UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

DESARROLLO DE UN PROCESO PARA PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE FRACCIÓN LIPÍDICA A PARTIR DE *CHLORELLA VULGARIS* CON POTENCIAL USO ALIMENTARIO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA:

Francisco Javier Mendoza Ramírez

GENERAL ESCOBEDO, N.L. NOVIEMBRE DE 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

DESARROLLO DE UN PROCESO PARA PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE FRACCIÓN LIPÍDICA A PARTIR DE *CHLORELLA VULGARIS* CON POTENCIAL USO ALIMENTARIO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTA:

Francisco Javier Mendoza Ramírez

GENERAL ESCOBEDO, N.L. NOVIEMBRE DE 2026

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO(A) EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

COMITÉ PARTICULAR

Dr. Celestino García Gómez
Director de Tesis

Dra. Nohemí de Carmen Reyes Vázquez
Co-Directora

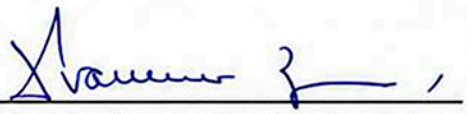
Dra. Sugey Ramona Sinagawa García
Asesora

MC. Elizabeth Garza Valverde
Asesora

Ph.D. Francisco Zavala García
Subdirector de Posgrado e Investigación

ESTA TESIS FUE APROBADA EN FORMATO, POR EL COMITÉ DE POSGRADO, ATENDIENDO A EL ARTÍCULO 123, DEL REGLAMENTO GENERAL DEL SISTEMA DE POSGRADO DE LA UANL.

COMITÉ DE POSGRADO



Ph. D. Francisco Zavala García
Presidente



Dra. Nelly Cristina Ramírez Grimaldo
Secretaria



Dra. Lidia Rosaura Salas Cruz
Vocal



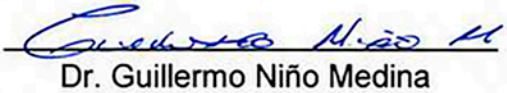
Ph.D. Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado
Vocal



Ph.D. Emilio Olivares Sáenz
Vocal



Dra. Sugey Ramona Sinagawa García
Vocal



Dr. Guillermo Niño Medina
Vocal

LUGAR DE INVESTIGACIÓN

UANL

DESARROLLO DE UN PROCESO PARA PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE FRACCIÓN LIPÍDICA A PARTIR DE *CHLORELLA VULGARIS* CON POTENCIAL USO ALIMENTARIO

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Suelos, Plantas y Aguas del Departamento de Ingeniería en Biosistemas, en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección del Dr. Celestino García Gómez y la Codirección del Dra. Nohemí de Carmen Reyes Vázquez

Celestino García Gómez

_____

Dr. Celestino García Gómez
Director de Tesis

_____ _____

Dra. Nohemí de Carmen Reyes Vázquez
Co-Directora

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia, por ser mi principal apoyo durante todo este proceso. Gracias por acompañarme en cada etapa, por su paciencia, comprensión y por motivarme a seguir adelante incluso en los momentos más difíciles.

A mis padres, por su amor, esfuerzo y ejemplo constante de dedicación y perseverancia. Todo lo que he logrado también es reflejo de los valores que me han enseñado.

A las personas que estuvieron cerca de mí durante este camino, por sus palabras de ánimo, su confianza y por recordarme que cada esfuerzo tiene un propósito.

Esta tesis representa no solo un logro académico, sino también el resultado de muchos aprendizajes, sacrificios y momentos de crecimiento personal.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios, por darme la fortaleza, la salud y la oportunidad de concluir esta etapa tan importante de mi formación académica y personal.

A mi director de tesis, Dr. Celestino García Gómez, por su orientación, apoyo y acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo. Sus conocimientos y observaciones fueron fundamentales para la realización de esta investigación.

A mi codirectora, Dra. Nohemí de Carmen Reyes Vázquez, por su disposición, paciencia y valiosas aportaciones, las cuales contribuyeron significativamente al fortalecimiento de este proyecto.

A mi asesora, Dra. Sugey Ramona Sinagawa García, por su apoyo académico, sus recomendaciones y por formar parte importante de este proceso.

A mi tutora, M.C. Elizabeth Garza Valverde, por su acompañamiento y orientación durante mi formación en el posgrado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindarme las herramientas, espacios y oportunidades necesarias para mi desarrollo profesional.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, dejarme hacer usos de sus equipos con el asesoramiento de todos sus trabajadores.

Finalmente, agradezco a mis compañeros, amigos y todas aquellas personas que, de una u otra manera, formaron parte de este camino. Su apoyo, consejos y compañía hicieron más llevadero este proceso y dejaron una huella importante en esta etapa de mi vida

INDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DE TESIS……iii

LUGAR DE INVESTIGACIÓN……..……..v

DEDICATORIA……vi

AGRADECIMIENTOS……vii

ÍNDICE DE CUADROS xii

ÍNDICE DE FIGURAS xiii

RESUMEN xv

ABSTRACT.....xvi

1 INTRODUCCIÓN.....1

2 ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO 3

2.1 Las microalgas como fuente de biocompuestos de interés alimentario 3

2.1.1 Composición química y valor nutricional de *Chlorella vulgaris* .4

2.1.2 Sistemas de cultivo y producción de biomasa 5

2.2 La fracción lipídica de las microalgas y los ácidos grasos omega-3 6

2.2.1 Perfil de ácidos grasos y relevancia de los omega-3.....6

2.2.2 Problemática de las fuentes marinas tradicionales.....7

2.3 Extracción de la fracción lipídica.....9

2.3.1 Métodos convencionales frente a tecnologías emergentes 9

2.3.2 Extracción asistida por ultrasonido 9

2.3.3 Sistemas de solventes: la mezcla hexano:etanol 10

2.3.4 Optimización mediante metodología de superficie de respuesta 11

2.4 Helados a base de plantas como matriz de aplicación 12

2.4.1 Tendencia plant-based y el uso de la soya.....12

2.4.2 Estructura y propiedades fisicoquímicas del helado 13

2.4.3 Sustitución parcial de grasa con lípidos vegetales y microalgales 14

2.4.4 El cacao como matriz enmascarante 15
2.5 Evaluación de la calidad del producto 16
2.5.1 Parámetros fisicoquímicos 16
2.5.2 Análisis instrumental del color: el espacio CIELAB 17
2.5.3 Análisis sensorial descriptivo 17
2.6 Vacío de conocimiento y justificación de la investigación 18
3 JUSTIFICACIÓN 20
4 HIPÓTESIS 22
5 OBJETIVOS 23
5.1 Objetivo General 23
5.1.1 Objetivos Específicos 23
6 MATERIALES Y MÉTODOS 24
6.1 Fase 1. Optimización de la extracción lipídica 24
6.1.1 Materia prima 24
6.1.2 Diseño experimental y sistema de extracción asistida por ultrasonido 25
6.1.3 Condiciones de extracción, separación y recuperación del extracto lipídico 26
6.1.4 Análisis estadístico de la fase de extracción 27
6.2 Fase 2. Optimización del cultivo de *Chlorella vulgaris* 28
6.2.1 Material biológico 28
6.2.2 Preparación del medio de cultivo 28
6.2.3 Sistema y condiciones de cultivo 29
6.2.4 Diseño experimental y variables de respuesta del cultivo 32
6.2.5 Purificación del extracto 33
6.2.6 Análisis estadístico 34
6.3 Fase 3. Aplicación del extracto lipídico en helado 35
6.3.1 Formulación del helado por tratamiento 35
6.3.2 Elaboración del helado vegetal 37
6.3.3 Evaluación fisicoquímica del helado 38
6.3.4 Evaluación de propiedades tecnológicas del helado 40

6.3.5 Evaluación sensorial 41
6.3.6 Diseño experimental y análisis estadístico de la fase de aplicación 43
7 RESULTADOS 44
7.1 Fase 1. Optimización de la extracción lipídica asistida por ultrasonido 44
7.1.1 Rendimiento lipídico obtenido por extracción asistida por ultrasonido 44
7.1.2 Análisis de varianza (ANOVA) del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de la amplitud, el tiempo y la relación de extracción 45
7.1.3 Ecuación del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de la amplitud, el tiempo y la relación de extracción 47
7.1.4 Efecto de la amplitud ultrasónica y la relación hexano:etanol. 49
7.1.5 Efecto de la amplitud ultrasónica y el tiempo de sonicación ... 50
7.1.6 Efecto del tiempo de sonicación y la relación hexano:etanol .. 51
7.2 Fase 2. Optimización del cultivo de *Chlorella vulgaris* 53
7.2.1 Rendimiento de optimización de biomasa 53
7.2.2 Rendimiento de optimización de Lípidos 62
7.2.3 Optimización dentro de las dos variables 72
7.2.4 Determinación de ácidos grasos 73
7.3 Fase 3. Aplicación del extracto lipídico en helado vegetal 75
7.3.1 Evaluación sensorial 80
7.3.2 Interpretación general de la fase de aplicación 81
8 DISCUSIÓN 83
8.1 Fase 1. Optimización de la extracción lipídica asistida por ultrasonido 83
8.1.1 Rendimiento lipídico obtenido por extracción asistida por ultrasonido 83
8.1.2 ANOVA del modelo de superficie de respuesta para la obtención

de lípidos en función de la amplitud, el tiempo y la relación de extracción. 83
8.1.3 Ecuación del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de la amplitud, el tiempo y la relación de extracción 85
8.1.4 Efecto de la amplitud ultrasónica y la relación hexano:etanol. 86
8.1.5 Efecto de la amplitud ultrasónica y el tiempo de sonicación. 87
8.1.6 Efecto de la amplitud ultrasónica y la relación hexano:etanol. 87
8.2 Fase 2. Optimización del cultivo de *Chlorella vulgaris*. 88
8.2.1 Rendimiento de optimización de biomasa. 88
8.2.2 Rendimiento de optimización de Lípidos 92
8.2.3 Optimización dentro de las dos variables 96
8.2.4 Determinación de ácidos grasos 97
8.3 Fase 3. Aplicación del extracto lipídico y evaluación de las propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y color instrumental del helado vegetal. 98
8.3.1 Evaluación sensorial 102
8.3.2 Interpretación general de la fase de aplicación 102
9 CONCLUSIONES 104
10 RECOMENDACIONES 106
11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro Página

Cuadro 1. Rango de variables independientes con valores actuales y codificados en el diseño de superficie de respuesta..... 26
Cuadro 2. Composición del medio Bold utilizado para el cultivo de *Chlorella vulgaris*. 29
Cuadro 3. Rango de variables independientes con valores actuales y codificados en el diseño de superficie de respuesta..... 32
Cuadro 4. Formulación de helado con adición de extracto lipídico 36
Cuadro 5. Diseño experimental para la extracción de lípidos y porcentaje obtenido. 45
Cuadro 6. ANOVA para el modelo de superficie de respuesta de lípidos. 46
Cuadro 7. Resultados experimentales del diseño de superficie de respuesta para la optimización del crecimiento de *Chlorella vulgaris.* 54
Cuadro 8. ANOVA para el modelo de superficie de respuesta de la variable de biomasa en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$..... 56
Cuadro 9. Resultados experimentales del diseño de superficie de respuesta para la optimización de lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris*. 63
Cuadro 10. ANOVA para el modelo de superficie de respuesta de la variable de biomasa en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$..... 65
Cuadro 11. Perfil de ácidos grasos de los tratamientos 74
Cuadro 12. Propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y de color instrumental del helado de chocolate a base de soya adicionado con extracto lipídico de *Chlorella vulgaris*. 76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Página

Figura 1. a) Montaje experimental de cultivo de *Chlorella vulgaris* en sistema de bolsas verticales, b) biomasa obtenida al final del tratamiento. 31
Figura 2. A) Muestra de extracto después de aplicar la purificación del extracto; B) Muestra de extacto antes de purificar. 34
Figura 3. Superficie de respuesta para amplitud y relación sobre la respuesta de lípidos. 49
Figura 4. Superficie de respuesta para amplitud y tiempo sobre la respuesta de lípidos. 50
Figura 5. Superficie de respuesta para relación y tiempo sobre la respuesta de lípidos. 52
Figura 6. Efecto de $NaNO_3$ y KH_2PO_4 sobre la biomasa de *Chlorella vulgaris*. 59
Figura 7. Efecto de $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$. sobre la biomasa de *Chlorella vulgaris*. 60
Figura 8. Efecto de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$. sobre la biomasa de *Chlorella vulgaris*. 61
Figura 9. Superficie de respuesta del efecto combinado de $NaNO_3$ y KH_2PO_4 sobre el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*. 68
Figura 10. Superficie de respuesta del efecto combinado de $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$ sobre el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*. 69
Figura 11. Superficie de respuesta del efecto combinado de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$ sobre el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*. 71
Figura 12. Perfil de deseabilidad para la optimización simultánea de la producción de biomasa y contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*. 72
Figura 13. Apariencia visual de los tratamientos de helado de chocolate a base de soya adicionados con extracto lipídico de *Chlorella vulgaris*. 79
Figura 14. Perfil sensorial de los tratamientos de helado vegetal adicionados con extracto lipídico de *Chlorella vulgaris*. C: Tratamiento control sin agregado de extracto (0%); T1: Tratamiento 1 con 1% de agregado de extracto lipídico; T2:

Tratamiento 2 con el 2% de agregado de extracto; T3: Tratamiento 3 con el 3% de agregado de extracto 81

RESUMEN

Las enfermedades crónicas no transmisibles y la demanda de alimentos funcionales impulsaron la búsqueda de fuentes ricas en ácidos grasos omega-3. Las microalgas son una alternativa sostenible libre de contaminantes marinos. *Chlorella vulgaris* es apta para consumo; su fracción lipídica puede recuperarse mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU), optimizada por metodología de superficie de respuesta (MSR), e incorporarse en helados a base de cacao que enmascaran color y sabor residuales, enfoque no documentado en helados vegetales. El objetivo fue desarrollar un proceso de producción y extracción de la fracción lipídica de *Chlorella vulgaris* y validar su aplicación en helado de chocolate a base de soya, considerando que optimizar cultivo y extracción incrementaría el rendimiento lipídico y permitiría formular un helado aceptable. El trabajo comprendió fases: (1) cultivo mixotrófico en fotobiorreactores de bolsa, optimizado por MSR, variando $NaNO_3$, KH_2PO_4 y C6H12O6; (2) extracción por EAU, considerando amplitud, tiempo y relación hexano:etanol; y (3) aplicación del extracto en helado de soya a tres concentraciones (1, 2 y 3 %) frente al control, evaluando propiedades fisicoquímicas, tecnológicas, de color y sensoriales. La biomasa (0.66–0.78 g/L) se favoreció con fósforo y carbono, mientras la acumulación lipídica (12.66–19.27 %) se favoreció con baja disponibilidad de nitrógeno (óptimo: 0.21 g/L $NaNO_3$, 0.28 g/L KH_2PO_4 y 0.80 g/L C6H12O6). La EAU presentó rendimientos de 5.38–12.32 %; la amplitud fue el factor (óptimo: 30 %, 15 min, relación 3:1). El extracto mostró un perfil rico en ácidos grasos poliinsaturados (63.46 a 63.81 %), con EPA y DHA de 19.06 a 19.82 % y 43.94 a 44.48 %, respectivamente. En el helado, el extracto mejoró el *overrun* (18 a 25 %), gravedad específica (577.33 a 623.67) e índice de derretimiento (77.5 a 60.2 %), sin alterar significativamente pH, sólidos totales, cenizas ni las coordenadas a* y b*. Fue viable producir, extraer y aplicar la fracción lipídica de *Chlorella vulgaris* en helado sin deteriorar calidad fisicoquímica ni sensorial, ya que el cacao enmascaró el efecto y aportó una combinación original a alimentos funcionales.

ABSTRACT

Chronic non-communicable diseases and the demand for plant-based functional foods have driven the search for lipid sources rich in omega-3 fatty acids. Microalgae offer an alternative free from marine contaminants. *Chlorella vulgaris* is suitable for consumption; its lipid fraction can be recovered via ultrasound-assisted extraction (UAE) optimized using response surface methodology (RSM) and incorporated into cocoa-based ice cream, which masks the algae's color and aftertaste, an approach not documented for plant-based ice creams. The objective was to develop a production and extraction process for the *Chlorella vulgaris* lipid fraction and validate its application in soy-based chocolate ice cream, based on the premise that optimizing cultivation and extraction would increase lipid yield and enable the formulation of an acceptable ice cream product. The study comprised phases: (1) mixotrophic cultivation in bag photobioreactors, optimized via RSM by varying $NaNO_3$, KH_2PO_4, and C6H12O6 levels; (2) UAE extraction, evaluating amplitude, time, and hexane:ethanol ratio; and (3) application of the extract in soy ice cream at three concentrations (1%, 2%, and 3%) compared to a control, assessing physicochemical, technological, color, and sensory properties. Biomass production (0.66–0.78 g/L) was favored by high phosphorus and carbon levels, whereas lipid accumulation (12.66–19.27%) was favored by low nitrogen availability (optimum: 0.21 g/L $NaNO_3$, 0.28 g/L KH_2PO_4, and 0.80 g/L C6H12O6). UAE yields ranged from 5.38% to 12.32%, with amplitude identified as the factor (optimum: 30%, 15 min, 3:1 ratio). The extract exhibited a profile rich in polyunsaturated fatty acids (63.46–63.81%), with EPA and DHA contents of 19.06–19.82% and 43.94–44.48% by weight. In the ice cream, the extract depending on the dosage improved overrun (18–25%), specific gravity (577.33–623.67), and melting rate (77.5–60.2%) without significantly altering pH, total solids, ash content, or a* and b* color coordinates. It proved feasible to produce, extract, and incorporate the *Chlorella vulgaris* lipid fraction into ice cream without compromising its physicochemical or sensory quality, as the cocoa masked the extract's impact and provided a novel combination for functional foods.

1 INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades crónicas no transmisibles, como la obesidad y la diabetes tipo 2, constituyen un problema de salud pública, y el sobrepeso, junto con la obesidad en adultos, supera el 70 % (Shamah-Levy *et al*., 2022). A partir de ello, cobraron impulso los alimentos funcionales, entre ellos los postres congelados de base vegetal, cuya fase grasa define la textura, la fusión y el overrun (Goff y Hartel, 2013). Como fuentes emergentes, las microalgas destacan por su productividad y por su contenido de proteínas, pigmentos y lípidos, y *Chlorella vulgaris* cuenta con un estatus reconocido para consumo humano (Bito *et al*., 2024). Según la cepa y las condiciones de cultivo, su fracción lipídica puede estar constituida por una cantidad variable de ácido linoleico y α-linolénico, y en condiciones autótrofas parece observarse un mayor contenido lipídico y de AGPI omega-3 (Mauricio *et al*., 2023).

En este contexto, se ha reportado que la nutrición del cultivo es un factor determinante para modular el perfil de ácidos grasos de las microalgas, lo que permitió optimizar las relaciones omega-6/omega-3 (Ghodrat Jahromi *et al*., 2022). Bajo relaciones C/N y glucosa controladas, el régimen mixotrófico maximiza la biomasa y los lípidos (Grubišić *et al*., 2024). Para ello, la fuente de carbono resulta ser clave, ya que el acetato de sodio favorece altas densidades y velocidades de crecimiento (Yan *et al*., 2024). Cabe destacar que los monosacáridos obtenidos de subproductos permiten mantener la biomasa con menor costo y una captación superior a la de los azúcares puros (Angelini *et al*., 2024). También se ha reportado que, a mayor escala, los fotobiorreactores cerrados alcanzan altos niveles de biomasa y de lípidos a partir de hidrolizados lignocelulósicos (Arora y Philippidis, 2021). Para el escalamiento, el ajuste de modelos cinéticos proporcionó criterios útiles para el diseño y la operación (Pavlov *et al*., 2025).

La recuperación de lípidos en microalgas se dificultó por la rigidez de la pared celular y por la aplicación de métodos convencionales de extracción, como

Soxhlet y Bligh-Dyer, asociados con el uso de disolventes orgánicos tóxicos. La EAU, basada en cavitación, permitió mejorar la liberación de lípidos y, con sistemas hexano:etanol, obtener extractos ricos en AGPI con rendimientos competitivos (Goh *et al*., 2023).

