiación ultrasónica y extracción Soxhlet.

Caracterizar las fracciones de pigmentos lipofílicos obtenidas a partir de *Chlorella vulgaris* utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF con matrices de transferencia electrónica.

2. Marco referencial

2.1 Marco teórico

El fitoplancton está conformado por especies de microalgas que habitan en todos los ecosistemas acuíferos. Estas comunidades pertenecen al primer nivel en la cadena trófica, es decir, son productores primarios. El fitoplancton se clasifica según su tamaño celular como piko fitoplancton (0,2-2,0 μm) en el cual se ubican algunas cianobacterias, nano fitoplancton (2,0-20 μm) que incluye algas eucariotas y cianobacterias, micro fitoplancton (20-200 μm), meso fitoplancton (0,2-2 mm) y macro fitoplancton (2-20 mm). En los tres últimos grupos se localizan las algas planctónicas. En general el fitoplancton incluye cianobacterias, diatomeas, dinoflagelados, algas verdes y cocolitofóridos, entre otros (Peraza, 2017).

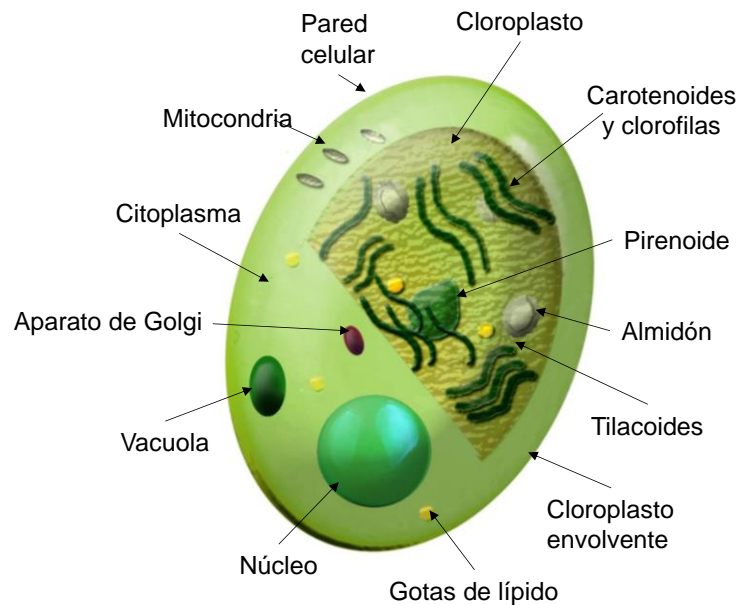
A pesar de que el fitoplancton constituye sólo entre el 1-2 % del carbono global presente en organismos fotosintéticos, su alta tasa de crecimiento y eficiencia fotosintética hacen que pueda fijar grandes cantidades de carbono (30 - 50 x 10⁹ toneladas métricas/año). Adicionalmente, también hace parte de los ciclos biogeoquímicos de elementos como el silicio, nitrógeno y fósforo (Graham & Wilcox, 2000) (Fernando et al., 2012). La estructura de las comunidades de fitoplancton puede cambiar dependiendo de la variación de factores físicos como la temperatura, hidrológicos como la turbulencia, biológicos como el parasitismo fúngico y químicos como la variación en nutrientes, materia orgánica y mineralización. El efecto de estas variables en las comunidades de fitoplancton se refleja en su abundancia y composición, por lo tanto, el fitoplancton es utilizado como un biomarcador para medir la calidad de los cuerpos de agua y el estado de los ecosistemas (Vázquez, 2008) (Garza & Orío, 2012).

La microalga *Chlorella vulgaris* se cataloga como organismo fitoplanctónico. El primer reporte científico sobre este microorganismo, hecho por el microbiólogo holandés Martinus Willem Beijerinck, data de 1890. El tamaño de las células de *Chlorella vulgaris* varía entre 2-10 μm y tienen forma esférica o elipsoidal. Entre sus características morfológicas vale la pena resaltar que tienen una pared celular rígida y gruesa, dentro del citoplasma se hospeda un cloroplasto, mitocondrias, vacuolas, un núcleo pequeño y el aparato de Golgi. En el cloroplasto se alberga grupos de tilacoides donde se encuentran pigmentos como clorofilas y carotenoides, también contiene un microcompartimiento (pirenoide) donde se fija el CO_2 y se almacenan gránulos de almidón, generalmente formados en condiciones desfavorables de crecimiento (Bejerinick, 1890) (Safi et al., 2014a).

La reproducción en estas microalgas es muy veloz y de tipo asexual (autoesporulación) y pueden aprovechar entre el 10-20% de la energía solar incidente. La *Chlorella vulgaris* ha sido ampliamente estudiada y se usa en medicina, producción de biocombustibles, agricultura, nutrición animal y humana. En el área medioambiental, se usa en el tratamiento de aguas residuales, atrapamiento de CO_2 y como biomarcador de ecotoxicidad. En la **Figura 1** se aprecia la estructura de una célula de *Chlorella vulgaris* (Zhang et al., 2000) (Nuñez, 2017) (Liu & Chen, 2014).

Figura 1

Representación de una célula de la Chlorella vulgaris, basado en (Safi et al., 2014a)



Desde los años 60 el fitoplancton marino ha atraído la atención de los ecólogos debido a que estos organismos viven en ecosistemas pelágicos, es decir aguas medias o superficiales. Consecuentemente, el estudio de biomarcadores moleculares en fitoplancton resulta de interés para determinar el estado del ecosistema. Las clorofilas y los carotenoides se usan como biomarcadores, particularmente los primeros que están asociados con el cálculo de la productividad neta primaria de un ecosistema. Los carotenoides, por otra parte, se encuentran en menor concentración y se han postulado como biomarcadores robustos en estrategias de quimiotaxonomía que tienen como objetivo la identificación de manera rápida y acertada de las especies de microorganismos que conforman el fitoplancton (Zapata & Garrido, 2000).

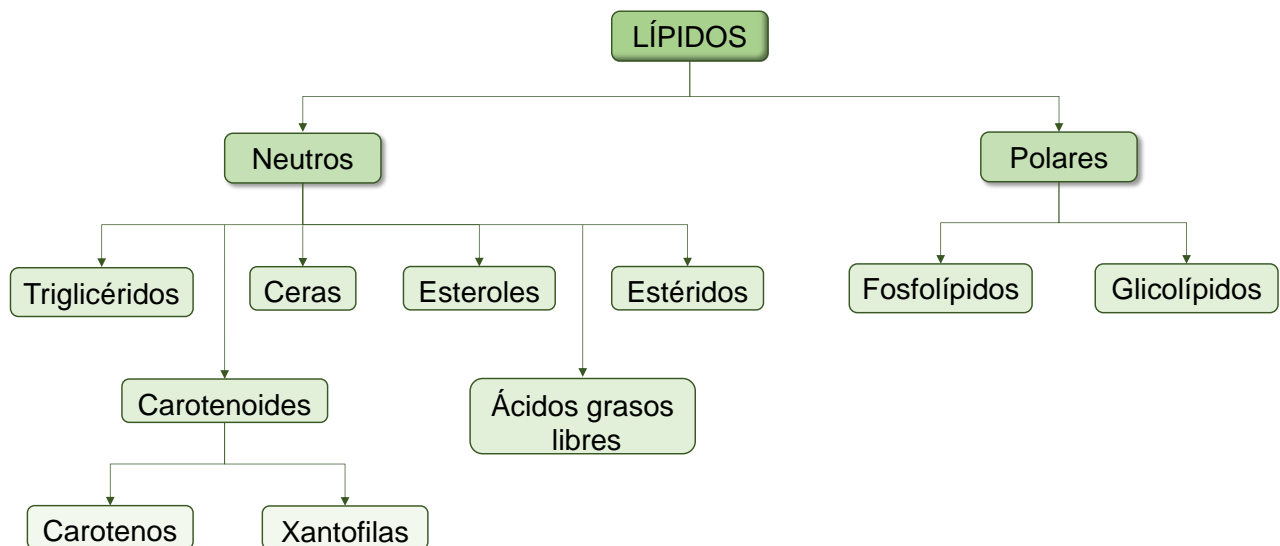
2.1.1 Lípidos (Ácidos grasos y carotenoides)

Las microalgas contienen mayoritariamente carbohidratos, proteínas y lípidos. Sin embargo, como resultado de su capacidad de adaptación a diferentes medios de crecimiento estos organismos pueden modificar el metabolismo de los lípidos que acumulan (Nieto, 2009). Durante años se han estudiado diferentes tipos de cepas *Chlorella* para la producción de biodiesel pues son fáciles de cultivar, su biomasa incrementa rápidamente, y es posible que produzcan altas concentraciones de lípidos (14-40 % en peso seco) (Nieto, 2009).

Los lípidos son biomoléculas compuestas por oxígeno, hidrógeno y carbono. La mayoría, son insolubles en agua y solubles en solventes apolares. Los lípidos se clasifican en (**Figura 2**): lípidos neutros o no polares como triglicéridos, carotenoides, hidrocarburos y ácidos grasos libres, entre otros; y lípidos polares como los fosfolípidos y glicolípidos (Ibáñez, 2005).

Figura 2

Clasificación general de los lípidos, basado en (Ibáñez, 2005)



Los lípidos desempeñan funciones importantes en la microalga pues son el depósito primario de energía y carbono. Estos compuestos se acumulan principalmente en el citoplasma, pared celular (membrana plasmática) y en el cloroplasto. Cabe resaltar, la importancia de la biosíntesis de los ácidos grasos en el metabolismo celular, ya que contribuyen con los grupos acilo a la formación de los acil lípidos de membrana como los glicosilglicéridos y fosfoglicéridos, también proporcionan los triacilglicerol (TAG) que actúan como lípidos de almacenamiento (Khozin-Goldberg, 2016).

Las microalgas exhiben gran variedad de ácidos grasos con diferentes estructuras, longitud de cadena y grado de insaturación. Generalmente, los ácidos grasos de origen natural tienen número par de carbonos, aunque se han reportado ácidos grasos de cadenas impares en algunos tipos de microalgas. En las microalgas se han identificado más de 76 tipos diferentes de ácidos grasos (Khozin-Goldberg, 2016). Los ácidos grasos, en especial los de cadena larga, son los componentes principales de la mayoría de los lípidos (Gunstone, 1996) (Burdge & Calder, 2015).

Existen nombres comunes o triviales ampliamente utilizados para nombrar los ácidos grasos como, por ejemplo, los ácidos linolénico y linoleico provenientes del aceite de linaza; el ácido palmítico proveniente del aceite de palma (Gunstone, 1996). Asimismo, se utilizan las abreviaciones para denominar a los ácidos grasos, por ejemplo, EPA (Ácido eicosaetanoico) y DHA (Ácido docosahexanoico) (He & Hou, 2021). Por otro lado, la nomenclatura sistemática consiste, en primero designar el hidrocarburo que le dio origen, este es la cadena carbonada más larga y el grupo carboxilo. Se comienza a enumerar a partir del carbono terminal de la cadena hidrocarbonada de origen y se deben designar las posiciones de las insaturaciones (He & Hou, 2021). Por último, en la nomenclatura numérica es primordial etiquetar la isomería de la estructura, ya sea cis (c) o trans (t) y la posición de los dobles enlaces. Se emplean las letras n:m, donde n es

la cantidad de átomos de carbono y m el número de dobles enlaces. Asimismo, se puede comenzar enumerando por el carbono terminal o desde el metilo quien debe marcarse como número n o número ω . El número ω se emplea solo para la isomería cis e indica el orden de los átomos de menor número de enlaces dobles de carbono (He & Hou, 2021). Algunos ejemplos de los tipos de nomenclatura mencionados se pueden observar en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Nombres numéricos, sistemáticos, comunes y su respectiva abreviación de algunos ácidos grasos principales.

Nombre numérico	Nombre sistemático	Nombre común	Abreviación
4:0	Ácido butírico	Ácido butírico	B
12:0	Ácido dodecanoico	Ácido láurico	La
14:0	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	M
16:0	Ácido palmítico	Ácido palmítico	P
18:0	Ácido esteárico	Ácido esteárico	St
18:1 ω 9	Ácido (9Z)-9-octadecenoico	Ácido oleico	O
18:2 ω 6	Ácido (9Z,12Z)-9,12-octadecadienóico	Ácido linoleico	L
20:4 ω 6	Ácido (5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14-eicosatetraenoico	Ácido Araquidónico	An
20:5 ω 3	Ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Ácido Eicosapentaenoico	EPA

Las microalgas sintetizan pigmentos como las clorofilas y los carotenoides que se encuentran unidos a los sistemas fotosintéticos en la membrana de los tilacoides (Takaichi, 2011). Los carotenoides son pigmentos derivados de tetraterpenos que absorben radiación en el espectro visible entre 420-550 nm. Estas moléculas son de carácter lipofílico y generalmente exhiben colores brillantes rojo, amarillo o naranja (Wright & Jeffrey, 2006) (Huang et al., 2017). Existen dos tipos de carotenoides: los que no poseen oxígeno se clasifican como carotenos mientras los oxigenados se conocen como xantofilas (**Figuras 3 y 4**). Las xantofilas pueden contener en su

estructura grupos aldehído, ceto, hidroxilo, carbometoxi, metoxi, carboxi, lactona y epoxi, los cuales pueden sufrir reacciones de esterificación. Cuando la cadena carbonada sufre eliminación de unidades de carbono, ya sea de un extremo o ambos, se denominan apocarotenoides y diapocarotenoides, respectivamente. Los pigmentos presentes en una comunidad de fitoplancton pueden ser usados como biomarcadores para establecer el estado de un ecosistema (Kaczor & Baranska, 2016).

Figura 3

Nomenclatura de carotenos y espectro UV-Vis.

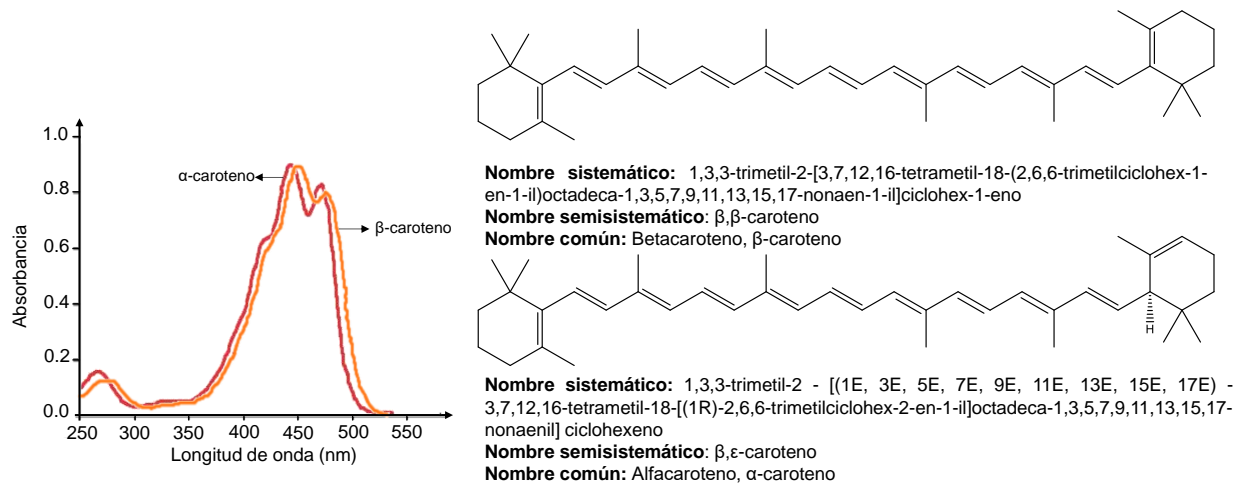
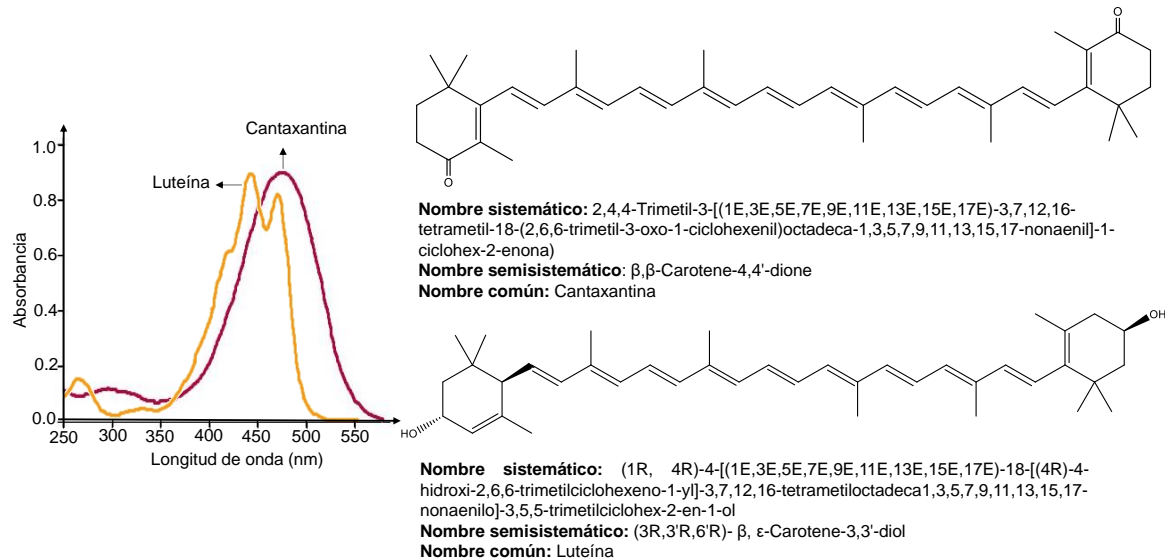


Figura 4

Nomenclatura de xantofilas y espectro UV-Vis.

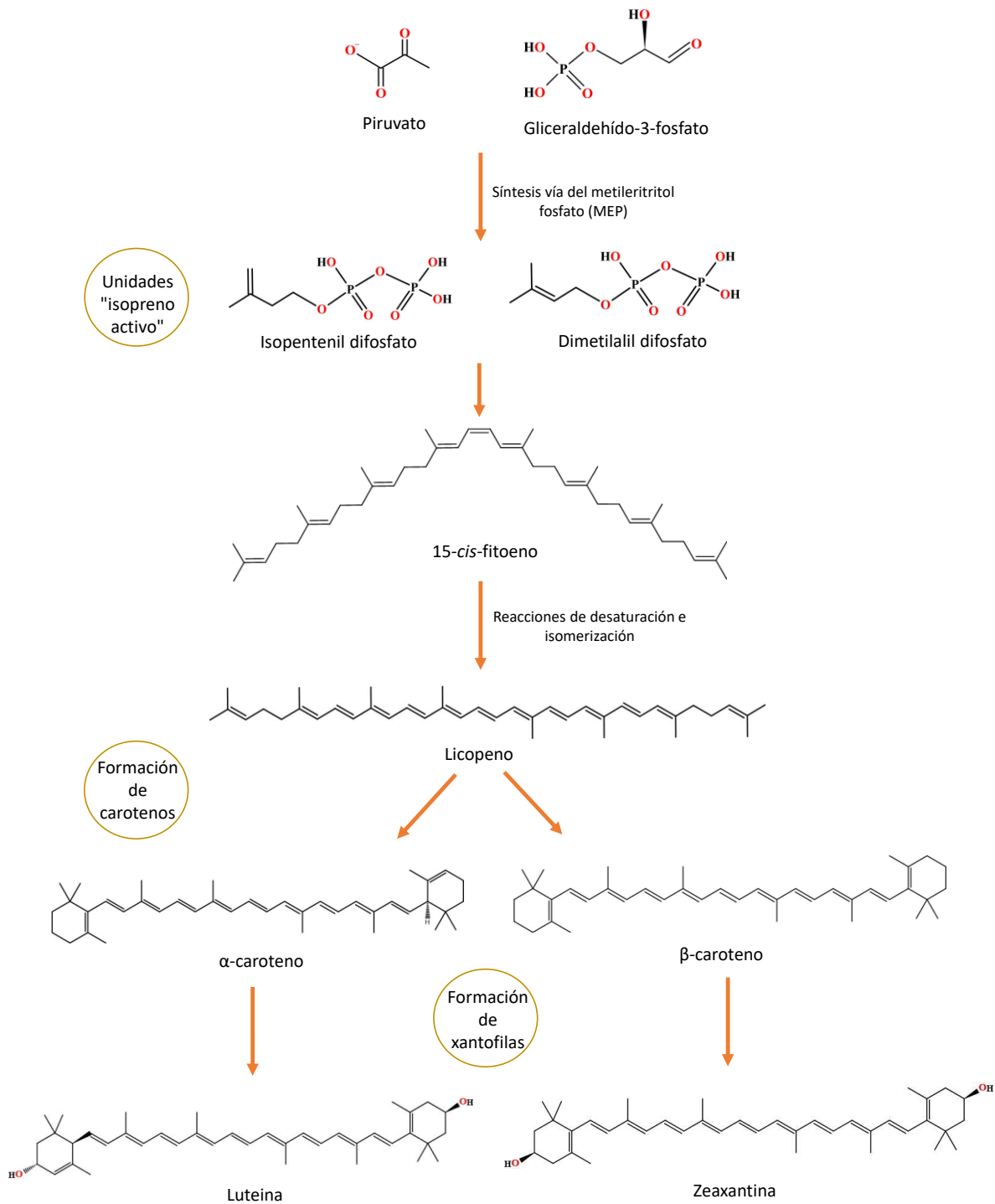


Como se mencionó anteriormente, la estructura básica de los carotenoides es una unidad de tetraterpeno compuesta a su vez por ocho unidades de isopreno, lo que los hace moléculas poliolefínicas por la presencia de 3 hasta 13 enlaces conjugados. Los carotenoides también pueden contener, en sus extremos, compuestos aromáticos. Debido a la presencia de dobles enlaces, existe conjugación electrónica que permite transiciones electrónicas de los orbitales π a π^* cuando estas moléculas absorben radiación en la región visible del espectro electromagnético. En consecuencia, el color del pigmento está estrechamente relacionado con la cantidad de dobles enlaces que posea la molécula. Es importante mencionar que cada enlace doble puede tener configuración *cis/trans*, siendo la *trans* termodinámicamente más estable y, por lo tanto, la más abundante en la naturaleza (Kaczor & Baranska, 2016) (Young & Britton, 1993).

La ruta biosintética de los carotenoides consta de cinco partes (ver **Figura 5**): La primera, la generación de unidades de “isopreno activo”, la segunda consta de la formación del fitoeno a partir de ocho unidades de isopreno, en la tercera ocurren reacciones de desaturación e isomerización dando a lugar al licopeno, en la cuarta ocurre la ciclación de las moléculas de licopeno surgiendo carotenos como el β -caroteno, por último, procede la adición de oxígeno molecular generando la formación de xantófilas (Roy et al., 2011).

Figura 5

Diagrama de ruta biosintética de la formación de carotenoides, basado en (Young & Britton, 1993).

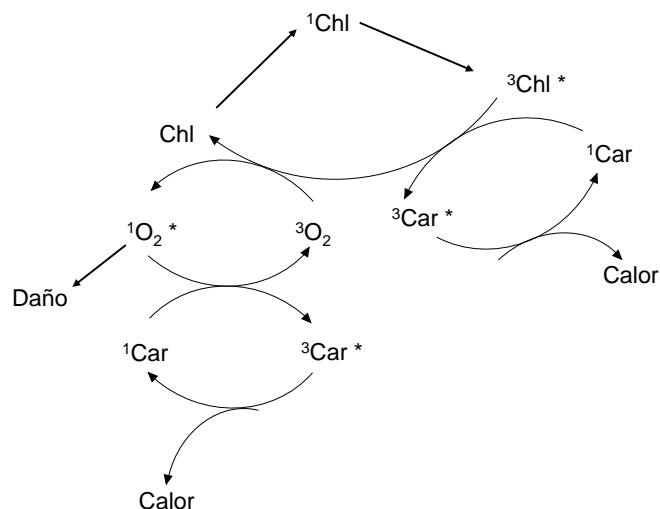


Los carotenoides cumplen una función muy importante en los procesos de la fotosíntesis, y existen alrededor de 50 de estos compuestos que son fundamentales en los complejos de captación de luz (LHC). La función de estas estructuras es absorber radiación en el rango de 450-550 nm y luego transferir la energía a las clorofilas aceptoras. Estas clorofilas no poseen la capacidad de absorber luz a esas longitudes de onda, ya que pueden sufrir daño fotooxidativo, por lo tanto, los carotenoides actúan como pigmentos antena y fotoprotectores (Young & Britton, 1993) (Bonet et al., 2016).

Cabe resaltar que este efecto de fotoprotección implica la transferencia de energía en estados triplete-triplete provenientes de la clorofila hacia los carotenoides, de esta manera también se previene la formación de oxígeno singlete, responsable del daño en las clorofilas. Esta fotoprotección principalmente es adjudicada a la presencia de los dobles enlaces conjugados en las moléculas de carotenoides. Aquellos que poseen más de nueve enlaces dobles conjugados actúan de forma efectiva en la inhibición del oxígeno singlete (**Figura 6**) (Young & Britton, 1993).