Se ha reportado que este método combinado con enzimas también libera lípidos polares con alto contenido de omega-3 (Blanco-Llamero *et al*., 2021). Cabe destacar que, en estudios comparativos, se sitúa entre las técnicas con mayor rendimiento lipídico en microalgas autótrofas (Foerster *et al*., 2023). Se ha indicado que su desempeño depende de variables interrelacionadas, como disolvente, tiempo, temperatura y amplitud. La MSR permite modelarlas mediante un diseño compuesto central o Box-Behnken e identificar condiciones óptimas por deseabilidad (Shekhar *et al*., 2023). En microalgas, se ha reportado la optimización de la extracción ultrasónica de lípidos de *Chlorella* sp. (Hadrich *et al*., 2018).

En el helado, por ejemplo, la adición de algas modifica el overrun, definido como el porcentaje de incremento en volumen ocasionado por la incorporación de aire durante el batido, así como el comportamiento de derretimiento, evaluado mediante el tiempo de inicio y la velocidad de derretimiento, y las propiedades sensoriales durante el almacenamiento (Markowska *et al*., 2023). En el caso de *Chlorella vulgaris* se ha evaluado su extracto lipídico como bioactivo alimentario (García-Segovia *et al*., 2024). Hasta ahora, no se ha reportado ningún estudio de acceso abierto y revisado por pares que utilice la fracción lipídica de microalgas en la elaboración de helado de base vegetal o de soya, lo que sustenta la originalidad del trabajo. Por tanto, esta investigación propone producir biomasa de *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactores mixotróficos, para posteriormente extraer su fracción lipídica mediante EAU optimizada con MSR y finalmente aplicarla en helado de base vegetal, bajo la hipótesis de obtener un helado aceptable y nutricionalmente superior al control.

2 ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

2.1 Las microalgas como fuente de biocompuestos de interés alimentario

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, eucariotas o procariotas, capaces de fijar dióxido de carbono y transformar la energía solar en biomasa rica en proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentos, vitaminas y minerales. A partir de estas características, estos microorganismos constituyen una de las materias primas más prometedoras para producir, de forma sostenible, compuestos de valor añadido, debido a su alta tasa de crecimiento, a su cultivo en terrenos no aptos para la agricultura y a sus tiempos breves de cosecha. A diferencia de los cultivos terrestres convencionales, no compiten directamente por tierra cultivable ni por agua dulce, lo que aumenta su interés en un escenario de creciente presión sobre los recursos naturales y de búsqueda de sistemas alimentarios más eficientes (Safi *et al.,* 2014).

En las últimas décadas, el interés industrial por las microalgas se ha ampliado desde la producción de biocombustibles hacia aplicaciones alimentarias, nutracéuticas y farmacéuticas, debido a la diversidad y actividad biológica de sus metabolitos. Su mercado ha crecido por la demanda de ingredientes naturales, funcionales y de origen vegetal. Entre las especies de mayor importancia comercial destacan *Arthrospira platensis* y *Chlorella vulgaris*, ambas con una amplia trayectoria de consumo humano (Bito *et al*., 2024). En particular, *C. vulgaris* es una microalga verde unicelular de agua dulce, reconocida por su valor nutricional, ya que aporta proteínas de alta calidad, aminoácidos esenciales, vitaminas del complejo B, betacaroteno y minerales como hierro, magnesio y calcio. Además, contiene pigmentos y polisacáridos asociados con actividad antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora (Safi *et al*., 2014). En conjunto, estas características la convierten en un ingrediente interesante para el desarrollo de alimentos funcionales y productos fortificados, y representan el punto de partida de la presente investigación.

2.1.1 Composición química y valor nutricional de *Chlorella vulgaris*

El contenido y la calidad de los componentes de *Chlorella vulgaris* dependen estrechamente del modo trófico y de las condiciones de cultivo. El contenido lipídico reportado en la biomasa de esta especie ronda el 10 % en base seca, aunque puede incrementarse de manera notable bajo condiciones de estrés nutricional, en particular ante la limitación de nitrógeno, que desvía el metabolismo celular hacia la acumulación de lípidos de reserva. Estudios comparativos de cepas comerciales demostraron que el modo autótrofo favoreció un mayor contenido de lípidos y de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, mientras que los modos heterótrofos tendieron a acumular más triacilgliceroles y ácidos grasos omega-6 (Domingues *et al.,* 2023).

Estas diferencias en la composición y el contenido lipídico, asociadas con la cepa y el modo de cultivo, influyen directamente en la eficiencia de extracción y en el valor nutricional de la fracción lipídica obtenida. Por ello, la selección de la cepa y del sistema de cultivo constituye una etapa determinante, ya que condiciona el perfil inicial del producto y el posible beneficio nutricional de su incorporación en alimentos. Para asegurar la reproducibilidad de los resultados experimentales, es necesario mantener un control estricto de estas variables de cultivo (Mauricio et al., 2023).

Además, la especie destaca por su contenido de compuestos bioactivos, como carotenoides, clorofila y polisacáridos, a los cuales se les atribuyen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, antidiabéticas e hipolipemiantes. El interés nutracéutico de la microalga se amplía con estos metabolitos, los cuales también condicionan el comportamiento tecnológico de la biomasa cuando esta se incorpora a un alimento, ya que los pigmentos aportan el color intenso de la biomasa y, en consecuencia, representan uno de los principales retos sensoriales de su aplicación. Comprender la naturaleza y la localización celular de estos compuestos resulta esencial para diseñar estrategias de extracción selectiva y de formulación que aprovechen su valor sin

transferir características organolépticas indeseables al producto final (Safi *et al*., 2014).

2.1.2 Sistemas de cultivo y producción de biomasa

La producción de biomasa microalgal se realiza principalmente en dos tipos de sistemas: estanques abiertos de tipo raceway y fotobiorreactores cerrados. Los estanques abiertos son económicos y sencillos de operar, pero ofrecen un control limitado de las condiciones y un mayor riesgo de contaminación por otros microorganismos. Los fotobiorreactores cerrados, incluidos los de geometría tubular, plana y de tipo bolsa, permiten un control más preciso de las variables de cultivo, como luz, temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes, y reducen el riesgo de contaminación, lo que se traduce en una biomasa de composición más reproducible (Adarme-Vega *et al*., 2012).

A nivel celular, las microalgas poseen estructuras que influyen directamente en la recuperación de lípidos, como paredes celulares de composición variable y sistemas de almacenamiento intracelular. La rigidez y el espesor de la pared celular varían entre especies y condiciones de cultivo, y constituyen una barrera física que debe superarse durante la extracción. Por tanto, la elección del sistema y de las condiciones de operación incide no solo en la productividad y el perfil de ácidos grasos, sino también en la facilidad con que los lípidos pueden liberarse en etapas posteriores. Por todo ello, el cultivo representa el primer punto de control en una estrategia orientada a la obtención de lípidos funcionales para uso alimentario (Safi *et al.*, 2014).

La pared celular de *Chlorella vulgaris* es, de hecho, una de las más resistentes entre las microalgas de uso alimentario, lo que repercute tanto en la digestibilidad de la biomasa íntegra como en la eficiencia de la extracción de sus componentes intracelulares. Esta característica refuerza la conveniencia de emplear tecnologías de disrupción celular, como el ultrasonido, capaces de romper dicha barrera y mejorar el acceso del disolvente. En consecuencia, la

comprensión de la arquitectura celular de la especie resulta un elemento clave para diseñar un proceso de extracción eficiente y para interpretar los rendimientos obtenidos *(*Blanco-Llamero *et al., 2021)*.

2.2 La fracción lipídica de las microalgas y los ácidos grasos omega-3

2.2.1 Perfil de ácidos grasos y relevancia de los omega-3

La fracción lipídica de las microalgas comprende lípidos neutros, principalmente triacilgliceroles, y lípidos polares, como glicolípidos y fosfolípidos; estos últimos, frecuentemente esterificados con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. En *Chlorella vulgaris*, los omega-3, en particular el ácido alfa-linolénico, se encuentran mayoritariamente en forma de glicolípidos asociados a las membranas cloroplásticas, de modo que el perfil lipídico guarda relación directa con el estado fotosintético y el color de la biomasa (Domingues *et al*., 2023).

Los ácidos grasos omega-3, y especialmente sus formas de cadena larga, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), son nutrientes esenciales que el organismo humano no sintetiza en cantidades suficientes y que deben aportarse a través de la dieta. Su ingesta se relaciona con efectos favorables sobre la salud cardiovascular, el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso central, la salud visual y la regulación de procesos inflamatorios. El interés por identificar fuentes confiables y sostenibles de estos compuestos se explica porque la evidencia, cada vez mayor, sobre estos beneficios ha incrementado la demanda de alimentos fortificados y suplementos (Adarme-Vega *et al*., 2012).

La diferenciación entre lípidos polares y neutros es relevante tanto nutricional como tecnológicamente. Los lípidos polares esterificados con omega-3 suelen presentar mayor biodisponibilidad y estabilidad que los triacilgliceroles libres. Además, la proporción de cada clase lipídica influye en la selección de los

solventes utilizados para su extracción. Desde el punto de vista nutricional, también es importante la relación entre ácidos grasos omega-6 y omega-3, ya que valores bajos se asocian con un perfil lipídico más favorable. Por ello, la caracterización de la fracción lipídica permite orientar el proceso de extracción y respaldar su incorporación como ingrediente en alimentos funcionales (Ghodrat Jahromi *et al*., 2022).

2.2.2 Problemática de las fuentes marinas tradicionales

Tradicionalmente, los aceites de pescado han satisfecho la demanda de ácidos grasos omega-3. Sin embargo, esta fuente presenta limitaciones cada vez más importantes, entre ellas, la sobrepesca y la presión sobre las poblaciones marinas, la presencia de contaminantes como metales pesados, dioxinas y bifenilos policlorados, la variación estacional de su composición, las propiedades organolépticas poco atractivas y su incompatibilidad con dietas vegetarianas y veganas (Adarme-Vega *et al*., 2012).

A estas limitaciones se suma que los peces no producen por sí mismos los omega-3, sino que los obtienen a través de su dieta y, en última instancia, de las microalgas. Depender del aceite de pescado supone, por ello, introducir un eslabón intermedio en la cadena trófica que incrementa los costos ambientales y económicos, además de favorecer la transferencia de contaminantes acumulados a lo largo de dicha cadena. La creciente sensibilización ambiental de los consumidores y la presión normativa sobre las pesquerías han impulsado la búsqueda de alternativas más limpias, estables y de origen no animal, capaces de asegurar un suministro continuo e independiente de las variaciones de los ecosistemas marinos (Bito *et al*., 2024).

2.2.3. Las microalgas como alternativa sostenible

Las microalgas constituyen el eslabón inicial de la cadena trófica marina y son, en última instancia, los productores primarios de los omega-3 que se acumulan en los peces. Por ello, obtener estos ácidos grasos directamente de la

microalga evita el intermediario animal y ofrece una fuente vegana, libre de los contaminantes asociados al medio marino y que puede producirse en sistemas controlados con bajo impacto ambiental (Adarme-Vega *et al*., 2012).

Desde el punto de vista productivo, las microalgas alcanzan rendimientos por unidad de superficie muy superiores a los de los cultivos oleaginosos terrestres y pueden cultivarse de forma continua a lo largo del año en sistemas cerrados que emplean energía renovable y un mínimo de agua dulce. El interés de la industria alimentaria por incorporar lípidos microalgales en productos funcionales se apoya en esta lógica, que consiste en aprovechar recursos situados más abajo en la cadena trófica. En este contexto, resulta pertinente emplear la fracción lipídica de *Chlorella vulgaris* como ingrediente para enriquecer un alimento de consumo masivo, al combinar beneficio nutricional y sostenibilidad (Hadrich *et al*., 2018).

2.2.4 Estabilidad oxidativa de los lípidos microalgales

La oxidación constituye la principal vulnerabilidad de los lípidos ricos en ácidos grasos poliinsaturados. Aunque los dobles enlaces les aportan valor nutricional, también actúan como puntos reactivos frente al oxígeno, la luz, el calor y los iones metálicos, lo que favorece la formación de hidroperóxidos y, posteriormente, de compuestos secundarios responsables de sabores y olores rancios. Durante este proceso, no solo se deteriora la calidad sensorial del extracto, sino que también disminuye su valor nutricional debido a la degradación de los omega-3 *(*García-Segovia *et al*., 2024*)*.

Además, la fracción lipídica de las microalgas suele acompañarse de antioxidantes naturales, como carotenoides y tocoferoles, que ejercen un efecto protector frente a la oxidación. Para mantener la estabilidad del extracto, resultan determinantes la preservación de estos antioxidantes durante la extracción, así como el control de la temperatura y de la exposición a la luz y al oxígeno a lo largo de todo el proceso. Estas consideraciones son especialmente relevantes

cuando el material se destina a un alimento que se almacenará congelado durante periodos prolongados, como ocurre con el helado (Bito *et al*., 2024).

2.3 Extracción de la fracción lipídica

2.3.1 Métodos convencionales frente a tecnologías emergentes

La recuperación de lípidos a partir de biomasa microalgal es una etapa crítica del procesamiento, condicionada por la rigidez de la pared celular, que dificulta el acceso del solvente al contenido intracelular. Durante décadas, métodos convencionales como la extracción Soxhlet (Soxhlet, 1879) o el procedimiento de Bligh y Dyer han sido la referencia para cuantificar lípidos totales (Hadrich *et al*., 2018). El método de Bligh y Dyer, basado en una mezcla de cloroformo y metanol, recupera con eficacia lípidos polares y no polares, y aún se usa como técnica de validación (Bligh & Dyer, 1959).

Aun así, estos métodos convencionales tienen desventajas importantes: exigen tiempos largos, grandes volúmenes de solvente, en ocasiones muy tóxicos, y temperaturas que pueden afectar la calidad del extracto por la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Ante estas limitaciones, se han desarrollado tecnologías emergentes, como la extracción asistida por ultrasonido, microondas, campos eléctricos pulsados y disrupción mecánica mediante molienda de perlas, que buscan mejorar la eficiencia, reducir el consumo de solventes y de energía, y preservar la integridad de los compuestos de interés. Estas tecnologías se alinean con los principios de la química verde y, al mismo tiempo, responden a la demanda de procesos más limpios y económicamente viables (Foerster *et al*., 2023).

2.3.2 Extracción asistida por ultrasonido

En la extracción asistida por ultrasonido, el proceso se basa en la cavitación acústica, ya que la formación, el crecimiento y el colapso de microburbujas en el medio líquido generan ondas de choque y microcorrientes. Estas rompen la pared celular y favorecen la penetración del solvente, lo que aumenta la transferencia

de masa hacia el exterior de la célula. Frente a procesos sin sonicación, esta disrupción mejora de forma significativa el rendimiento de extracción y, al mismo tiempo, reduce los tiempos de operación (Hernández *et al*., 2022).

Entre los principales parámetros que controlan el proceso se encuentran la potencia o densidad de energía ultrasónica, la frecuencia, el tiempo de sonicación, la temperatura y la relación solvente (hexano:etanol). Al aumentar la potencia y el tiempo, se intensifica la disrupción celular y, por tanto, el rendimiento, aunque un exceso puede elevar la temperatura del medio y favorecer la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, por lo que la calidad del extracto puede verse comprometida. Por esta razón, la EAU se considera una tecnología de química verde únicamente cuando sus condiciones se ajustan con precisión para maximizar el rendimiento y preservar la integridad de los compuestos termolábiles (Goh *et al*., 2023).

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) destaca por su operación sencilla, menor costo y facilidad de escalamiento, por lo que es una alternativa ampliamente estudiada para recuperar lípidos de microalgas. Su eficiencia depende de la especie, la estructura de la pared celular y el sistema de solventes utilizado, factores que deben optimizarse de manera conjunta (Hadrich *et al*., 2018). Su principio se basa en la cavitación, donde las burbujas generadas por el ultrasonido oscilan o colapsan rápidamente, produciendo fuerzas capaces de romper la pared celular y liberar los compuestos intracelulares. La intensidad de este fenómeno está influida por propiedades del medio, como la viscosidad, la tensión superficial y la presión de vapor, por lo que la composición del solvente y la temperatura afectan directamente el rendimiento de extracción (Blanco-Llamero *et al*., 2021).

2.3.3 Sistemas de solventes: la mezcla hexano:etanol

La polaridad del solvente tiene una influencia importante en la eficiencia de la extracción lipídica. Los solventes no polares, como el hexano, presentan una

alta selectividad por los lípidos neutros y un bajo costo; en cambio, los solventes polares, como el etanol, favorecen la recuperación de lípidos polares y compuestos asociados, además de mostrar menor toxicidad y estar autorizados en la industria alimentaria. Por esta razón, las mezclas binarias (hexano:etanol) permiten extraer de manera simultánea lípidos polares, no polares y neutros, y de este modo superan el rendimiento de cualquiera de los solventes puros (Uribe-Wandurraga *et al*., 2021).

La relación entre ambos solventes es una variable clave, porque, al incrementarse la proporción de etanol, aumenta la polaridad del sistema y, en consecuencia, se recuperan en mayor medida los lípidos polares y los pigmentos, mientras que una mayor proporción de hexano favorece la fase apolar. Junto con ello, la relación solvente y el tiempo de contacto completan el conjunto de variables que determinan el rendimiento final. Además, el uso de un solvente polar como el etanol facilita la separación posterior de fases y reduce el riesgo asociado con el manejo de solventes más agresivos, lo que resulta especialmente relevante cuando el extracto se destina a una aplicación alimentaria (Escorsim *et al*., 2018).

2.3.4 Optimización mediante metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta es una herramienta estadística que permite modelar y optimizar procesos con múltiples variables mediante un número reducido de experimentos. A partir de diseños como el central compuesto, la MSR ajusta un modelo polinomial de segundo orden que describe la relación entre los factores, por ejemplo, la potencia del ultrasonido, el tiempo de extracción y la composición del solvente, y la respuesta de interés, en este caso, el rendimiento lipídico (Uribe-Wandurraga *et al*., 2021).

El modelo de segundo orden incorpora términos lineales, cuadráticos y de interacción, lo que le permite describir no solo el efecto individual de cada factor,

sino también las curvaturas de la respuesta y las interacciones entre variables, que a menudo resultan determinantes y no podrían detectarse mediante un análisis de un factor a la vez.

El análisis de varianza permite determinar la significancia del modelo y de sus términos, mientras que el coeficiente de determinación y la falta de ajuste indican su calidad y capacidad predictiva (Ng *et al*., 2024). Una vez validado, las superficies de respuesta y los gráficos de contorno facilitan la identificación de la zona óptima, y la optimización numérica permite calcular las condiciones que maximizan el rendimiento. Estas condiciones deben comprobarse experimentalmente para confirmar la fiabilidad del modelo. Programas como Design Expert facilitan el diseño experimental, el análisis estadístico y la generación de superficies (Hadrich *et al*., 2018).

Frente al método tradicional de evaluar un factor a la vez, la metodología de superficie de respuesta (MSR) permite analizar simultáneamente varias variables y sus interacciones con menos ensayos, reduciendo tiempo, reactivos y recursos. Además, permite distinguir entre efectos principales e interacciones, información que un enfoque univariante no puede proporcionar y que con frecuencia resulta crucial para comprender el comportamiento real del proceso. Por estas razones, la MSR se ha consolidado como una de las herramientas más empleadas en la optimización de procesos de extracción y de formulación en la industria alimentaria (Shekhar *et al*., 2023).

2.4 Helados a base de plantas como matriz de aplicación

2.4.1 Tendencia plant-based y el uso de la soya

El crecimiento sostenido del mercado de alimentos de origen vegetal responde a motivos relacionados con la salud, la sostenibilidad y la ética del consumidor, así como a restricciones fisiológicas, como la intolerancia a la lactosa o la alergia a la proteína láctea. Los postres congelados no han sido ajenos a esta tendencia, y la demanda de helados sin ingredientes de origen

animal ha crecido de forma notable en los últimos años, lo que impulsa la innovación en formulaciones basadas en bebidas vegetales (Ng *et al*., 2024).

En estos productos, las bebidas vegetales sustituyen a la leche como base de la formulación; la soya destaca por su elevado contenido proteico y su perfil nutricional favorable, lo que la convierte en una alternativa idónea para elaborar helados sin ingredientes de origen animal (Gil, 2024). Además, la proteína de soya desempeña una función tecnológica, dado que estabiliza la espuma y constituye la matriz estructural del producto. No obstante, las bebidas vegetales presentan retos específicos, como sus propios matices de sabor y una capacidad de emulsificación y aireación distinta en comparación con la leche, los cuales deben resolverse mediante un diseño cuidadoso de la formulación (Ghaderi *et al*., 2021).