Figura 6

Representación esquemática del efecto fotoprotector de los carotenoides. Basado en (Young & Britton, 1993).



Los carotenoides están organizados en forma de complejos pigmento-proteína y junto a las clorofilas forman complejos de recolección de luz, los cuales contienen centros de reacción donde la energía es absorbida para ser transformada en energía química. Luego de que ocurran estas reacciones iniciales, la transferencia electrónica se lleva a cabo en las membranas fotosintéticas donde se produce NADP y ATP reducido, estos compuestos reaccionan en ausencia de luz con el CO₂ y se producen los carbohidratos (Bonet et al., 2016).

2.1.2 Técnicas utilizadas para la extracción de lípidos y carotenoides

2.1.2.1 Extracción asistida con radiación ultrasónica.

La técnica de extracción con radiación de ultrasonido comenzó a ser utilizada en laboratorios alrededor de la década de 1950, está fundamentada en la administración de ondas sonoras de compresión y expansión de 20000 o más vibraciones por segundo (Vinatoru, 2001). El ultrasonido se clasifica en dos grupos: alta frecuencia-baja potencia (2-10 MHz) y baja frecuencia-alta potencia (20-100 kHz) (Virkyute, 2014). La extracción con ultrasonido se fundamenta en el fenómeno de la cavitación, en el cual la distancia entre las moléculas cambia a medida que las ondas atraviesan la muestra (Capelo, 2009). Cuando la energía de ultrasonido es alta, es decir, la onda que atraviesa el líquido es grande, perturba las fuerzas de atracción (distancia) entre las moléculas y se generan vacíos llamados burbujas de cavitación. En la extracción con ultrasonido, el movimiento de estas burbujas de cavitación puede causar destrucción de paredes celulares en tejidos biológicos y rompimiento de cadenas de polímeros (Capelo, 2009) (CIATEJ, 2016).

La sonoquímica es muy útil en los procesos de extracción ya que reduce el tiempo y el consumo de agua y energía. Se encuentran estudios en los que el ultrasonido interactúa con las

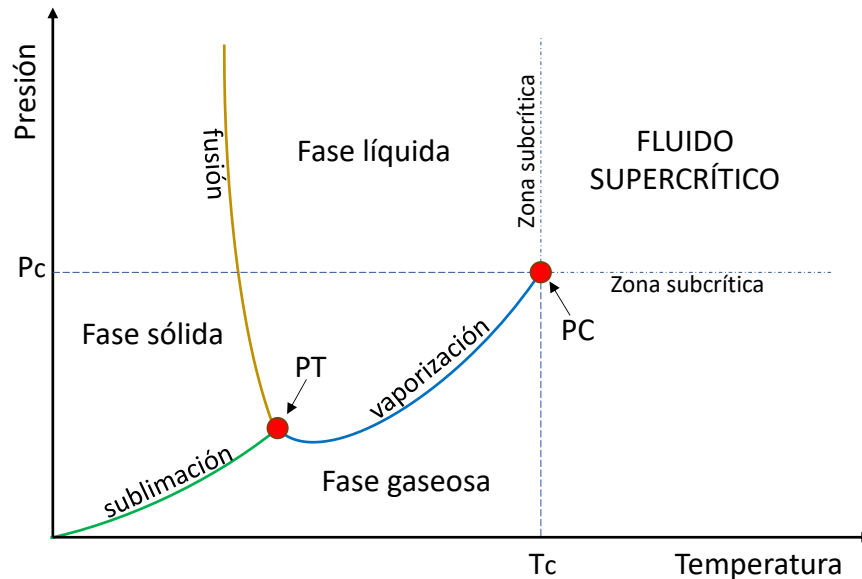
paredes celulares de plantas y de esta manera se promueve la extracción de compuestos de interés (Virkyte, 2014). Existen reportes que demuestran la eficacia del uso de radiación ultrasonido con resultados de alto rendimiento en extracciones de lípidos polares y neutros, carotenoides (neoxantina, β -caroteno, luteína) y ácidos grasos (Omega 3 y 6) en la microalga *Chlorella vulgaris*, estos compuestos son aplicables en la industria alimentaria (Couto et al., 2022) (Plaza et al., 2012a), debido a sus características nutricionales y antioxidantes.

2.1.2.2 Extracción con Fluidos supercríticos.

A mediados de los años setenta e inicios de los ochenta se incrementó el uso de fluidos supercríticos para las extracciones en laboratorios. Un fluido supercrítico es aquel que, al elevar su temperatura y presión a sus puntos críticos, presenta simultáneamente comportamientos de gas y líquido (Skoog et al., 2008) (Pandey et al., 2015). En la **Figura 7** se observa un diagrama de fases donde se relacionan los estados líquido, sólido y gaseoso con relación a la temperatura y la presión. En el punto crítico del fluido, los estados gas y líquido se encuentran en equilibrio. Además, sobre este punto, el fluido no se puede definir como un líquido o un gas, pero posee propiedades de ambos; entre sus características se encuentran variaciones en la densidad y su capacidad de solvente además de ser una sustancia compresible como un gas (Vázquez, 2008).

Figura 7

Diagrama de fases (PT: Punto triple, PC: Punto crítico, Pc: Presión crítica, Tc: temperatura crítica).



En el proceso de extracción con fluidos supercríticos (SFE) se busca separar de una matriz un grupo de sustancias o un compuesto en particular utilizando como solvente un fluido supercrítico. Algunas de las ventajas de esta técnica es que requiere poco tiempo, la extracción puede tardar generalmente entre 10-60 minutos, mientras que con solventes orgánicos algunos autores reportan horas e incluso días como tiempo de extracción (Kitada et al., 2009a) (Skoog et al., 2008) (Fanali et al., 2013). Además, es un método amigable con el ambiente y a su vez económico pues evita gastar cantidades elevadas de solventes orgánicos (Pandey et al., 2015).

Para la SFE se utiliza un equipo que generalmente contiene una bomba para el solvente, una celda de presión donde se deposita la muestra, una zona de calentamiento y un recipiente donde se deposita el material extraído (Fanali et al., 2013). Los solventes utilizados en la extracción presentan características únicas que permiten una mayor selectividad debido al ajuste de

temperatura y presión, deben tener transporte de masa eficaz debido a su baja viscosidad dinámica, alto coeficiente de difusión y densidad propia de un líquido (Pandey et al., 2015).

El uso de CO₂ como solvente presenta muchas ventajas en la SFE en comparación con solventes como el metano y etano (Coco-Enríquez et al., 2017). El CO₂ debido a su polaridad supercrítica, permite la extracción de lípidos no polares con rendimientos altos. Además, el CO₂ utilizado puede ser reciclado evitando una reinversión del solvente, caso contrario de las extracciones convencionales con solventes orgánicos. Además, el CO₂ supercrítico es un solvente de alta selectividad en el proceso de extracción debido a su polaridad (Fanali et al., 2013) (Cuellar, 2017). Facilita la recuperación de compuestos sin residuos tóxicos, no influye en la degradación de componentes activos que posteriormente pueden recuperarse con un alto grado de pureza (de Andrade Lima et al., 2018).

Se han reportado diferentes estudios de extracción de carotenoides en microalgas utilizando CO₂ supercrítico, donde se estudian las condiciones de presión y temperatura para concluir cuales son las condiciones óptimas para obtener un mayor rendimiento de extracción de carotenoides. Los autores concuerdan en que 64 °C y 59,3 MPa son las condiciones operacionales que permiten obtener el mayor rendimiento de extracción utilizando CO₂ supercrítico (Millao & Uquiche, 2016). También existen reportes de resultados en el pretratamiento de la microalga, donde se concluye que el agua presente en las microalgas promueve la extracción actuando como codisolvente de carotenoides y, por el contrario, liofilizar la muestra inicial puede causar la degradación de los compuestos (Mouahid et al., 2016).

2.1.2.3. Extracción Soxhlet.

La técnica de extracción Soxhlet inventada por el químico alemán Franz Ritter von Soxhlet en 1879, ha sido uno de los métodos más usado en la extracción de componentes en muestras

sólidas (Anderson et al., 2016). Está basado principalmente en una continua recirculación de solvente orgánico, el cual pasa por ciclos repetidos de ebullición y condensación a través de la matriz sólida; de esta forma se logra extraer compuestos presentes en la matriz. Además, dependiendo de la naturaleza de la muestra se escoge entre un rango de solventes orgánicos (Jan C. J. Bart, 2005; John R. Dean, 2010).

Inicialmente, la muestra es depositada en un dedal poroso de celulosa, el cual se introduce en el cuerpo del extractor Soxhlet. El solvente localizado en la parte inferior comienza a calentarse usando una placa de calentamiento, así, este comienza a evaporarse, sube por uno de los tubos del aparato, llega a tener contacto con el condensador y comienza a descender por el cuerpo del Soxhlet y ahí entra en contacto con la muestra. El cuerpo del Soxhlet contiene un sifón por el cual el solvente con los componentes extraídos regresa al matraz de ebullición y el proceso se repite hasta que los analitos son removidos de la muestra sólida (Jan C. J. Bart, 2005; John R. Dean, 2010).

Entre las ventajas más relevante de esta técnica se encuentra el alto rendimiento de extracción y la pureza en la muestra. El proceso es sencillo y eficiente como lo demuestra su amplio uso científico. Entre las desventajas están la larga duración del proceso, la necesidad de refrigeración constante y la pérdida de compuestos volátiles (Saini et al., 2021).

2.1.3. Caracterización química

2.1.3.1. Espectroscopia UV-Vis.

La espectroscopía UV-Vis de absorción molecular se basa en la medición de la absorbancia o la transmitancia de una solución que contiene cierta concentración del compuesto de interés. Los equipos UV-vis están compuestos por una fuente de radiación, selectores de longitud de onda,

cubetas de diferentes dimensiones donde se deposita la muestra, un detector y un equipo de procesamiento de señales (Skoog, Holler, et al., n.d.).

La espectroscopía ultravioleta-visible se aplica al análisis cualitativo y cuantitativo de sustancias. En las aplicaciones cualitativas se destaca la detección directa de grupos cromóforos, particularmente aquellos que presentan aromaticidad o conjugaciones. Su alta sensibilidad, simplicidad, facilidad de operación y rapidez de respuesta permiten aplicaciones cuantitativas de esta técnica. Además, este método posee una buena exactitud pues los errores que se encuentran en la medición de concentraciones oscilan en un intervalo de 1-5%. Cabe resaltar, que al momento de realizar las mediciones para obtener una alta sensibilidad influye la selección de la longitud de onda del instrumento y variables como el pH, la temperatura, la concentración en la que se encuentra el analito y la naturaleza del disolvente (Skoog, West, et al., n.d.).

2.1.3.2. MALDI-TOF.

La técnica de espectrometría de masas (MS) permite determinar la relación masa/carga de especies atómicas y moleculares posteriores a su ionización. Mediante MS es posible identificar los analitos dentro de una mezcla compleja y se puede establecer la fórmula molecular del compuesto (Gross, 2017). Un equipo de espectrometría de masas está conformado por un sistema de introducción de la muestra, fuente de ionización, analizador de masas, detector, sistema de vacío y adquisición (Carmen et al., 2010).

El proceso de ionización en MS se escoge dependiendo de la naturaleza de la muestra y del tipo de información que se desea. Por ejemplo, los procesos altamente energéticos como los que suceden en la ionización electrónica se aplican a moléculas termoestables, volátiles y de masas bajas. Otros procesos de ionización, menos energéticos, como los que ocurren en desorción láser

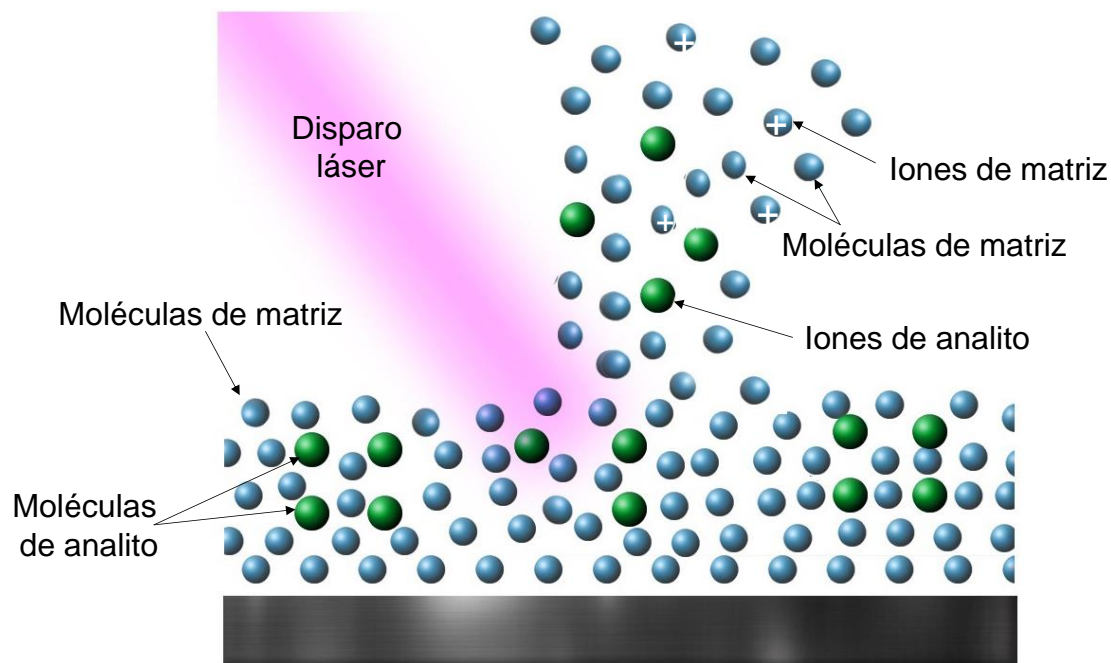
asistida por una matriz se utilizan para el análisis de macromoléculas térmicamente inestables y no volátiles (Carmen et al., 2010).

La ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI) fue reportada por primera vez por Michael Karas y Franz Hillenkamp, quienes pertenecían al Instituto de Biofísica de la Universidad de Frankfurt, y en 1988 realizaron publicaciones relacionados con análisis de proteínas usando esta técnica (Mingorance et al., 2016). MALDI pertenece al tipo de ionización suave y se emplea generalmente para el estudio de macromoléculas biológicas. En la **Figura 8** se muestra un esquema de ionización MALDI (Carmen et al., 2010).

Cabe resaltar la existencia de distintos tipos de láser que se emplean en estas técnicas de espectrometría, de modo que se seleccionan dependiendo de su aplicación. Entre los láseres que poseen un mayor rango de longitud de onda, se encuentran los de nitrógeno y Nd:Yag. En el proceso MALDI la muestra absorbe energía posterior a la irradiación láser, fenómeno que provoca la ionización de la misma (matriz-analito). La muestra debe ser irradiada por miles de disparos provenientes del láser que a su vez emplee una baja fluencia y una irradiancia por encima de 10^6 Wcm⁻², ya que de esta manera se consigue una ablación homogénea y poco profunda en la formación de iones. Además, esto contribuye a la obtención de espectros con fragmentación iónica baja o ausente y con una muy buena resolución. A su vez, los pulsos de láser con los que se irradia se efectúan en un periodo extremadamente corto de tiempo, por lo tanto, los iones se generan de manera rápida y esto evita la degradación térmica del analito (Gross, 2017).

Figura 8

Esquema de la fuente de ionización MALDI



En la técnica MALDI la matriz juega un papel fundamental, pues no solo sirve para dispersar el analito, sino como un medio de absorción de los fotones provenientes de la fuente láser. Por esta razón, la naturaleza del analito determina el tipo de matriz. Por ejemplo, los analitos altamente polares se combinan de forma eficaz con matrices polares. Es relevante mencionar que en general, una matriz MALDI debe poseer buena capacidad de incorporación u homogeneidad con el analito, lo cual contribuye a la formación de microcristales definidos. Debe poseer una fuerte absorción en la región de emisión del haz de energía empleado (láser), baja temperatura de sublimación, además de permitir la eficaz protonación, deprotonación o de actuar como agente aceptor o donador de electrones de las moléculas del analito (Carmen et al., 2010).

Al utilizar una matriz de transferencia electrónica (ET), luego de ser irradiada la muestra con el láser, la matriz se ioniza debido a un fenómeno llamando “pooling” postulado en el modelo

CPCD (Coupled Physical and Chemical Dynamics) (Knochenmuss, 2014). Al formarse los iones de la matriz estos abstraen un electrón del analito neutro para así formar un ion secundario del mismo (en modo de iones positivos), de esta manera se evita la fotoionización directa del analito (Donovan McCarley et al., 1991). Cabe resaltar, que el proceso de transferencia electrónica es posible solo si la energía de ionización del analito (EI_A) es menor que la de la matriz (EI_M) como se evidencia en la **Ecuación 1** (Donovan McCarley et al., 1991).

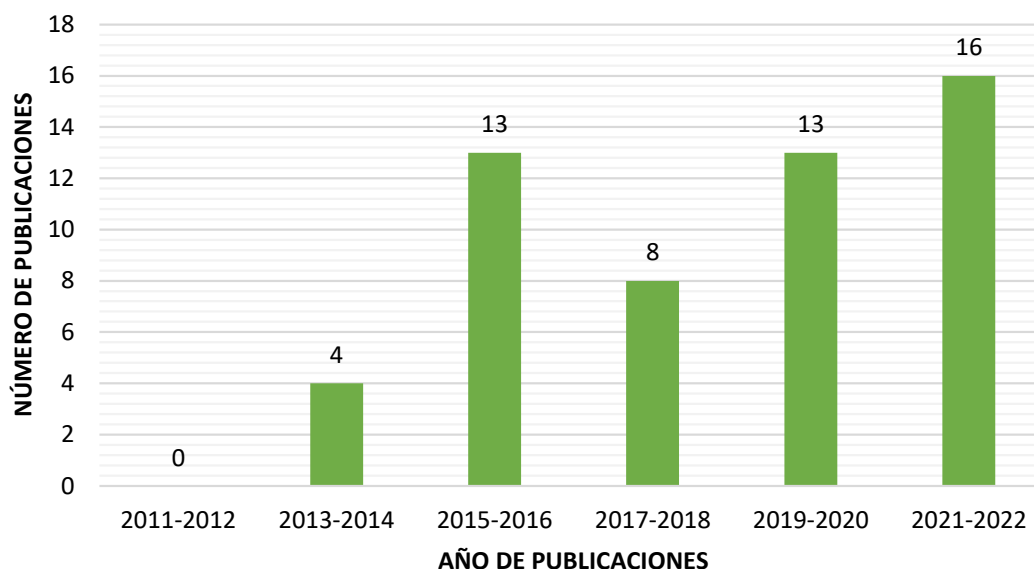


2.1.4. Antecedentes

De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, usando como herramienta principal la base de datos Scopus (Elsevier), se encontraron artículos científicos relacionados con la caracterización de carotenoides y ácidos grasos. La búsqueda se realizó en el periodo de tiempo comprendido entre el año 2011 y el 2022. Se empleó la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY ("Characterization", "carotenoid", "chlorella", "vulgaris", "MALDI"); en la **Figura 9** se muestra la gráfica con los artículos reportados en la base de datos.

Figura 9

Publicaciones de artículos científicos en el periodo 2011-2022. Gráfica basada en la base de datos Scopus (Elsevier).



En la gráfica anterior (**Figura 9**) se puede observar la relación entre el número de artículos publicados y sus respectivos años, en el periodo de tiempo 2011-2022. Además, se observa que en los últimos seis años hay una tendencia de incremento en el número de publicaciones sobre este tema, en total se reportan 54 publicaciones, de las cuales el país con mayor contribución en este tema ha sido India con 10 artículos, seguido por Estados Unidos con 8, Brasil 7 y China 5.

En la revisión bibliográfica realizada se encontraron diferentes artículos relacionados con el análisis de pigmentos incluyendo los carotenoides. Para las muestras analizadas, los autores utilizaron técnicas como espectroscopia UV-Vis, cromatografía líquida (HPLC), espectroscopia de resonancia Raman y espectrometría de masas ESI, entre otras.

Los investigadores Barletta R.; et. al. aislaron pigmentos de células individuales de fitoplancton marino mediante el uso de cromatografía HPLC. Los autores cultivaron y

caracterizaron diferentes especies de macro y microalgas, utilizando HPLC como técnica de extracción de pigmentos, identificaron varios carotenoides como la fucoxantina, luteína y β -caroteno. El reporte concluye que la espectroscopía RAMAN permite determinar y cuantificar carotenoides en células individuales de manera no destructiva con alta precisión, y resalta la importancia de la concentración de pigmentos con el estrés ambiental de las especies estudiadas (Barletta et al., 2015).

Madhu N.; et. al examinaron muestras de fitoplancton tomadas de cuerpos de agua alrededor de dos regiones costeras del sureste de India con características hidrográficas y biológicas diferentes. Usando HPLC y CHEMTAX identificaron aproximadamente 14 pigmentos, entre ellos: zeaxantina, fucoxantina, peridina, clorofila b, diadinoxantina y β -caroteno. Los autores mencionan que el estudio del fitoplancton es útil para seguir los procesos biogeoquímicos y la productividad de los diferentes cuerpos de agua (Madhu et al., 2014). Por otra parte, Suzuki K. et al., analizaron muestras de fitoplancton marino recolectadas de la zona central tropical del mar Pacífico y mar de Bering. Los autores compararon las técnicas de separación UHPLC y HPLC, y concluyeron que UHPLC permite obtener mayores rendimientos debido a su sensibilidad; es más eficiente y veloz, comparado con HPLC (Suzuki et al., 2015).

Kitada K.; et. al. analizaron diferentes extractos de muestras de la microalga *Chlorella vulgaris* mediante HPLC. Realizaron diferentes extracciones empleando CO₂ supercrítico y modificando condiciones de temperatura y presión. Caracterizaron pigmentos presentes en la microalga, como lo son β -caroteno, luteína, clorofila a y clorofila b. Los autores concluyeron que la extracción usando CO₂ supercrítico tiene una alta selectividad para la extracción de pigmentos como la luteína. Además, determinaron que las condiciones óptimas de presión y temperatura para una mayor extracción de luteína eran 50 MPa y 80 °C (Kitada et al., 2009b).

Los investigadores Hussain J.; et. al. utilizaron tres métodos diferentes para extracción de lípidos en muestras de *Chlorella vulgaris*. La biomasa fue secada utilizando liofilización y secado al horno. Los autores encontraron mejor rendimiento utilizando la extracción con radiación de ultrasonido, comparada con los otros dos métodos: extracción Bligh & Dyer y extracción Soxhlet empleando hexano como solvente. En la extracción Soxhlet utilizaron 0,5 g de muestra, un tiempo de extracción de 150 min a 65 °C. Caracterizaron principalmente ácidos linoleicos como lo son el ácido oleico y palmítico, entre otros, como los principales ácidos grasos encontrados en las muestras de las microalgas *Chlorella vulgaris* (Hussain et al., 2015).

Los autores Pérez M.; et. al. analizaron muestras de microalga *Chlorella* y *Scenedesmus*. Compararon la eficacia de extracción de diferentes solventes mediante Soxhlet y determinaron la cantidad de lípidos presentes usando métodos gravimétricos. Establecieron que la combinación de solventes metanol: hexano (1:3) para *Chlorella* y cloroformo: metanol (1:2) para *Scenedesmus*, proporcionaron altos rendimientos en la extracción de lípidos (Pérez et al., 2018).

Los investigadores Obeid S.; et. al. evaluaron fracciones de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Nannochloropsis oculata*. Utilizaron CO₂ SFE con y sin solvente para la extracción de pigmentos y los caracterizaron empleando HPLC. Concluyeron que el rendimiento de extracción es mayor utilizando etanol como co-solvente e identificaron diferentes compuestos, entre ellos: clorofilas, β -caroteno y lípidos como la luteína (Obeid et al., 2022a).

Ranjith R.; et. al. realizaron una exhaustiva revisión a los diferentes métodos de extracción de lípidos a partir de microalgas como principal fuente en producción de biocombustibles. Entre algunas de las técnicas de extracción analizadas se encuentran, extracción asistida por ultrasonido, microondas, método Bligh y Dyer, método Folch, hidrólisis lipídica in situ y transesterificación

supercrítica in situ (SC-IST/E). Los autores sugieren emplear una combinación de métodos, como los son: extracción enzimática y mecánica o con disolventes, para así lograr una extracción eficiente de los lípidos provenientes de las microalgas (Kumar et al., 2015).