Gracias a un perfil de aminoácidos relativamente completo, la soya aporta una proteína de elevado valor biológico y, además, presenta un contenido graso moderado, con predominio de ácidos grasos insaturados. A ello se suma la ausencia de lactosa y colesterol, características apreciadas por un grupo cada vez más amplio de consumidores. Por otra parte, deben controlarse las notas de sabor a leguminosa y la presencia de factores antinutricionales, aunque un procesamiento adecuado puede reducir estos últimos. En un helado de chocolate, además, el sabor intenso del cacao contribuye a integrar sensorialmente la base de soya, lo que refuerza la idoneidad de esta combinación (Ng *et al*., 2024).

2.4.2 Estructura y propiedades fisicoquímicas del helado

El helado constituye un sistema coloidal complejo en el que se combinan una fase de aire incorporado, cristales de hielo, glóbulos de grasa parcialmente coalescidos y una fase acuosa continua que contiene azúcares, proteínas y estabilizantes. La calidad sensorial y el desempeño del producto durante el almacenamiento y el consumo dependen de variables como el porcentaje de

aireación, u overrun, el índice de fusión, los sólidos totales y la gravedad específica (Goff y Hartel, 2013).

En formulaciones a base de soya, la adición de proteína vegetal puede incrementar los sólidos totales y reforzar la red estructural, lo que disminuye la velocidad de fusión; sin embargo, un exceso de proteína puede provocar el colapso de las celdas de aire y reducir el overrun (Gil, 2024). Para desarrollar un helado vegetal de calidad, el equilibrio entre estos parámetros es fundamental, ya que un overrun adecuado aporta ligereza y cremosidad, mientras que una resistencia suficiente a la fusión facilita el manejo y prolonga el tiempo de consumo antes de que el producto pierda su estructura (Goff y Hartel, 2013).

En este equilibrio, los estabilizantes y emulsificantes desempeñan un papel clave, ya que regulan la cristalización del hielo, limitan el tamaño de las celdas de aire y elevan la viscosidad de la fase continua, lo que da lugar a una textura más homogénea y a una mayor resistencia a la fusión. En los sistemas vegetales, donde la ausencia de grasa láctea y caseínas modifica la estabilización natural de la espuma y la emulsión, el diseño de la formulación debe compensar esas diferencias para obtener atributos similares a los del helado convencional. En última instancia, la interacción entre proteína de soya, lípidos añadidos, azúcares y estabilizantes determina la microestructura del producto y, con ella, su comportamiento fisicoquímico y sensorial (Ghaderi *et al*., 2021).

2.4.3 Sustitución parcial de grasa con lípidos vegetales y microalgales

La grasa cumple funciones esenciales en el helado: contribuye a la cremosidad, a la sensación en boca, a la estabilidad de la espuma y a la liberación de aromas. La sustitución parcial de la grasa convencional por aceites vegetales o por lípidos de microalgas constituye una estrategia para mejorar el perfil nutricional del producto, generalmente en niveles moderados, del orden del 10 % o inferiores, a fin de no comprometer la estructura ni los atributos

sensoriales (Uribe-Wandurraga *et al*., 2021).

La incorporación de lípidos microalgales ricos en omega-3 abre la posibilidad de obtener un postre congelado con declaraciones nutricionales de interés, lo que transforma un producto típicamente indulgente en un vehículo de compuestos funcionales. Sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados son especialmente susceptibles a la oxidación, lo que puede generar sabores y olores desagradables, además de reducir la vida útil. Por ello, el nivel de adición, la protección frente a la oxidación y la posible aplicación de estrategias como la encapsulación deben considerarse cuidadosamente para preservar tanto la calidad sensorial como el beneficio nutricional del extracto (García-Segovia *et al*., 2024).

2.4.4 El cacao como matriz enmascarante

Una de las principales limitaciones del uso de *Chlorella vulgaris* en alimentos es su impacto sensorial, debido a su color verde intenso, aroma característico y sabor vegetal, los cuales pueden reducir la aceptación del consumidor conforme aumenta su concentración (Gil, 2024). Para disminuir estos efectos, el cacao representa una matriz adecuada, ya que su color oscuro y su perfil aromático pueden enmascarar las características residuales del extracto algal. Diversos estudios indican que la aceptación de alimentos con microalgas mejora cuando se emplean matrices con tonalidades oscuras y sabores predominantes. Por ello, el chocolate puede facilitar la incorporación de la fracción lipídica de *C. vulgaris* en helados, al reducir la percepción de atributos sensoriales no deseados (Hernández *et al*., 2022).

Como beneficio adicional, esta estrategia emplea la fracción lipídica y no la biomasa total, por lo que disminuye de manera inherente la presencia de pigmentos y de compuestos asociados con el sabor vegetal, dado que gran parte de ellos permanece en la biomasa residual después de la extracción. Por ello, el efecto sensorial del ingrediente es menor que el de la biomasa íntegra, y la matriz

de cacao solo necesita ocultar las notas residuales que podrían transferirse junto con los lípidos. Con un extracto purificado y una matriz de alta intensidad sensorial, esta combinación aumenta, por tanto, la probabilidad de obtener un producto con una aceptabilidad similar a la de su contraparte convencional (García-Segovia *et al*., 2024).

2.5 Evaluación de la calidad del producto

2.5.1 Parámetros fisicoquímicos

La evaluación de los parámetros fisicoquímicos permite determinar la calidad del helado y describir su comportamiento durante el almacenamiento y el consumo. Entre estos destacan el pH (método AOAC 981.12.), los grados Brix (método AOAC 983.17), los sólidos totales (AOAC 941.08) y la gravedad específica (método AOAC 925.22). El pH influye en la estabilidad de las proteínas y en la percepción del sabor, mientras que los grados Brix indican el contenido de sólidos solubles. Los sólidos totales se asocian con la textura y la resistencia al derretimiento, y la gravedad específica se relaciona con el grado de aireación del producto (Goff y Hartel, 2013).

La incorporación de biomasa o derivados de microalgas en productos lácteos y sus análogos puede modificar parámetros como el pH y el contenido proteico, afectando su estructura, estabilidad y calidad final (Hernández *et al*., 2022). En el helado, el overrun y el índice de fusión son indicadores importantes de su comportamiento tecnológico. El overrun expresa la cantidad de aire incorporado durante el batido y se relaciona con la cremosidad, ligereza y rendimiento volumétrico. El índice de fusión, por su parte, indica la velocidad de derretimiento y refleja la estabilidad estructural del producto. Ambos parámetros dependen de la composición de la mezcla, especialmente de los sólidos, proteínas, grasas y estabilizantes, por lo que permiten evaluar los cambios generados por la incorporación de la fracción lipídica microalgal.

2.5.2 Análisis instrumental del color: el espacio CIELAB

El color es un atributo importante en la aceptación de los alimentos, por lo que su medición objetiva permite comparar las características entre muestras. El sistema CIELAB describe el color mediante tres coordenadas: L*, que representa la luminosidad; a*, que indica tonalidades entre rojo y verde; y b*, que representa el eje entre amarillo y azul. Este sistema es ampliamente utilizado en alimentos por su uniformidad perceptual y permite realizar mediciones instrumentales mediante colorímetros o espectrofotómetros (Pathare *et al*., 2013). Además, la diferencia global de color entre dos muestras puede expresarse mediante el parámetro ΔE^*_{ab}, el cual representa la distancia entre sus coordenadas dentro del espacio CIELAB y se calcula mediante la ecuación 1.

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

ΔL* representa la diferencia de luminosidad entre la muestra evaluada y la de referencia, mientras que Δa* y Δb* indican las variaciones en los ejes rojo-verde y amarillo-azul, respectivamente. Estos valores se obtienen al restar las coordenadas de la muestra de referencia a las del tratamiento. Un ΔE* cercano a cero indica colores similares, mientras que valores mayores reflejan diferencias más evidentes. En este estudio, las coordenadas L*, a* y b*, junto con ΔE*, permitieron evaluar si la incorporación del extracto lipídico de *Chlorella vulgaris* modificó el color hacia tonalidades verdes o amarillas y si estos cambios fueron perceptibles. Para asegurar resultados comparables, se estandarizaron las condiciones de iluminación, observación y temperatura (Pathare *et al*., 2013).

2.5.3 Análisis sensorial descriptivo

El análisis sensorial permite medir, analizar e interpretar las respuestas humanas ante las características de los alimentos percibidas por los sentidos. Sus principales métodos incluyen pruebas discriminativas, descriptivas y afectivas, utilizadas para identificar diferencias, caracterizar atributos y evaluar la

aceptación de los productos (Murray *et al*., 2001). En particular, el análisis descriptivo permite establecer un perfil sensorial objetivo mediante jueces entrenados o semientrenados, quienes evalúan la intensidad de atributos previamente definidos. Entre sus metodologías destaca el Análisis Descriptivo Cuantitativo, útil para comparar formulaciones e identificar los atributos relacionados con la aceptabilidad. Además, los resultados pueden analizarse estadísticamente para determinar diferencias significativas entre las muestras (Stone *et al*., 1974).

Las metodologías descriptivas actuales pueden emplear paneles semientrenados y procedimientos más rápidos, manteniendo una fiabilidad adecuada frente a los métodos tradicionales. En un helado funcional, su aplicación permite evaluar apariencia, color, aroma, sabor y textura, y determinar si el extracto lipídico afecta la calidad sensorial o si el cacao logra enmascarar sus características residuales (Murray *et al*., 2001). La validez del análisis depende de la selección y capacitación de los jueces, el uso de escalas definidas y el control de las condiciones de evaluación. Además, la codificación y el orden de presentación de las muestras deben aleatorizarse para reducir sesgos. Finalmente, el análisis estadístico permite identificar diferencias reales entre formulaciones y, cuando los datos no cumplen supuestos de normalidad, pueden emplearse pruebas no paramétricas (Stone *et al*., 1974).

2.6 Vacío de conocimiento y justificación de la investigación

Aunque algunos trabajos han analizado la incorporación de biomasa en yogur, queso y helado con el fin de mejorar su perfil nutricional y funcional, la revisión de la literatura indica que la mayoría empleó biomasa completa y se centró en matrices lácteas, donde se aprovechó principalmente su contenido proteico o la coloración de la microalga. Por el contrario, son escasos los estudios que utilizan de manera específica la fracción lipídica aislada, y casi no se encuentran investigaciones que la integren en una matriz vegetal (Hernández *et*

al., 2022; Yalcin *et al*., 2024).

En la literatura científica revisada por pares y de acceso abierto, no se ha descrito el uso de la fracción lipídica de *Chlorella vulgaris*, obtenida mediante extracción asistida por ultrasonido y optimizada con metodología de superficie de respuesta, en una matriz específica de helado de chocolate a base de soya. Esta ausencia, entendida como un vacío de conocimiento, puede considerarse la base de esta investigación y, a la vez, delimita su contribución original al campo de la ciencia y tecnología de los alimentos (Gil, 2024; Uribe-Wandurraga *et al*., 2021).

La integración de un extracto lipídico funcional de origen vegetal, rico en omega-3, una técnica de extracción verde y eficiente, una matriz vegetal libre de ingredientes de origen animal y una estrategia de enmascaramiento de algunos atributos sensoriales como color y sabor basada en la adición de cacao. En este contexto, este trabajo pretende aportar evidencia sobre la viabilidad fisicoquímica y sensorial de un helado de chocolate elaborado a base de soya y enriquecido con la fracción lipídica de *Chlorella vulgaris*. También aporta la integración en un desarrollo aspectos de sostenibilidad económica de la materia prima, eficiencia del proceso de extracción de aceite, y la aplicación de éste a un producto lácteo evaluando su aceptabilidad (Uribe-Wandurraga *et al*., 2021).

Desde un punto de vista metodológico, el desarrollo de este producto requiere articular conocimientos de diversas áreas, entre ellas, el cultivo y la caracterización de la microalga, la optimización estadística del proceso de extracción, la formulación del helado vegetal y la evaluación integral de su calidad mediante análisis bromatológicos, fisicoquímicos, instrumentales y sensoriales. Al mismo tiempo, este carácter interdisciplinario representa un reto y una oportunidad, porque permite generar conocimiento aplicable no solo al producto específico aquí estudiado, sino también a futuras estrategias de incorporación de ingredientes funcionales de origen microalgal en otras matrices alimentarias de base vegetal.

3 JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de nuevas fuentes lipídicas con valor nutricional y tecnológico para la industria agroalimentaria ha crecido a partir del interés por desarrollar ingredientes funcionales de origen natural. En ese marco, las microalgas, en especial *Chlorella vulgaris*, ofrecen una opción prometedora porque pueden acumular lípidos, pigmentos, antioxidantes y otros compuestos bioactivos de interés. En la formulación de alimentos funcionales, productos nutracéuticos y matrices alimentarias innovadoras, estos componentes pueden aprovecharse, y así contribuir al desarrollo de alternativas más sustentables frente a las fuentes convencionales de lípidos (Bito *et al*., 2024).

Uno de los principales retos en el aprovechamiento de *Chlorella vulgaris*, sin embargo, radica en obtener lípidos de forma eficiente, ya que el rendimiento del proceso depende tanto de las condiciones de cultivo como del método de extracción. Las técnicas convencionales suelen usar solventes orgánicos muy tóxicos, requieren tiempos prolongados y operan en condiciones que pueden afectar la estabilidad de compuestos sensibles. Se vuelve necesario, por ello, mejorar estrategias que aumenten el rendimiento lipídico, reduzcan el impacto ambiental y conserven la funcionalidad de los compuestos bioactivos presentes en la biomasa microalgal (Foerster *et al*., 2023).

Al promover la ruptura celular mediante cavitación, mejorar la transferencia de masa y reducir el tiempo de extracción, la EAU, como tecnología emergente, presenta potencial para intensificar la recuperación de lípidos. El uso de sistemas alternativos de solventes, como hexano:etanol, puede favorecer una extracción más eficiente y menos agresiva que los métodos convencionales, además de facilitar su aplicación alimentaria (Blanco-Llamero *et al*., 2021). Para aumentar la producción de biomasa y la acumulación de lípidos, también es necesario optimizar el cultivo de *Chlorella vulgaris*, considerando factores como las fuentes de nitrógeno, fósforo y carbono, que influyen en su crecimiento y composición. Por ello, integrar la optimización del cultivo con la extracción puede mejorar la

eficiencia global del proceso, desde la producción de biomasa hasta la recuperación de lípidos (Mauricio *et al*., 2023). Esta estrategia busca establecer un proceso sostenible y escalable que favorezca el aprovechamiento de recursos biotecnológicos renovables y el desarrollo de ingredientes funcionales con potencial uso en las industrias alimentaria y nutracéutica.

De esta manera, el proyecto no solo responde a una problemática tecnológica relacionada con la eficiencia de extracción, sino también a la demanda actual de procesos más limpios, funcionales y orientados al desarrollo de productos con valor agregado.

Por lo tanto, la presente investigación aportará bases científicas y tecnológicas para el diseño de un proceso integrado de producción y extracción de lípidos de *Chlorella vulgaris*, orientado a la obtención de ingredientes funcionales mediante metodologías más eficientes, sustentables y aplicables al sector agroalimentario.

4 HIPÓTESIS

La optimización de las condiciones de cultivo de *Chlorella vulgaris* y de la extracción asistida por ultrasonido con solventes alternativos permitirá incrementar significativamente el rendimiento lipídico y preservar compuestos bioactivos, generando un proceso más eficiente y sustentable para la obtención de ingredientes funcionales con aplicación potencial en productos agroalimentarios con aplicación potencial en productos lácteos y nutracéuticos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Desarrollar un proceso para producción y extracción de fracción lipídica a partir de *Chlorella Vulgaris* con potencial uso alimentario.

5.1.1 Objetivos Específicos

Determinar el efecto de las condiciones modificadas de cultivo sobre el crecimiento celular y la producción de lípidos de *Chlorella vulgaris* mediante MSR.

Evaluar la eficiencia de la extracción asistida por ultrasonido para la recuperación de lípidos a partir de biomasa microalgal liofilizada mediante MSR.

Validar la aplicación de los extractos lipídicos obtenidos de *Chlorella vulgaris* en la formulación de un helado vegano a base de soya.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en tres fases experimentales principales. La primera fase correspondió a la optimización del cultivo de *Chlorella vulgaris*, con el propósito de establecer condiciones nutricionales que favorecieran la producción de biomasa y la acumulación de lípidos. La segunda fase consistió en la optimización del proceso de extracción lipídica asistida por ultrasonido, mediante el uso de un sistema de solventes con hexano y la evaluación del efecto de variables operativas sobre el rendimiento de extracción. Finalmente, la tercera fase estuvo orientada a la aplicación del extracto lipídico obtenido en una matriz alimentaria tipo helado vegetal, con el objetivo de evaluar su incorporación como ingrediente funcional y su efecto sobre las características fisicoquímicas, tecnológicas básicas y sensoriales del producto.

La organización metodológica en fases permitió integrar de manera secuencial la producción de biomasa microalgal, la recuperación de lípidos y su aplicación en un alimento. De esta forma, el proceso contempló desde la generación de materia prima biológica hasta la obtención de un producto con potencial aplicación agroalimentaria. Cada fase se diseñó con base en criterios experimentales que permitieran controlar las variables críticas del sistema y obtener información útil para la optimización del proceso global.

6.1 Fase 1. Optimización de la extracción lipídica

6.1.1 Materia prima

Para la fase de extracción lipídica se utilizó biomasa seca de *Chlorella vulgaris.* Esta biomasa se obtuvo de las condiciones de cultivo previamente optimizadas o, en ensayos preliminares, de biomasa comercial deshidratada. El uso de biomasa seca permitió trabajar con una materia prima más estable, con menor variabilidad por contenido de agua y adecuada para la extracción con solventes orgánicos.

La biomasa se almacenó en recipientes herméticos, protegida de la luz y

la humedad, con la finalidad de evitar alteraciones en sus componentes lipídicos. La exposición al oxígeno, la humedad, la temperatura elevada o la luz pudo favorecer procesos de degradación oxidativa; por ello, se procuró mantener condiciones de almacenamiento que conservaran la estabilidad del material hasta el momento de su uso.

Antes de la extracción, la biomasa fue homogeneizada mediante molienda o mezclado manual controlado, con el objetivo de obtener un tamaño de partícula más uniforme. Esta preparación facilitó el contacto entre la biomasa y el sistema de solventes, favoreciendo la transferencia de compuestos lipídicos hacia la fase orgánica durante el proceso de extracción.

6.1.2 Diseño experimental y sistema de extracción asistida por ultrasonido

La optimización del proceso de extracción lipídica se realizó mediante MSR, con el propósito de evaluar el efecto de las variables operativas sobre el rendimiento de lípidos obtenidos a partir de biomasa seca de *Chlorella vulgaris*. Se consideraron tres factores independientes: amplitud ultrasónica, tiempo de sonicación y relación de solventes (hexano: etanol).

La extracción se realizó mediante un sistema de ultrasonido de sonda, operado a una frecuencia fija de 20 kHz. Esta técnica se utilizó para favorecer la ruptura celular mediante cavitación acústica, lo que permitió mejorar la liberación de los lípidos intracelulares hacia el sistema de solventes. La amplitud ultrasónica se evaluó en un intervalo de 10 a 30 %, el tiempo de sonicación de 5 a 15 min y la relación hexano de 2:1 a 4:1.

El Cuadro 1 presenta los factores independientes utilizados en la MSR, así como sus respectivos niveles codificados: bajo (-1), medio (0) y alto (+1). Se tomaron en cuenta tres factores independientes: amplitud ultrasónica (10–30 %), tiempo de sonicación (5–15 min) y relación de solventes hexano (2:1–4:1), con el

objetivo de optimizar la extracción de lípidos a partir de *Chlorella vulgaris.*

Cuadro 1. Rango de variables independientes con valores actuales y codificados en el diseño de superficie de respuesta.

Código	Factores	Niveles		
		-1	0	+1
A	Amplitud (%)	10	20	30
B	Tiempo (min)	5	10	15
C	Relación (Hex:EtOH)	2:1	3:1	4:1

Hex:EtOH: relación hexano:etanol empleada como sistema de solventes durante la extracción lipídica.

Las corridas experimentales fueron generadas mediante el software Design-Expert, utilizando un diseño adecuado para ajustar modelos de segundo orden. En cada tratamiento se mantuvieron constantes la cantidad de biomasa, el volumen total de solvente, el tipo de recipiente y el procedimiento de separación posterior, y se modificaron únicamente los factores establecidos en el diseño experimental.