Patras D.; et. al., presentaron una revisión de diferentes técnicas de extracción y caracterización de moléculas bioactivas como proteínas, lípidos, ácidos grasos, aminoácidos, clorofilas, reportadas en varios tipos de microalgas. Mostraron técnicas de extracción tanto mecánicas como químicas. Asimismo, exponen técnicas como UV-Vis, HPLC, LC-MS, MALDI-TOF-MS, para la identificación y cuantificación de pigmentos (Patras et al., 2018).

Chandrashekharaiyah P.; et. al., evaluaron la capacidad de biorremediación de las microalgas *S. acutus* y *C. pyrenoidosa* al ser expuestas a distintas concentraciones de plomo. Para lo anterior, emplearon técnicas como FTIR y microscopía electrónica de transmisión energía dispersiva (HAADF-S/TEM-EDS) para así caracterizar la bioacumulación de este metal pesado. Concluyeron que la microalga *S. acutus* posee mayor capacidad de biorremediación de este metal comparado con *C. pyrenoidosa* (Purushanahalli Shivagangaiah et al., 2021).

Los autores G. De Bhowmick; et. al., realizaron el seguimiento, durante un año, del crecimiento del cultivo de la microalga marina *Chlorella variabilis*, analizaron la variación de productividad de biomasa y perfil lipídico. Además, emplearon extracciones Soxhlet usando hexano como solvente y caracterizaron lípidos mediante GC y MALDI-TOF. Identificaron ácidos grasos como el ácido oleico (18:1), palmítico (16:0), linoleico (18:2) y esteárico (18:0). Concluyeron que la mayor productividad de biomasa de la microalga se obtuvo en verano y debido a su alto contenido en ácidos grasos saturados, le adjudica potencial en la producción de biodiesel (de Bhowmick et al., 2014).

Shanta P.; et. al. estudiaron la citotoxicidad en la microalga *C. Reinhardtii*, teniendo en cuenta la variación en su componente lipídico. Para esto, emplearon la combinación de espectrometría MALDI-MS y tecnología de microchips. Demostraron que el uso de este método es eficiente, ya que no es necesario realizar algún tipo de extracción, permitiendo un adecuado monitoreo ecotoxicológico, a partir de la cantidad de lípidos presentes (Shanta et al., 2021).

3. *Materiales y métodos*

3. 1 **Materiales y reactivos**

3.1.1 *Medio de cultivo para el crecimiento de la microalga Chlorella vulgaris*

Para la preparación del medio del cultivo BBM (Medio Basal de Bold) se utilizaron los reactivos que se muestran en la **Tabla 2**. En todos los casos, el medio de cultivo fue preparado utilizando agua tipo I, y almacenado a 4 °C, hasta su uso. Además, el medio de cultivo siempre fue utilizado en un tiempo no mayor a dos días de su preparación.

Tabla 2

Composición del medio de cultivo, Medio Basal de Bold (MBB), utilizado para el crecimiento de la microalga Chlorella vulgaris.

Nutrientes	Compuesto	Cantidad/L
Macronutrientes	KH ₂ PO ₄	175 mg
	CaCl ₂	25 mg
	MgSO ₄	75 mg
	NaNO ₃	250 mg
	K ₂ HPO ₄	75 mg
	NaCl	25 mg
Solución de boro H₃BO₃		11,42 mg
Solución de micronutrientes		1 mL

Solución alcalina	1 mL
Solución ácida	1 mL

Nutrientes	Compuesto	Cantidad/L
Micronutrientes	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 mg
	MnSO ₄ .H ₂ O	1,20 mg
	(NH ₄) ₂ MoO ₄	8,70 mg
	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 mg
	CoCl ₂	0,41 mg

Solución ácida	
Compuesto	Cantidad/L
FeSO ₄	4,98 g
H ₂ SO ₄	1 mL

Solución alcalina	
Compuesto	Cantidad/L
NaEDTA	5 g
KOH	3,1 g

500 mL del medio de cultivo se esterilizaron durante 30 minutos a 120 °C en un autoclave de carga frontal (5075 EL-D Tuttnauer). Para el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*, se utilizó la cepa (A.01-*Chlorella vulgaris*) adquirida previamente por el grupo de investigación GIFTEX de la Escuela de Química, de la Universidad Industrial de Santander. Se prepararon pre inóculos del microorganismo tomando alícuotas de 5 mL del cultivo inicial, las cuales fueron transferidas a cuatro Erlenmeyers de 250 mL, que contenían 100 mL de medio BBM previamente esterilizado. Los pre inóculos estuvieron en crecimiento durante 15 días bajo iluminación intermitente (Luz blanca 12 V), con periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Asimismo, se realizó seguimiento de la posible presencia de contaminación en el cultivo, utilizando placas de Agar-Agar, cada ocho días. Para lo anterior, se tomaron 10 µL del cultivo de las microalgas, y se depositaron en placas Agar-Agar (en cajas de Petri), previamente acondicionadas. Las placas Agar-Agar, junto con el medio de cultivo, se almacenaron selladas utilizando papel kraft por un periodo de tres días en una incubadora a 25 °C. En caso de presencia

de contaminantes e.g., bacterias u hongos, se adicionó antibiótico -cloranfenicol-, y antimicótico -nistatina-, 0,1 g/L y 600 U/L (Unidades Internacionales/Litro), respectivamente, a los pre inóculos, y se dejó nuevamente el cultivo por un periodo de 15 días. Al finalizar los 15 días, y previa observación de la ausencia de hongos y bacterias en el medio de cultivo, los pre inóculos se transfirieron a cuatro recipientes de vidrio de 3 L de capacidad, los cuales contenían 2 L de medio del cultivo BBM previamente esterilizado, cada uno. Los cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris* se mantuvieron en una incubadora bajo condiciones constantes de temperatura de 25 °C, y flujo de aire de 1,6 L/min (Wong et al., 2016), con el fin de aumentar la disponibilidad de CO₂ en el medio de cultivo (Fernando et al., 2012).

Pasados 15 días de crecimiento del cultivo, se precedió a coleccionar la biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris* (P. Matos et al., 2018). Para lo anterior, alícuotas de 20 mL del cultivo se centrifugaron a 7000 rpm, durante 10 min, a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido fue almacenado en un ultracongelador a -80 °C, hasta su liofilización. El proceso anterior fue repetido hasta obtener biomasa liofilizada suficiente para las extracciones. Asimismo, y para corroborar la morfología de las células de *Chlorella vulgaris* (Liu & Chen, 2016a), el crecimiento de la microalga fue monitoreado mediante microscopia óptica utilizando un microscopio óptico OLYMPUS BX53, equipado con una cámara AxioCam.

3.2 Extracción de pigmentos a partir de la microalga *C. vulgaris*

Para la obtención de los extractos de pigmentos a partir de biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris*, se evaluaron tres técnicas: extracción asistida por radiación de ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos SFE (CO₂) y extracción Soxhlet.

3.2.1. Extracción de pigmentos asistida por radiación de ultrasonido (EAU)

La sonoquímica es una técnica ampliamente utilizada debido al fenómeno de cavitación, y a que requiere cortos periodos de extracción, bajo consumo de energía y solventes (Kuss & Kromidas, 2009). Para la extracción asistida con radiación de ultrasonido (EAU), se utilizó un equipo Branson Ultrasonics CPX 1800, el cual cuenta con una potencia ultrasónica de 35 W y una frecuencia de 37 kHz. Para las extracciones de los pigmentos se utilizó 5,0 mg de biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris*. Se siguió la metodología descrita por (Plaza et al., 2012a), con algunas modificaciones, se utilizó 1 mL de acetona, como solvente de extracción, durante 25 min a temperatura ambiente. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

3.2.2. Extracción de pigmentos utilizando fluido supercrítico (SFE)

La extracción con fluido supercrítico (SFE), es una técnica amigable con el ambiente, debido a que se evita el uso de cantidades elevadas de solventes orgánicos (Vázquez, 2008). En este proyecto de investigación se utilizó un equipo Apeks Supercritical 1500-1 L, equipado con un contenedor de extracción de 0,7 L de capacidad, y un sistema de bombeo de CO₂ (4500 psi). Se utilizaron 3,0 g de biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris* para extraer por 2 h (120 min) a una temperatura de 40 °C y 1300 psi, estas condiciones garantizan el estado supercrítico del CO₂ (Sovová & Stateva, 2019) (Solana et al., 2014). Al finalizar el proceso se recolectaron los extractos obtenidos.

3.2.3 Extracción de pigmentos utilizando Soxhlet

La extracción Soxhlet es una técnica donde la muestra tiene contacto repetitivo con el solvente escogido, lo cual asegura la obtención de un extracto rico en el compuesto de interés, debido al desplazamiento del equilibrio de transferencia del compuesto desde la biomasa, y hacia el solvente (Luque de Castro & Priego-Capote, 2010). En este proyecto de investigación, la

extracción Soxhlet, se realizó por triplicado siguiendo la metodología descrita por (Hussain et al., 2015), con algunas modificaciones. Se utilizó 0,6 g de biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris*, y n-hexano como solvente de extracción, el sistema se mantuvo a una temperatura entre 65 y 70 °C, por 120 min. El solvente se eliminó de los extractos obtenidos mediante evaporación rotatoria, las muestras se almacenaron a 4 °C, hasta su análisis.

3.3. Identificación de pigmentos a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*

Para el análisis de los pigmentos presentes en los extractos obtenidos a partir de biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris*, se utilizó espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis) y espectrometría de masas MALDI.

3.3.1. Caracterización UV-Vis de extractos de la microalga *Chlorella vulgaris*

En esta investigación se caracterizaron extractos de pigmentos obtenidos a partir de biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris* mediante extracción asistida con radiación de ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción Soxhlet (Véase Sección 3.2). Los extractos fueron caracterizados mediante espectroscopia UV-Vis utilizando un espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 10S (Thermo Scientific, Billwrica, MA, EE.UU.), equipado con una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Asimismo, los extractos fueron medidos en una concentración 1 mg/mL, de extracto seco en acetona (>99,5%), para la toma de los espectros se empleó un barrido espectral desde 350 hasta 800 nm.

3.3.2. Caracterización MALDI de extractos de la microalga *Chlorella vulgaris*

Para la caracterización de los extractos de pigmentos obtenidos a partir de biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris* mediante extracción asistida con radiación de ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción Soxhlet (Véase

Sección 3.2), se utilizó espectrometría de masas MALDI. Los ensayos MALDI se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF Bruker Ultraflexreme (Bruker Daltonics, Billerica, MA), provisto con un láser Smart Beam de Nd:YAG ($\lambda = 355$ nm) con frecuencia de 1 kHz y un pulso de 8 ns. Los espectros de masas se adquirieron en el rango m/z 100 a 1000 en modo reflectrón empleando un voltaje de aceleración de 25 kV, con un tiempo de extracción de iones (PIE) de 100 ns, en modo de iones positivos. La calibración del equipo en el rango de masas especificado se realizó usando las señales de la matriz MALDI comercial CHCA, y de una serie de péptidos estándar: leucina-encefalina, bradiquinina, bombesina y sustrato de renina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

La preparación de las muestras para el análisis MALDI se realizó utilizando la matriz comercial de transferencia electrónica (ET) DCTB, 5 mM en ACN. Los extractos fueron disueltos en ACN con ayuda de agitación en un vortex por 2 min, luego se mezclaron con la solución de la matriz hasta alcanzar proporciones molares matriz (M): analito (A) de 100:1. La relación A:M fue determinada utilizando la concentración de clorofila a reportada en la literatura, en los extractos obtenidos mediante extracción asistida con radiación de ultrasonido (EAU), utilizando acetona como solvente de extracción (Plaza et al., 2012a). Las muestras fueron depositadas sobre el porta muestras MALDI utilizando el método dried-droplet para lo cual se mezclaron 10 μ L de la solución de la matriz (DCTB, 5 mM) con 10 μ L de la solución de la muestra (extractos EAU, SFE y Soxhlet, de manera separada). La mezcla matriz (M): analito (A), se agitó en un vórtex a 1500 rpm durante 30 segundos, y luego se depositó 1 μ L sobre el porta muestras MALDI. Cada espectro corresponde a 3000 espectros acumulados tomados en 3 adquisiciones de 1000 disparos cada una.

Para el análisis de los espectros se utilizó el software de análisis de datos Flex Analysis. De las señales obtenidas en los espectros MALDI, se tuvo en cuenta las relaciones señal-ruido

(S/N), la exactitud en la masa (Δ ppm) y comparaciones entre el patrón isotópico experimental y teórico de compuestos previamente reportados en la literatura para la microalga *Chlorella vulgaris*. Igualmente, se compararon esos patrones isotópicos mediante “ChemCalc: un bloque de construcción para la infraestructura química del mañana” (Patiny & Borel, 2013). Para la identificación de lípidos se utilizó la herramienta “LIPID MAPS® Structure Database (LMSD)”, una base de datos exclusiva de lípidos (Sud et al., 2007).

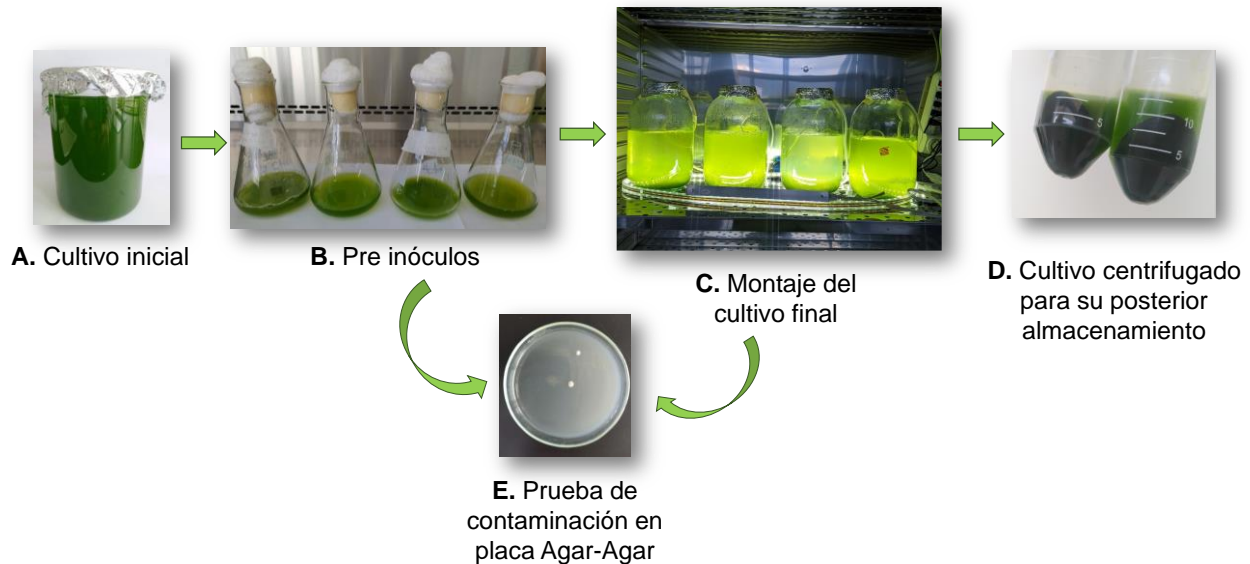
4.Resultados y discusión

4.1 Cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*

El proceso de preparación del cultivo se llevó a cabo utilizando un cultivo de *Chlorella vulgaris* existente en el laboratorio del Grupo de Investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental (GIFTEX), de la escuela de Química, de la Universidad Industrial de Santander. A partir de este medio de cultivo existente, se prepararon pre inóculos tomando alícuotas de 5 mL del cultivo inicial. Las alícuotas se transfirieron a cuatro Erlenmeyers de 250 mL que contenían 100 mL de medio BBM previamente esterilizado, cada uno. Estos pre inóculos estuvieron en crecimiento durante 15 días bajo iluminación (Luz blanca 12 V) intermitente con periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Como se puede observar en la **Figura 10, A y B**.

Figura 10

Esquema del cultivo de la microalga Chlorella vulgaris.



Nota. En la figura se observa, A: Cultivo inicial, B: Pre inóculos, C: Montaje del cultivo inicial, D: Cultivo centrifugado, E: Prueba de contaminación en placa Agar-Agar.

Seguidamente a la estabilización de los pre inóculos, se realizó seguimiento a los 8 y 15 días, para verificar la ausencia de hongos o bacterias que podrían afectar el crecimiento de las microalgas. Para realizar dicho seguimiento de contaminación, se tomaron de 10 μ L del medio de cultivo junto con la microalga y se depositaron en placas Agar-Agar en cajas de Petri, (Véase **Figura 10, E**). Las placas Agar-Agar junto con las muestras se almacenaron por tres días en una incubadora como se describió en sección de metodología y se observó si existía o no la presencia de estos microorganismos.

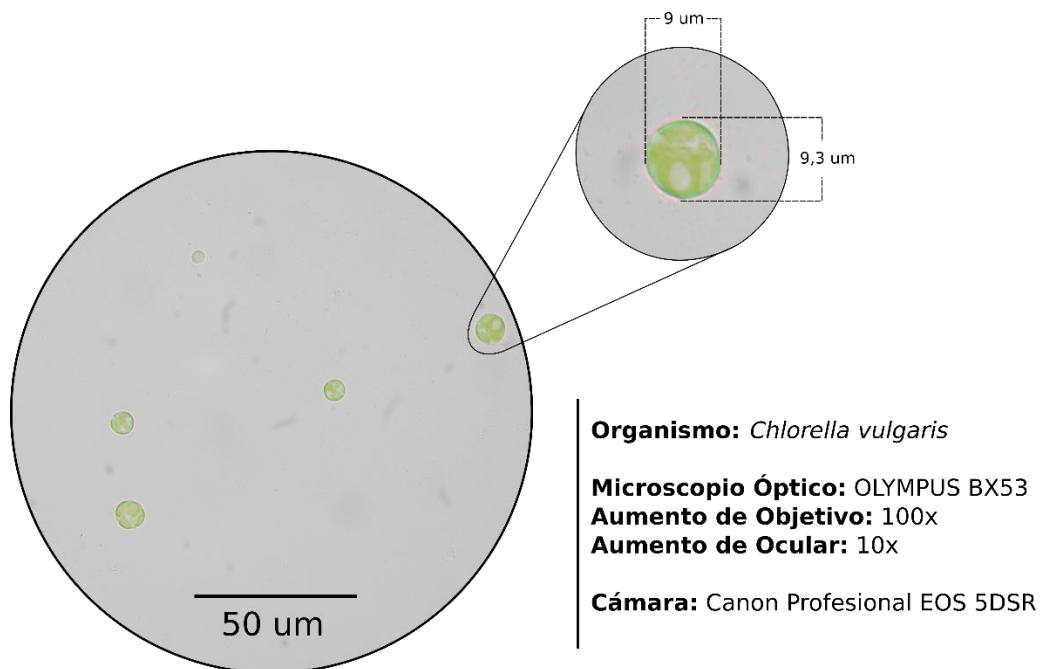
Al finalizar los 15 días, los pre inóculos se transfirieron a cuatro recipientes de vidrio de 3 L de capacidad cada uno, los cuales contenían 2 L de medio del cultivo BBM previamente

esterilizado (Véase **Figura 10, C**). Pasados 15 días de crecimiento del cultivo, se procedió a coleccionar la biomasa.

Asimismo, y con el fin de realizar una caracterización morfológica de las células de *Chlorella vulgaris*, se realizaron análisis de microscopía óptica. Mediante las mediciones de microscopía óptica y el uso del programa libre ImageJ, se comprobó que las células observadas presentan una morfología esférica y un tamaño alrededor de 9 μm , lo cual concuerda con el rango reportado (Safi et al., 2014a) para *Chlorella vulgaris* (2-10 μm), (Véase **Figura 11**). Además, en la imagen de microscopía óptica se evidencia la ausencia de otros microorganismos en el medio de cultivo, como por ejemplo bacterias, lo que indica que la microalga estaba creciendo en un medio axénico.

Figura 11

Imagen de microscopía óptica del cultivo de la microalga Chlorella vulgaris.



Asimismo, tal como se puede observar en la imagen de la **Figura 11**, las microalgas *Chlorella vulgaris* presentan una coloración verde intensa asociada con la presencia de clorofilas y un cloroplasto de gran tamaño dentro de la célula. Algunos autores han reportado que el cloroplasto en las células de *Chlorella vulgaris* puede alcanzar dos terceras partes de la célula (Jacob-Lopes et al., n.d.). Lo anterior quiere decir que las células estudiadas en este proyecto de investigación se encuentran en una etapa de crecimiento/estabilización y no en una fase de muerte.

4.2. Rendimiento de extracción de pigmentos a partir de la microalga *C. vulgaris*

En la **Figura 13** se muestran los rendimientos de extracción obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido empleando acetona como solvente, extracción Soxhlet empleando hexano como solvente y extracción con CO₂ supercrítico. Los extractos fueron obtenidos (**Figura 12**) a partir de biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris*, según los procedimientos detallados en las **Secciones 3.2.1, 3.2.2 y 3.2.3**; donde se empleó roto evaporación para retirar los solventes de las extracciones por EAU y Soxhlet.

Figura 12

Imagen de los extractos obtenidos mediante: radiación asistida por ultrasonido (EAU), extracción con CO₂ supercrítico (SFE), y extracción Soxhlet.

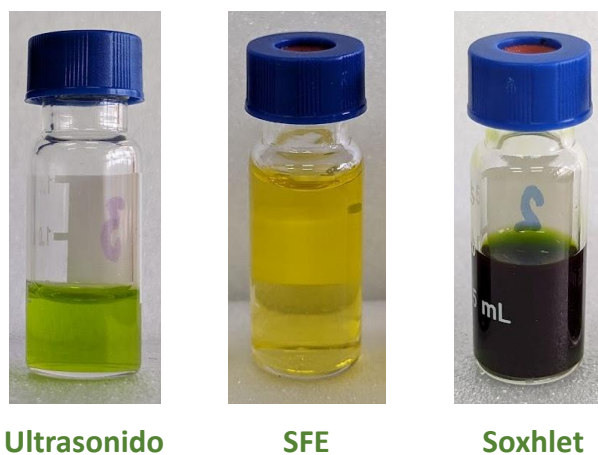
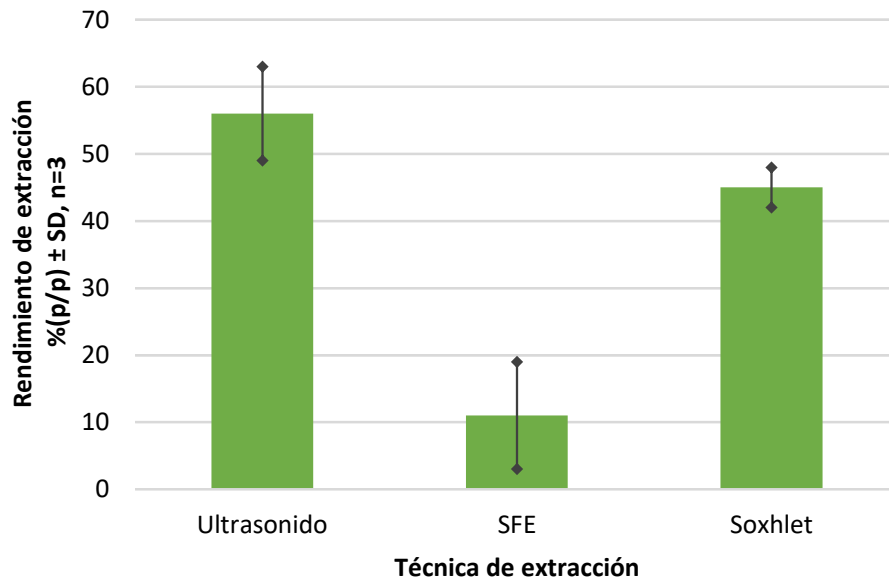


Figura 13

Representación gráfica de los rendimientos de extracción obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción con CO₂ supercrítico (SFE), y extracción Soxhlet.



Usando el método de extracción asistida por radiación ultrasonido se logró una recuperación del $56 \pm 7\%$ de la biomasa seca de *Chlorella vulgaris*, en comparación con la extracción Soxhlet $45 \pm 3\%$, y extracción con CO₂ supercrítico (SFE) $11 \pm 8\%$. Sin embargo, la técnica de extracción SFE ha sido sugerida en la literatura como el método de extracción con el cual se podrían identificar mayor cantidad de compuestos lipofílicos presentes en las muestras de microalga *Chlorella vulgaris* (Obeid et al., 2022a, 2022b).

Los rendimientos de extracción varían en función de las condiciones utilizadas y de la técnica. La mayor eficiencia fue lograda empleando la extracción asistida por ultrasonido de la biomasa seca de *Chlorella vulgaris* comparada con Soxhlet y SFE. Lo anterior, se debe a que la acetona utilizada en extracción asistida por ultrasonido es un excelente disolvente para muchos compuestos orgánicos, desde pigmentos polares hasta aceites y grasas. Algunos autores han

reportado rendimientos de extracción en células de *Chlorella vulgaris* en el rango de 20 a 52% para EAU (Couto et al., 2022) (Plaza et al., 2012b). Asimismo, el alto rendimiento de extracción al utilizar EAU, es posible al principio de la técnica extracción, debido al proceso de cavitación, el cual produce lisis de la pared celular en las microalgas *Chlorella vulgaris*, permitiendo la interacción membrana celular-solvente y, por lo tanto, favoreciendo el acceso a la extracción de pigmentos (Couto et al., 2022).