6.1.3 Condiciones de extracción, separación y recuperación del extracto lipídico

Para cada ensayo experimental se emplearon tubos Falcon de 50 mL como sistema de reacción. Se pesaron 0.75 g de biomasa seca de *Chlorella vulgaris* y se mezclaron con 30 mL de n-hexano:etanol en las proporciones definidas por el diseño experimental. La extracción asistida por ultrasonido se realizó con una sonda ultrasónica (U.S. Solid, modelo USS-HLUH), con potencia máxima de 1750 W y frecuencia de 20 kHz. La amplitud y el tiempo de sonicación se establecieron según la matriz experimental. El proceso se efectuó sin control activo de temperatura, registrándose valores aproximados entre 30 y 40 °C durante la sonicación. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min para separar las fases. Finalmente, la fase superior,

correspondiente a la fracción lipídica, se recuperó cuidadosamente y se lavó con agua destilada fría. Después, la fracción recuperada fue transferida a crisoles previamente llevados a peso constante mediante secado a 110 °C durante 24 h.

El solvente fue evaporado a 70 °C durante 24 h. Una vez finalizada la evaporación, los crisoles fueron enfriados en desecador y posteriormente pesados en balanza analítica. El contenido de extracto lipídico se determinó mediante el método gravimétrico, considerando la diferencia entre el peso del crisol con extracto seco y el peso del crisol vacío (Phan *et al*., 2023).

El rendimiento lipídico se calculó mediante la ecuación 2:

(2)

$$CL(\%): \frac{[(W_2 - W_1)]}{WB} * 100$$

Donde:

CL (%) = contenido de lípidos extraídos.

W_1 = peso del crisol vacío llevado a peso constante (g).

W_2 = peso del crisol con el extracto lipídico seco después de la evaporación del solvente (g).

WB = peso de la biomasa seca utilizada en la extracción (g).

6.1.4 Análisis estadístico de la fase de extracción

Los resultados de rendimiento lipídico fueron analizados mediante el software Design-Expert®. Se ajustó un modelo polinómico de segundo orden para describir el comportamiento del proceso en función de la amplitud ultrasónica, el tiempo de sonicación y la relación hexano. El modelo permitió evaluar los efectos principales, las interacciones y los términos cuadráticos.

El análisis de varianza se utilizó para determinar la significancia del modelo y de cada factor. Se consideraron significativos aquellos términos con $p < 0.05$.

La calidad del ajuste fue evaluada mediante R^2, R^2 ajustado y falta de ajuste. Estos indicadores ayudaron a determinar si el modelo describió adecuadamente los resultados experimentales.

A partir de los modelos obtenidos, se produjeron superficies de respuesta y gráficas de contorno. Estas herramientas permitieron visualizar las combinaciones de variables que maximizaron el rendimiento lipídico. Finalmente, se seleccionaron las condiciones óptimas de extracción y, de ser necesario, se realizó una corrida de validación para comparar el valor experimental con el valor predicho por el modelo.

6.2 Fase 2. Optimización del cultivo de *Chlorella vulgaris*

6.2.1 Material biológico

La microalga utilizada en el presente estudio fue *Chlorella vulgaris*, seleccionada debido a su capacidad de crecimiento bajo condiciones controladas y a su potencial para acumular lípidos de interés alimentario. El cultivo se mantuvo bajo condiciones controladas antes del inicio de los ensayos experimentales, con el propósito de garantizar la viabilidad del inóculo y reducir la variabilidad asociada al estado fisiológico inicial de la microalga.

Antes de iniciar los tratamientos, el cultivo se aclimató al medio y a las condiciones ambientales establecidas. La utilización de un cultivo activo y homogéneo fue fundamental para asegurar la reproducibilidad de los resultados, ya que las condiciones iniciales del inóculo pudieron influir directamente sobre la cinética de crecimiento, la producción de biomasa y la acumulación de lípidos.

6.2.2 Preparación del medio de cultivo

Para el cultivo de *Chlorella vulgaris* se utilizó medio Bold como base nutritiva. En el Cuadro 2 se muestra la composición del medio, conformada por los siguientes reactivos.

Cuadro 2. Composición del medio Bold utilizado para el cultivo de *Chlorella vulgaris.*

Reactivo	Concentración(g/L)
Nitrato de sodio ($NaNO_3$)	0.1
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.175
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	0.075
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.075
Cloruro de calcio ($CaCl_2$)	0.025
Cloruro de sodio (NaCl)	0.025
EDTA disódico	0.05
Hidróxido de potasio (KOH)	0.031
Sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.0050
Ácido bórico (H_3BO_3)	0.0114
Sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.0088
Cloruro de manganeso tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0.0014
Trióxido de molibdeno (MoO_3)	0.0007
Sulfato cúprico pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.0016
Nitrato de cobalto hexahidratado [$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$]	0.0005

Los reactivos fueron pesados individualmente y disueltos en agua destilada o desionizada. Posteriormente, el medio fue ajustado al pH establecido para el cultivo y esterilizado antes de su uso. Los componentes no evaluados se mantuvieron constantes, mientras que las concentraciones de $NaNO_3$, KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$ fueron modificadas de acuerdo con el diseño experimental.

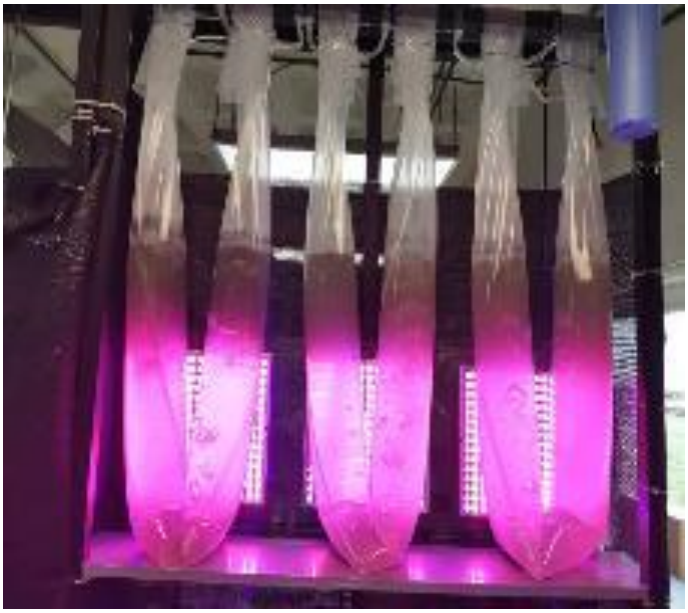
6.2.3 Sistema y condiciones de cultivo

El cultivo de *Chlorella vulgaris* se llevó a cabo en bolsas fotobiorreactoras verticales de polietileno transparente (ULINE POLY TUBING, Apodaca, México),

con capacidad aproximada de 20 L y volumen de trabajo de 15 L. Las bolsas fueron colocadas en una estructura metálica que permitió mantenerlas suspendidas verticalmente, favoreciendo la distribución uniforme de la iluminación y la aireación.

La Figura 1 muestra el acondicionamiento de cada bolsa, la cual contó con una línea de aireación individual, con el objetivo de mantener la biomasa en suspensión, favorecer el intercambio gaseoso y evitar la sedimentación celular. La iluminación fue proporcionada mediante paneles LED, procurando mantener una exposición uniforme en todas las unidades experimentales.

a)



b)



Figura *1.* a) Montaje experimental de cultivo de *Chlorella vulgaris* en sistema de bolsas verticales, b) biomasa obtenida al final del tratamiento.

Las condiciones de cultivo fueron controladas para favorecer el crecimiento de *Chlorella vulgaris*. La temperatura se mantuvo aproximadamente en 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad e intensidad lumínica cercana a 120 µmol/m²/s (i-Venoya). El pH se ajustó dentro de un intervalo adecuado (8–8.5) para el crecimiento microalgal. El seguimiento del crecimiento se realizó mediante mediciones en un espectrofotómetro (Thermo scientific,

Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer, Estados Unidos de América) periódicas de densidad óptica a 680 nm.

6.2.4 Diseño experimental y variables de respuesta del cultivo

La optimización del cultivo de *Chlorella vulgaris* se realizó mediante MSR, utilizando un diseño experimental generado en el software Design-Expert®. Esta metodología permitió evaluar el efecto de diferentes concentraciones de nutrientes sobre la producción de biomasa y el contenido lipídico de la microalga.

Las variables independientes consideradas fueron la concentración de nitrato de sodio ($NaNO_3$), fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y $C_6H_{12}O_6$. Estas variables fueron evaluadas en tres niveles codificados: bajo (-1), medio (0) y alto (+1), de acuerdo con las modificaciones establecidas para las corridas experimentales.

En el Cuadro 3 se muestran las modificaciones que se realizaron a las corridas generadas por el software Design-Expert®.

Cuadro 3. Rango de variables independientes con valores actuales y codificados en el diseño de superficie de respuesta

Código	**Factores**	**Niveles**		
		-1	**0**	**+1**
A	$NaNO_3$ (g/L)	0.1	0.25	0.4
B	KH_2PO_4 (g/L)	0.07	0.175	0.28
C	$C_6H_{12}O_6$ (g/L)	0.2	0.5	0.8

Las variables de respuesta fueron la producción de biomasa y el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*. La producción de biomasa permitió evaluar el crecimiento microalgal bajo las condiciones nutricionales establecidas, mientras que el contenido lipídico permitió determinar la capacidad de acumulación de lípidos en cada tratamiento. El análisis conjunto de ambas respuestas permitió

seleccionar las condiciones más adecuadas para favorecer la producción global de lípidos microalgales.

6.2.5 Purificación del extracto

La extracción de lípidos se realizó a partir de biomasa mediante el uso de hexano como solvente, en una relación 1:40 (biomasa). La mezcla fue sometida a ultrasonido a 35 °C y una potencia de 300 W, con el fin de favorecer la ruptura celular y mejorar la eficiencia de extracción. Posteriormente, el solvente fue removido mediante evaporación en rotavapor (Yamato, modelo BM200, Japón), a aproximadamente 37 °C, obteniéndose un extracto lipídico crudo que contenía lípidos, pigmentos y otros compuestos extraídos.

La purificación de los lípidos se llevó a cabo mediante un método modificado basado en lo reportado por Ferreira *et al*. (2022). Para ello, el extracto crudo se redisolvió en un volumen reducido de cloroformo. Se preparó una columna de adsorción utilizando una bureta de vidrio como soporte, empacada con una mezcla de sílica gel y carbón activado en una relación 1:5, previamente homogeneizada con cloroformo, con una relación total sílica gel: carbón activado de 1:5, para facilitar su acondicionamiento.

La columna fue inicialmente humedecida con cloroformo y se mantuvo cerrada para permitir el asentamiento del lecho adsorbente. Posteriormente, se permitió la salida del exceso de solvente y se procedió a la aplicación del extracto en la parte superior de la columna. La elución se llevó a cabo mediante la adición controlada de cloroformo, permitiendo el desplazamiento de la muestra a través del lecho adsorbente.

Durante este proceso, los compuestos pigmentados y otras impurezas fueron retenidos preferentemente por la sílica gel y el carbón activado, mientras que la fracción lipídica, compuesta principalmente por lípidos neutros, fue arrastrada por el solvente y recuperada en el eluato. El procedimiento continuó

hasta observar un cambio de coloración en la columna, indicativo del avance de los pigmentos a través del sistema.

Finalmente, las fracciones recolectadas se concentraron mediante la evaporación del cloroformo, obteniéndose un extracto lipídico purificado con menor contenido de compuestos interferentes. Este método se basó en un mecanismo de adsorción selectiva, donde la separación ocurrió en función de la afinidad de los compuestos hacia los materiales presentes en la columna, obteniendo un extracto lipídico purificado como se puede observar en la figura 2.

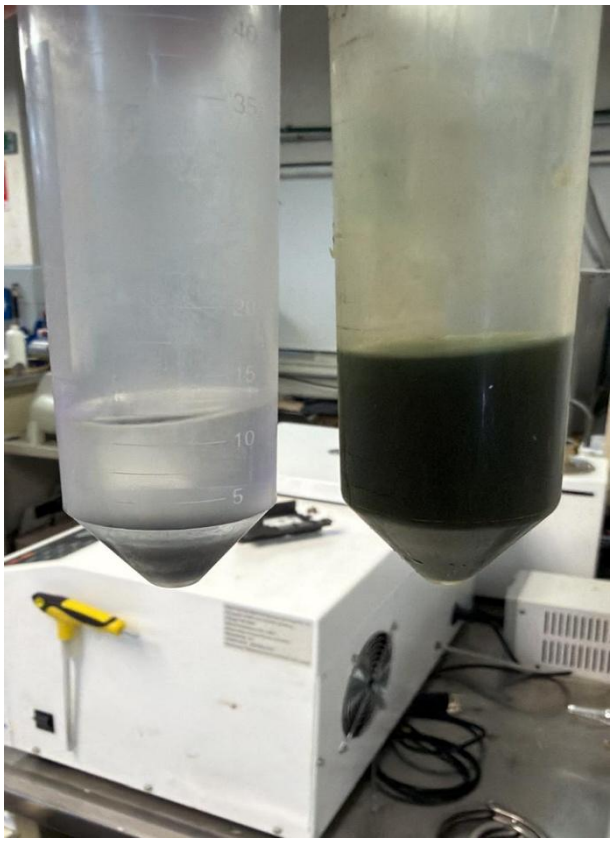


Figura 2. A) Muestra de extracto después de aplicar la purificación del extracto; B) Muestra de extracto antes de purificar.

6.2.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software Design-Expert®. Se ajustó un modelo polinómico de segundo orden para describir la relación entre las variables independientes y las variables de respuesta. El

análisis de varianza permitió determinar la significancia estadística del modelo, de los efectos principales, de las interacciones y de los términos cuadráticos.

Se consideraron significativos aquellos efectos con valores de $p < 0.05$. La calidad del ajuste fue evaluada mediante los coeficientes R^2 y R^2 ajustado, así como mediante la prueba de falta de ajuste cuando correspondió. A partir de los modelos obtenidos, se generaron superficies de respuesta y gráficas de contorno, con el propósito de identificar las condiciones óptimas para maximizar la producción de biomasa y el contenido lipídico.

6.3 Fase 3. Aplicación del extracto lipídico en helado

6.3.1 Formulación del helado por tratamiento

La aplicación del extracto lipídico de *Chlorella vulgaris* se realizó mediante su incorporación en una matriz alimentaria tipo helado vegetal a base de lechada de soya. Para ello, se elaboraron cuatro tratamientos: un tratamiento control sin extracto lipídico y tres tratamientos adicionados con diferentes concentraciones de extracto.

La formulación se muestra en el Cuadro 4, donde la base fue de 500 g por tratamiento. Todos los tratamientos mantuvieron constantes las cantidades de leche de soya, endulzante, grasa vegetal, estabilizante, emulsionante y saborizante. La única variable modificada fue la concentración del extracto lipídico de *Chlorella vulgaris*, incorporado en proporciones de 1, 2 y 3 %, equivalentes a 5, 10 y 15 mL, respectivamente.

Cuadro 4. Formulación de helado con adición de extracto lipídico

Componente	Control (g)	T1 (g)	T2 (g)	T3 (g)
Leche de soya	354	354	354	354
Endulzante	81	81	81	81
Grasa vegetal	40	40	40	40
Estabilizante	1.5	1.5	1.5	1.5
Emulsionante	1.5	1.5	1.5	1.5
Saborizante	22	22	22	22
Extracto lipídico	0	5 mL (1%)	10 mL (2%)	15 mL (3 %)
Total	500	500	500	500

Control: formulación de tratamiento control al cual no se le agregó extracto; T1: formulación de tratamiento 1 al cual se le agregó 1% de extracto lipídico; T2: formulación de tratamiento 2 al cual se le agregó 2% de extracto lipídico; T3: formulación de tratamiento 3 al cual se le agregó 3% de extracto lipídico.

El tratamiento control correspondió a la formulación base de helado vegetal sin adición de extracto lipídico de *Chlorella vulgaris*. Este tratamiento fue utilizado como referencia para comparar los cambios generados por la incorporación del extracto en las formulaciones experimentales.

El tratamiento T1 fue elaborado con la formulación base adicionada con 5 mL de extracto lipídico, correspondiente a una concentración de 1%. El tratamiento T2 fue formulado con 10 mL de extracto lipídico, equivalente a 2 %. Finalmente, el tratamiento T3 contuvo 15 mL de extracto lipídico, correspondiente a 3 %.

La comparación entre tratamientos permitió analizar el efecto de la concentración del extracto lipídico sobre las características del helado vegetal. Esta evaluación fue importante para determinar si el extracto podía incorporarse en la matriz sin afectar negativamente la calidad del producto, principalmente en atributos como color, sabor, aceptación sensorial, comportamiento de

derretimiento y propiedades fisicoquímicas.

6.3.2 Elaboración del helado vegetal

La elaboración del helado inició con la obtención de la lechada de soya. Para ello, los granos de soya fueron clasificados y limpiados, retirando impurezas, granos dañados o materiales extraños. Posteriormente, los granos fueron sometidos a remojo en agua potable durante el tiempo necesario para favorecer su hidratación y ablandamiento.

Después del remojo, los granos hidratados fueron escaldados mediante tratamiento térmico con agua caliente. Esta etapa permitió reducir compuestos indeseables, mejorar la textura del grano y facilitar el proceso posterior de molienda. Una vez finalizado el escaldado, los granos fueron enjuagados para retirar residuos superficiales y disminuir posibles sabores no deseados.

La soya hidratada y escaldada fue molida con agua hasta obtener una suspensión homogénea. Posteriormente, la mezcla fue filtrada para separar la fracción líquida, correspondiente a la lechada de soya, de los residuos sólidos. La lechada obtenida fue sometida a pasteurización con el propósito de reducir la carga microbiana y mejorar la estabilidad sanitaria de la materia prima. Finalmente, la lechada fue envasada y almacenada bajo refrigeración hasta su utilización en la formulación del helado.

Para la elaboración del helado, la lechada de soya fue calentada y mezclada con los ingredientes de la formulación. Primero se incorporaron los componentes secos y líquidos de la base, incluyendo el endulzante, la grasa vegetal, el estabilizante, el emulsionante y el saborizante. La mezcla se mantuvo bajo agitación mediante un vortex mixer (MI0101002, FOUR E´S SCIENTIFIC) para favorecer la integración uniforme de los ingredientes y evitar la formación de grumos.

Posteriormente, se agregó el extracto lipídico de *Chlorella vulgaris* de acuerdo con la concentración correspondiente a cada tratamiento. En el caso del tratamiento control, no se adicionó extracto. La incorporación del extracto se realizó durante el mezclado, procurando una distribución homogénea dentro de la matriz. Esta etapa fue importante debido a la naturaleza lipídica del extracto, ya que una dispersión inadecuada podía generar separación de fases o distribución irregular del ingrediente funcional.

Una vez incorporados todos los ingredientes, la mezcla fue procesada en una máquina para helado (NC301LAA, Ninja Creami). Durante esta etapa se favoreció la congelación parcial, la incorporación de aire y la formación de la estructura característica del producto. El helado obtenido fue colocado en recipientes limpios y posteriormente almacenado bajo congelación hasta el momento de su análisis.

Todas las formulaciones fueron elaboradas bajo el mismo procedimiento, manteniendo constantes las condiciones de preparación, mezclado, procesamiento y almacenamiento. Esto permitió que las diferencias observadas entre tratamientos pudieran atribuirse principalmente a la concentración del extracto lipídico incorporado.

6.3.3 Evaluación fisicoquímica del helado

La evaluación fisicoquímica se realizó con el propósito de determinar el efecto de la adición del extracto lipídico de *Chlorella vulgaris* sobre las características básicas del helado vegetal. Las variables consideradas fueron humedad, cenizas, pH, gravedad específica, color y °Brix.

La humedad fue determinada de acuerdo con el método AOAC 925.10. Esta variable permitió conocer el contenido de agua presente en el helado y evaluar si la incorporación del extracto modificó la proporción de sólidos y agua en la matriz. Para su determinación, una cantidad definida de muestra fue

sometida a secado bajo una estufa a 105 °C (40 GC Lab Oven, QUINCY LAB INC.) en condiciones controladas hasta alcanzar peso constante.

El resultado fue expresado como porcentaje de humedad y se obtuvo con la siguiente ecuación 3:

(3)

$$HUMEDAD: \frac{W_1 - W_2}{W_1} * 100\%$$

donde W_1 es el peso de la muestra húmeda (g); W_2 es el peso de la muestra seca (g).