El hexano es un solvente orgánico no polar reconocido por su afinidad hacia compuestos lipídicos, y gran selectividad hacia fracciones de tipo lípidos neutros (Alba et al., 2013). El hexano ha sido reportado con altos rendimientos de extracción de pigmentos utilizando la técnica Soxhlet comparado con solventes como acetona y metanol (Ramluckan et al., 2014). Además, bajo las condiciones establecidas en este estudio, es un excelente candidato en la extracción de pigmentos comparado con lo reportado por otros autores (S. Donatus et al., 2015) (M. Donatus, Ranjitha, et al., 2015), ya que demuestra su alta efectividad debido a los rendimientos obtenidos (75-85%) en la producción de aceite de las microalgas. De igual manera se alcanzó un mayor rendimiento de extracción de pigmentos utilizando Soxhlet en comparación con SFE, (Kitada et al., 2009b) (S. Donatus et al., 2015)(M. Donatus, Ranjitha, et al., 2015). Esto se debe al principio de la extracción Soxhlet donde la matriz sólida se mantiene en continuo contacto, ocasionado a la recirculación del solvente, el cual pasa por ciclos repetidos de ebullición y condensación (John R. Dean, 2010).

Por otra parte, la extracción con CO₂ supercrítico como solvente de extracción, solvente amigable con el ambiente (Pandey et al., 2015), que permite obtener extractos sin necesidad de eliminación del solvente. Ahora bien, otra ventaja de SFE como técnica de extracción, es que permite modificar las condiciones de presión y temperatura para alcanzar las condiciones óptimas y así obtener un mayor rendimiento de extracción de compuestos de interés (Millao & Uquiche,

2016). De acuerdo con la literatura, y a diferencia de las dos técnicas de extracción anteriores, se observa que el uso simultáneo de un co-solvente como el etanol junto con el CO₂ supercrítico, aumenta considerablemente el rendimiento de extracción (Kitada et al., 2009b). Al comparar nuestros resultados con lo reportado en la literatura, encontramos que el uso particular de etanol en la extracción con CO₂ supercrítico, contribuye a extracción selectiva del 30% de clorofila a, a partir de cultivos de *Chlorella vulgaris* (Obeid et al., 2022a). Con este estudio corroboramos que a pesar de hacer uso único del solvente CO₂, se logró obtener un extracto de pigmentos mediante SFE, bajo las condiciones utilizadas en la presente investigación.

Por otra parte, es importante destacar que la elección del método de extracción para la biomasa de *Chlorella vulgaris* dependerá de la aplicación final deseada. Por lo tanto, se debe realizar un análisis previo para seleccionar el método adecuado. Existen informes que describen el uso de métodos como la radiación de ultrasonido y Soxhlet para la obtención de omega 3- 6, carotenoides y lípidos, los cuales tienen potencial aplicación en la industria alimentaria, así como la producción de suplementos dietéticos y aditivos para alimentos (Gille et al., 2016a) (Couto et al., 2022) (Dolganyuk et al., 2020). Igualmente, varios estudios emplean la extracción de aceites a partir de la microalga *Chlorella vulgaris* utilizando la extracción con CO₂ supercrítico y el método Soxhlet. Estos aceites se utilizan para la producción de biodiesel (M. Donatus, Ranjitha J., et al., 2015) (Bahadar et al., 2016) (Moghadam & Aghababai Beni, 2022).

4.3. Caracterización de extractos de *C. vulgaris* mediante espectroscopia UV-Vis

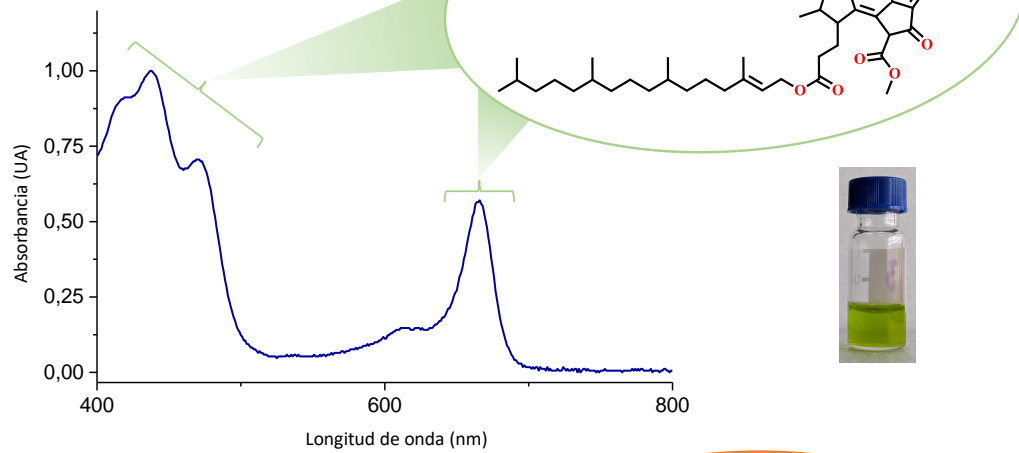
En la **Figura 14** se encuentran los espectros UV-Vis medidos a los extractos obtenidos mediante extracción asistida por radiación de ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción Soxhlet. Los extractos fueron obtenidos a partir de biomasa

lío filizada de la microalga *Chlorella vulgaris*. Los espectros de absorción en la región UV-Vis del espectro electromagnético fueron medidos de acuerdo con los procedimientos detallados en la Sección 3.3.1. y son importantes para el estudio del crecimiento y desarrollo del cultivo de microalgas, así como de la composición química de sus derivados.

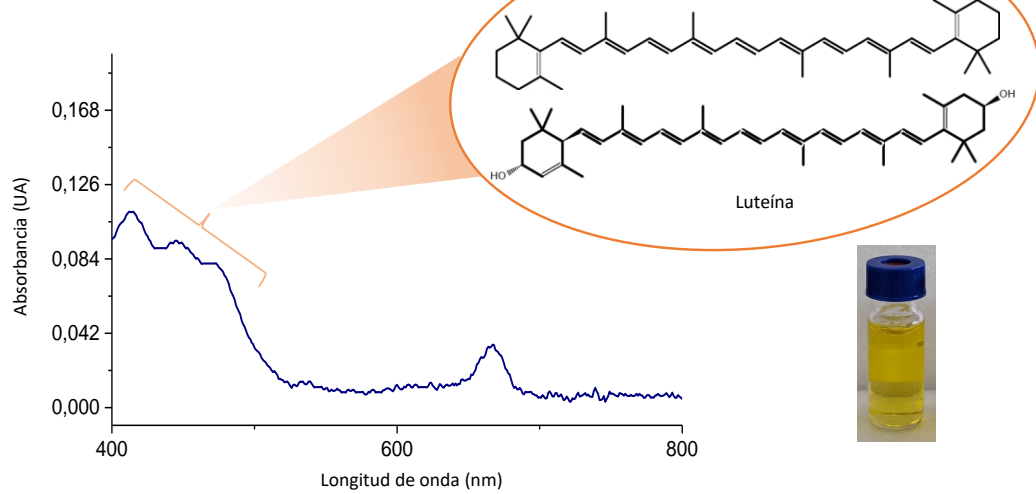
Figura 14

Espectros UV-Vis medidos a los extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción Soxhlet a partir de biomasa seca de Chlorella vulgaris.

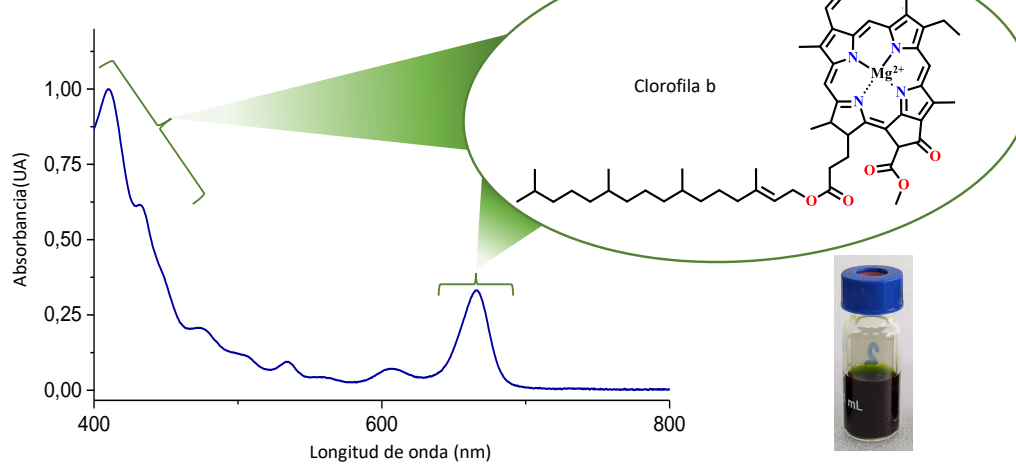
Ultrasonido



SFE



Soxhlet



En los espectros UV-Vis, (Véase **Figura 14**) se pueden observar principalmente tres bandas de absorción en la región entre 400-500 nm, y dos bandas de absorción en la región 600-700 nm. Las bandas observadas entre $\lambda = 410$ y 420 nm, denominadas tipo Soret, corresponden a compuestos tipo porfirina como las clorofilas. Lo anterior, también se corrobora con la banda que se observa aproximadamente a $\lambda = 665$ nm, denominada tipo -Q (Bayu et al., 2020). Los valores máximos de absorción medidos para los extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción Soxhlet, concuerdan con reportes previos de la literatura (Bhuvana et al., 2019a). Los autores reportan la presencia de clorofila a y clorofila b en muestras de microalga *Chlorella vulgaris* (Bhuvana et al., 2019a). Además, las bandas observadas con máximo de absorción en 443 nm y 469 nm corresponden a pigmentos tipo carotenoide, posiblemente se pueden adjudicar a pigmentos como el β -caroteno y la luteína. Lo anterior, se ajusta con los reportes de varios autores (Pantami et al., 2020), quienes identificaron carotenoides en muestras de microalga *Chlorella vulgaris*.

Con respecto a los solventes utilizados en las extracciones, se puede decir que a pesar de utilizar hexano como solvente en la extracción Soxhlet, y acetona para la extracción asistida con radiación ultrasonido (EAU), en estos extractos se observan señales relacionadas a las clorofilas. Según la literatura, el uso del hexano en la extracción Soxhlet permite aislar pigmentos derivados de clorinas debido a la presencia de la cadena fitol, en la estructura molecular de las clorofilas (Dolganyuk et al., 2020). Asimismo, el corrimiento de algunas de estas bandas se puede justificar, ya que, la clorofila a se logra convertir a su forma más sencilla, es decir, en feofitina a (Valcareggi Morcelli et al., 2021)(Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids BASIC PROTOCOL, 2001).

Para finalizar, en los espectros UV-Vis medidos para los extractos obtenidos mediante extracción asistida con radiación ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE), y extracción Soxhlet, se obtuvieron bandas que se pueden relacionar con la presencia de compuestos tipo clorofila y carotenoide. Aun así, el perfil de absorción de cada extracto es diferente. De acuerdo con la literatura, el extracto obtenido mediante SFE debe presentar una composición de compuestos tipo carotenoide en mayor abundancia al ser comparado con los extractos EAU y Soxhlet. Lo anterior, será corroborado mediante los experimentos MALDI (Macías-Sánchez et al., 2005).

4.4. Caracterización de extractos de *C. vulgaris* mediante MALDI MS

En las **Figuras 15, 16, 17** y en las **Tablas 3, 4, 5** se muestra la caracterización de los extractos obtenidos mediante extracción asistida por radiación de ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción Soxhlet utilizando espectrometría de masas. Los espectros MALDI fueron tomados utilizando DCTB como matriz de transferencia electrónica (ET), de acuerdo con los procedimientos detallados en la Sección 3.3.2. La caracterización molecular de los extractos de la microalga *Chlorella vulgaris* mediante experimentos MALDI, se realizó utilizando el software de análisis de datos Flex Analysis. Como criterios de identificación de las señales detectadas en los espectros MALDI, se utilizaron las relaciones señal-ruido (S/N), la exactitud en la masa (Δ ppm) y comparaciones entre el patrón isotópico experimental y teórico de compuestos previamente reportados en la literatura para la microalga *Chlorella vulgaris*. Para esto último se generó una base de datos basada en compuestos reportados en la literatura científica (Ver Anexos). Para la identificación de lípidos se utilizó la herramienta “LIPID MAPS® Structure Database (LMSD)”, una base de datos exclusiva de lípidos (Sud et al., 2007). Asimismo, se

compararon los patrones isotópicos experimentales con los calculados mediante “ChemCalc: un bloque de construcción para la infraestructura química del mañana” (Patiny & Borel, 2013).

En las **Figuras 15, 16, 17** se puede observar que mediante espectrometría de masas MALDI se logró observar señales correspondientes a pigmentos tipo clorofila, carotenoides y lípidos. Lo anterior, a partir de extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción Soxhlet de *Chlorella vulgaris*, previamente liofilizada. Además, en las **Tablas 3, 4, 5** se muestra de manera detallada los pigmentos tipo clorofila, carotenoides y lípidos identificados mediante espectrometría de masas MALDI. Asimismo, y tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, la técnica de espectrometría de masas MALDI es una herramienta crucial que permite la identificación y caracterización de compuestos en diferentes campos, incluyendo biología, química y farmacología.

Figura 15

*Espectro de masas MALDI del extracto obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU) a partir de biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris*. Utilizando DCTB como matriz ET MALDI, relación molar matriz(M): analito(A) 100:1 (M:A).*

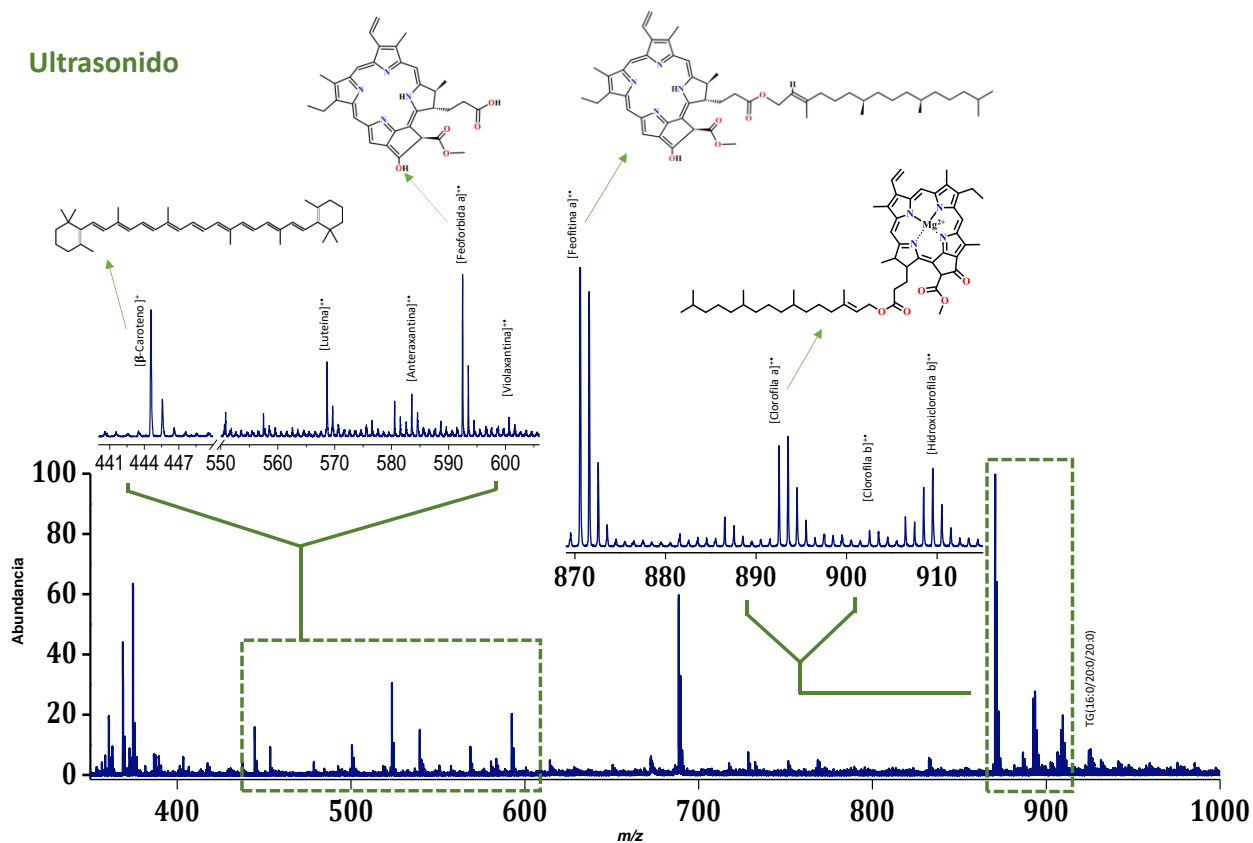


Tabla 3

*Pigmentos tipo clorofila, carotenoides y lípidos identificados en extracto obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), a partir de biomasa seca de *Chlorella vulgaris*. La tabla muestra el nombre del compuesto correspondiente, la masa teórica, la exactitud de masa relativa (Δ ppm), la relación señal ruido (S/N) y la fórmula propuesta.*

Extracción asistida por radiación de ultrasonido (EAU) a partir de biomasa liofilizada de <i>Chlorella vulgaris</i>					
Compuesto	Especie detectada	Masa calculada	Δ ppm	S/N	Fórmula molecular
β -Caroteno	M ⁺	444,438	15,8	52,7	C ₄₀ H ₅₆
Luteína	M ⁺	568,428	7	23,3	C ₄₀ H ₅₆ O ₂
Anteraxantina	M ⁺	584,423	8,6	10,0	C ₄₀ H ₅₆ O ₃
Violaxantina	[M + H - 18] ⁺	583,617	6,9	12,6	C ₄₀ H ₅₆ O ₄
Feoforbida a	M ⁺	592,269	3,4	54,7	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₅
Violaxantina	M ⁺	600,418	6,7	5,0	C ₄₀ H ₅₆ O ₄
Clorofila a	M ⁺	614,238	8,1	7,7	C ₃₅ H ₃₄ N ₄ O ₅ Mg
Cer(44:1;O4)	[M + Na] ⁺	732,648	25,9	7,2	C ₄₄ H ₈₇ NO ₅
DG(22:2/22:2/0:0)	[M + Na] ⁺	751,622	14,6	6,9	C ₄₇ H ₈₄ O ₅
PS(13:0/20:2)	[M + Na] ⁺	768,479	15,6	9,5	C ₃₉ H ₇₂ NO ₁₀ P
PS(19:0/20:1)	[M + H] ⁺	832,607	14,4	10,3	C ₄₅ H ₈₆ NO ₁₀ P
Feofitina a	M ⁺	870,566	1,1	169	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅
PS(20:5/22:1)	[M + Na] ⁺	886,557	5,6	11,8	C ₄₈ H ₈₂ NO ₁₀ P
Clorofila a	M ⁺	892,535	0,1	42,0	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₅ Mg
Clorofila b	M ⁺	906,515	16,5	12,7	C ₅₅ H ₇₀ N ₄ O ₆ Mg
Hidroxiclorofila b	M ⁺	908,530	5,5	19,2	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆ Mg
Hidroxiclorofila b	[M + H] ⁺	909,538	11	19,4	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆ Mg
Clorofila b	[M + NH ₄] ⁺	924,549	16,2	10,6	C ₅₅ H ₇₀ N ₄ O ₆ Mg
TG(18:3/18:3/20:2)	[M + Na] ⁺	925,726	7,6	7,1	C ₅₉ H ₄₄ O ₆
Clorofila a	[M + K] ⁺	931,499	2,1	7,8	C ₅₅ H ₉₂ O ₅ N ₄ Mg
TG(16:0/20:0/20:0)	[M + Na] ⁺	941,851	13,8	7,0	C ₅₉ H ₁₁₄ O ₆

Nota. Significado de abreviaturas, Cer: Ceramida, DG: Diglicérido, PS: fosfatidilserina, TG: Triglicérido.

En general, los espectros de masas MALDI medidos para cada uno de los extractos utilizando DCTB como matriz ET MALDI, proporción 100:1 (A:M) (Véase **Figura 14**), presentaron background bajo, lo que permitió realizar la asignación molecular de pigmentos de tipo clorofilas, carotenoides y lípidos presentes. En el espectro de masas MALDI del extracto obtenido mediante extracción asistida por radiación de ultrasonido (EAU), (Véase **Figura 15**), se

logró identificar un total de 17 compuestos, de los cuales 6 fueron derivados de clorofilas, 4 carotenoides, y 7 compuestos lipídicos. La acetona, solvente utilizado para obtener los extractos EAU, es un solvente ampliamente reportado para la extracción de pigmentos de microalgas, como fue discutido anteriormente (Valcareggi Morcelli et al., 2021). Lo anterior, se relaciona con la diversidad de compuestos identificados mediante MALDI MS en los extractos obtenidos mediante extracción asistida por radiación de ultrasonido (EAU).

Entre los pigmentos de tipo clorofila, identificados en el extracto obtenido mediante extracción asistida por radiación de ultrasonido (EAU) (Véase **Figura 15** y **Tabla 3**), se encuentran la clorofila a ($C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$), clorofila b ($C_{55}H_{70}N_4O_6Mg$), hidrox-clorofila b ($C_{55}H_{72}N_4O_6Mg$), feofitina a ($C_{55}H_{74}N_4O_5$), clorofilida a ($C_{35}H_{34}N_4O_5Mg$), y feoforbida a ($C_{35}H_{36}N_4O_5$). En los extractos EAU se identificó clorofila a, junto con cada uno de sus derivados. Otros autores ya han reportado previamente la identificación de pigmentos tipo clorofila en células de *Chlorella vulgaris*, como se mencionó anteriormente (Obeid et al., 2022a) (Bhuvana et al., 2019a), en estos casos utilizando un sistema de separación de HPLC. Algo interesante fue, los derivados de clorofila fueron detectados como cationes radicales de la molécula M^+ , y como moléculas protonadas $[M + H]^+$ o aductos de potasio $[M + K]^+$ o amonio $[M + NH_4]^+$. Lo anterior, posiblemente a la presencia de estos iones en el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, donde cumplen función de micro y macronutrientes. Asimismo, se identificaron los carotenoides violaxantina ($C_{40}H_{56}O_4$), anteraxantina ($C_{40}H_{56}O_3$), y β -caroteno ($C_{40}H_{56}$), compuestos identificados previamente por otros autores mediante HPLC (Gille et al., 2016a) (Stramarkou et al., 2017a). Por otro lado, en el extracto obtenido mediante extracción asistida por radiación de ultrasonido (EAU) utilizando acetona, se identificó lípidos principalmente como triacilglicéridos (TAG), y glicerofosfolípidos (GP).

Figura 16

*Espectro de masas MALDI del extracto obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE), a partir de biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris*. Utilizando DCTB como matriz ET MALDI, proporciones molares matriz(M): analito(A) 100:1 (M:A).*

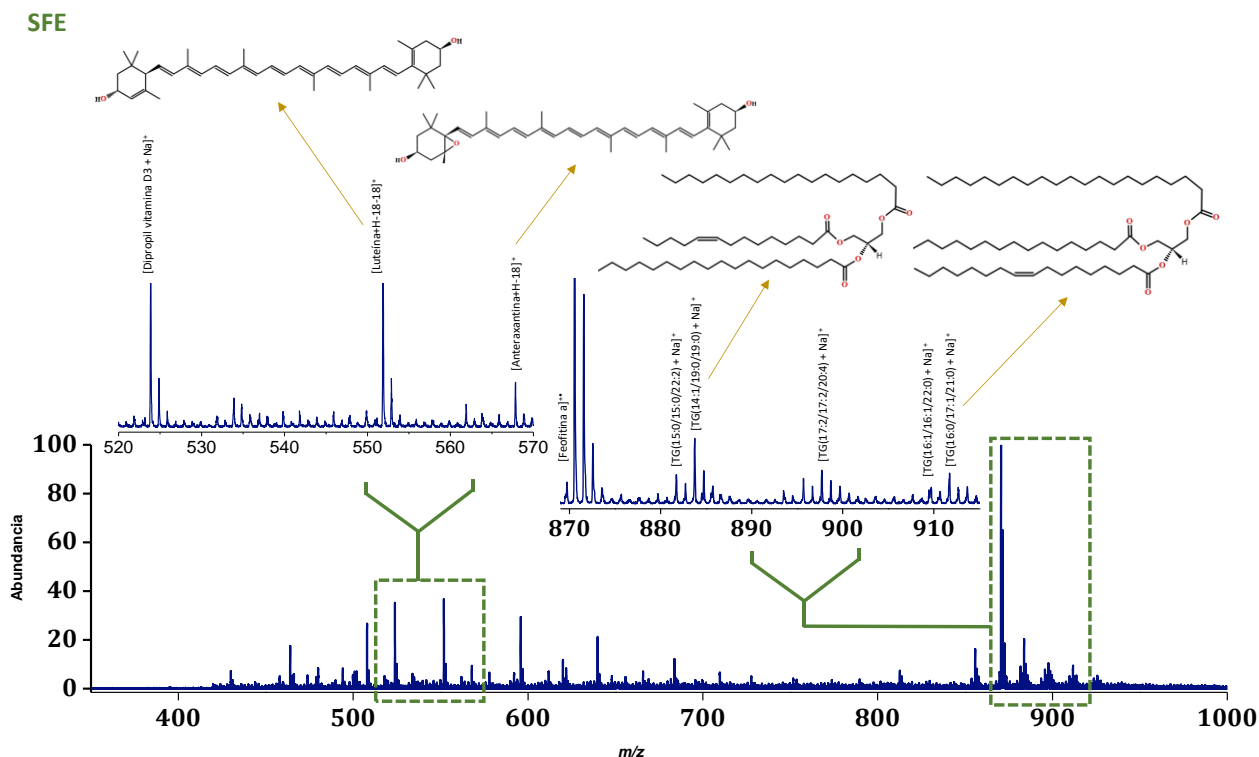


Tabla 4

*Pigmentos tipo clorofila, carotenoides y lípidos identificados en extracto obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE), a partir de biomasa seca de *Chlorella vulgaris*. La tabla muestra el nombre del compuesto correspondiente, la masa teórica, la exactitud de masa relativa (Δ ppm), la relación señal ruido (S/N) y la fórmula propuesta.*

Extracción con CO ₂ como fluido supercrítico (SFE) a partir de biomasa liofilizada de <i>Chlorella vulgaris</i>					
Compuesto	Especie detectada	Masa calculada	Δ ppm	S/N	Fórmula molecular
Derivado de vitamina D3	[M + Na] ⁺	463,319	16,8	39,6	C ₂₉ H ₄₄ O ₃
Diacetato de vitamina D3	[M + Na] ⁺	507,345	11,8	49,3	C ₃₁ H ₄₈ O ₄
Dipropil vitamina D3	[M + Na] ⁺	523,413	8,2	57,7	C ₃₃ H ₅₆ O ₃
Luteína	[M + H - 18 - 18] ⁺	533,428	21,8	7,8	C ₄₀ H ₅₆ O ₂
Luteína	[M + H - 18] ⁺	551,428	15,9	55,5	C ₄₀ H ₅₆ O ₂
Anteraxantina	[M + H - 18] ⁺	567,423	15,9	12,2	C ₄₀ H ₅₆ O ₃
PG(10:0/10:0)	[M + Na] ⁺	577,312	7,4	7,3	C ₂₆ H ₅₁ O ₁₀ P
DG(12:0/20:0)	[M + Na] ⁺	591,496	6,8	8,2	C ₃₅ H ₆₈ O ₅
DG(13:0/20:5)	[M + Na] ⁺	595,434	3,4	42,8	C ₃₆ H ₆₀ O ₅
DG(dO-36:4)	[M + Na] ⁺	611,538	11,4	9,0	C ₃₉ H ₇₂ O ₃
DG(15:0/19:0)	[M + Na] ⁺	619,528	12,9	16,7	C ₃₇ H ₇₂ O ₅
DG(13:0/22:6)	[M + Na] ⁺	621,449	11,3	107	C ₃₈ H ₆₂ O ₅
PA(13:0/17:2)	[M + Na] ⁺	639,400	0,2	29,7	C ₃₃ H ₆₁ O ₈ P
PA(14:0/18:3)	[M + Na] ⁺	665,416	6	8,1	C ₃₅ H ₆₃ O ₈ P
PA(13:0/20:1)	[M + Na] ⁺	683,463	17,6	14,2	C ₃₆ H ₆₉ O ₈ P
PS(20:1/22:6)	[M + Na] ⁺	812,542	11,1	8,9	C ₄₈ H ₈₀ NO ₁₀ P
TG(16:0/16:0/18:1)	[M + Na] ⁺	855,742	3,5	23,9	C ₅₃ H ₁₀₀ O ₆
Feofitina a	M ⁺	870,566	0,1	129	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅
TG(15:0/15:0/22:2)	[M + Na] ⁺	881,757	10,2	12,3	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆
TG(14:1/19:0/19:0)	[M + Na] ⁺	883,773	7,9	27,4	C ₅₅ H ₁₀₄ O ₆
TG(17:2/17:2/20:5)	[M + Na] ⁺	895,679	4,5	10,5	C ₅₇ H ₉₂ O ₆
TG(17:2/17:2/20:4)	[M + Na] ⁺	897,695	12,3	15,3	C ₅₇ H ₉₄ O ₆
TG(16:1/16:1/22:0)	[M + Na] ⁺	909,788	5,5	7,3	C ₅₇ H ₁₀₆ O ₆
TG(16:0/17:1/21:0)	[M + Na] ⁺	911,804	5,5	10,9	C ₅₇ H ₁₀₈ O ₆
TG(17:0/18:2/20:0)	[M + Na] ⁺	923,804	10,8	6,0	C ₅₈ H ₁₀₈ O ₆
TG(18:3/18:3/20:2)	[M + Na] ⁺	925,761	2,2	6,2	C ₅₉ H ₉₈ O ₆

Nota. Significado de abreviaturas, PG: fosfatidilserina, DG: Diglicérido, PS: fosfatidilserina, PA: ácido fosfatídico, TG: Triglicérido.

En el análisis MALDI del extracto de *Chlorella vulgaris* obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Véase **Figura 16** y **Tabla 4**) se logró identificar feofitina a ($C_{55}H_{74}N_4O_5$), un pigmento fotosintético indispensable en el proceso de la fotosíntesis. Lo anterior, se relaciona con el espectro UV-Vis medido para el extracto SFE (Véase **Figura 14**), donde se logró observar una señal con baja absorbancia en la región de absorción de las clorofilas y sus derivados. Además, se identificó anteraxantina ($C_{40}H_{56}O_3$), pigmento identificado también mediante extracción asistida por radiación de ultrasonido, y luteína ($C_{40}H_{56}O_2$). Estos compuestos han sido previamente reportados por otros autores en las células de la microalga *Chlorella vulgaris* (Gille et al., 2016a) (Stramarkou et al., 2017a). De acuerdo con la identificación realizada mediante MALDI MS del extracto SFE, *Chlorella vulgaris* presenta una variada composición lipídica, 19 lípidos diferentes asignados. Entre los lípidos identificados se encuentran triacilglicéridos (TAG), glicerofosfolípidos (GP), fosfatidilgliceroles (PG), fosfatidilserina (PS), y ácidos fosfatídicos (PA). Lo anterior, puede ser relacionado con reportes de la literatura, donde identifican gran cantidad de lípidos en células de *Chlorella vulgaris*, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Pantami et al., 2020). Adicionalmente, en el extracto SFE se logró la identificación de derivados de vitamina D3, la cual ha sido reportada previamente en *Chlorella vulgaris* (Sandgruber et al., 2021).

Figura 17

Espectro de masas MALDI del extracto obtenido mediante extracción Soxhlet a partir de biomasa liofilizada de Chlorella vulgaris. Utilizando DCTB como matriz ET MALDI, proporciones molares matriz(M): analito(A) 100:1 (M:A).

Soxhlet

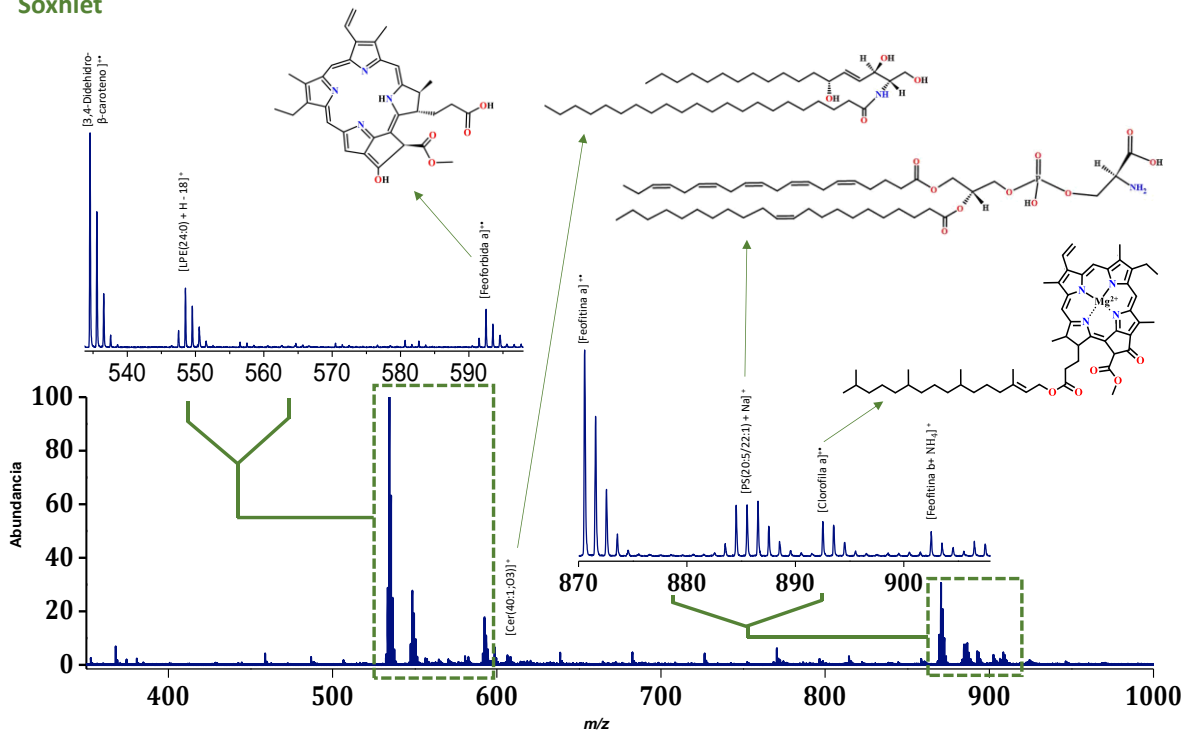


Tabla 5

Pigmentos tipo clorofila, carotenoides y lípidos identificados en extracto obtenido mediante extracción Soxhlet a partir de biomasa seca de Chlorella vulgaris. La tabla muestra el nombre del compuesto correspondiente, la masa teórica, la exactitud de masa relativa (Δ ppm), la relación señal ruido (S/N) y la fórmula propuesta.

Extracción Soxhlet a partir de biomasa liofilizada de <i>Chlorella vulgaris</i>					
Compuesto	Especie detectada	Masa calculada	Δ ppm	S/N	Fórmula molecular
3,4-Dihidro- β -caroteno	M ^{+•}	534,423	15,9	829	C ₄₀ H ₅₄
LPE(24:0)	[M + H - 18] ⁺	548,407	8,4	214	C ₂₉ H ₆₀ NO ₇ P
Feoforbida a	M ^{+•}	592,269	15,2	118	C ₃₅ H ₃₆ N ₄ O ₇
PE(2-OMe-26:2/0:0)	[M + H] ⁺	606,450	11,9	24	C ₃₂ H ₆₄ NO ₇ P
PE(12:0/14:0)	[M + H] ⁺	608,429	4,8	11	C ₃₁ H ₆₂ NO ₈ P
Cer(40:1;O3)	[M + H] ⁺	638,609	15,2	27,6	C ₄₀ H ₇₉ NO ₄

Cer(42:1;O4)	[M + H] ⁺	682,635	4,5	29,7	C ₄₂ H ₈₄ NO ₅
Cer(44:1;O5)	[M + H] ⁺	726,661	10,9	30	C ₄₄ H ₈₇ NO ₆
PE(15:1/22:4)	[M + H] ⁺	752,523	4	6,4	C ₄₂ H ₇₄ NO ₈ P
PS(13:0/20:2)	[M + Na] ⁺	768,479	15,7	7,1	C ₃₉ H ₇₂ NO ₁₀ P
PC(15:0/20:3)	[M + H] ⁺	770,570	12,8	45,6	C ₄₃ H ₈₀ NO ₈ P
PS(15:0/20:2)	[M + H] ⁺	774,529	12,9	8,4	C ₄₁ H ₇₇ NO ₁₀ P
PE(18:2/22:2)	[M + H] ⁺	796,586	19,6	15,9	C ₄₅ H ₈₂ NO ₈ P
PE(17:1/22:6)	[M + Na] ⁺	798,505	2,6	7,7	C ₄₄ H ₇₄ NO ₈ P
PC(18:0/20:2)	[M + H] ⁺	814,633	14,1	22,8	C ₄₆ H ₈₈ NO ₈ P
PS(20:2/21:0)	[M + H] ⁺	858,622	7,7	14,1	C ₄₇ H ₈₈ NO ₁₀ P
Feofitina a	M ⁺⁺	870,566	1	185	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅
Feofitina b	M ⁺⁺	884,545	0,1	30,2	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆
PS(20:5/22:1)	[M + Na] ⁺	886,557	1,6	41,4	C ₄₈ H ₈₂ NO ₁₀ P
Clorofila a	M ⁺⁺	892,535	0,1	18	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₅ Mg
Feofitina b	[M + NH ₄] ⁺	902,579	14,8	26,8	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆
Clorofila b	M ⁺⁺	906,515	2	16	C ₅₅ H ₇₀ N ₄ O ₆ Mg
Hidroxiclorofila b	M ⁺⁺	908,530	21,1	29,3	C ₅₅ H ₇₂ N ₄ O ₆ Mg
Clorofila b	[M + NH ₄] ⁺	924,349	10,6	11,9	C ₅₅ H ₇₀ N ₄ O ₆ Mg

Nota. Significado de abreviaturas, LPE: Lisofosfatidiletanolamina, PE: Fosfatidiletanolamina, Cer: Ceramida, PS: fosfatidilserina, PC: fosfatidilcolina.

Por otra parte, en el análisis por espectrometría de masas MALDI del extracto de *Chlorella vulgaris* obtenido mediante extracción Soxhlet (Véase **Figura 17** y **Tabla 5**), se identificaron un total de 22 compuestos, de los cuales 6 fueron asignados como clorofilas y sus derivados; una señal fue asignada a un carotenoide y 15 señales fueron asignadas a compuestos lipídicos. Curiosamente, en el extracto obtenido mediante Soxhlet, utilizando hexano como solvente de extracción, solo se logró identificar el carotenoide 3,4-didehidro-β-caroteno (C₄₀H₅₄). Lo anterior, también puede correlacionarse con el análisis UV-Vis del extracto Soxhlet (Véase **Figura 14**), donde no se observa la banda representativa en la región de absorción de los carotenoides, aproximadamente

$\lambda=450$ nm. Adicional a los lípidos identificados en los extractos obtenidos mediante EAU y SFE, en el extracto Soxhlet se identificó fosfatidilcolinas (PC) y fosfatidiletanolamina (PE).

Asimismo, y tal como se puede observar en las **Tablas 3, 4, 5**, los valores de masa experimental de los compuestos identificados son bastante cercanos a los valores de masa teóricos, lo que se traduce en alta exactitud en la masa (Δ ppm). Igualmente, como se mencionó anteriormente, se compararon los patrones isotópicos de las señales con los patrones isotópicos calculados. Por ejemplo, al observar la abundancia relativa experimental y teórica de algunos compuestos (ver **Tabla 6**), se confirma la similitud entre las señales obtenidas. Se puede analizar que para la clorofila b el pico correspondiente a $M + 2$ se superpone con otro compuesto con una masa similar y, por lo tanto, se observa un pico con una abundancia mayor. Además, el valor del descriptor analítico relación señal a ruido (S/N) es mayor que 5 para todas las señales asignadas. El mayor valor de S/N 829,5, se obtuvo para el 3,4-didehidro- β -caroteno ($C_{40}H_{54}$) identificado en el extracto obtenido con Soxhlet a partir de biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris*. Por el contrario, el valor más bajo de S/N 5,0, se obtuvo para el carotenoide violaxantina identificado en el extracto de la microalga *Chlorella vulgaris* obtenido mediante extracción asistida con radiación de ultrasonido.

Tabla 6

Abundancia relativa calculada y experimental de algunos compuestos tipo clorofila, carotenoide y lípido identificados en extracto obtenido mediante extracción Ultrasonido a partir de biomasa seca de Chlorella vulgaris.

Compuesto	Isotópologo	Abundancia relativa calculada	Abundancia relativa experimental
Luteína	1	100	100
	2	43,983	44,270
	3	9,850	15,785
Anteraxantina	1	100	100
	2	44,021	47,952
	3	10,072	13,964
	4	1,592	6,072
Clorofila b (M+NH ₄)	1	100	100
	2	74,64	81,88
	3	42,227	40,36
TG(16:0/20:0/20:0)	1	100	100
	2	65,353	67,534
	3	22,243	19,025

Es importante destacar la identificación de clorofila a y clorofila b intactas y sus derivados en los extractos, debido a que las moléculas de clorofila a y clorofila b, son altamente lábiles y termoinestables, que se descomponen fácilmente ante la presencia de ácidos o bases en el medio, así como debido al aumento de la temperatura (Mostofa et al., 2013). Lo anterior, hace que su aislamiento y caracterización estructural sea una tarea difícil. *Chlorella vulgaris* es un microorganismo fotosintético que juega un papel importante en la cadena alimentaria y el ciclo del carbono. La clorofila, es un pigmento fundamental en el proceso de la fotosíntesis de las microalgas, y es responsable de la absorción de la luz y la conversión de la energía en química. La clorofila a (C₅₅H₇₂N₄O₅Mg), es la clorofila más común en las microalgas. Las microalgas también pueden contener otros pigmentos, como la feofitina a y la clorofilida a, los cuales también fueron

identificados en este proyecto de investigación. Estos pigmentos fotosintéticos derivados de clorofila pueden afectar la eficiencia de la fotosíntesis y el crecimiento de la microalga (Jacob-Lopes et al., n.d.). Asimismo, es importante destacar que la presencia de diferentes tipos de pigmentos y su proporción puede variar en función de las condiciones ambientales en las que se encuentre la microalga, como por ejemplo la intensidad y la disponibilidad de luz, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la profundidad en la columna de agua, entre otros.

Igualmente, los carotenoides, pigmentos identificados en este proyecto de investigación en extractos de la microalga *Chlorella vulgaris* (Véase **Figura 15,16,17** y **Tabla 3,4,5**), son ampliamente utilizados como fotoprotectores celulares (Young & Britton, 1993). Lo anterior, debido a que protegen a la microalga contra los efectos nocivos de la luz y la radiación UV. Además, los carotenoides presentan un alto interés en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y como pigmentos (Kaczor & Baranska, 2016). La biosíntesis de carotenoides por parte de las microalgas es un proceso complejo que involucra factores internos y externos, como la concentración de CO₂, la disponibilidad de radiación, la temperatura, la composición del medio de cultivo y la presencia de contaminantes (Bonet et al., 2016). Por lo anterior, algunos autores concluyen que los cambios composicionales de pigmentos pueden ser utilizados como indicadores del estado de las microalgas y del ecosistema (Moorthy et al., 2022).

En los extractos obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción Soxhlet a partir de biomasa seca de *Chlorella vulgaris* también se logró identificar triacilglicéridos (TAG) (Véase **Figura 15,16,17** y **Tabla 3,4,5**). Los TAGs son un tipo de lípidos que se encuentran comúnmente en microalgas, los cuales cumplen una función de almacenamiento de energía. Además, permiten el crecimiento de la microalga.

Chlorella vulgaris presenta una variada composición de triacilglicéridos, lo que podría ser un interesante potencial como fuente de biodiésel, y aunque es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales en esta área, es probable que los TAGs de microalgas se conviertan en una alternativa sostenible a los combustibles fósiles (de Salud et al., 2009) Asimismo, los glicerofosfolípidos, los fosfatidilgliceroles, la fosfatidilserina y los ácidos fosfatídicos son compuestos fosfatados encontrados en microalgas que desempeñan un papel importante en la estructura y función de las membranas celulares. Los glicerofosfolípidos son un tipo de lípidos que comprenden glicerol y un grupo fosfatado, y son esenciales para la formación y mantenimiento de las membranas celulares. El fosfatidilglicerol es un componente clave de las membranas celulares y juega un papel importante en la regulación de la permeabilidad de las mismas. Además, también es un precursor importante para la síntesis de otros compuestos fosfatados, como los fosfatidilinositoles y los fosfatidilcolinas también identificadas en este proyecto de investigación (Borowitzka et al., 2016).

Al realizar una comparación de los compuestos identificados utilizando las diferentes técnicas de extracción a partir de la biomasa liofilizada de la microalga *Chlorella vulgaris*, se puede observar que la extracción SFE es la que permite identificar una mayor cantidad de pigmentos lipofílicos en comparación con la extracción asistida por ultrasonido y la extracción Soxhlet. Además de los resultados anteriormente mencionados, es importante destacar que la identificación de pigmentos mediante espectrometría de masas MALDI contribuye a una mayor comprensión de la composición química de la microalga *Chlorella vulgaris*, y su potencial en la producción de compuestos de interés. La identificación de moléculas tan diferentes estructuralmente como las clorofilas, los carotenoides y los lípidos, que varían ampliamente en polaridad, y en sus propiedades fisicoquímicas, mediante un solo experimento MALDI, utilizando una matriz comercial como el DCTB, es un reporte significativo que permite acercarse a la

identificación integral de biomarcadores de microalgas. Por lo tanto, se propone a la técnica de espectrometría de masas MALDI como una herramienta analítica que permite, en un periodo de tiempo pequeño, la identificación de una gran cantidad de pigmentos de microalgas.

5. Conclusiones

Se obtuvieron fracciones no polares de pigmentos del microorganismo *Chlorella vulgaris* mediante tres técnicas de extracción y su respectivo rendimiento: extracción asistida con radiación de ultrasonido ($56 \pm 7\%$), extracción con fluido supercrítico ($11 \pm 8\%$), y extracción Soxhlet ($45 \pm 3\%$). La evaluación de las técnicas permitió concluir que la extracción con CO₂ supercrítico fue la más eficiente en la obtención de fracciones no polares de pigmentos lipofílicos.

El uso de UV-Vis como técnica de análisis espectroscópico de los extractos obtenidos por las metodologías empleadas en la investigación, permitió elucidar señales relacionadas a la presencia de clorofilas y carotenoides en las respectivas regiones del espectro de absorción. Se obtuvieron bandas de absorción a 410, 420, 665 nm adjudicadas a compuestos tipo clorofilas. Asimismo, se obtuvieron señales de absorción a 443 y 469 nm correspondientes a pigmentos tipo carotenoide.

La caracterización mediante MALDI-TOF con DCTB como matriz de transferencia electrónica (ET) de las fracciones de pigmentos obtenidas a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*, reveló que la extracción con CO₂ supercrítico es superior en la identificación de pigmentos lipofílicos. Lo anterior, al comparar la extracción SFE con las demás técnicas evaluadas, extracción asistida con radiación de ultrasonido y extracción Soxhlet. Este resultado brinda información sobre la

eficacia de las técnicas de extracción y su aplicación en la obtención de pigmentos lipofílicos en microalgas. Cabe resaltar, entre los pigmentos lipofílicos identificados por MALDI encontramos triacilglicéridos como TG(15:0/15:0/22:2), fosfatidilglicerol como PG(10:0/10:0), fosfatidilserina como PS(20:1/22:6) y ácidos fosfatídicos como PA(13:0/17:2).

Los resultados de esta investigación sugieren que la combinación de la técnica de extracción con CO₂ supercrítico y el uso de espectrometría de masas MALDI-TOF ofrece un enfoque eficaz para la caracterización de pigmentos lipofílicos en la microalga *Chlorella vulgaris*.

6. Recomendaciones

Para mejorar los resultados obtenidos a partir de la extracción con fluido supercrítico (SFE), y de acuerdo con la literatura (Kitada et al., 2009b), se recomienda la implementación de un co-solvente polar (por ejemplo, etanol), que modifique la polaridad del solvente de extracción y permita extraer tanto moléculas de polaridad baja como moléculas de polaridad media. Asimismo, se recomienda explorar la posibilidad del análisis directo (sin extracción) de las células de la microalga *C. vulgaris*, en la cámara de ionización MALDI, y medir los perfiles pigmentarios obtenidos. Lo anterior, y previo al estudio de las variables en el equipo MALDI, permitiría obtener información molecular de la microalga en poco tiempo (segundos).