El contenido de cenizas fue determinado mediante el método AOAC 923.03. Esta variable permitió estimar el contenido mineral total presente en el producto. Para ello, la muestra fue sometida a incineración en mufla (THERMOLYNE, THERMO SCIENTIFIC) a 550 °C hasta obtener un residuo inorgánico estable. El resultado se expresó como porcentaje de cenizas respecto a la muestra analizada y se calculó mediante la ecuación 4:

(4)

$$Cenizas = \frac{W_2}{W_1} * 100\%$$

donde W_1 es el peso de la muestra húmeda (g); W_2 es el peso de la muestra seca (g).

El pH fue determinado mediante potenciómetro, siguiendo el método AOAC 981.12. Esta variable permitió evaluar la acidez o alcalinidad del helado vegetal. Antes de realizar la medición, el equipo se calibró con soluciones buffer apropiadas. De acuerdo con el procedimiento establecido, se leyó directamente la muestra o una dispersión homogénea del helado.

La gravedad específica se determinó mediante el método AOAC 925.22 para establecer la relación entre la densidad del helado o de la mezcla y la del

agua, permitiendo identificar cambios físicos asociados con la formulación y la incorporación de aire.

El color se evaluó mediante el sistema CIELAB, registrando los valores L*, a* y b*, correspondientes a luminosidad y a los ejes verde-rojo y azul-amarillo, respectivamente. Esta medición permitió detectar posibles cambios visuales ocasionados por el extracto lipídico de *Chlorella vulgaris*.

Por su parte, los °Brix se determinaron por refractometría según el método AOAC 983.17, con el fin de estimar el contenido de sólidos solubles, principalmente azúcares y otros solutos presentes en la formulación.

6.3.4 Evaluación de propiedades tecnológicas del helado

Las propiedades tecnológicas evaluadas fueron overrun e índice de derretimiento. Estas variables permitieron conocer el comportamiento físico del helado durante el procesamiento y durante su exposición a condiciones de temperatura superiores a la de congelación.

El overrun fue determinado con base en lo reportado por Akalın *et al*. (2008). Esta variable representó el porcentaje de aire incorporado al helado durante el proceso de batido y congelación. Para su cálculo, se comparó el peso de un volumen definido de mezcla base antes del procesamiento con el peso del mismo volumen de helado después del procesamiento. El resultado fue expresado como porcentaje de overrun.

El cálculo podrá realizarse mediante la ecuación 5:

(5)

$$Overrun = \frac{P_2 - P_1}{P_1} * 100\%$$

donde P_1 es el volumen de la mezcla (g); P_2 es el volumen del postre helado (g).

Un mayor porcentaje de overrun indicó mayor incorporación de aire, mientras que valores bajos reflejaron una menor aireación del producto. Esta variable fue relevante porque la incorporación del extracto lipídico pudo modificar la estructura de la matriz y afectar la capacidad de retención de aire.

El índice de derretimiento fue determinado con base en la metodología de Muse y Hartel (2004). Esta variable permitió evaluar la estabilidad del helado durante el derretimiento. Para su determinación, se colocó una cantidad definida de helado sobre una malla o soporte, permitiendo que la fracción derretida fuera recolectada en un recipiente durante un tiempo establecido.

La masa o volumen de helado derretido fue registrado en intervalos de tiempo definidos. Los resultados se expresaron como porcentaje de muestra derretida en función del tiempo o como tasa de derretimiento. Esta variable permitió comparar la estabilidad de los tratamientos y determinar si la concentración del extracto lipídico modificó el comportamiento del helado frente al derretimiento. Su valor se obtuvo con la ecuación 6:

(6)

$$\text{Índice de derretimiento} = \frac{A_1 - A_2}{A_1}$$

donde A_1 y A_2 son el peso de la muestra inicial y del postre helado derretido, respectivamente (g).

6.3.5 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial se realizó con 20 panelistas semientrenados, siguiendo como referencia la metodología descrita por Meilgaard et al. (2016). Antes de la evaluación, los participantes recibieron una explicación sobre el objetivo de la prueba, los atributos sensoriales que debían evaluar y la forma correcta de utilizar la escala hedónica. Asimismo, se familiarizaron previamente con los conceptos de apariencia, color, olor, sabor, textura, cremosidad y

aceptación general, con la finalidad de disminuir diferencias en la interpretación de los atributos.

Antes de iniciar la prueba, se indicó a los panelistas que evitaran consumir alimentos, fumar, mascar chicle o utilizar productos con aromas intensos que pudieran interferir con su percepción sensorial. También se les solicitó no utilizar el teléfono celular ni comunicarse con los demás participantes durante la evaluación. Entre cada muestra, se proporcionó agua para realizar la limpieza del paladar y reducir la influencia de la muestra evaluada previamente.

Las muestras fueron codificadas con números aleatorios de tres dígitos y presentadas en porciones uniformes. El orden de presentación se aleatorizó para reducir el efecto ocasionado por la secuencia de evaluación. Los panelistas calificaron los atributos de apariencia, color, olor, sabor, textura, cremosidad y aceptación general mediante una escala hedónica de 9 puntos.

La evaluación sensorial permitió determinar la aceptación del helado vegetal adicionado con extracto lipídico de *Chlorella vulgaris* y comparar los tratamientos con el control. La prueba fue relevante debido a que el extracto lipídico microalgal pudo influir en las características sensoriales del producto, principalmente en el color, el olor y el sabor. De esta manera, fue posible identificar la concentración con mayor aceptación y determinar si la adición del extracto modificó positiva o negativamente la percepción de los panelistas.

Los resultados se organizaron de acuerdo con el tratamiento y el atributo evaluado. Posteriormente, se analizaron estadísticamente para determinar si existieron diferencias significativas entre el control y los tratamientos adicionados con extracto lipídico.

6.3.6 Diseño experimental y análisis estadístico de la fase de aplicación

La evaluación de las variables del helado se realizó mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA), considerando como factor de estudio la concentración del extracto lipídico de *Chlorella vulgaris* incorporado en la formulación. Los tratamientos fueron: control sin extracto, T1 con 1 % de extracto, T2 con 2 % de extracto y T3 con 3 % de extracto.

Cada tratamiento fue evaluado por triplicado, considerando n = 3 para las variables fisicoquímicas y tecnológicas. Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante el software Minitab.

Se aplicó análisis de varianza para determinar si existieron diferencias significativas entre tratamientos. Cuando se presentaron diferencias significativas, se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey, considerando un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Este análisis permitió identificar si la concentración del extracto lipídico tuvo un efecto significativo sobre las propiedades evaluadas en el helado vegetal, así como determinar qué tratamientos presentaron diferencias entre sí.

7 RESULTADOS

7.1 Fase 1. Optimización de la extracción lipídica asistida por ultrasonido

7.1.1 Rendimiento lipídico obtenido por extracción asistida por ultrasonido

La extracción lipídica asistida por ultrasonido presentó rendimientos variables entre las corridas experimentales evaluadas. Los valores obtenidos oscilaron entre 5.38 y 12.32 % de lípidos extraídos respecto a la biomasa seca utilizada.

En el Cuadro 5 se muestran los valores de las corridas generadas por el software, donde se observa que el menor rendimiento lipídico se presentó en la corrida 7, correspondiente a 20 % de amplitud, 5 min de sonicación y relación hexano de 4:1, con un rendimiento de 5.38 %. El mayor rendimiento se obtuvo en la corrida 12, con 30 % de amplitud, 15 min de sonicación y relación hexano de 3:1, alcanzando un rendimiento de 12.32 %.

Cuadro 5. Diseño experimental para la extracción de lípidos y porcentaje obtenido.

Corrida	Amplitud (%)	Tiempo (min)	Relación (v/v)	Lípidos (%)
1	20	5	2	10.86
2	20	10	3	9.96
3	10	10	2	10.49
4	30	10	2	11.42
5	30	10	4	11.12
6	30	5	3	11.18
7	20	5	4	5.38
8	10	10	4	8.28
9	20	15	4	9.63
10	10	15	3	9.66
11	20	10	3	9.77
12	30	15	3	12.32
13	20	10	3	10.22
14	20	10	3	9.7
15	10	5	3	9.88
16	20	10	3	9.49
17	20	15	2	10.12

7.1.2 Análisis de varianza (ANOVA) del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de la amplitud, el tiempo y la relación de extracción

En el Cuadro 6 se muestra el análisis de varianza, el cual indicó que el modelo cuadrático elaborado para describir la obtención de lípidos fue estadísticamente significativo ($F = 7.25$; $p = 0.0080$). Esto sugiere que las variables estudiadas explicaron una parte importante de la variación observada en la respuesta. En comparación con una suma de cuadrados residual de 3.93, el modelo alcanzó una suma de cuadrados de 36.60, lo que evidenció una contribución notable de los términos incluidos en la ecuación al comportamiento experimental del sistema.

Cuadro 6. ANOVA para el modelo de superficie de respuesta de lípidos.

Fuente	SC	gl	CM	Valor F	Valor p
Modelo	36.60	9	4.07	7.25	0.0080
A-Amplitud	7.92	1	7.92	14.12	0.0071
B–Tiempo	0.8128	1	0.8128	1.45	0.2677
C–Relación	12.83	1	12.83	22.87	0.0020
AB	0.3192	1	0.3192	0.5692	0.4752
AC	0.9120	1	0.9120	1.63	0.2429
BC	2.79	1	2.79	4.97	0.0610
A^2	7.26	1	7.26	12.94	0.0088
B^2	0.7767	1	0.7767	1.39	0.2777
C^2	3.56	1	3.56	6.35	0.0398
Residual	3.93	7	0.5608	—	—
Falta de ajuste	3.46	3	1.15	9.84	0.0256
Error puro	0.4683	4	0.1171	—	—
Total corregido	40.52	16	—	—	—

En cuanto a los efectos principales, la amplitud (A) presentó un efecto significativo sobre la obtención de lípidos ($F = 14.12$; $p = 0.0071$) y aportó una suma de cuadrados de 7.92. La relación de extracción (C) presentó un efecto altamente significativo sobre la respuesta ($F = 22.87$; $p = 0.0020$) y fue el factor con mayor contribución individual, con una suma de cuadrados de 12.83. En cambio, el tiempo de extracción (B) no mostró un efecto significativo ($F = 1.45$; $p = 0.2677$). Las interacciones AB, AC y BC tampoco fueron significativas ($p > 0.05$), aunque BC presentó la mayor tendencia de interacción ($F = 4.97$; $p = 0.0610$). Entre los términos cuadráticos, A^2 tuvo un efecto significativo ($F = 12.94$; $p = 0.0088$), indicando curvatura en la respuesta. Asimismo, C^2 resultó significativo ($F = 6.35$; $p = 0.0398$), lo que confirmó un comportamiento no lineal dentro del intervalo experimental evaluado. En cambio, el término cuadrático del tiempo (B^2) no mostró significancia estadística ($F = 1.39$; $p = 0.2777$).

La prueba de falta de ajuste resultó significativa (F = 9.84; p = 0.0256), lo que indicó diferencias entre las predicciones del modelo y los valores experimentales y sugirió que este no explicó completamente la variabilidad del sistema. El error puro presentó una suma de cuadrados de 0.4683, asociada con la variación entre las réplicas. En general, la obtención de lípidos estuvo influida principalmente por la amplitud y la relación de extracción, cuyos términos cuadráticos también fueron significativos, evidenciando un comportamiento no lineal. En contraste, el tiempo de extracción no presentó una contribución estadísticamente significativa bajo las condiciones evaluadas.

7.1.3 Ecuación del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de la amplitud, el tiempo y la relación de extracción

La ecuación 7 de regresión polinómica de segundo orden, obtenida para el porcentaje de lípidos, muestra la relación de la respuesta con la amplitud (A), el tiempo (B) y la relación de extracción (C), e incluye efectos lineales, interacciones de segundo orden y términos cuadráticos. En el punto central del diseño experimental, el intercepto del modelo fue de 15.36875, valor que correspondió a la respuesta estimada.

(7)

$$Lípidos\ (\%) = 15.36875 - 0.62545A - 0.20665B + 1.62575C + .00565AB + 0.04775AC + 0.16700BC + 0.01313A^2 - 0.01718B^2 - 0.91950C^2$$

donde:

A = Amplitud
B = Tiempo
C = Relación

En relación con los coeficientes lineales, la amplitud y el tiempo presentaron efectos negativos sobre la respuesta, con valores de −0.62545 y −0.20665, respectivamente. Dentro del intervalo experimental analizado, esto

sugirió que el aumento de estas variables tendió a disminuir el porcentaje de lípidos estimado por el modelo. En contraste, la relación de extracción mostró un coeficiente lineal positivo de 1.62575, lo que indicó una contribución favorable a la obtención de lípidos y, en comparación con los demás efectos lineales de la ecuación, una influencia relativa mayor sobre la respuesta.

Por otro lado, los términos AB, AC y BC representaron las interacciones entre factores, con coeficientes de 0.00565, 0.04775 y 0.16700, respectivamente. Dado que todos presentaron signo positivo, la combinación simultánea de los factores implicados favoreció el valor predicho de la respuesta. Entre ellos, el término BC tuvo el coeficiente de mayor magnitud, lo que sugirió una contribución más marcada de la interacción entre el tiempo y la relación de extracción dentro de la estructura matemática del modelo.

La curvatura en la superficie de respuesta pudo explicarse mediante los términos cuadráticos. Para A^2, el coeficiente fue positivo (0.01313), lo que indicó una ligera curvatura ascendente asociada con la amplitud. En cambio, B^2 y C^2 presentaron coeficientes negativos de −0.01718 y −0.91950, respectivamente, lo que evidenció una curvatura descendente en estas variables. La magnitud del coeficiente de C^2 fue mucho mayor que la de los demás términos cuadráticos, lo que indicó que la relación de extracción tuvo una influencia importante sobre la forma de la superficie de respuesta y sobre el comportamiento no lineal del porcentaje de lípidos dentro del dominio experimental evaluado.

En conjunto, la estructura matemática de la ecuación indicó que la respuesta dependió de la contribución conjunta de efectos lineales, interacciones entre factores y componentes cuadráticos, lo que dio lugar a una superficie de respuesta con comportamiento no lineal. Así, la presencia de coeficientes positivos y negativos mostró que la variación del porcentaje de lípidos estuvo determinada tanto por efectos de incremento como de reducción vinculados con los distintos factores y sus combinaciones dentro del rango experimental

considerado.

7.1.4 Efecto de la amplitud ultrasónica y la relación hexano:etanol

Como se observa en la Figura 3, la superficie de respuesta mostró el efecto combinado de la amplitud ultrasónica y la relación hexano sobre el porcentaje de lípidos extraídos de *Chlorella vulgaris*. El rendimiento lipídico aumentó conforme se incrementó la amplitud ultrasónica, observándose los valores más bajos en amplitudes cercanas al 10 % y los mayores rendimientos en la región próxima al 30 %.

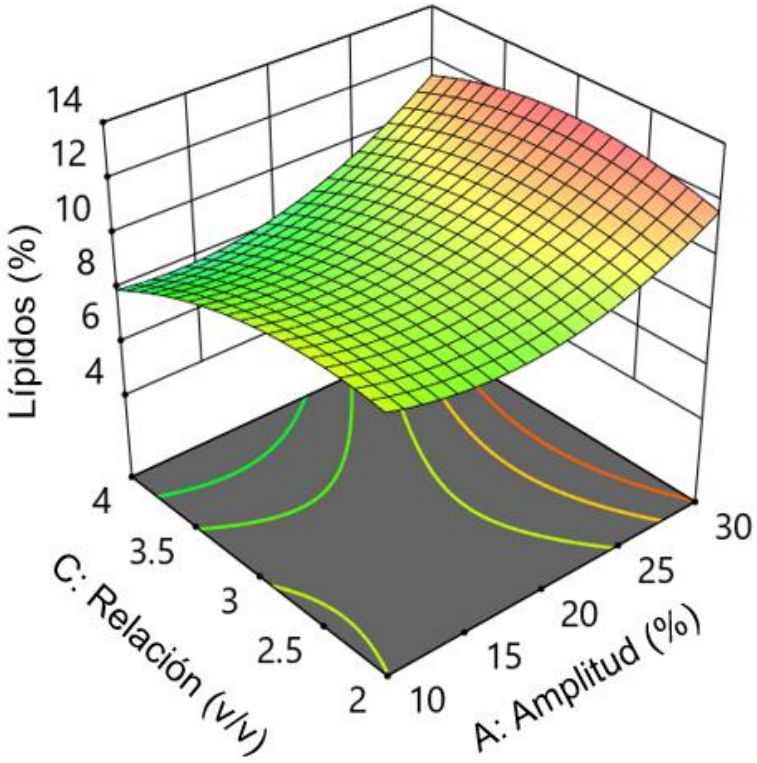


Figura 3. Superficie de respuesta para amplitud y relación sobre la respuesta de lípidos.

Asimismo, la relación hexano presentó un comportamiento curvilíneo, ya que los mayores porcentajes de extracción no se ubicaron en los extremos evaluados, sino en una zona intermedia cercana a la relación 3:1. Esto indicó que una proporción balanceada entre hexano y etanol favoreció la recuperación de lípidos. En conjunto, la Figura 3 muestra que la mejor región de extracción se

localizó con alta amplitud ultrasónica y una relación hexano intermedia, condiciones asociadas con una mayor recuperación lipídica.

7.1.5 Efecto de la amplitud ultrasónica y el tiempo de sonicación

En la Figura 4 se presenta la superficie de respuesta correspondiente al efecto combinado de la amplitud ultrasónica y el tiempo de sonicación sobre el porcentaje de lípidos extraídos, manteniendo constante la relación hexano en 3:1. Se observó que el rendimiento lipídico tendió a incrementarse cuando la amplitud aumentó, especialmente en la región cercana al 30 %, donde se concentraron los valores más altos de extracción.

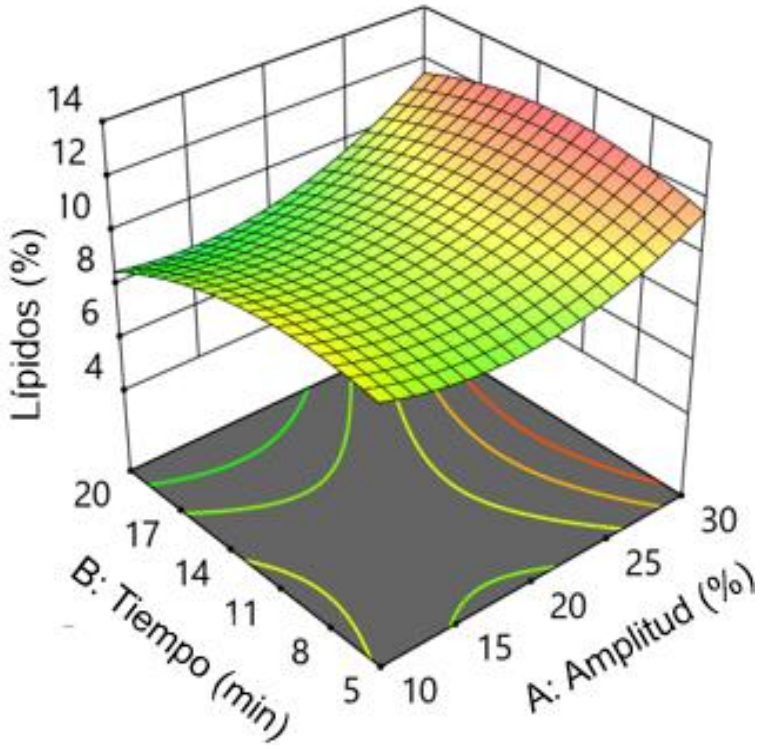


Figura 4. Superficie de respuesta para amplitud y tiempo sobre la respuesta de lípidos.

El tiempo de sonicación también mostró influencia sobre la respuesta, aunque su efecto fue más evidente cuando se combinó con amplitudes elevadas. A tiempos cortos, el porcentaje de lípidos se mantuvo en valores moderados; sin

embargo, al aumentar el tiempo hacia 15–20 min, junto con una mayor amplitud, la superficie mostró una tendencia ascendente. Esto indicó que la recuperación lipídica fue favorecida por una mayor intensidad del tratamiento ultrasónico y por una exposición más prolongada de la biomasa al proceso de sonicación.

En conjunto, se evidenció que la combinación de alta amplitud y mayor tiempo de sonicación permitió alcanzar una zona de mayor extracción lipídica, lo cual sugirió que ambas variables actuaron de manera complementaria durante la ruptura celular y la transferencia de lípidos hacia el sistema de solventes.