Referencias Bibliográficas

- Abou-Shanab, R. A. I., Matter, I. A., Kim, S. N., Oh, Y. K., Choi, J., & Jeon, B. H. (2011). Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. *Biomass and Bioenergy*, 35(7), 3079–3085. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.021>
- Adamakis, I. D., Lazaridis, P. A., Terzopoulou, E., Torofias, S., Valari, M., Kalaitzi, P., Rousonikolos, V., Gkoutzikostas, D., Zouboulis, A., Zalidis, G., & Triantafyllidis, K. S. (2018). Cultivation, characterization, and properties of *Chlorella vulgaris* microalgae with different lipid contents and effect on fast pyrolysis oil composition. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(23), 23018–23032. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2368-5>
- Ahmed, S., Shivasharana, A. C. T., & Kaliwal, B. B. (2016). *Identification And Characterisation Of Chlorella Vulgaris For Biodiesel Production*. www.ijres.com
- Alba, C., Universidad, Q., Valle, D., de Ingenierías, F., De, E., & Química, I. (2013). *EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS A PARTIR DE LA MICROALGA Chlorella vulgaris*.
- Anderson, J., Berthod, A., Pino, V., & Stalcup, A. (2016). *Analytical Separation Science* (John Wiley & Sons, Ed.; 5 Volume Set, Vol. 5).
- Anthony, J., Rangamaran, V. R., Gopal, D., Shivasankarasubbiah, K. T., Thilagam, M. L. J., Peter Dhassiah, M., Padinjattayil, D. S. M., Valsalan, V. K. N., Manambrakat, V., Dakshinamurthy, S., Thirunavukkarasu, S., & Ramalingam, K. (2015). Ultraviolet and 5'Fluorodeoxyuridine Induced Random Mutagenesis in *Chlorella vulgaris* and Its Impact on Fatty Acid Profile: A New Insight on Lipid-Metabolizing Genes and Structural Characterization of Related Proteins. *Marine Biotechnology*, 17(1), 66–80. <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9597-5>

- Bahadar, A., Khan, M. B., & Willmann, J. C. (2016). Accelerated production and analysis of biofuel derived from photobioreactor engineered microalgae using super critical fluid extraction. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, 38(8), 1132–1139. <https://doi.org/10.1080/15567036.2013.813992>
- Barletta, R. E., Krause, J. W., Goodie, T., & el Sabae, H. (2015). The direct measurement of intracellular pigments in phytoplankton using resonance Raman spectroscopy. *Marine Chemistry*, 176, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.09.005>
- Bayu, A., Rachman, A., Noerdjito, D. R., Putra, M. Y., & Widayatno, W. B. (2020). High-value chemicals from marine diatoms: A biorefinery approach. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 460(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/460/1/012012>
- Beyerinick, M. W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung*, 47, 725–739, 741–754, 757–768, 781–785. <http://img.algaebase.org/pdf/AC100CF003338161AAoHt43C4207/35049.pdf>
- Bhuvana, P., Sangeetha, P., Anuradha, V., & Ali, M. S. (2019a). Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N. Oculata* and *C. Vulgaris*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101094. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101094>
- Bhuvana, P., Sangeetha, P., Anuradha, V., & Ali, M. S. (2019b). Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N. Oculata* and *C. Vulgaris*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101094>
- Bonet, M. L., Canas, J. A., Ribot, J., & Palou, A. (2016). Carotenoids in Nature. *Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation, and Function*, 79, 377–414. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7>

- Borowitzka, M. A., Beardall, J., & Raven, J. A. (2016). Lipid Metabolism in Microalgae. In *The Physiology of Microalgae* (Vol. 6, pp. 413–484). Springer International .
<http://www.springer.com/series/7591>
- Burdge, G. C., & Calder, P. C. (2015). Introduction to fatty acids and lipids. In *World Review of Nutrition and Dietetics* (Vol. 112, pp. 1–16). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000365423>
- Capelo, J. L. (2009). *Ultrasound in Chemistry, Analytical Applications*. Wiley-VCH.
- Carmen, M., Gómez, M., & González, M. B. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Semantic Scholar*, 113–168.
<http://analesranf.com/index.php/mono/article/view/1066>
- CIATEJ, A. C. (2016). *Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción* (Primera).
- Coco-Enríquez, L., Muñoz-Antón, J., & Martínez-Val, J. M. (2017). New text comparison between CO₂ and other supercritical working fluids (ethane, Xe, CH₄ and N₂) in line- focusing solar power plants coupled to supercritical Brayton power cycles. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(28), 17611–17631. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.071>
- Couto, D., Melo, T., Conde, T. A., Moreira, A. S. P., Ferreira, P., Costa, M., Silva, J., Domingues, R., & Domingues, P. (2022). Food grade extraction of *Chlorella vulgaris* polar lipids: A comparative lipidomic study. *Food Chemistry*, 375. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131685>
- Cuellar, R. (2017). *Diseño de la automatización para una planta piloto de extracción por fluido supercrítico utilizando CO₂ como solvente*. Pontificia Universidad Católica de Perú.
- de Andrade Lima, M., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2018). Optimisation and modelling of supercritical CO₂ extraction process of carotenoids from carrot peels. *Journal of Supercritical Fluids*, 133(July 2017), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.028>

- de Bhowmick, G., Subramanian, G., Mishra, S., & Sen, R. (2014). Raceway pond cultivation of a marine microalga of Indian origin for biomass and lipid production: A case study. *Algal Research*, 6(PB), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.07.005>
- de Salud, F., De, E., Departamento, M., Ciencias, D. E., & Bucaramanga, B. (2009). *EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE LA MICROALGA Chlorella sp AISLADA DE AMBIENTES DULCEACUÍCOLAS COLOMBIANOS A ESCALA DE LABORATORIO Y PILOTO* LUDDY PATRICIA NIETO ESTÉVEZ.
- Dolganyuk, V., Andreeva, A., Budenkova, E., Sukhikh, S., Babich, O., Ivanova, S., Prosekov, A., & Ulrikh, E. (2020). Study of morphological features and determination of the fatty acid composition of the microalgae lipid complex. *Biomolecules*, 10(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/biom10111571>
- Donatus, M., Ranjitha, J., Vijayalakshme S., & Madonna Shalma S. (2015). Growth, Biochemical Sketch and Hydrocarbon Derivative Production from a Newly Isolated Chlorella Vulgaris. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 67–71.
- Donatus, M., Ranjitha J., Vijayalakshmi S., & Shalma M. (2015). Growth, Biochemical Sketch and Hydrocarbon Derivative Production from a Newly Isolated Chlorella Vulgaris. *Int. J. Pharm. Sci. Rev.*, 67–71.
- Donatus, S., Vijayalakshmi, S., & Lingam, R. (2015). *An efficient extraction method for the isolation of newly isolated green microalgae from fresh water bodies*. 8, 543–551.
- Donovan McCarley, T., McCarley, R. L., & Limbach, P. A. (1991). Methods in Enzymology. In *Rapid Commun. Mass Spectrom* (Vol. 63, Issue 4).
- Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids BASIC PROTOCOL*. (2001).

- Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C., & Lloyd, D. K. (2013). *Liquid Chromatography: Applications*. Elsevier Science. <https://books.google.com.co/books?id=qGB72VA3V9YC>
- Fernando, A., Solano, B., Augusto, C., Ruiz, G., David, J., & Davila, M. (2012). *UTEX 1803 en fotobiorreactores a escala laboratorio Improvement of CO₂ sequestration by Chlorella vulgaris UTEX 1803 on lab scale photobioreactors*. 25(2), 39–47.
- Garza, R. y, & Orío, A. (2012). *Valoración del potencial ecológico en los embalses de la confederación hidrográfica del Tajo [2008-2010]*.
- Gille, A., Trautmann, A., Posten, C., & Briviba, K. (2016a). Bioaccessibility of carotenoids from *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(5), 507–513. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1181158>
- Gille, A., Trautmann, A., Posten, C., & Briviba, K. (2016b). Bioaccessibility of carotenoids from *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(5), 507–513. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1181158>
- Graham, L. E., & Wilcox, L. W. (2000). *Algae*. Prentice Hall. <https://books.google.com.co/books?id=sYXwAAAAMAAJ>
- Gross, J. H. (2017). *Mass Spectrometry* (Third). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>
- Gunstone, F. D. (1996). Fatty Acid and Lipid Chemistry. In *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4131-8>
- Hayashida, G., Schneider, C., Espíndola, L., Arias, D., Riquelme, C., Wulff-Zottele, C., Díaz-Palma, P., & Rivas, M. (2017). Characterization of a Chlorophyta microalga isolated from a microbial mat in Salar de Atacama (northern Chile) as a potential source of compounds for biotechnological applications. *Phycological Research*, 65(3), 202–211. <https://doi.org/10.1111/pre.12176>

- He, H., & Hou, T. (2021). Lipid. In *Essentials of Food Chemistry* (pp. 197–253). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-16-0610-6_5
- Huang, J. J., Lin, S., Xu, W., & Cheung, P. C. K. (2017). Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton. *Biotechnology Advances*, 35(5), 597–618.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.001>
- Hussain, J., Liu, Y., Lopes, W. A., Druzian, J. I., Souza, C. O., Carvalho, G. C., Nascimento, I. A., & Liao, W. (2015). Effects of Different Biomass Drying and Lipid Extraction Methods on Algal Lipid Yield, Fatty Acid Profile, and Biodiesel Quality. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 3048–3057. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1486-5>
- Ibáñez, M. (2005). *Obtención de ácido eicosapentaenoico (20:5n3) a partir de la microalga Phaeodactylum tricornutum* [Universidad Almería].
https://books.google.com.co/books?id=lUgOAQAAQBAJ&dq=clasificaci%C3%B3n+lipidos+al+gas&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Jacob-Lopes, E., Queiroz, M. I., Queiroz, L., & Editors, Z. (n.d.). *Pigments from Microalgae Handbook*.
- Jan C. J. Bart. (2005). *Additives in Polymers: Industrial Analysis and Applications* (John Wiley & Sons, Ed.).
- Jay, M. I., Kawaroe, M., & Effendi, H. (2018). Lipid and fatty acid composition microalgae *Chlorella vulgaris* using photobioreactor and open pond. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 141(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/141/1/012015>
- John R. Dean. (2010). *Extraction Techniques in Analytical Sciences* (John Wiley & Sons, Ed.).
- Junko Yabuzak. (n.d.). *Carotenoids Database*. <http://carotenoiddb.jp/>
- Kaczor, A., & Baranska, M. (2016). *Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology*. John Wiley & Sons, Ltd.

<http://doi.wiley.com/10.1002/ejoc.201200111%0Apapers3://publication/doi/10.1002/ejoc.201200111>

Khozin-Goldberg, I. (2016). Lipid Metabolism in Microalgae. In J. and R. J. A. Borowitzka Michael A. and Beardall (Ed.), *The Physiology of Microalgae* (pp. 413–484). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24945-2_18

Kim, Y. H., Park, S., Kim, M. H., Choi, Y. K., Yang, Y. H., Kim, H. J., Kim, H., Kim, H. S., Song, K. G., & Lee, S. H. (2013). Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* using [Bmim][MeSO₄]. *Biomass and Bioenergy*, 56, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.04.022>

Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S., & Hasegawa, T. (2009a). Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(5), 657–661. <https://doi.org/10.1002/jctb.2096>

Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S., & Hasegawa, T. (2009b). Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(5), 657–661. <https://doi.org/10.1002/jctb.2096>

Knochenmuss, R. (2014). MALDI mechanisms: Wavelength and matrix dependence of the coupled photophysical and chemical dynamics model. *Analyst*, 139(1), 147–156. <https://doi.org/10.1039/c3an01446k>

Koh, H. G., Kang, N. K., Kim, E. K., Suh, W. I., Park, W. K., Lee, B., & Chang, Y. K. (2019). Isolation and characterization of novel *Chlorella* species with cold resistance and high lipid accumulation

for biodiesel production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 952–961.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1904.04008>

Kumar, R. R., Rao, P. H., & Arumugam, M. (2015). Lipid extraction methods from microalgae: A comprehensive review. In *Frontiers in Energy Research* (Vol. 3, Issue JAN). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00061>

Kuss, H.-Joachim., & Kromidas, Stavros. (2009). *Quantification in LC and GC : a practical guide to good chromatographic data*. Wiley-VCH.

LIPID MAPS® Structure Database (LMSD). (n.d.). <https://www.lipidmaps.org/databases>

Liu, J., & Chen, F. (2014). Biology and Industrial Applications of Chlorella: Advances and Prospects. In *Advances in biochemical engineering/biotechnology* (Vol. 153, pp. 1–35). Springer International. https://doi.org/10.1007/10_2014_286

Liu, J., & Chen, F. (2016a). Biology and industrial applications of Chlorella: Advances and prospects. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 153, 1–35.
https://doi.org/10.1007/10_2014_286

Liu, J., & Chen, F. (2016b). Biology and industrial applications of Chlorella: Advances and prospects. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 153, 1–35.
https://doi.org/10.1007/10_2014_286

Lohman, E. J., Gardner, R. D., Halverson, L., Macur, R. E., Peyton, B. M., & Gerlach, R. (2013). An efficient and scalable extraction and quantification method for algal derived biofuel. *Journal of Microbiological Methods*, 94(3), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.007>

Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 1217, Issue 16, pp. 2383–2389).
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>

- Macías-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodríguez, M., Martínez De La Ossa, E., Lubián, L. M., & Montero, O. (2005). Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering*, 66(2), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.03.021>
- Madhu, N. v., Ullas, N., Ashwini, R., Meenu, P., Rehitha, T. v., & Lallu, K. R. (2014). Characterization of phytoplankton pigments and functional community structure in the Gulf of Mannar and the Palk Bay using HPLC-CHEMTAX analysis. *Continental Shelf Research*, 80, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2014.03.004>
- Madhubalaji, C. K., Mudaliar, S. N., Chauhan, V. S., & Sarada, & R. (n.d.). *Evaluation of drying methods on nutritional constituents and antioxidant activities of Chlorella vulgaris cultivated in an outdoor open raceway pond*. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02355-2/Published>
- Matos, J., Cardoso, C. L., Falé, P., Afonso, C. M., & Bandarra, N. M. (2020). Investigation of nutraceutical potential of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 303–312. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14278>
- Matos, P., Ferreira, W. B., Morioka, L. R. I., Moecke, E. H. S., França, K. B., & Sant'Anna, E. S. (2018). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in medium supplemented with desalination concentrate grown in a pilot-scale open raceway. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35(4), 1183–1192. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180354s20170338>
- McKee T, & McKee J.R. (2016). *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. (5th ed.). McGraw Hill. <https://bibliotecavirtual.uis.edu.co:3180/content.asp?bookid=1960§ionid=148095989>

- Millao, S., & Uquiche, E. (2016). Extraction of oil and carotenoids from pelletized microalgae using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, *116*, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.05.049>
- Mingorance, J., Regueiro, B., & Muñoz-Bellido, J. L. (2016). Perspectiva histórica de la espectrometría de masas en microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *34*(Supl 2), 3–7. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(16\)30184-7](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30184-7)
- Mirizadeh, S., Casazza, A. A., Converti, A., Nosrati, M., & Shojaosadati, S. A. (2021). Repetitive non-destructive extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* grown under stress conditions. *Bioresource Technology*, *326*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124798>
- Moghadam, A. J., & Aghababai Beni, A. (2022). Comparison of biodiesel production from *Dunaliella salina* teodor and *Chlorella vulgaris* microalgae using supercritical fluid technique. *South African Journal of Chemical Engineering*, *41*, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2022.06.004>
- Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., Rimauro, J., & Musmarra, D. (2018). Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph15112436>
- Moorthy, A. K., Shukla, S. P., Govindarajan, R. B., Kumar, K., & Bharti, V. S. (2022). Application of Microalgal Physiological Response as Biomarker for Evaluating the Toxicity of the Textile Dye Alizarin Red S. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *109*(2), 401–408. <https://doi.org/10.1007/s00128-022-03525-3>
- Moreno, R., Aita, G. M., Madsen, L., Gutierrez, D. L., Yao, S., Hurlburt, B., & Brashear, S. (2013). Identification of naturally isolated Southern Louisiana's algal strains and the effect of higher CO₂

content on fatty acid profiles for biodiesel production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(5), 948–957. <https://doi.org/10.1002/jctb.3930>

Mostofa, K. M. G., Liu, C. qiang, Pan, X., Vione, D., Hayakawa, K., Yoshioka, T., & Komissarov, G. (2013). Chlorophylls and their Degradation in Nature. In *Environmental Science and Engineering* (pp. 687–768). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32223-5_8

Mouahid, A., Crampon, C., Toudji, S.-A. A., & Badens, E. (2016). Effects of high water content and drying pre-treatment on supercritical CO₂ extraction from *Dunaliella salina* microalgae: Experiments and modelling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 116, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.06.007>

Nieto, L. P. (2009). *EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS DE LA MICROALGA *Chlorella* sp AISLADA DE AMBIENTES DULCEACUÍCOLAS COLOMBIANOS A ESCALA DE LABORATORIO Y PILOTO*. Universidad Industrial de Santander.

Nuñez, M. (2017). *Cultivo a pequeña escala de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* para la obtención de aceite*. Universidad Santo Tomás.

Obeid, S., Beaufils, N., Peydecastaing, J., Camy, S., Takache, H., Ismail, A., & Pontalier, P. Y. (2022a). Microalgal fractionation for lipids, pigments and protein recovery. *Process Biochemistry*, 121, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.07.002>

Obeid, S., Beaufils, N., Peydecastaing, J., Camy, S., Takache, H., Ismail, A., & Pontalier, P. Y. (2022b). Microalgal fractionation for lipids, pigments and protein recovery. *Process Biochemistry*, 121, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.07.002>

- Pandey, A., Höfer, R., Taherzadeh, M., Nampoothiri, M., & Larroche, C. (2015). *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier Science.
<https://books.google.com.co/books?id=dxKdBAAAQBAJ>
- Pandit, P. R., Fulekar, M. H., & Karuna, M. S. L. (2017). Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13437–13451.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-8875-y>
- Pantami, H. A., Bustamam, M. S. A., Lee, S. Y., Ismail, I. S., Faudzi, S. M. M., Nakakuni, M., & Shaari, K. (2020). Comprehensive GCMS and LC-MS/MS metabolite profiling of *Chlorella vulgaris*. *Marine Drugs*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/MD18070367>
- Patias, L. D., Fernandes, A. S., Petry, F. C., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2017). Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. *Food Research International*, 100, 260–266.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.069>
- Patiny, L., & Borel, A. (2013). ChemCalc: A building block for tomorrow's chemical infrastructure. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(5), 1223–1228.
<https://doi.org/10.1021/ci300563h>
- Patras, D., Moraru, C. V., & Socaciu, C. (2018). Screening of bioactive compounds synthesized by microalgae: A progress overview on extraction and chemical analysis. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia*, 63(1), 21–35. <https://doi.org/10.24193/subbchem.2018.1.02>
- Peraza, R. (2017). *Diversidad y abundancia de fitoplancton del embalse Abreus (Cienfuegos, Cuba)*. 72. https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/10996/TESIS_MAESTRÍA_ROSELY

PEREZA.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttp://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_en_desarrollo/article/view/3499

Pérez, M., Quishpi, J., Pauta, G., León, F., Cisneros, J., Pinos, V., & Alvarado, A. (2018). Comparación de las eficiencias de recuperación de lípidos de las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* obtenidas con diferentes disolventes. *MASKANA*, 9(2), 27–34. <https://doi.org/10.18537/mskn.09.02.04>

Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., García-Blairsy Reina, G., Señoráns, F. J., & Ibáñez, E. (2012a). Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT*, 46(1), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.024>

Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., García-Blairsy Reina, G., Señoráns, F. J., & Ibáñez, E. (2012b). Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT*, 46(1), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.024>

Purushanahalli Shivagangaiah, C., Sanyal, D., Dasgupta, S., & Banik, A. (2021). Phycoremediation and photosynthetic toxicity assessment of lead by two freshwater microalgae *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiologia Plantarum*, 173(1), 246–258. <https://doi.org/10.1111/ppl.13368>

Qi, F., Pei, H., Mu, R., Ma, G., Wu, D., & Han, Q. (2019). Characterization and optimization of endogenous lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* SDEC-3M ability to rapidly accumulate lipid for reversing nightly lipid loss. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1493-9>

- Ramluckan, K., Moodley, K. G., & Bux, F. (2014). An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*, *116*, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.07.118>
- Roy, S., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S., & Johnsen, G. (2011). *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. Cambridge University Press. https://books.google.com.co/books?id=K_2AJHmdvxgC
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014a). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 35, Issue October 2017, pp. 265–278). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014b). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 35, pp. 265–278). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Saini, R. K., Prasad, P., Shang, X., & Keum, Y. S. (2021). Advances in lipid extraction methods—a review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222413643>
- Sandgruber, F., Gielsdorf, A., Baur, A. C., Schenz, B., Müller, S. M., Schwerdtle, T., Stangl, G. I., Griehl, C., Lorkowski, S., & Dawczynski, C. (2021). Variability in macro- and micronutrients of 15 commercially available microalgae powders. *Marine Drugs*, *19*(6). <https://doi.org/10.3390/md19060310>
- Santhanam, P., Begum, A., & Pachiappan, P. (2018). *Basic and Applied Phytoplankton Biology*. Springer Singapore. <https://books.google.com.co/books?id=JS5mDwAAQBAJ>

- Schüler, L., Greque de Moraes, E., Trovão, M., Machado, A., Carvalho, B., Carneiro, M., Maia, I., Soares, M., Duarte, P., Barros, A., Pereira, H., Silva, J., & Varela, J. (2020). Isolation and Characterization of Novel *Chlorella Vulgaris* Mutants With Low Chlorophyll and Improved Protein Contents for Food Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00469>
- Shanmugam, S., Mathimani, T., Anto, S., Sudhakar, M. P., Kumar, S. S., & Pugazhendhi, A. (2020). Cell density, Lipidomic profile, and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacterium for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123061>
- Shanta, P. v., Li, B., Stuart, D. D., & Cheng, Q. (2021). Lipidomic Profiling of Algae with Microarray MALDI-MS toward Ecotoxicological Monitoring of Herbicide Exposure. *Environmental Science and Technology*, 55(15), 10558–10568. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01138>
- Shiklomanov, I. A., Programme, I. H., & Unesco. (1998). *World Water Resources: A New Appraisal and Assessment for the 21st Century*. UNESCO. https://books.google.com.co/books?id=R_uTtwAACAAJ
- Skoog, D. A., Crouch, S. R., Holler, F. J., & Anzures, M. B. (2008). *Principios de analisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning. <https://books.google.com.co/books?id=7FOyZbb7q8UC>
- Skoog, D. A., Holler, Fj., & Crouch, S. R. (n.d.). *Principios de análisis instrumental*. www.FreeLibros.me
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R., & Mora Lugo, E. de la. (n.d.). *Fundamentos de química analítica / Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Stanley R., Crouch ; traducción Dr. Eugenio de la Mora Lugo, M. en C. Jesús Miguel Torres Flores*.

- Solana, M., Rizza, C. S., & Bertucco, A. (2014). Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Journal of Supercritical Fluids*, *92*, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.013>
- Soleimani khorrandashti, M., Samipoor Giri, M., & Majidian, N. (2021). Extraction lipids from *Chlorella vulgaris* by supercritical CO₂ for biodiesel production. *South African Journal of Chemical Engineering*, *38*, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.03.008>
- Sotoudehniakarani, F., Alayat, A., & McDonald, A. G. (2019). Characterization and comparison of pyrolysis products from fast pyrolysis of commercial *Chlorella vulgaris* and cultivated microalgae. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, *139*, 258–273. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2019.02.014>
- Sovová, H., & Stateva, R. P. (2019). New developments in the modelling of carotenoids extraction from microalgae with supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, *148*(March), 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.03.002>
- Stephenson, A. L., Dennis, J. S., Howe, C. J., Scott, S. A., & Smith, A. G. (2010). Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels*, *1*(1), 47–58. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.1>
- Stramarkou, M., Papadaki, S., Kyriakopoulou, K., & Krokida, M. (2017a). Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, *29*(6), 2947–2960. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1181-8>
- Stramarkou, M., Papadaki, S., Kyriakopoulou, K., & Krokida, M. (2017b). Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, *29*(6), 2947–2960. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1181-8>

- Su, Y., Xia, S., Wang, R., & Xiao, L. (2017). Phytohormonal quantification based on biological principles. In *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811562-6.00013-X>
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., & Subramaniam, S. (2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>
- Suzuki, K., Kamimura, A., & Hooker, S. B. (2015). Rapid and highly sensitive analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with the first derivative spectrum chromatogram (FDSC) technique. *Marine Chemistry*, 176, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.07.010>
- Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9(6), 1101–1118. <https://doi.org/10.3390/md9061101>
- Valcareggi Morcelli, A., da Silva Andrade, W., Frankenberg, C. L. C., Rech, R., & Marcílio, N. R. (2021). Extraction of Chlorophylls and Carotenoids from Microalgae: COSMO-SAC-Assisted Solvent Screening. *Chemical Engineering and Technology*, 44(7), 1227–1232. <https://doi.org/10.1002/ceat.202100008>
- Vázquez, L. (2008). *Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-)

- Virkutyte, J. (2014). The use of power ultrasound in biofuel production, bioremediation, and other applications. In *Power Ultrasonics: Applications of High-Intensity Ultrasound*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-028-6.00036-3>
- Wong, Y. K., Ho, K. C., Tsang, Y. F., Wang, L., & Yung, K. K. L. (2016). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Column Photobioreactor for Biomass Production and Lipid Accumulation. *Water Environment Research*, 88(1), 40–46. <https://doi.org/10.2175/106143015x14362865227553>
- Wright, S. W., & Jeffrey, S. W. (2006). Pigment markers for phytoplankton production. *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 2: Reactions and Processes*, 2 N(September 2005), 71–104. https://doi.org/10.1007/698_2_003
- Yao, L., Gerde, J. A., Lee, S. L., Wang, T., & Harrata, K. A. (2015). Microalgae lipid characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1773–1787. <https://doi.org/10.1021/jf5050603>
- Young, A. J., & Britton, G. (1993). *Carotenoids in Photosynthesis* (A. J. Young & G. Britton, Eds.; Primera, Vol. 1). Springer Science. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-2124-8>
- Zapata, M., & Garrido, J. L. (2000). La Diversidad Pigmentaria Del Fitoplancton Marino : Implicaciones Ecológicas. *Biotecnología y Aplicaciones de Microorganismos Pigmentados: IV Simposio Científico En Biología Celular y Molecular*, 75–94.
- Zhang, F., Kabeya, H., Kitagawa, R., Hirotsu, T., Yamashita, M., & Otsuki, T. (2000). Exploratory research of PVC-*Chlorella* composite material (PCCM) as effective utilization of *Chlorella* biologically fixing CO₂. *Journal of Materials Science*, 35(10), 2603–2609. <https://doi.org/10.1023/A:1004779415778>

Apéndices

Nombre del compuesto	Familia	Fórmula Química	Masa monoisotópica	Referencias
Luteína	Xantófila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Safi et al., 2014b)(Gille et al., 2016b)(Stramarkou et al., 2017b) (Schüler et al., 2020)
β-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Safi et al., 2014b)(Gille et al., 2016b)(Stramarkou et al., 2017b) (Schüler et al., 2020)
Luteoxantina	Xantófila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4179	(Stramarkou et al., 2017b)
Loroxantina	Xantófila	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	584,4230	(Stramarkou et al., 2017b)
Sifonaxantina	Xantófila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4179	(Stramarkou et al., 2017b)
β-ZeaCaroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₈	538,4539	(Stramarkou et al., 2017b)
Cantaxantina	Xantófila	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	564,3967	(Safi et al., 2014b)(Stramarkou et al., 2017b)
Astaxantina	Xantófila	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	596,3866	(Safi et al., 2014b)(Stramarkou et al., 2017b)
Feofitina a	Clorofila	C ₅₅ H ₇₄ N ₄ O ₅	870,5659	(Safi et al., 2014b)(Stramarkou et al., 2017b)
Clorofila a	Clorofila	C ₅₅ H ₇₂ MgN ₄ O ₅	892,5353	(Safi et al., 2014b)(Stramarkou et al., 2017b) (Bhuvana et al.,

				2019b)(Madhu balaji et al., n.d.)(Soleimani khorramdashti et al., 2021)
Clorofila b	Clorofila	$C_{55}H_{70}MgN_4O_6$	906,5146	(Safi et al., 2014b)(Bhuvana et al., 2019b)(Madhu balaji et al., n.d.)(Soleimani khorramdashti et al., 2021)
Feofitina b	Clorofila	$C_{55}H_{72}N_4O_6$	884,5452	(Safi et al., 2014b)
Violoxantina	Xantófila	$C_{40}H_{56}O_4$	600,4179	(Safi et al., 2014b)(Schüler et al., 2020)(Bhuvana et al., 2019b)
Licopeno	Caroteno	$C_{40}H_{56}$	536,4382	(Bhuvana et al., 2019b)
Fucoxantina	Xantófila	$C_{42}H_{58}O_6$	658,4233	(Bhuvana et al., 2019b)
Neoxantina	Xantófila	$C_{40}H_{56}O_4$	600,4179	(Schüler et al., 2020)
Zeaxantina	Xantófila	$C_{40}H_{56}O_2$	568,4280	(Schüler et al., 2020)
Fitoeno	Caroteno	$C_{40}H_{64}$	544,5008	(Schüler et al., 2020)
trans-crocoxantina	Xantófila	$C_{40}H_{54}O$	550,4175	(Patias et al., 2017)
trans-echinenona	Caroteno	$C_{40}H_{54}O$	550,4175	(Patias et al., 2017)
Ácido butírico (C4:0)	Ácido graso	$C_4H_8O_2$	88,0524	(Ahmed et al., 2016)
Ácido caprílico (C8:0)	Ácido graso	$C_8H_{16}O_2$	144,1150	(Ahmed et al., 2016)(Hayashida et al., 2017)
Ácido láurico (C12:0)	Ácido graso	$C_{12}H_{24}O_2$	200,1776	(Ahmed et al., 2016)(Jay et al., 2018)(Abou-Shanab et al., 2011)
Ácido tridecanoico (C13:0)	Ácido graso	$C_{13}H_{26}O_2$	214,1933	(Molino et al., 2018)
Ácido mirístico (C14:0)	Ácido graso	$C_{14}H_{28}O_2$	228,2089	(Couto et al., 2022; Lohman et al., 2013)

				(Ahmed et al., 2016) (Molino et al., 2018) (Lohman et al., 2013) (Liu & Chen, 2016b)(Sotoudehniakarani et al., 2019) (Pandit et al., 2017)(Yao et al., 2015) (J. Matos et al., 2020) (Anthony et al., 2015) (Koh et al., 2019) (Moreno et al., 2013) (Mirizadeh et al., 2021)
Ácido miristoleico (C14:1)	Ácido graso	$C_{14}H_{26}O_2$	226,1933	(Ahmed et al., 2016)(Molino et al., 2018) (Pandit et al., 2017) (Yao et al., 2015)
Ácido pentadecanoico (C15:0)	Ácido graso	$C_{15}H_{28}O_2$	240,2089	(Couto et al., 2022) (Ahmed et al., 2016) (Pandit et al., 2017)
Ácido ginkgólico (C15:1)	Ácido graso	$C_{22}H_{34}O_3$	346,2508	(Hayashida et al., 2017)
Ácido palmítico (C16:0)	Ácido graso	$C_{16}H_{32}O_2$	256,2402	(Couto et al., 2022) (Ahmed et al., 2016) (Hayashida et al., 2017) (Molino et al., 2018) (Lohman et al., 2013) (Sotoudehniakarani et al., 2019) (Pandit et al., 2017) (Jay et al., 2018) (Kim et al., 2013) (Yao et

				<p>al., 2015)(Stephenson et al., 2010)(Shanmugam et al., 2020)(Abou-Shanab et al., 2011) (Soleimani khorramdashti et al., 2021) (Adamakis et al., 2018) (Anthony et al., 2015) (Koh et al., 2019) (Qi et al., 2019)(Molino et al., 2018) (Moreno et al., 2013) (Mirizadeh et al., 2021)</p>
<p>Ácido palmitoleico (C16:1) (C16:1n7) (C16:1n9) (Ácido fisetoléico)</p>	<p>Ácido graso</p>	<p>C₁₆H₃₀O₂</p>	<p>254,2246</p>	<p>(Couto et al., 2022) (Ahmed et al., 2016) (Hayashida et al., 2017) (Molino et al., 2018) (Lohman et al., 2013) (Pandit et al., 2017) (Yao et al., 2015) (Jay et al., 2018) (Kim et al., 2013) (Stephenson et al., 2010) (Shanmugam et al., 2020) (Abou-Shanab et al., 2011) (Soleimani khorramdashti et al., 2021)(J. Matos et al., 2020) (Adamakis et</p>

				al., 2018) (Anthony et al., 2015) (Koh et al., 2019) (Qi et al., 2019) (Molino et al., 2018) (Sotoudehniakari et al., 2019)(Moreno et al., 2013)
Ácido hexadecadienoico, (C16:2)(C16:2n6)	Ácido graso	$C_{16}H_{28}O_2$	252,2089	(Couto et al., 2022) (Hayashida et al., 2017) (Yao et al., 2015) (Stephenson et al., 2010)(Adamakis et al., 2018) (Anthony et al., 2015) (Koh et al., 2019) (Qi et al., 2019)
Ácido rugánico (C16:3)(C16:3n3)	Ácido graso	$C_{16}H_{26}O_2$	250,1933	(Couto et al., 2022) (Hayashida et al., 2017) (Yao et al., 2015) (Stephenson et al., 2010) (Adamakis et al., 2018) (Anthony et al., 2015)
Ácido margárico (C17:0)	Ácido graso	$C_{17}H_{34}O_2$	270,2559	(Couto et al., 2022) (Molino et al., 2018)(Pandit et al., 2017) (Yao et al., 2015)
Ácido cis-10-heptadecenoico (C17:1)	Ácido graso	$C_{18}H_{32}O_2$	280,2402	(Couto et al., 2022) (Ahmed et al., 2016)(Yao et al., 2015)
Ácido esteárico (C18:0)	Ácido graso	$C_{18}H_{36}O_2$	284,7153	(Couto et al., 2022) (Ahmed et al., 2016)

				(Hayashida et al., 2017) (Molino et al., 2018) (Lohman et al., 2013) (Sotoudehniakari et al., 2019) (Pandit et al., 2017) (Yao et al., 2015) (Kim et al., 2013), (Stephenson et al., 2010) (Shanmugam et al., 2020) (Abou-Shanab et al., 2011) (Soleimani khorramdashti et al., 2021)(J. Matos et al., 2020) (Adamakis et al., 2018)(Anthony et al., 2015) (Koh et al., 2019)(Qi et al., 2019)(Molino et al., 2018) (Moreno et al., 2013) (Mirizadeh et al., 2021)
Oleic acid (C18:1 cis-9) (C18:1 <i>c</i>) (C18:1 <i>t</i>) (C18:1) (C18:1n9c) (C18:1n9) (C18:1n7) (ácido cis-9-octadecenoico)	Ácido graso	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,2559	(Couto et al., 2022) (Ahmed et al., 2016) (Hayashida et al., 2017) (Lohman et al., 2013) (Sotoudehniakari et al., 2019)(Pandit et al., 2017) (Jay et al., 2018)(Yao et al.,

				<p>2015)(Stephenson et al., 2010)(Shanmugam et al., 2020) (Abou-Shanab et al., 2011) (Soleimani khorramdashti et al., 2021) (J. Matos et al., 2020)(Adamakis et al., 2018) (Anthony et al., 2015) (Koh et al., 2019) (Molino et al., 2018)(Moreno et al., 2013) (Mirizadeh et al., 2021)</p>
<p>Ácido linoleico, éster metílico del ácido linolelaídico (C18:2) (C18:2n6)</p>	<p>Ácido graso</p>	<p>$C_{18}H_{32}O_2$</p>	<p>280,2402</p>	<p>(Couto et al., 2022) (Ahmed et al., 2016) (Hayashida et al., 2017) (Molino et al., 2018) (Lohman et al., 2013) (Sotoudehniakari et al., 2019)(Pandit et al., 2017) (Jay et al., 2018) (Kim et al., 2013) (Stephenson et al., 2010) (Shanmugam et al., 2020) (J. Matos et al., 2020) (Adamakis et al., 2018) (Anthony et al., 2015) (Koh et al., 2019) (Qi et al., 2019) (Molino et al., 2018) (Moreno</p>

				et al., 2013) (Mirizadeh et al., 2021)
Ácido b-Linolénico, Ácido Linolénico (C18:3)	Ácido graso	$C_{18}H_{30}O_2$	278,2246	(Ahmed et al., 2016) (Hayashida et al., 2017) (Molino et al., 2018) (Pandit et al., 2017) (Yao et al., 2015) (Stephenson et al., 2010) (Lohman et al., 2013) (J. Matos et al., 2020) (Anthony et al., 2015) (Koh et al., 2019) (Qi et al., 2019) (Moreno et al., 2013) (Mirizadeh et al., 2021)
Ácido γ -linolénico (C18:3n6)	Ácido graso	$C_{18}H_{30}O_2$	278,2246	(Jay et al., 2018) (Abou-Shanab et al., 2011) (Molino et al., 2018) (Sotoudehniakrani et al., 2019) (Mirizadeh et al., 2021)
Ácido α -Linolénico (C18:3n3)	Ácido graso	$C_{18}H_{30}O_2$	278,2246	(Couto et al., 2022) (Sotoudehniakrani et al., 2019) (Adamakis et al., 2018) (Mirizadeh et al., 2021)
Ácido araquídico (C20:0)	Ácido graso	$C_{20}H_{40}O_2$	312,3028	(Couto et al., 2022) (Soleimani khorramdashti et al., 2021) (Molino et al.,

				2018) (Lohman et al., 2013) (Sotoudehniakrani et al., 2019) (Pandit et al., 2017) (Yao et al., 2015) (Anthony et al., 2015) (Hayashida et al., 2017)
Éster metílico del ácido cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	Ácido graso	$C_{21}H_{38}O_2$	322,2872	(Shanmugam et al., 2020)
Éster metílico del ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5n3)	Ácido graso	$C_{21}H_{32}O_2$	316,2402	(Shanmugam et al., 2020)
Ácido araquidónico (C20:4)	Ácido graso	$C_{20}H_{32}O_2$	304,2402	(Ahmed et al., 2016)(Jay et al., 2018) (Sotoudehniakrani et al., 2019)
Ácido eicosapentaenoico (C20 :5) (C20:5n3)	Ácido graso	$C_{20}H_{30}O_2$	302,2246	(Soleimani khorramdashti et al., 2021) (Jay et al., 2018) (Lohman et al., 2013)
Ácido behénico (C22:0)	Ácido graso	$C_{22}H_{44}O_2$	340,3341	(Sotoudehniakrani et al., 2019) (Pandit et al., 2017) (Yao et al., 2015) (Shanmugam et al., 2020)
Ácido erúcico (C22:1 ω9) (C22:1n9)	Ácido graso	$C_{22}H_{42}O_2$	338,3185	(Ahmed et al., 2016) (Shanmugam et al., 2020)
Éster metílico del ácido cis-13,16-docosadienoico (C22:2)	Ácido graso	$C_{23}H_{42}O_2$	350,3185	(Shanmugam et al., 2020)
Ácido docosahexaenoico (DHA) - (C22:6) (C22:6n3)	Ácido graso	$C_{20}H_{34}O_2$	306,2559	(Soleimani khorramdashti et al., 2021) (Ahmed et al., 2016) (Lohman et al., 2013) (Sotoudehniakrani et al., 2019)

				rani et al., 2019)
Ácido lignocérico (C24:0)	Ácido graso	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368,3654	(Lohman et al., 2013) (Pandit et al., 2017) (Yao et al., 2015). (Shanmugam et al., 2020)
Ácido α-eleosteárico	Ácido graso	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,2246	(Sotoudehniak rani et al., 2019)
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	Ácido graso	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302,2246	(Sotoudehniak rani et al., 2019)
Ácido petacosanoico	Ácido graso	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382,3811	(Sotoudehniak rani et al., 2019)
Ácido hexacosanoico	Ácido graso	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	396,3967	(Sotoudehniak rani et al., 2019)
Ácido pantoténico (Vit. B5)	Ácido graso	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219,1107	(Ahmed et al., 2016)
Cer(44:1;O4)	Lípido	C ₄₄ H ₈₇ NO ₅	732,6481	(LIPID MAPS® Structure Database (LMSD), n.d.)
DG(22:2/22:2/0:0)	Lípido	C ₄₇ H ₈₄ O ₅	751,6216	(LIPID MAPS® Structure Database (LMSD), n.d.)
PS(13:0/20:2)	Lípido	C ₃₉ H ₇₂ NO ₁₀ P	768,4791	(LIPID MAPS® Structure Database (LMSD), n.d.)
PS(19:0/20:1)	Lípido	C ₄₅ H ₈₆ NO ₁₀ P	832,6067	(LIPID MAPS® Structure Database (LMSD), n.d.)
PS(20:5/22:1)	Lípido	C ₄₈ H ₈₂ NO ₁₀ P	886,5574	(LIPID MAPS® Structure Database (LMSD), n.d.)
TG(18:3/18:3/20:2)	Lípido	C ₅₉ H ₄₄ O ₆	925,7261	(LIPID MAPS® Structure Database (LMSD), n.d.)
TG(16:0/20:0/20:0)	Lípido	C ₅₉ H ₁₁₄ O ₆	941,8513	(LIPID MAPS® Structure Database (LMSD), n.d.)

				<i>Database (LMSD), n.d.)</i>
PG(10:0/10:0)	Lípido	C ₂₆ H ₅₁ O ₁₀ P	577,3117	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
DG(12:0/20:0)	Lípido	C ₃₅ H ₆₈ O ₅	591,4964	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
DG(13:0/20:5)	Lípido	C ₃₆ H ₆₀ O ₅	595,4338	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
DG(dO-36:4)	Lípido	C ₃₉ H ₇₂ O ₃	611,5379	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
DG(15:0/19:0)	Lípido	C ₃₇ H ₇₂ O ₅	619,5277	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
DG(13:0/22:6)	Lípido	C ₃₈ H ₆₂ O ₅	621,4494	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PA(13:0/17:2)	Lípido	C ₃₃ H ₆₁ O ₈ P	639,4001	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PA(14:0/18:3)	Lípido	C ₃₅ H ₆₃ O ₈ P	665,4158	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PA(13:0/20:1)	Lípido	C ₃₆ H ₆₉ O ₈ P	683,4627	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PS(20:1/22:6)	Lípido	C ₄₈ H ₈₀ NO ₁₀ P	812,5417	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
TG(16:0/16:0/18:1)	Lípido	C ₅₃ H ₁₀₀ O ₆	855,7417	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
TG(15:0/15:0/22:2)	Lípido	C ₅₅ H ₁₀₂ O ₆	881,7574	(LIPID MAPS® <i>Structure</i>

				<i>Database (LMSD), n.d.)</i>
TG(14:1/19:0/19:0)	Lípido	C ₅₅ H ₁₀₄ O ₆	883,7730	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
TG(17:2/17:2/20:5)	Lípido	C ₅₇ H ₉₂ O ₆	895,6791	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
TG(17:2/17:2/20:4)	Lípido	C ₅₇ H ₉₄ O ₆	897,6948	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
TG(16:1/16:1/22:0)	Lípido	C ₅₇ H ₁₀₆ O ₆	909,7880	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
TG(16:0/17:1/21:0)	Lípido	C ₅₇ H ₁₀₈ O ₆	911,8040	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
TG(17:0/18:2/20:0)	Lípido	C ₅₈ H ₁₀₈ O ₆	923,8043	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
TG(18:3/18:3/20:2)	Lípido	C ₅₉ H ₉₈ O ₆	925,7611	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
LPE(24:0)	Lípido	C ₂₉ H ₆₀ NO ₇ P	548,4074	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PE(2-OMe-26:2/0:0)	Lípido	C ₃₂ H ₆₄ NO ₇ P	606,4498	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PE(12:0/14:0)	Lípido	C ₃₁ H ₆₂ NO ₈ P	608,4291	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
Cer(40:1;O3)	Lípido	C ₄₀ H ₇₉ NO ₄	638,6087	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
Cer(42:1;O4)	Lípido	C ₄₂ H ₈₄ NO ₅	682,6349	(LIPID MAPS® <i>Structure</i>

				<i>Database (LMSD), n.d.)</i>
Cer(44:1;O5)	Lípido	C ₄₄ H ₈₇ NO ₆	726,6611	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PE(15:1/22:4)	Lípido	C ₄₂ H ₇₄ NO ₈ P	752,5230	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PS(13:0/20:2)	Lípido	C ₃₉ H ₇₂ NO ₁₀ P	768,4791	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PC(15:0/20:3)	Lípido	C ₄₃ H ₈₀ NO ₈ P	770,5699	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PS(15:0/20:2)	Lípido	C ₄₁ H ₇₇ NO ₁₀ P	774,5285	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PE(18:2/22:2)	Lípido	C ₄₅ H ₈₂ NO ₈ P	796,5856	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PE(17:1/22:6)	Lípido	C ₄₄ H ₇₄ NO ₈ P	798,5049	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PC(18:0/20:2)	Lípido	C ₄₆ H ₈₈ NO ₈ P	814,6325	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PS(20:2/21:0)	Lípido	C ₄₇ H ₈₈ NO ₁₀ P	858,6224	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
PS(20:5/22:1)	Lípido	C ₄₈ H ₈₂ NO ₁₀ P	886,5574	(LIPID MAPS® <i>Structure Database (LMSD), n.d.)</i>
Furanoxido de peridinol	Xantofila	C ₃₇ H ₄₈ O ₆	588,3451	(Junko Yabuzak, n.d.)
Alloxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	564,3967	(Junko Yabuzak, n.d.)
Luteína	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)

β -Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
α -Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
Fucoxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₅₈ O ₆	658,4233	(Junko Yabuzak, n.d.)
19`-Hexafucoxantina	Xantofila	C ₄₈ H ₇₂ O ₆	744,5329	(Junko Yabuzak, n.d.)
19-Butanoiloxitiloxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₅₈ O ₅	642,4284	(Junko Yabuzak, n.d.)
19'-hexanoiloxifucoxantina	Xantofila	C ₄₈ H ₆₈ O ₈	772,4914	(Junko Yabuzak, n.d.)
Diadinoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	582,4073	(Junko Yabuzak, n.d.)
Neoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4179	(Junko Yabuzak, n.d.)
Zeaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Violaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4179	(Junko Yabuzak, n.d.)
Peridinina	Xantofila	C ₃₉ H ₅₀ O ₇	630,3557	(Junko Yabuzak, n.d.)
Isómero de peridinina	Xantofila	C ₃₉ H ₅₀ O ₈	646,3506	(Junko Yabuzak, n.d.)
Prasincoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4179	(Junko Yabuzak, n.d.)
Alfanizofila	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4179	(Junko Yabuzak, n.d.)
Anteraxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	584,4229	(Junko Yabuzak, n.d.)
MyxoXantófila	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₈	746,4758	(Junko Yabuzak, n.d.)
Cantaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	564,3967	(Junko Yabuzak, n.d.)
Equinenona	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4175	(Junko Yabuzak, n.d.)
Crocoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4175	(Junko Yabuzak, n.d.)
Astaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	596,3866	(Junko Yabuzak, n.d.)
Sifonaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4179	(Junko Yabuzak, n.d.)
Micromonol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₃	586,4386	(Junko Yabuzak, n.d.)
Dinoxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₅₈ O ₅	642,4284	(Junko Yabuzak, n.d.)
Micromonal	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	584,4229	(Junko Yabuzak, n.d.)

Diadinocromo	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	582,4073	(Junko Yabuzak, n.d.)
Monadoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	566,4124	(Junko Yabuzak, n.d.)
Diatoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	566,4124	(Junko Yabuzak, n.d.)
Sifonina	Xantofila	C ₅₂ H ₇₆ O ₅	780,5693	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
Adonirrubina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O ₃	580,3916	(Junko Yabuzak, n.d.)
Astaceno	Xantofila	C ₄₀ H ₄₈ O ₄	592,3553	(Junko Yabuzak, n.d.)
Criptoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
Neocromo	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4179	(Junko Yabuzak, n.d.)
Giroxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₅₆ O ₆	656,4077	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-Diapolipicopeno	Caroteno	C ₃₀ H ₄₀	400,3130	(Junko Yabuzak, n.d.)
Neo-4,4'-diaponeurosporeno B	Caroteno	C ₃₀ H ₄₂	402,3286	(Junko Yabuzak, n.d.)
Neo-4,4'-diaponeurosporeno C	Caroteno	C ₃₀ H ₄₂	402,3286	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-Diapofitoeno	Caroteno	C ₃₀ H ₄₈	408,3756	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-Diapocitoflueno	Caroteno	C ₃₀ H ₄₆	406,3599	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-Diapo-7,8,11,12-tetrahidrolipicopeno	Caroteno	C ₃₀ H ₄₄	404,3443	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-Diapo-ζ-Caroteno	Caroteno	C ₃₀ H ₄₄	404,3443	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-Diaponeurosporeno	Caroteno	C ₃₀ H ₄₂	402,3286	(Junko Yabuzak, n.d.)
Hidroxi-3,4-deshidro-apo-8'-licopeno	Xantofila	C ₃₀ H ₄₂ O	418,3235	(Junko Yabuzak, n.d.)
4-hidroxi-4,4'-diaponeurosporeno	Xantofila	C ₃₀ H ₄₂ O	418,3235	(Junko Yabuzak, n.d.)
1-hexosil-1,2-dihidro-3,4-didehidroapo-8'-licopenol	Xantofila	C ₃₆ H ₅₂ O ₇	596,3713	(Junko Yabuzak, n.d.)
ácido 1-(D-manosiloxi)-3,4-didénhidro-1,2-dihidro-8'-apolicopenoico	Xantofila	C ₃₇ H ₅₀ O ₉	638,3454	(Junko Yabuzak, n.d.)
OH-Diaponeurosporeno éster glucósido	Xantofila	C ₄₀ H ₆₀ O ₇	652,4339	(Junko Yabuzak, n.d.)