7.1.6 Efecto del tiempo de sonicación y la relación hexano:etanol

En la Figura 5 se muestra la superficie de respuesta correspondiente al efecto combinado del tiempo de sonicación y la relación hexano sobre el porcentaje de lípidos extraídos, manteniendo constante la amplitud ultrasónica. A diferencia de las superficies anteriores, en esta gráfica se observó un comportamiento más curvilíneo, donde los mayores porcentajes de extracción se concentraron en una región intermedia de ambas variables.

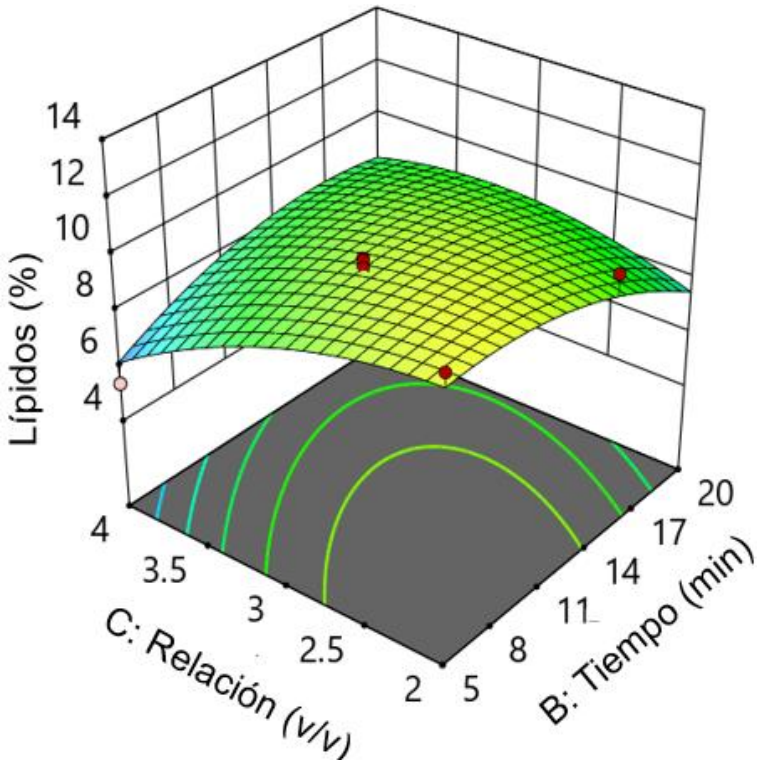


Figura 5. Superficie de respuesta para relación y tiempo sobre la respuesta de lípidos.

El rendimiento lipídico no aumentó de forma lineal con el incremento del tiempo ni con la relación de solventes. En cambio, la superficie mostró que los valores más altos se ubicaron aproximadamente entre tiempos medios a altos de sonicación y relaciones hexano cercanas a 3:1. Esto indicó que prolongar el tiempo de extracción pudo favorecer la recuperación de lípidos, pero su efecto dependió de que existiera una proporción adecuada entre ambos solventes.

Asimismo, en los extremos de la relación hexano, especialmente hacia relaciones más altas de hexano, el rendimiento tendió a disminuir. Este comportamiento indicó que el aumento de la proporción de hexano no favoreció de manera continua la extracción lipídica dentro del intervalo evaluado, por lo que la mayor recuperación se presentó en una condición intermedia de solventes. En conjunto, la Figura 5 indica que la combinación de un tiempo de sonicación adecuado y una relación hexano intermedia favoreció la obtención de mayores

porcentajes de lípidos.

7.2 Fase 2. Optimización del cultivo de *Chlorella vulgaris*

7.2.1 Rendimiento de optimización de biomasa

El Cuadro 7 presenta los resultados experimentales obtenidos para la optimización del crecimiento de *Chlorella vulgaris* mediante metodología de superficie de respuesta. Se evaluó el efecto de las concentraciones de $NaNO_3$, KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$ sobre la producción de biomasa, expresada en g/L.

Cuadro 7. Resultados experimentales del diseño de superficie de respuesta para la optimización del crecimiento de *Chlorella vulgaris.*

Corrida	$NaNO_3$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	$C_6H_{12}O_6$ (g/L)	Biomasa(g/L)
1	0.25	0.175	0.5	0.7166
2	0.25	0.175	0.5	0.7228
3	0.4	0.28	0.5	0.7491
4	0.25	0.28	0.2	0.6766
5	0.4	0.175	0.2	0.6768
6	0.4	0.07	0.5	0.6835
7	0.1	0.175	0.8	0.6687
8	0.1	0.28	0.5	0.7232
9	0.25	0.175	0.5	0.7148
10	0.25	0.07	0.8	0.6616
11	0.1	0.07	0.5	0.6817
12	0.25	0.175	0.5	0.75
13	0.25	0.175	0.5	0.7513
14	0.25	0.28	0.8	0.7804
15	0.25	0.07	0.2	0.7544
16	0.4	0.175	0.8	0.6828
17	0.4	0.175	0.2	0.6747

Los valores de biomasa obtenidos oscilaron entre 0.6616 y 0.7804 g/L, lo que indicó que las modificaciones en la composición del medio de cultivo influyeron en el crecimiento microalgal. El valor más alto se registró en la corrida 14, con 0.25 g/L de $NaNO_3$, 0.28 g/L de KH_2PO_4 y 0.8 g/L de $C_6H_{12}O_6$, alcanzando una biomasa de 0.7804 g/L. Esto sugirió que una concentración intermedia de nitrógeno, combinada con niveles altos de fósforo y carbono, favoreció la producción de biomasa.

Por el contrario, el menor valor de biomasa se obtuvo en la corrida 10, con 0.25 g/L de $NaNO_3$, 0.07 g/L de KH_2PO_4 y 0.8 g/L de $C_6H_{12}O_6$, registrándose

0.6616 g/L. Al comparar esta condición con la corrida 14, se observó que ambas mantuvieron la misma concentración de $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$, pero difirieron en la concentración de KH_2PO_4. Esto indicó que el incremento de KH_2PO_4 de 0.07 a 0.28 g/L tuvo un efecto favorable sobre la producción de biomasa bajo esas condiciones.

Las corridas centrales, correspondientes a 0.25 g/L de $NaNO_3$, 0.175 g/L de KH_2PO_4 y 0.5 g/L de $C_6H_{12}O_6$, presentaron valores entre 0.7148 y 0.7513 g/L, lo que reflejó una respuesta relativamente estable en el punto medio del diseño. En conjunto, los resultados mostraron que la mayor producción de biomasa se asoció principalmente con niveles altos de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$, mientras que concentraciones bajas de KH_2PO_4 limitaron el crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

7.2.1.1 ANOVA del modelo de superficie de respuesta para la obtención de biomasa en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

En el Cuadro 8 se muestra el análisis de varianza, el cual indicó que el modelo cuadrático planteado para describir la biomasa fue estadísticamente significativo ($F = 7.92$; $p = 0.0062$). Esto evidenció que los términos incluidos en la ecuación contribuyeron de manera importante a explicar la variabilidad observada en la respuesta. Al modelo se le asignó una suma de cuadrados de 0.0196, mientras que la suma de cuadrados residual fue de 0.0019, lo que sugirió que una parte relevante de la variación experimental quedó explicada por los factores analizados y sus efectos conjuntos.

Cuadro 8. ANOVA para el modelo de superficie de respuesta de la variable de biomasa en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

Fuente	SC	gl	CM	Valor F	Valor p
Modelo	0.0196	9	0.0022	7.92	0.0062
A–$NaNO_3$	0.0002	1	0.0002	0.6660	0.4413
B-KH_2PO_4	0.0027	1	0.0027	9.96	0.0160
C- $C_6H_{12}O_6$	3.645E-06	1	3.645-06	0.0132	0.9116
AB	0.0001	1	0.0001	0.5274	0.4913
AC	0.0001	1	0.0001	0.2813	0.6123
BC	0.0097	1	0.0097	35.10	0.0006
A^2	0.0042	1	0.0042	15.09	0.0060
B^2	0.0004	1	0.0004	1.44	0.2699
C^2	0.0021	1	0.0021	7.77	0.0270
Residual	0.0019	7	0.0003	—	—
Falta de ajuste	0.0006	3	0.0002	0.6281	0.6340
Error puro	0.0013	4	0.0003	—	—
Total corregido	0.0216	16	—	—	—

El factor B (KH_2PO_4) presentó un efecto significativo sobre la producción de biomasa (F = 9.96; p = 0.0160), indicando que su concentración influyó de manera importante en la respuesta. En contraste, A ($NaNO_3$) y C ($C_6H_{12}O_6$) no mostraron efectos lineales significativos, con valores de p de 0.4413 y 0.9116, respectivamente. Las interacciones AB y AC tampoco fueron significativas (p > 0.05). Sin embargo, la interacción BC resultó altamente significativa (F = 35.10; p = 0.0006) y representó la interacción de mayor aporte al modelo. Esto indicó que el efecto conjunto de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$ fue relevante para la producción de biomasa y que la influencia de uno dependió de la concentración del otro.

Al examinar los términos cuadráticos, A^2 resultó significativo (F = 15.09; p = 0.0060), lo que reveló la existencia de curvatura asociada a la concentración

de $NaNO_3$. El término C² presentó un efecto significativo sobre la biomasa (F = 7.77; p = 0.0270), evidenciando un comportamiento no lineal asociado con $C_6H_{12}O_6$. En contraste, B² no fue significativo (F = 1.44; p = 0.2699), lo que indicó una respuesta principalmente lineal para KH_2PO_4. La falta de ajuste tampoco fue significativa (F = 0.6281; p = 0.6340), indicando una adecuada concordancia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. El error puro presentó una suma de cuadrados de 0.0013. En conjunto, la biomasa estuvo influida principalmente por KH_2PO_4, su interacción con $C_6H_{12}O_6$ y los efectos cuadráticos de $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$, confirmando la presencia de curvatura en la respuesta dentro del intervalo experimental evaluado.

7.2.1.2 Ecuación del modelo de superficie de respuesta para la obtención de biomasa en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

En cuanto a la respuesta, la ecuación 8 de regresión polinómica de segundo orden para la biomasa representó el efecto de las concentraciones de $NaNO_3$ (A), KH_2PO_4 (B) y $C_6H_{12}O_6$ (C), e incluyó términos lineales, interacciones entre factores y componentes cuadráticos. En el punto central del diseño experimental, el intercepto del modelo fue 0.7311, valor que coincidió con la biomasa estimada.

(8)

$$Biomasa = 0.7311 + 0.0048A + 0.0185B + 0.0007C + 0.0060AB + 0.0044AC + 0.0491BC - 0.0314A^2 + 0.0097B^2 - 0.0225C^2$$

Donde:

A: $NaNO_3$

B: KH_2PO_4

C: $C_6H_{12}O_6$

Los coeficientes lineales de los tres factores fueron positivos, lo que indicó una contribución favorable sobre la producción de biomasa. KH_2PO_4 presentó el mayor coeficiente (B = 0.0185), mostrando la influencia más marcada, seguido

de $NaNO_3$ (0.0048) y $C_6H_{12}O_6$ (0.0007). Las interacciones entre factores también mostraron coeficientes positivos. La interacción KH_2PO_4 × $C_6H_{12}O_6$ (BC) presentó el valor más alto (0.0491), indicando una mayor contribución conjunta sobre la biomasa. En cambio, las interacciones AB y AC mostraron coeficientes menores, de 0.0060 y 0.0044, respectivamente, aunque también se asociaron con un incremento de la respuesta estimada.

En la superficie de respuesta, los términos cuadráticos mostraron la presencia de curvatura. Para la concentración de $NaNO_3$, el coeficiente asociado a A^2 fue negativo (-0.0314), lo que indicó una curvatura descendente. De manera similar, el término C^2 presentó un coeficiente negativo (-0.0225), lo cual pudo señalar una disminución progresiva de la respuesta cuando la concentración de $C_6H_{12}O_6$ se alejó de la región central del diseño experimental. En contraste, el término B^2 exhibió un coeficiente positivo (0.0097), que reflejó una curvatura ascendente asociada a la concentración de KH_2PO_4.

Dentro de la estructura matemática del modelo, la magnitud de los coeficientes indicó que la interacción BC fue uno de los componentes de mayor peso, seguida por los términos cuadráticos de $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$. Así, el comportamiento de la biomasa no dependió solo de los efectos individuales de los factores, sino también de su interacción y de las relaciones no lineales representadas por los términos cuadráticos.

7.2.1.3 Efecto de la $NaNO_3$ y el KH_2PO_4

En la figura 6 se observa el efecto combinado de $NaNO_3$ y KH_2PO_4 sobre la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*. La superficie muestra una respuesta curvilínea, lo que indicó que el crecimiento microalgal estuvo influido por la interacción entre ambas fuentes nutricionales.

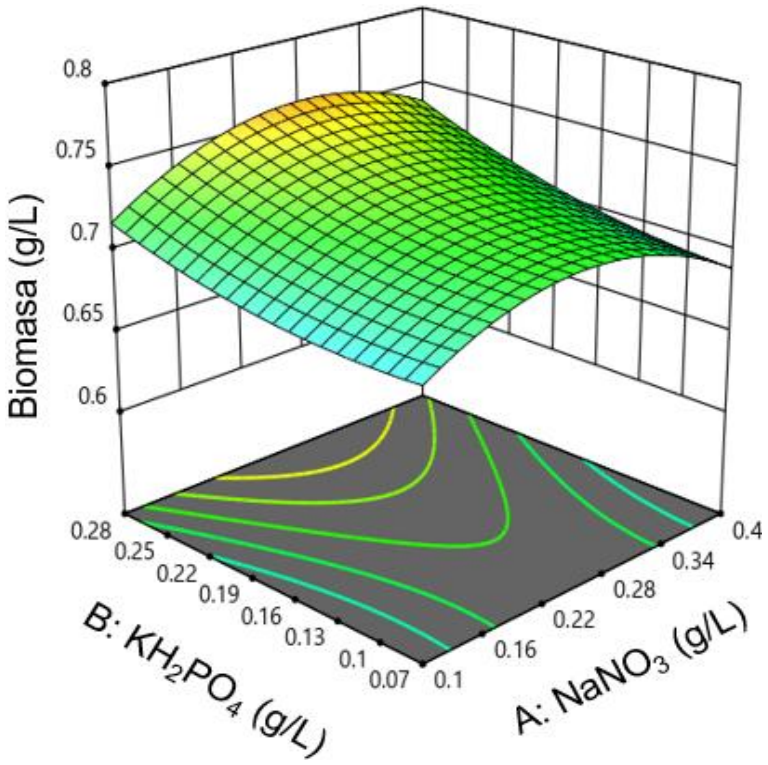


Figura 6. Efecto de $NaNO_3$ y KH_2PO_4 sobre la biomasa de *Chlorella vulgaris*.

Los mayores valores de biomasa se ubicaron hacia concentraciones intermedias de $NaNO_3$ y niveles altos de KH_2PO_4, alcanzando valores cercanos a 0.78 g/L. Este comportamiento sugirió que el incremento de KH_2PO_4 favoreció la producción de biomasa, especialmente cuando la concentración de $NaNO_3$ se mantuvo en un nivel medio.

Por otro lado, las zonas con menor biomasa se observaron hacia concentraciones bajas de KH_2PO_4, lo que coincidió con los resultados experimentales, donde el menor valor de crecimiento se obtuvo con 0.07 g/L de KH_2PO_4. Esto indicó que una baja disponibilidad de fósforo pudo limitar el desarrollo celular bajo las condiciones evaluadas.

En general, los resultados mostraron que la producción de biomasa fue favorecida por una combinación equilibrada entre $NaNO_3$ y KH_2PO_4, destacando la importancia del fósforo en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* dentro del diseño

experimental.

7.2.1.4 Efecto del $NaNO_3$ y la relación $C_6H_{12}O_6$.

En la figura 7 se muestra el efecto combinado de $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$ sobre la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*. La superficie presenta una forma curvilínea, con una zona central más elevada, lo que indicó que la mayor producción de biomasa se obtuvo en condiciones intermedias de $NaNO_3$ combinadas con niveles medios a altos de $C_6H_{12}O_6$.

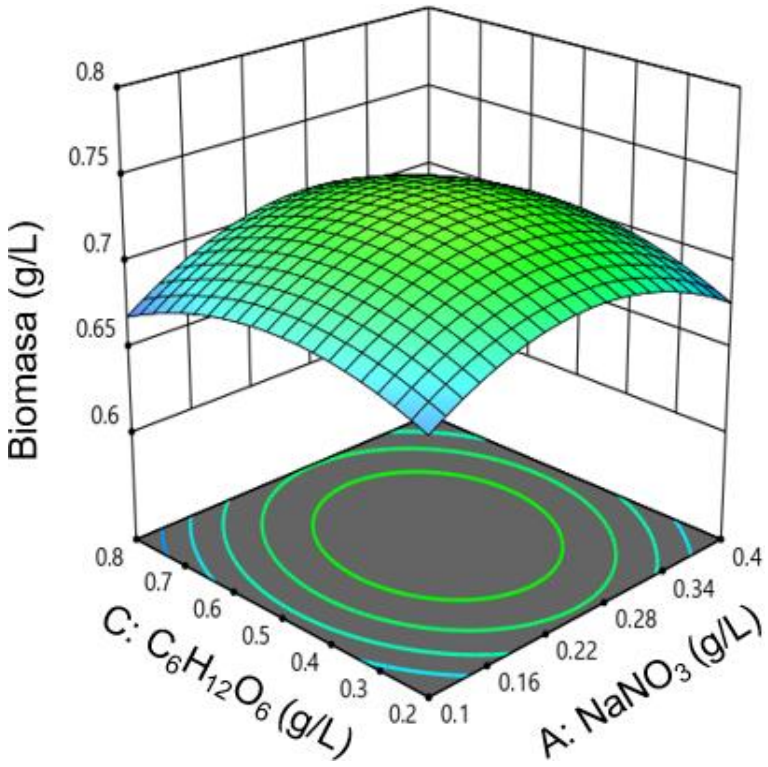


Figura 7. Efecto de $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$. sobre la biomasa de Chlorella vulgaris.

La biomasa tendió a disminuir en los extremos de las variables evaluadas, especialmente cuando la concentración de $C_6H_{12}O_6$ fue baja. Esto sugirió que una baja disponibilidad de carbono limitó el crecimiento microalgal, aun cuando se modificara la concentración de $NaNO_3$. Por otro lado, el incremento excesivo de $NaNO_3$ tampoco generó un aumento proporcional en la biomasa, lo que indicó que el nitrógeno presentó un rango óptimo dentro del diseño experimental.

En general, los resultados mostraron que la producción de biomasa fue favorecida por una combinación equilibrada entre la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono. La zona de mayor respuesta se ubicó cerca del punto medio de $NaNO_3$ y hacia concentraciones elevadas de $C_6H_{12}O_6$, lo que coincidió con la condición óptima propuesta por el modelo para maximizar el crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

7.2.1.5 Efecto del KH_2PO_4 y la relación $C_6H_{12}O_6$.

En la figura 8 se presenta el efecto combinado de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$ sobre la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris*. La superficie muestra una respuesta ascendente hacia la región donde ambas variables se encuentran en niveles altos, lo que indicó que la producción de biomasa fue favorecida por el incremento conjunto de la fuente de fósforo y la fuente de carbono.

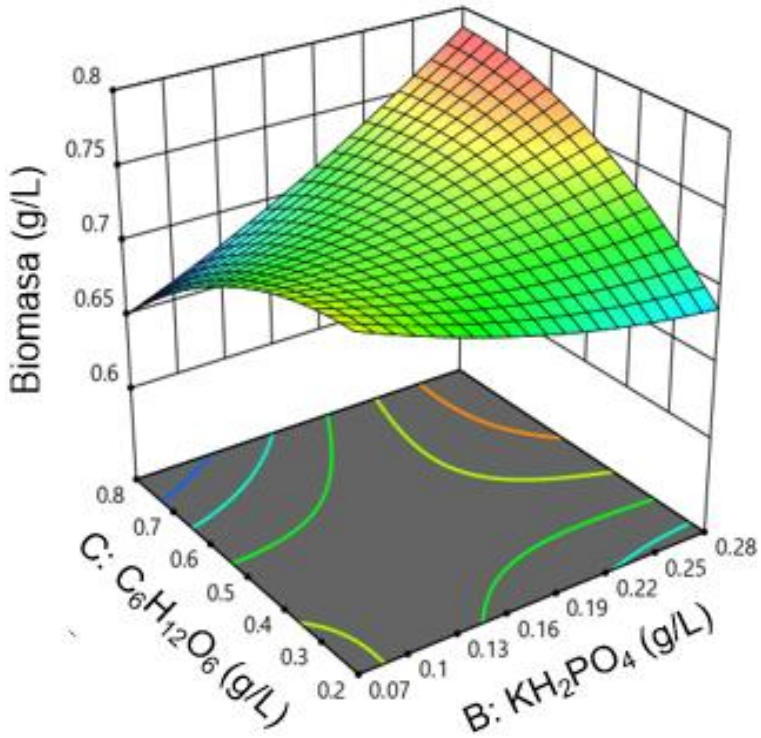


Figura 8. Efecto de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$. sobre la biomasa de *Chlorella vulgaris.*

Los mayores valores de biomasa se observaron cerca de 0.28 g/L de KH_2PO_4 y 0.8 g/L de $C_6H_{12}O_6$, alcanzando valores próximos a 0.78 g/L. Este comportamiento coincidió con la corrida experimental donde se obtuvo la mayor producción de biomasa, lo que sugirió que la disponibilidad simultánea de fósforo y carbono fue importante para favorecer el crecimiento microalgal.