4,4'-Diapolicopen-4-al	Xantofila	C ₃₀ H ₃₈ O	414,2922	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-Diaponeurosporen-4-al	Xantofila	C ₃₀ H ₄₀ O	416,3079	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-Diapolicopendial	Xantofila	C ₃₀ H ₃₆ O ₂	428,2715	(Junko Yabuzak, n.d.)
Hidroxiaponeurosporenal	Xantofila	C ₃₀ H ₄₀ O ₂	432,3028	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ácido 4,4'-Diapocaroteno-4'-al-4-oico	Xantofila	C ₃₀ H ₃₆ O ₃	444,2664	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ácido 4,4'-Diaplycopeno-4,4'-dioico	Xantofila	C ₃₀ H ₃₆ O ₄	460,2613	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ácido 4,4'-diapocarotenoico	Xantofila	C ₃₀ H ₃₈ O ₂	430,2872	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ácido 4,4'-Diaponeurosporen-4-oico	Xantofila	C ₃₀ H ₄₀ O ₂	432,3028	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ácido 4'-hidroxi-4,4'-diaponeurosporeno-4-oico	Xantofila	C ₃₀ H ₄₀ O ₃	448,2977	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-diapolicopenodioato de metilo	Xantofila	C ₃₁ H ₃₈ O ₄	474,2770	(Junko Yabuzak, n.d.)
Hidroxi-3,4-dehidro-apo-8'-licopenoato de metilo	Xantofila	C ₃₁ H ₄₂ O ₃	462,3134	(Junko Yabuzak, n.d.)
Acetil-4,4'-diapolipicopeno-4,4'-dioato	Xantofila	C ₃₂ H ₃₈ O ₅	502,2719	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ester del ácido 4,4'-Diaponeurosporen-4-oico	Xantofila	C ₃₃ H ₄₆ O ₂	474,3497	(Junko Yabuzak, n.d.)
Éster glucosílico del ácido diapolicopendioico	Xantofila	C ₃₆ H ₄₆ O ₉	622,3141	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ácido 4'-(beta-D-glucopiranosiloxi)-7',8'-dihidro-4,4'-diapo-psi,psi-caroteno-4-oico	Xantofila	C ₃₆ H ₄₈ O ₈	608,3349	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ácido β-D-glucosil 4,4'-diaponeurosporenoico	Xantofila	C ₃₆ H ₅₀ O ₇	594,3556	(Junko Yabuzak, n.d.)
Manosil-3,4-dehidro-apo-8'-licopenoato de metilo	Xantofila	C ₃₇ H ₅₂ O ₈	624,3662	(Junko Yabuzak, n.d.)
Metilglucosil-3,4-dehidro-apo-8'-licopenoato	Xantofila	C ₃₇ H ₅₂ O ₈	624,3662	(Junko Yabuzak, n.d.)
Glucopiranosil-1-O-(4,4'-diapo-7',8',11',12'-tetrahidrolipopen-4-oato)-6-O-(2-metilbutanoato)	Xantofila	C ₄₁ H ₆₀ O ₈	680,4288	(Junko Yabuzak, n.d.)
Éster diglucosílico del ácido diapolicopendioico	Xantofila	C ₄₂ H ₅₆ O ₁₄	784,3670	(Junko Yabuzak, n.d.)
Diéster del ácido 4,4-(D-glucopiranosiloxi)-4,4'-diapolipicopeno-4,4'-dioico	Xantofila	C ₄₈ H ₆₆ O ₁₆	898,4350	(Junko Yabuzak, n.d.)

Estafiloxantina	Xantofila	C ₅₁ H ₇₈ O ₈	818,5696	(Junko Yabuzak, n.d.)
Isostafiloxantina	Xantofila	C ₅₁ H ₇₈ O ₈	818,5696	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
(5Z)-Licopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
(9Z)-Licopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
(13Z)-Licopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
Prolicopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licoperseno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₆	546,5164	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2-Dihidrolipopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₈	538,4538	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2,1',2'-Tetrahidrolipopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)
(E)-Fitoeno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₄	544,5008	(Junko Yabuzak, n.d.)
Fitoeno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₄	544,5008	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2-Dihidrofitoeno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₆	546,5164	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2-Dihidrofitoeno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₄	544,5008	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2-Dihidro-ζ-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₂	542,4851	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2,1',2'-Tetrahidroneurosporeno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₂	542,4851	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2,7,8,11,12-Hexahidrolipopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₂	542,4851	(Junko Yabuzak, n.d.)
Fitoflueno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₂	542,4851	(Junko Yabuzak, n.d.)
(9Z,15Z)-Fitoflueno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₂	542,4851	(Junko Yabuzak, n.d.)
(E)-Fitoflueno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₂	542,4851	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2-Dihidroneurosporeno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)
(15Z)-1,2-dihidroneurosporeno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)
ζ-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)
(9Z,9'Z)-ζ-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)

(9Z,15Z,9'Z)- ζ -Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)
(poli-Z)- ζ -Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)
ζ -Caroteno asimétrico	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)
9Z- ζ -Caroteno asimétrico	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)
Neurosporeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₈	538,4538	(Junko Yabuzak, n.d.)
(7Z,9Z)-Neurosporeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₈	538,4538	(Junko Yabuzak, n.d.)
(7Z,9Z,9'Z)-Neurosporeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₈	538,4538	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2-Dihidro-3,4-dehidrolicopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4-Dihidrolicopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₄	534,4225	(Junko Yabuzak, n.d.)
Bisdehidrolicopeno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₂	532,4069	(Junko Yabuzak, n.d.)
Monohidroxicopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
Dihidroxicopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4,3',4'-Tetradehidrorrodopina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4-Dihidrodopina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
3',4'-Deshidrodopina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
(9Z)-Licopen-20-ol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
(13Z)-Licopen-20-ol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
(2S,5R,6R)-1,16-didehidro-2,6-cyclolycopene-5-ol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
Desmetilsferoideno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O	554,4487	(Junko Yabuzak, n.d.)
Rodopina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O	554,4487	(Junko Yabuzak, n.d.)
1-Hidroxi-1,2-dihidroneurosporeno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₀ O	556,4644	(Junko Yabuzak, n.d.)
Cloroxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₆₀ O	556,4644	(Junko Yabuzak, n.d.)
1-hidroxi-1,2,7',8',11',12'-hexahidrolicopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₂ O	558,4800	(Junko Yabuzak, n.d.)

1-Hidroxi- ζ -Caroteno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₂ O	558,4800	(Junko Yabuzak, n.d.)
Fitofluenol	Xantofila	C ₄₀ H ₆₂ O	558,4800	(Junko Yabuzak, n.d.)
1-Hidroxi-1,2-dihidrofiflueno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₄ O	560,4957	(Junko Yabuzak, n.d.)
1-hidroxi-1,2-dihidrofifiteno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₆ O	562,5113	(Junko Yabuzak, n.d.)
Anhidrodovibrina	Xantofila	C ₄₁ H ₅₈ O	566,4487	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2-Dihidroxi-3,4-didehidrolicopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Didemetilspirilloxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licofila	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
15Z-Esferoide	Xantofila	C ₄₁ H ₆₀ O	568,4644	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4-Dihidroanhidrodovibrina	Xantofila	C ₄₁ H ₆₀ O	568,4644	(Junko Yabuzak, n.d.)
Esferoideno	Xantofila	C ₄₁ H ₆₀ O	568,4644	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,1'-dihidroxi-3,4-didehidrolicopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₂	570,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
2,6-Ciclicopeno-1,5-diol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₂	570,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
Rodopinol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₂	570,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
(2S,5S,6R)-1,16-didehydro-2,6-cyclolycopene-5-ol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₂	570,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
(2R,5R,6R)-2,6-cyclolycopene-1,5-diol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₂	570,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
11',12'-Dihidroesferoideno	Xantofila	C ₄₁ H ₆₂ O	570,4800	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4-Dihidroesferoideno	Xantofila	C ₄₁ H ₆₂ O	570,4800	(Junko Yabuzak, n.d.)
Dihidroxicicopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₀ O ₂	572,4593	(Junko Yabuzak, n.d.)
Hidroxidimetilsferoideno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₀ O ₂	572,4593	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4,11',12'-Tetrahidroesferoideno	Xantofila	C ₄₁ H ₆₄ O	572,4957	(Junko Yabuzak, n.d.)
Dihidroxi-neurosporeno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₂ O ₂	574,4749	(Junko Yabuzak, n.d.)
1-Metoxi-1,2-dihidrofiflueno	Xantofila	C ₄₁ H ₆₆ O	574,5113	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,1'-Dihidroxi- ζ -Caroteno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₄ O ₂	576,4906	(Junko Yabuzak, n.d.)

1,2-Dihidroxitoflueno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₄ O ₂	576,4906	(Junko Yabuzak, n.d.)
1-metoxi-1,2-dihidrofiteo	Xantofila	C ₄₁ H ₆₈ O	576,5270	(Junko Yabuzak, n.d.)
Monodimetil espirilloxantina	Xantofila	C ₄₁ H ₅₈ O ₂	582,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
Rodovibrina	Xantofila	C ₄₁ H ₆₀ O ₂	584,4593	(Junko Yabuzak, n.d.)
(2S,5S,6R)-2,6-cyclolycopene-1-methoxy-5-ol	Xantofila	C ₄₁ H ₆₀ O ₂	584,4593	(Junko Yabuzak, n.d.)
Hidroxiesferoideno	Xantofila	C ₄₁ H ₆₂ O ₂	584,4593	(Junko Yabuzak, n.d.)
3',4'-Dihidrodovibrina	Xantofila	C ₄₁ H ₆₂ O ₂	584,4593	(Junko Yabuzak, n.d.)
1'-Hidroxi-3,4,1',2'-tetrahydroesferoideno	Xantofila	C ₄₁ H ₆₄ O ₂	588,4906	(Junko Yabuzak, n.d.)
1'-Hidroxi-3,4,1',2',11',12'-hexahydroesferoideno	Xantofila	C ₄₁ H ₆₆ O ₂	590,5062	(Junko Yabuzak, n.d.)
1-hidroxi-3,4,7,8,1',2',11',12'-octahydroesferoideno	Xantofila	C ₄₁ H ₆₈ O ₂	592,5219	(Junko Yabuzak, n.d.)
(15Z)-Espirilloxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₆₀ O ₂	596,4593	(Junko Yabuzak, n.d.)
Espirilloxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₆₀ O ₂	596,4593	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4-Dihidrospirilloxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₆₂ O ₂	598,4749	(Junko Yabuzak, n.d.)
Oscilol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(Junko Yabuzak, n.d.)
(2S,2'S) Oscilol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4,3',4'-Tetrahydrospirilloxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₆₄ O ₂	600,4906	(Junko Yabuzak, n.d.)
Metoxisferoideno	Xantofila	C ₄₂ H ₆₄ O ₂	600,4906	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4,3',4',7',8'-Hexahidrospirilloxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₆₆ O ₂	602,5062	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4,3',4',7',8',11',12'-Octahidrospirilloxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₆₈ O ₂	604,5219	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4-Dehidrodopina glucósido	Xantofila	C ₄₂ H ₆₆ O ₆	714,4859	(Junko Yabuzak, n.d.)
Desmetilsferoideno glucósido	Xantofila	C ₄₆ H ₆₈ O ₆	716,5015	(Junko Yabuzak, n.d.)
Glucósido de rodopina	Xantofila	C ₄₆ H ₆₈ O ₆	716,5015	(Junko Yabuzak, n.d.)
Glucósido de didemetilspirilloxantina	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₇	730,4808	(Junko Yabuzak, n.d.)

Deoxoscillol 2-ramnósido	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₇	730,4808	(Junko Yabuzak, n.d.)
Glucósido de rodopinol	Xantofila	C ₄₆ H ₆₈ O ₇	732,4965	(Junko Yabuzak, n.d.)
Glucósido de dihidroxilicopeno	Xantofila	C ₄₆ H ₇₀ O ₇	734,5121	(Junko Yabuzak, n.d.)
Glucósido de metoxihidroxilicopeno	Xantofila	C ₄₇ H ₇₂ O ₇	748,5278	(Junko Yabuzak, n.d.)
Éster glucósido de 3,4-Dihidrodopina	Xantofila	C ₅₀ H ₇₂ O ₇	784,5278	(Junko Yabuzak, n.d.)
Éster glucósido de didemetilspirilloxantina	Xantofila	C ₅₀ H ₇₂ O ₈	800,5227	(Junko Yabuzak, n.d.)
Éster glucósido de metoxihidroxilicopeno	Xantofila	C ₅₀ H ₇₆ O ₈	804,5540	(Junko Yabuzak, n.d.)
Oscilaxantina	Xantofila	C ₅₂ H ₇₆ O ₁₂	892,5336	(Junko Yabuzak, n.d.)
Oscilol 2,2'-dirhamnósido	Xantofila	C ₅₂ H ₇₆ O ₁₂	892,5336	(Junko Yabuzak, n.d.)
Oscilol 2,2'-difucósido	Xantofila	C ₅₂ H ₇₆ O ₁₂	892,5336	(Junko Yabuzak, n.d.)
Diglucósido de dihidroxilicopeno	Xantofila	C ₅₂ H ₈₀ O ₁₂	896,5649	(Junko Yabuzak, n.d.)
Éster diglucósido de dihidroxilicopeno	Xantofila	C ₅₅ H ₈₄ O ₁₃	952,5911	(Junko Yabuzak, n.d.)
Oscilol 2,2'-di-(O-metilmetilpentosido)	Xantofila	C ₅₄ H ₈₀ O ₁₆	984,5446	(Junko Yabuzak, n.d.)
Diéster diglucósido de dihidroxilicopeno	Xantofila	C ₆₀ H ₉₂ O ₁₄	1036,6487	(Junko Yabuzak, n.d.)
1,2-epóxido de licopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
5,6-epóxido de licopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
ζ-Caroteno epóxido	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	556,4644	(Junko Yabuzak, n.d.)
Epóxido de fitoflueno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₂ O	558,4800	(Junko Yabuzak, n.d.)
Epóxido de fitoeno	Xantofila	C ₄₀ H ₆₄ O	560,4957	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licopaneroles A	Xantofila	C ₉₂ H ₁₈₀ O ₅	1365,3830	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licopaneroles B	Xantofila	C ₉₄ H ₁₈₄ O ₆	1409,4092	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licopaneroles C	Xantofila	C ₅₆ H ₁₁₀ O ₂	814,8505	(Junko Yabuzak, n.d.)
Tetradehidrolipopenal	Xantofila	C ₄₀ H ₅₀ O	546,3861	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4-Dehydrolycopen-16-al	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O	548,4018	(Junko Yabuzak, n.d.)

3,4-Didehydro-1,2-dihydrolycopen-20-al	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licopeno-20-al	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licopenal	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
Licopeno-19-al	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
Tetradehidrolícopendial	Xantofila	C ₄₀ H ₄₈ O ₂	560,3654	(Junko Yabuzak, n.d.)
Rodopinal	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
1-metoxi-3,4-didehidrolícopen-20-al	Xantofila	C ₄₁ H ₅₆ O ₂	580,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Metoxilícopenal	Xantofila	C ₄₁ H ₅₈ O ₂	582,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
Rodobacterioxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₅₈ O ₃	610,4386	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4,3',4'-Tetrahidroespirilioxantina-20-al	Xantofila	C ₄₂ H ₆₂ O ₃	614,4699	(Junko Yabuzak, n.d.)
P 500	Xantofila	C ₄₂ H ₆₂ O ₃	614,4699	(Junko Yabuzak, n.d.)
Glucósido de rodopinal	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₇	730,4808	(Junko Yabuzak, n.d.)
4,4'-Diketolícopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	564,3967	(Junko Yabuzak, n.d.)
Cetohidroxilícopeno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	566,4123	(Junko Yabuzak, n.d.)
Desmetilsferoidenona	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Esferoidenona	Xantofila	C ₄₁ H ₅₈ O ₂	582,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
3,4-Dihidroesferoidenona	Xantofila	C ₄₁ H ₆₀ O ₂	584,4593	(Junko Yabuzak, n.d.)
Hidroxidemetilsferoidenona	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₃	586,4386	(Junko Yabuzak, n.d.)
Filipsiaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O ₄	596,3865	(Junko Yabuzak, n.d.)
2-ceto-demetil-espirilioxantina	Xantofila	C ₄₁ H ₅₆ O ₃	596,4229	(Junko Yabuzak, n.d.)
2'-Dihidrofilipsiaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₄	598,4022	(Junko Yabuzak, n.d.)
2-Cetodovibrina	Xantofila	C ₄₁ H ₅₈ O ₃	598,4386	(Junko Yabuzak, n.d.)
Hidroxisferoidenona	Xantofila	C ₄₁ H ₆₀ O ₃	600,4542	(Junko Yabuzak, n.d.)

2-Cetoespiriloxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₅₈ O ₃	610,4386	(Junko Yabuzak, n.d.)
Metoxisferoidenona	Xantofila	C ₄₂ H ₆₂ O ₃	614,4699	(Junko Yabuzak, n.d.)
2,2'-Diketospiriloxantina	Xantofila	C ₄₂ H ₅₆ O ₄	624,4178	(Junko Yabuzak, n.d.)
γ-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
(15Z)-γ-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
Retrodehidro-γ-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₄	534,4225	(Junko Yabuzak, n.d.)
7',8',11',12'-Tetrahydro-γ-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₆₀	540,4695	(Junko Yabuzak, n.d.)
Toruleno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	534,4225	(Junko Yabuzak, n.d.)
(3'Z,5'Z)-Toruleno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	534,4225	(Junko Yabuzak, n.d.)
β-ZeaCaroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₈	538,4538	(Junko Yabuzak, n.d.)
16'-Hidroxitoruleno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
18'-Hidroxitoruleno	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
trans-Celaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
Celaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
(3'Z,5'Z)-Celaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O	550,4174	(Junko Yabuzak, n.d.)
Aleuriaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
Rubixantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
Gazaniaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
Bacteriorubixantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
3'-Hidroxirubixantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Desoximixol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Saproxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
β-ZeaCaroteno-3,17'-diol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₂	570,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mixol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₃	584,4229	(Junko Yabuzak, n.d.)

Mixobactina	Xantofila	C ₄₆ H ₆₄ O ₆	712,4702	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ramnósido de saproxantina	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₆	714,4859	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mixol 2'-ramnósido	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₇	730,4808	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mixol 2'-fucósido	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₇	730,4808	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mixol 2'-chinovósido	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₇	730,4808	(Junko Yabuzak, n.d.)
FleiXantófila	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₇	730,4808	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mixol 2'-glucósido	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₈	746,4757	(Junko Yabuzak, n.d.)
Alfanizofila	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₈	746,4757	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mixol 2'-hexósido	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₈	746,4757	(Junko Yabuzak, n.d.)
Rubicromo	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Torularhodinaldehído	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O	548,4018	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ternstroemioxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	566,4123	(Junko Yabuzak, n.d.)
Deoxiflexixantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	566,4123	(Junko Yabuzak, n.d.)
Rubixantona	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	566,4123	(Junko Yabuzak, n.d.)
Deinoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	582,4073	(Junko Yabuzak, n.d.)
Flexixantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	582,4073	(Junko Yabuzak, n.d.)
4-Cetomixol	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₄	598,4022	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mixobactona	Xantofila	C ₄₆ H ₆₄ O ₇	728,4652	(Junko Yabuzak, n.d.)
K-G	Xantofila	C ₄₆ H ₆₆ O ₇	730,4808	(Junko Yabuzak, n.d.)
Salinixantina	Xantofila	C ₆₁ H ₉₂ O ₉	968,6741	(Junko Yabuzak, n.d.)
Torularhodina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	564,3967	(Junko Yabuzak, n.d.)
Geliodesxantina	Xantofila	C ₃₇ H ₄₆ O ₃	538,3447	(Junko Yabuzak, n.d.)
Tangeraxantina	Xantofila	C ₃₄ H ₄₄ O ₂	484,3341	(Junko Yabuzak, n.d.)
Geliidenona	Xantofila	C ₄₀ H ₅₀ O ₃	578,3760	(Junko Yabuzak, n.d.)

Crasostreaxantina A	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₄	598,4022	(Junko Yabuzak, n.d.)
δ-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
Ditaxantina	Xantofila	C ₃₁ H ₄₂ O ₄	478,3083	(Junko Yabuzak, n.d.)
Vitixantina	Xantofila	C ₃₃ H ₄₂ O ₆	534,2981	(Junko Yabuzak, n.d.)
α-Citraurina	Xantofila	C ₃₀ H ₄₂ O ₂	434,3184	(Junko Yabuzak, n.d.)
Cochloxantina	Xantofila	C ₃₀ H ₃₈ O ₄	462,2770	(Junko Yabuzak, n.d.)
γ,ψ-Caroteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₆	536,4382	(Junko Yabuzak, n.d.)
Clorobacteno	Caroteno	C ₄₀ H ₅₂	532,4069	(Junko Yabuzak, n.d.)
Sioxantina	Xantofila	C ₄₆ H ₆₂ O ₇	726,4495	(Junko Yabuzak, n.d.)
Okenona	Xantofila	C ₄₁ H ₅₄ O ₂	578,4123	(Junko Yabuzak, n.d.)
Aloxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₂ O ₂	564,3967	(Junko Yabuzak, n.d.)
Diatoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	566,4123	(Junko Yabuzak, n.d.)
Eschscholtzxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₂	566,4123	(Junko Yabuzak, n.d.)
Zeaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Meso-Zeaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Isozeaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Parasiloxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₂	570,4436	(Junko Yabuzak, n.d.)
Pectenol A	Xantofila	C ₄₀ H ₅₄ O ₃	582,4073	(Junko Yabuzak, n.d.)
Corbiculaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(Junko Yabuzak, n.d.)
Crustaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(Junko Yabuzak, n.d.)
Heteroxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mimulaxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(Junko Yabuzak, n.d.)
Nostoxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₄	600,4178	(Junko Yabuzak, n.d.)
Carboxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₄	602,4335	(Junko Yabuzak, n.d.)

Neoflor	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₅	618,4284	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mastraxantina	Xantofila	C ₄₀ H ₆₀ O ₆	636,4389	(Junko Yabuzak, n.d.)
Mutatocromo	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O	552,4331	(Junko Yabuzak, n.d.)
Aurocromo	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Criptoflavina	Xantofila	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	568,4280	(Junko Yabuzak, n.d.)
Latocromo	Xantofila	C ₄₀ H ₅₈ O ₅	618,4284	(Junko Yabuzak, n.d.)
P457	Xantofila	C ₅₂ H ₇₆ O ₁₅	940,5184	(Junko Yabuzak, n.d.)
Dihidroisopentenildehidrodopina	Xantofila	C ₄₅ H ₆₆ O	622,5113	(Junko Yabuzak, n.d.)
2-Isopentenil-3,4-dehidrodopina	Xantofila	C ₄₅ H ₆₄ O	620,4957	(Junko Yabuzak, n.d.)
Nonaflavuxantina	Xantofila	C ₄₅ H ₆₄ O	620,4957	(Junko Yabuzak, n.d.)
2'-Isopentilsaproxantina	Xantofila	C ₄₅ H ₆₆ O ₂	638,5063	(Junko Yabuzak, n.d.)
3''-Hidroxi-2'-isopentilsaproxantina	Xantofila	C ₄₅ H ₆₆ O ₃	654,5012	(Junko Yabuzak, n.d.)
Nonapreno	Caroteno	C ₄₅ H ₆₄	604,5008	(Junko Yabuzak, n.d.)
Nonaprenoxantina	Xantofila	C ₄₅ H ₆₈ O	624,5270	(Junko Yabuzak, n.d.)
11',12'-Dehidrononaprenoxantina	Xantofila	C ₄₅ H ₆₆ O	622,5114	(Junko Yabuzak, n.d.)
7',8',11',12'-Dehidrononaprenoxantina	Xantofila	C ₄₅ H ₆₄ O	620,4957	(Junko Yabuzak, n.d.)
2-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil)-7,8,7',8'-tetrahidro-epsilon,psi-caroteno	Xantofila	C ₄₅ H ₆₈ O	624,5270	(Junko Yabuzak, n.d.)
2-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil)-beta,beta-caroteno	Xantofila	C ₄₅ H ₆₄ O	620,4957	(Junko Yabuzak, n.d.)
Monoglucósido de decaprenoxantina	Xantofila	C ₅₇ H ₈₄ O ₇	880,6217	(Junko Yabuzak, n.d.)