Por el contrario, las zonas con menor respuesta se ubicaron hacia concentraciones bajas de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$, donde la biomasa se mantuvo cercana a valores de 0.65–0.68 g/L. Esto indicó que la baja disponibilidad de estos nutrientes pudo limitar el crecimiento de *Chlorella vulgaris* bajo las condiciones evaluadas.

En general, los resultados mostraron que la producción de biomasa fue favorecida por niveles altos de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$, destacando que el crecimiento celular dependió del balance entre la fuente de fósforo y la fuente de carbono dentro del medio de cultivo.

7.2.2 Rendimiento de optimización de Lípidos

El Cuadro 9 muestra los resultados del contenido lipídico obtenido en *Chlorella vulgaris* bajo diferentes combinaciones de $NaNO_3$, KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$ evaluadas mediante el diseño experimental. Los valores de lípidos oscilaron entre 12.66 % y 19.27 %, lo que evidenció que la composición del medio de cultivo influyó en la acumulación lipídica de la microalga.

Cuadro 9. Resultados experimentales del diseño de superficie de respuesta para la optimización de lípidos en la microalga *Chlorella vulgaris*.

Corrida	$NaNO_3$ (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	$C_6H_{12}O_6$ (g/L)	Lípidos (%)
1	0.25	0.175	0.5	16.31
2	0.25	0.175	0.5	16.47
3	0.4	0.28	0.5	15.99
4	0.25	0.28	0.2	15.89
5	0.4	0.175	0.2	18.39
6	0.4	0.07	0.5	12.66
7	0.1	0.175	0.8	19.27
8	0.1	0.28	0.5	15.48
9	0.25	0.175	0.5	16.03
10	0.25	0.07	0.8	16.08
11	0.1	0.07	0.5	16.07
12	0.25	0.175	0.5	15.64
13	0.25	0.175	0.5	16.29
14	0.25	0.28	0.8	15.63
15	0.25	0.07	0.2	16.58
16	0.4	0.175	0.8	14.23
17	0.4	0.175	0.2	16.61

El mayor contenido lipídico se obtuvo en la corrida 7, con 0.10 g/L de $NaNO_3$, 0.175 g/L de KH_2PO_4 y 0.80 g/L de $C_6H_{12}O_6$, alcanzando un valor de 19.27 %. Esto indicó que una menor concentración de nitrógeno, combinada con una concentración alta de $C_6H_{12}O_6$, favoreció la acumulación de lípidos en *Chlorella vulgaris*.

Por el contrario, el menor contenido lipídico se registró en la corrida 6, con 0.40 g/L de $NaNO_3$, 0.07 g/L de KH_2PO_4 y 0.50 g/L de $C_6H_{12}O_6$, obteniéndose 12.66 % de lípidos. Este resultado sugirió que una concentración elevada de nitrógeno, junto con una baja concentración de fósforo, no favoreció la

acumulación lipídica bajo las condiciones evaluadas.

Las corridas centrales, correspondientes a 0.25 g/L de $NaNO_3$, 0.175 g/L de KH_2PO_4 y 0.50 g/L de $C_6H_{12}O_6$, mostraron valores bastante constantes, entre 15.64 % y 16.47 %, lo que sugirió una respuesta estable en el punto medio del diseño experimental. En conjunto, los resultados mostraron que la acumulación de lípidos fue mayor al reducirse la concentración de $NaNO_3$ y al aumentarse la de $C_6H_{12}O_6$, con lo que se destacó la importancia del balance entre la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono en la producción lipídica de *Chlorella vulgaris*.

7.2.2.1 ANOVA del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

En el Cuadro 10 se presenta el ANOVA del modelo de superficie de respuesta para la producción de lípidos. El modelo fue estadísticamente significativo (F = 9.51; p = 0.0036), lo que indicó que la regresión representó de manera adecuada la relación entre las variables independientes evaluadas y la respuesta obtenida. Entre los efectos lineales, únicamente el nitrato de sodio (A = $NaNO_3$) presentó un efecto significativo sobre la producción de lípidos (F = 14.43; p = 0.0067), lo que evidenció que la concentración de la fuente nitrogenada fue un factor decisivo en la respuesta. En contraste, los efectos lineales de KH_2PO_4 (p = 0.3712) y $C_6H_{12}O_6$ (p = 0.1853) no alcanzaron significancia estadística, por lo que su contribución individual al modelo no fue relevante.

Cuadro 10. ANOVA para el modelo de superficie de respuesta de la variable de lípidos en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

Fuente	SC	gl	CM	Valor F	Valor p
Modelo	30.00	9	3.33	9.51	0.0036
A – $NaNO_3$	5.06	1	5.06	14.43	0.0067
B – KH_2PO_4	0.3200	1	0.3200	0.9130	0.3712
C – $C_6H_{12}O_6$	0.7564	1	0.7564	2.16	0.1853
AB	3.84	1	3.84	10.96	0.0129
AC	10.96	1	10.96	31.26	0.0008
BC	0.0144	1	0.0144	0.0411	0.8451
A^2	0.0011	1	0.0011	0.0031	0.9573
B^2	5.23	1	5.23	14.91	0.0062
C^2	4.30	1	4.30	12.28	0.0099
Residual	2.45	7	0.3505	—	—
Falta de ajuste	2.03	3	0.6771	6.42	0.0522
Error puro	0.4221	4	0.1055	—	—
Total corregido	32.45	16	—	—	—

En relación con los términos de interacción, las combinaciones AB ($NaNO_3$ × KH_2PO_4; F = 10.96; p = 0.0129) y AC ($NaNO_3$ × $C_6H_{12}O_6$; F = 31.26; p = 0.0008) resultaron significativas, y esta última mostró la mayor magnitud dentro del modelo. Los resultados indicaron una marcada interdependencia entre la fuente de nitrógeno y la de carbono, mientras que la interacción BC (KH_2PO_4 × $C_6H_{12}O_6$) no fue significativa (p = 0.8451). Los términos cuadráticos B^2 (F = 14.91; p = 0.0062) y C^2 (F = 12.28; p = 0.0099) resultaron significativos, evidenciando curvatura en la respuesta y posibles valores óptimos intermedios para ambos factores. En contraste, A^2 no presentó significancia (p = 0.9573). La falta de ajuste tampoco fue significativa (F = 6.42; p = 0.0522), lo que indicó una adecuada concordancia entre el modelo y los datos experimentales. En conjunto, estos resultados respaldaron la capacidad del modelo cuadrático para predecir la producción de lípidos.

7.2.2.2 Ecuación del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

La producción de lípidos, de acuerdo con el modelo de superficie de

respuesta obtenido, pudo describirse mediante una función polinómica de segundo orden en relación con las concentraciones de nitrato de sodio (A), fosfato monopotásico (B) y $C_6H_{12}O_6$ (C). En el punto central del diseño experimental, es decir, cuando los tres factores se encontraron en sus niveles intermedios, el término independiente de 16.15 correspondió al valor estimado de la respuesta, como se observa en la ecuación 9.

(9)

$$Lípidos = 16.15 - 0.7950A + 0.2000B - 0.3075C + 0.9800AB - 1.66AC + 0.0600BC + 0.0160A^2 - 1.11B^2 + 1.01C^2$$

Donde:

A: $NaNO_3$

B: KH_2PO_4

C: $C_6H_{12}O_6$

En el rango estudiado, los coeficientes lineales del nitrato de sodio (−0.7950A) y de $C_6H_{12}O_6$ (−0.3075C) presentaron signo negativo, lo que sugirió que un incremento de estas variables tendió a reducir la producción de lípidos, siendo mayor el efecto del nitrato de sodio entre ambos. En contraste, el fosfato monopotásico (+0.2000B) mostró un coeficiente positivo y de menor tamaño, lo que indicó una contribución directa, aunque limitada, a la respuesta.

En la ecuación, la interacción entre nitrato de sodio y $C_6H_{12}O_6$ (−1.66AC) correspondió al coeficiente de mayor magnitud absoluta entre los términos de interacción y, debido a su signo negativo, evidenció un efecto antagónico importante entre la fuente nitrogenada y la fuente de carbono sobre la acumulación de lípidos. Con signo positivo, la interacción entre nitrato de sodio y fosfato monopotásico (+0.9800AB) reflejó un efecto sinérgico entre ambos componentes, mientras que la interacción entre fosfato monopotásico y $C_6H_{12}O_6$ (+0.0600BC) también contribuyó de manera positiva, aunque con una magnitud pequeña.

En los términos cuadráticos, el fosfato monopotásico ($-1.11B^2$) presentó un coeficiente negativo, lo que describió una curvatura cóncava hacia abajo y sugirió la presencia de un valor óptimo intermedio para esta variable. Por el contrario, los términos cuadráticos de $C_6H_{12}O_6$ ($+1.01C^2$) y del nitrato de sodio ($+0.0160A^2$) tuvieron signo positivo, y este último presentó una magnitud casi despreciable, lo que señaló una contribución mínima de la curvatura asociada a la fuente nitrogenada dentro del modelo.

7.2.2.3 Efecto de la $NaNO_3$ y el KH_2PO_4

La figura 9 muestra la superficie de respuesta del efecto combinado de la concentración de $NaNO_3$ y KH_2PO_4 sobre el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*. La gráfica presenta un comportamiento curvilíneo, y los mayores porcentajes de lípidos se concentraron en la región con menor concentración de $NaNO_3$, en especial cerca de 0.10 g/L. A medida que aumentó la concentración de $NaNO_3$, el contenido lipídico tendió a disminuir. Bajo las condiciones evaluadas, esta tendencia sugirió que los niveles elevados de nitrógeno no favorecieron la acumulación de lípidos. En contraste, las concentraciones bajas de $NaNO_3$ se asociaron con valores más altos de lípidos, alcanzando porcentajes cercanos a 18–19 %.

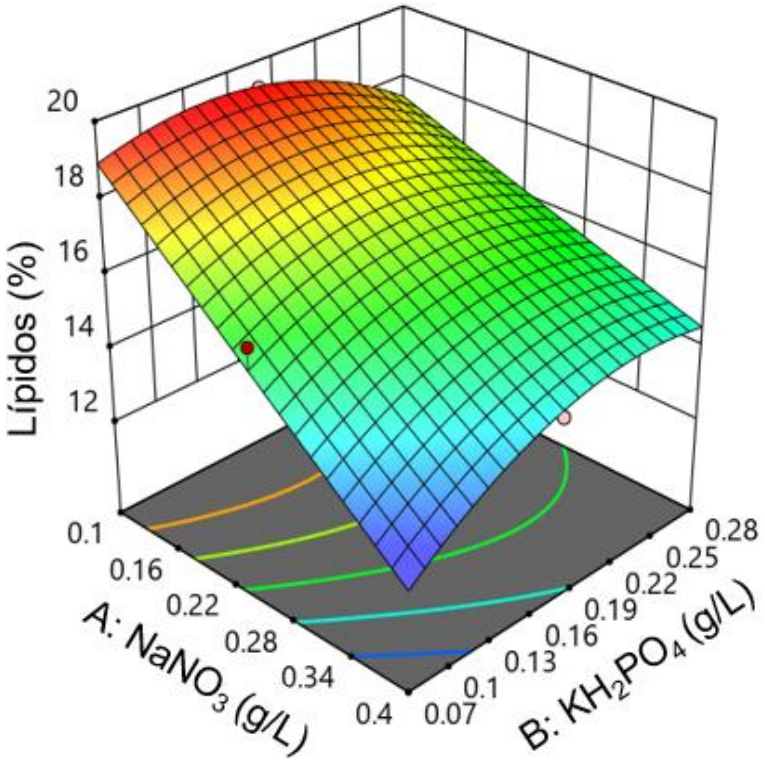


Figura 9. Superficie de respuesta del efecto combinado de $NaNO_3$ y KH_2PO_4 sobre el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*.

Respecto al KH_2PO_4, la superficie muestra que su efecto dependió de la concentración de $NaNO_3$. En condiciones de bajo $NaNO_3$, el contenido lipídico se mantuvo alto en un intervalo amplio de KH_2PO_4, aunque los valores más favorables se ubicaron hacia concentraciones bajas e intermedias de este factor. Sin embargo, cuando el $NaNO_3$ aumentó, el porcentaje de lípidos disminuyó con mayor claridad, aun con variaciones en la concentración de KH_2PO_4.

En conjunto, se evidenció que la acumulación lipídica de *Chlorella vulgaris* fue favorecida principalmente por concentraciones bajas de $NaNO_3$, mientras que el efecto de KH_2PO_4 fue secundario y dependió de su interacción con la fuente de nitrógeno.

7.2.2.4 Efecto del $NaNO_3$ y la relación $C_6H_{12}O_6$.

En la figura 10 se observa el efecto combinado de $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$ sobre

el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*. La superficie muestra un comportamiento curvilíneo, lo que indicó que la acumulación de lípidos dependió de la interacción entre la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono.

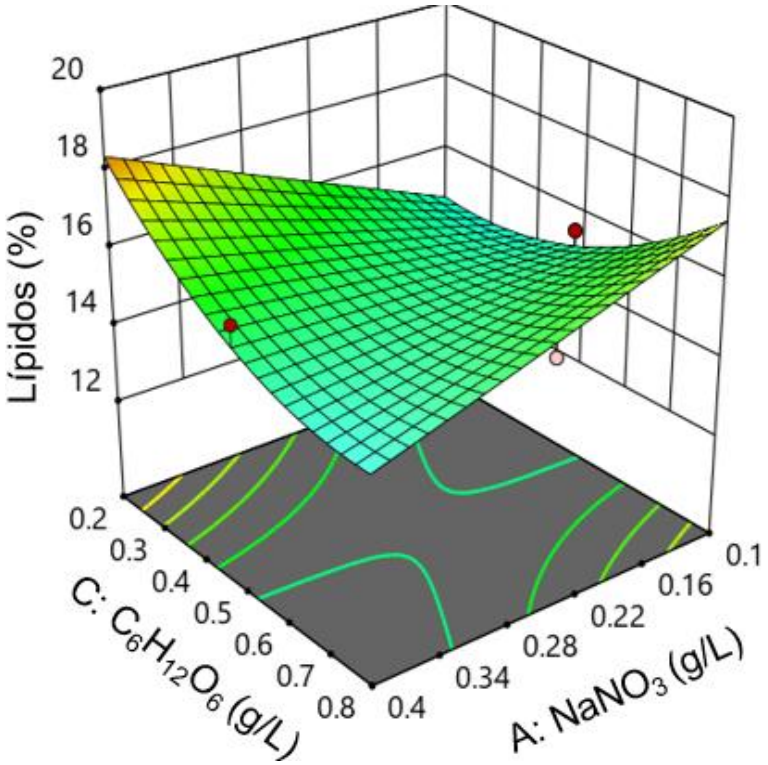


Figura 10. Superficie de respuesta del efecto combinado de $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$ sobre el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*.

Los mayores porcentajes de lípidos se localizaron en condiciones de baja concentración de $NaNO_3$ combinada con niveles altos de $C_6H_{12}O_6$. Este comportamiento sugirió que una menor disponibilidad de nitrógeno, junto con una mayor disponibilidad de carbono, favoreció la acumulación lipídica en la biomasa microalgal.

Por otro lado, en concentraciones elevadas de $NaNO_3$, el contenido lipídico tendió a disminuir en gran parte de la superficie, especialmente cuando $C_6H_{12}O_6$ se mantuvo en niveles intermedios. Esto indicó que el incremento de

nitrógeno no favoreció directamente la acumulación de lípidos bajo las condiciones evaluadas.

En conjunto, los resultados mostraron que la producción lipídica fue favorecida por una relación nutricional orientada hacia menor disponibilidad de nitrógeno y mayor disponibilidad de carbono, destacando la importancia del balance entre $NaNO_3$ y $C_6H_{12}O_6$ en el cultivo de *Chlorella vulgaris*.

7.2.2.5 Efecto del KH_2PO_4 y la relación $C_6H_{12}O_6$

En la figura 11 se presenta el efecto combinado de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$ sobre el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris*. La superficie muestra una respuesta curvilínea, lo que indicó que la acumulación de lípidos no dependió únicamente del aumento individual de cada nutriente, sino de la interacción entre ambos factores.

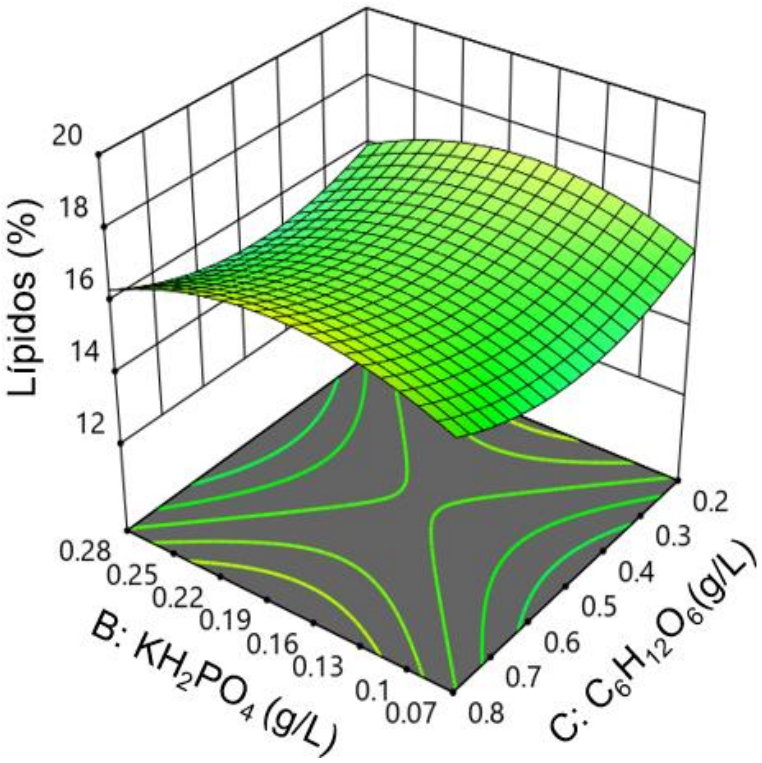


Figura 11. Superficie de respuesta del efecto combinado de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$ sobre el contenido lipídico de *Chlorella vulgaris.*

Los valores de lípidos se mantuvieron principalmente en un intervalo intermedio, cercano a 15–18 %. La zona con mayor respuesta se ubicó hacia concentraciones intermedias de KH_2PO_4 combinadas con niveles medios a altos de $C_6H_{12}O_6$, lo que sugirió que el balance entre fósforo y carbono favoreció la acumulación lipídica.

El incremento de $C_6H_{12}O_6$ no produjo un aumento uniforme del contenido de lípidos en toda la superficie, ya que su efecto cambió según la concentración de KH_2PO_4. Esto indicó que la disponibilidad de carbono por sí sola no fue suficiente para maximizar la respuesta, sino que dependió de una proporción adecuada con la fuente de fósforo.

En general, los resultados mostraron que una combinación equilibrada entre KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$ favoreció mejores porcentajes de lípidos, mientras que

los extremos de concentración tendieron a generar respuestas menos favorables.

7.2.3 Optimización dentro de las dos variables

En la figura 12 se muestra la solución de optimización simultánea obtenida mediante la función de deseabilidad para las variables de cultivo de *Chlorella vulgaris.* La combinación óptima propuesta por el modelo fue de 0.210 g/L de $NaNO_3$, 0.28 g/L de KH_2PO_4 y 0.8 g/L de $C_6H_{12}O_6$, con una deseabilidad global de 0.807.

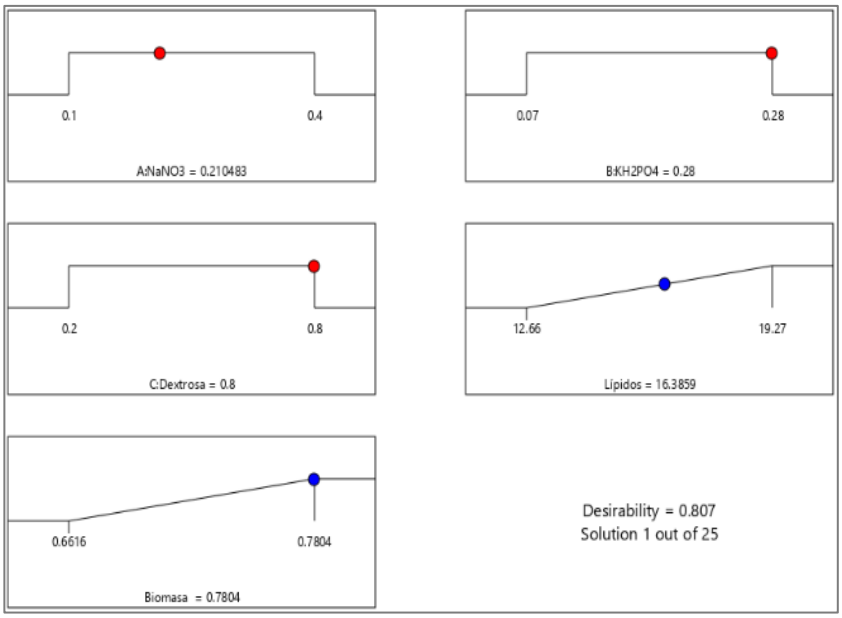


Figura 12. Perfil de deseabilidad para la optimización simultánea de la producción de biomasa y contenido lipídico de *Chlorella vulgaris.*

Bajo estas condiciones, el modelo predijo un contenido lipídico de 16.3859 % y una producción de biomasa de 0.7804 g/L. Estos valores indicaron que la solución seleccionada no correspondió necesariamente al punto de mayor contenido lipídico individual, sino a una condición de compromiso que permitió obtener simultáneamente una elevada producción de biomasa y un contenido lipídico aceptable.

La deseabilidad obtenida indicó que la combinación propuesta fue

adecuada para satisfacer conjuntamente los objetivos de optimización. En este sentido, la solución permitió dar prioridad a una condición equilibrada entre la acumulación de lípidos y la producción de biomasa, lo que fue importante para maximizar la obtención global de lípidos microalgales a partir del cultivo.

7.2.4 Determinación de ácidos grasos

En el cuadro 11 se presenta el perfil de ácidos grasos de las tres mejores corridas (5, 7, 17) y el control. En todos los casos, los ácidos grasos poliinsaturados constituyeron la fracción mayoritaria, con valores comprendidos entre 63,46 ± 2,38 % y 63,81 ± 0,37 %, sin presentar cambios significativos entre ellos ($p > 0.05$), ni con relación al control. La corrida 7 presentó el valor numéricamente más alto de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que la corrida 17 mostró el menor promedio y la mayor variabilidad. Por su parte, los ácidos grasos saturados se encontraron entre 29,29 ± 0,40 % y 29,59 ± 2,47 %, con valores cercanos entre el control y los tratamientos formulados.

Cuadro 11. Perfil de ácidos grasos de los tratamientos.

Determinación (% en peso)	Control	Corrida 5	Corrida 7	Corrida 17
Ácido palmítico	26,29 ± 0,06^{A}	25,99 ± 0,37^{A}	25,92 ± 0,35^{A}	26,25 ± 2,15^{A}
Ácido esteárico	1,27 ± 0,08^{A}	1,33 ± 0,02^{A}	1,32 ± 0,00^{A}	1,44 ± 0,14^{A}
Ácido oleico	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Ácido linoleico	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Ácido α-linolénico	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Σ AGS	29,57 ± 0,09^{A}	29,37 ± 0,39^{A}	29,29 ± 0,40^{A}	29,59 ± 2,47^{A}
Σ AGMI	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Σ AGPI	63,76 ± 0,42^{A}	63,69 ± 0,30^{A}	63,81 ± 0,37^{A}	63,46 ± 2,38^{A}
EPA	19,82 ± 0,38^{A}	19,67 ± 0,09^{A}	19,33 ± 0,13^{A}	19,06 ± 0,08^{A}
DHA	43,94 ± 0,04^{A}	44,02 ± 0,21^{A}	44,48 ± 0,25^{A}	44,41 ± 2,47^{A}

Σ AGS = ácidos grasos saturados totales; Σ AGMI = ácidos grasos monoinsaturados totales; Σ AGPI = ácidos grasos poliinsaturados totales; EPA = ácido eicosapentaenoico; DHA = ácido docosahexaenoico. C: Corrida control del diseño experimental de la obtención del extracto; Corrida 5: Corrida referente al diseño experimental de la obtención del extracto; Corrida 7: Corrida referente al diseño experimental de la obtención del extracto; Corrida 17: Corrida referente al diseño experimental de la obtención del extracto. Letras distintas en cada fila para cada propiedad fisicoquímica denotan diferencia estadística significativa ($p<0.05$).

Dentro de los ácidos grasos saturados, el ácido palmítico (C16:0) fue el más abundante, con concentraciones de 25,92 ± 0,35 % a 26,29 ± 0,06 %. El ácido esteárico (C18:0) se detectó en menores proporciones, entre 1,27 ± 0,08 % y 1,44 ± 0,14 %. Los ácidos oleico (C18:1 n-9), linoleico (C18:2 n-6) y linolénico (C18:3 n-3), así como la fracción total de ácidos grasos monoinsaturados, presentaron concentraciones inferiores a 0,01 % en todos los tratamientos.

Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga EPA y DHA tampoco presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p> 0.05$), ni con relación al control. El EPA presentó valores entre 19.82 ± 0.38 % en el control y

19.06 ± 0.08 % en la corrida 17. Aunque se observó una disminución numérica, todos los tratamientos compartieron la misma letra estadística, indicando ausencia de diferencias significativas. El DHA se mantuvo como el ácido graso predominante del perfil, con valores entre 43.94 ± 0.04 % y 44.48 ± 0.25 %. La corrida 7 presentó el mayor valor promedio de DHA; sin embargo, todos los tratamientos compartieron la misma letra estadística, por lo que las diferencias observadas no fueron significativas. En general, los resultados mostraron perfiles semejantes entre tratamientos.

7.3 Fase 3. Aplicación del extracto lipídico en helado vegetal

En el Cuadro 12 se presentan los resultados de las propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y de color instrumental del helado de chocolate a base de soya en el cual se evaluaron cuatro tratamientos y un control sin extracto lipídico (C) y los tratamientos con diferentes concentraciones T1 (1%), T2 (2%) y T3 (3%). Bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA), los datos se analizaron en el software Minitab mediante la comparación de medias de Tukey, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Cuadro 12. Propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y de color instrumental del helado de chocolate a base de soya adicionado con extracto lipídico de *Chlorella vulgaris.*

Propiedades	Helado de chocolate a base de soya			
	C	T1	T2	T3
Fisicoquímicas				
pH	6.78±0.02A	6.83 ± 0.08A	6.71 ± 0.07A	6.8 ± 0.08A
Grados Brix (%)	25.67 ± 0.58^{B}	30.67 ± 1.16^{A}	29.66 ± 2.52^{AB}	27.67 ± 2.08^{AB}
Sólidos totales (%)	32.67 ± 0.61^{A}	33.10 ± 0.40^{A}	30.49 ± 0.66^{B}	32.68 ± 0.16^{A}
Humedad (%)	67.33 ± 0.61^{B}	66.90 ± 0.40^{A}	69.51 ± 0.66^{B}	67.32 ± 0.16^{B}
Cenizas (%)	1.08 ± 0.29^{A}	0.90 ± 0.04^{A}	0.92 ± 0.03^{A}	1.00 ± 0.43^{A}
Tecnológicas				
Overrun (%)	18.00 ± 1.00^{B}	20.00 ± 1.00^{B}	23.00 ± 1.00^{A}	25.00 ± 1.00^{A}
Índice de derretimiento (%)	77.50 ± 0.50^{A}	71.70 ± 0.50^{B}	64.57 ± 0.15^{C}	60.20 ± 0.50^{D}
Gravedad específica	577.33 ± 26.80^{B}	605.00 ± 10.44^{AB}	610.00 ± 7.94^{AB}	623.67 ± 6.51^{A}
Color				
Color L*	30.29 ± 0.13^{B}	30.89 ± 1.39^{B}	36.34 ± 0.63^{A}	32.42 ± 2.24^{B}
Color a*	11.89 ± 0.51^{A}	11.39 ± 0.67^{A}	10.84 ± 0.44^{A}	11.78 ± 0.58^{A}
Color b*	20.81 ± 0.40^{A}	21.17 ± 0.62^{A}	20.11 ± 2.11^{A}	19.75 ± 1.28^{A}

C: Tratamiento control de helado sin agregado de extracto (0%); T1: Tratamiento 1 de helado con 1% de agregado de extracto lipídico; T2: Tratamiento 2 de helado con el 2% de agregado de extracto; T3: Tratamiento 3 de helados con el 3% de agregado de extracto. Letras distintas en cada fila para cada propiedad fisicoquímica, tecnológica y color denotan diferencia estadística significativa ($p<0.05$) respectivamente.

Los valores de pH fueron cercanos entre los tratamientos; el valor más alto se observó en T1, con 6.83 ± 0.0764, mientras que el valor más bajo correspondió a T2, con 6.71 ± 0.0764. De acuerdo con la comparación de medias, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, ya que todos

compartieron la misma letra estadística. Esto indicó que la incorporación del extracto lipídico no modificó significativamente el pH del helado vegetal, manteniéndose todos los tratamientos en valores cercanos a la neutralidad.

En cuanto al contenido de grados brix mostrado en el Cuadro 12, el mayor valor de °Brix se obtuvo en T1, con 30.67 ± 1.1550 %, mientras que el menor valor correspondió al control, con 25.67 ± 0.5770 %. Los tratamientos T2 y T3 presentaron valores intermedios de sólidos solubles, mientras que T1 fue significativamente mayor que el control ($p < 0.05$), aunque el efecto no aumentó proporcionalmente con la concentración del extracto. En sólidos totales, T1 mostró el valor más alto (33.10 ± 0.40 %) y T2 el más bajo (30.49 ± 0.66 %); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). En cuanto a la humedad, T2 presentó el mayor porcentaje (69.51 ± 0.66 %) y T1 el menor (66.90 ± 0.40 %), mientras que el control y T3 mostraron valores intermedios y similares. En general, la incorporación del extracto lipídico produjo variaciones numéricas, pero no modificó significativamente los sólidos totales del helado vegetal. T2 fue significativamente diferente del resto de los tratamientos, mientras que C, T1 y T3 compartieron la misma letra estadística. Esto indicó que únicamente la formulación T2 incrementó significativamente ($p<0.05$) el contenido de humedad en comparación con los demás tratamientos.

Para el contenido de cenizas, el Cuadro 12 muestra que el mayor valor se presentó en el control, con 1.08 ± 0.29 %, mientras que el menor se observó en T1, con 0.90 ± 0.04 %. Los tratamientos T2 y T3 presentaron valores intermedios. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$), ya que todos compartieron la misma letra estadística. Por lo tanto, la adición del extracto lipídico no modificó significativamente el contenido de cenizas del helado vegetal.

En cuanto al overrun, en el Cuadro 12 se observa que el mayor porcentaje se obtuvo en T3, con 25.00 ± 1.00 %, mientras que el menor valor correspondió al control, con 18.00 ± 1.00 %. Los tratamientos T1 y T2 presentaron valores

intermedios de 20.00 ± 1.00 % y 23.00 ± 1.00 %, respectivamente. La comparación de medias mostró que C y T1 pertenecieron al mismo grupo estadístico, mientras que T2 y T3 formaron un grupo diferente. Esto indicó que las concentraciones más altas de extracto lipídico favorecieron significativamente ($p<0.05$) la incorporación de aire durante el procesamiento del helado.

Por otra parte, el Cuadro 12 muestra que el mayor índice de derretimiento se registró en el control, con 77.5 ± 0.50 %, mientras que el menor valor correspondió a T3, con 60.20 ± 0.50 %. Los tratamientos T1 y T2 presentaron valores intermedios de 71.70 ± 0.50 % y 64.57 ± 0.15 %, respectivamente, mostrando diferencias significativas entre todos los tratamientos ($p<0.05$). Se observó una disminución significativa ($p<0.05$) progresiva del índice de derretimiento conforme aumentó la concentración del extracto lipídico, lo que indicó que T3 presentó la mayor estabilidad frente al derretimiento.

En el caso de la gravedad específica, los datos del Cuadro 12 indican que el mayor valor se observó en T3, con 623.67 ± 6.51, mientras que el menor correspondió al control, con 577.33 ± 26.80. T1 y T2 mostraron valores intermedios. La comparación indicó que T3 fue significativamente mayor ($p<0.05$) que el control, mientras que T1 y T2 presentaron un comportamiento intermedio. Esto indicó que la mayor concentración de extracto lipídico incrementó significativamente ($p<0.05$) la gravedad específica del helado vegetal.

La figura 13 muestra la apariencia visual de las formulaciones del helado de chocolate tanto el control como los adicionados con extracto lipídico, donde se observó color café característico de la cocoa. Respecto al color instrumental, (Cuadro 12) se determinó que el valor más alto de L* se obtuvo en T2, con 36.34 ± 0.63, mientras que el valor más bajo correspondió al control, con 30.29 ± 0.13. T1 y T3 presentaron valores intermedios. La prueba de Tukey mostró que T2 fue significativamente diferente del resto de los tratamientos, mientras que C, T1 y T3 compartieron la misma letra estadística. Esto indicó que T2 presentó una

mayor luminosidad ($p<0.05$) en comparación con las demás formulaciones, como se puede observar en la figura 13.

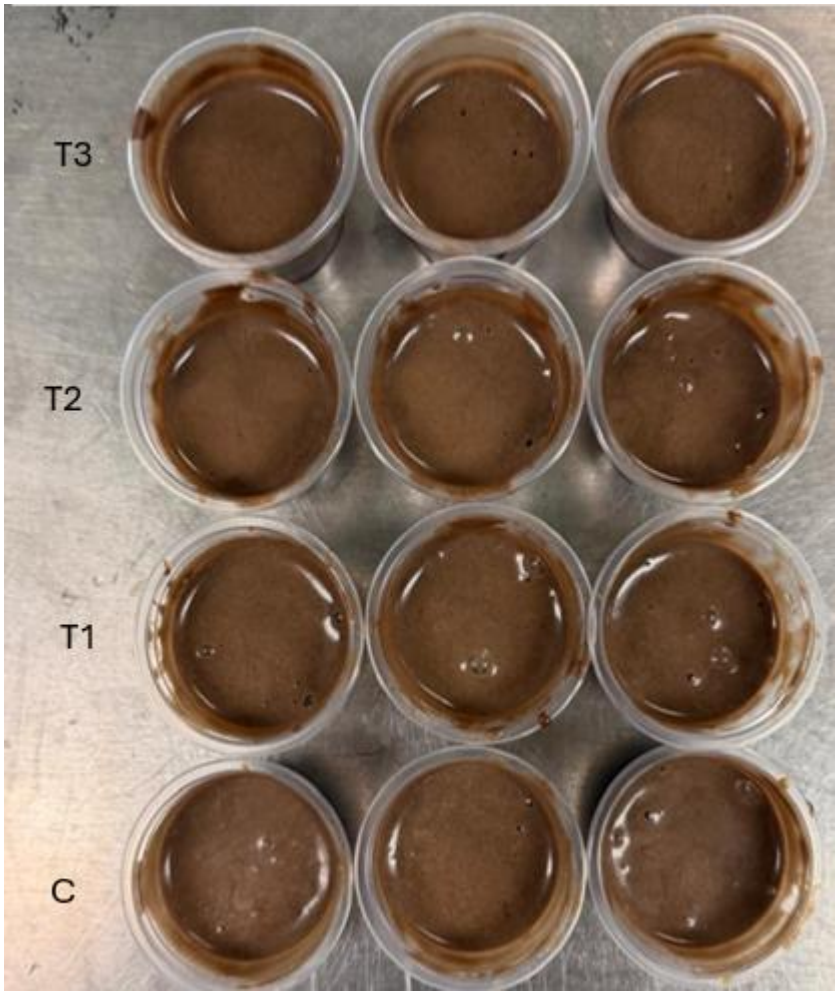


Figura 13. Apariencia visual de los tratamientos de helado de chocolate a base de soya adicionados con extracto lipídico de *Chlorella vulgaris*.

C: Tratamiento control sin agregado de extracto (0%); T1: Tratamiento 1 con 1% de agregado de extracto lipídico; T2: Tratamiento 2 con el 2% de agregado de extracto; T3: Tratamiento 3 con el 3% de agregado de extracto. Se muestran los triplicados realizados de cada tratamiento.

Por su parte, el parámetro a* representa la posición del color en el eje verde-rojo, es decir, los valores positivos se relacionan con el rojo y los negativos con el verde. Como se muestra en el Cuadro 12, el valor más alto de a* se obtuvo en el control, con 11.89 ± 0.51, mientras que el valor más bajo se registró en T2, con 10.84 ± 0.44, con valores intermedios para T1 y T3. Los valores fueron

positivos en todos los tratamientos, es decir, el color se mantuvo dentro de la región roja del eje. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos, ya que todos compartieron la misma letra estadística. Por lo tanto, la incorporación del extracto lipídico no modificó significativamente este parámetro de color.

Finalmente, el parámetro b* se define como la posición del color en el eje azul-amarillo, donde los valores positivos representan una tendencia hacia el amarillo y los negativos una tendencia hacia el azul. En el Cuadro 12 se muestra que el valor más alto de b* se obtuvo en T1, con 21.17 ± 0.62, y el más bajo en T3, con 19.75 ± 1.28. Los valores intermedios se obtuvieron para el control y T2. En todos los tratamientos, los valores fueron positivos, mostrando una tendencia hacia los tonos amarillentos. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos según la comparación estadística realizada. Esto sugirió que la adición del extracto lipídico no afectó significativamente la tendencia hacia los tonos amarillentos en el helado vegetal.

7.3.1 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial se realizó considerando atributos como intensidad de color café, uniformidad de color, olor a chocolate, olor a soya, cremosidad, suavidad en boca, sabor a chocolate, sabor a microalga, sabor a soya y dulzor, como se observa en la figura 14.



Figura 14. Perfil sensorial de los tratamientos de helado vegetal adicionados con extracto lipídico de *Chlorella vulgaris*. C: Tratamiento control sin agregado de extracto (0%); T1: Tratamiento 1 con 1% de agregado de extracto lipídico; T2: Tratamiento 2 con el 2% de agregado de extracto; T3: Tratamiento 3 con el 3% de agregado de extracto.

De manera general, el control y T1 presentaron perfiles sensoriales más amplios en atributos como dulzor, cremosidad, suavidad en boca y sabor a chocolate. Los tratamientos T2 y T3 mostraron modificaciones más evidentes en el perfil sensorial, principalmente en atributos relacionados con sabor a microalga, sabor a soya y percepción general de la matriz.

7.3.2 Interpretación general de la fase de aplicación

En conjunto, los resultados mostraron que la incorporación del extracto lipídico de *Chlorella vulgaris* modificó principalmente las propiedades tecnológicas del helado vegetal. En comparación con el control, el tratamiento T3 destacó por exhibir el mayor overrun, el menor índice de derretimiento y la mayor gravedad específica, lo que pudo indicar un mejor desempeño tecnológico.

Entre los tratamientos, las variables pH, sólidos totales, cenizas, a* y b* no presentaron diferencias significativas. Por ello, es probable que la incorporación

del extracto no haya alterado de manera significativa algunas propiedades fisicoquímicas ni el color. Sin embargo, en variables específicas como °Brix, humedad, overrun, índice de derretimiento, gravedad específica y luminosidad, sí se observaron efectos.

8 DISCUSIÓN

8.1 Fase 1. Optimización de la extracción lipídica asistida por ultrasonido

8.1.1 Rendimiento lipídico obtenido por extracción asistida por ultrasonido

En línea con lo reportado para la extracción de lípidos de microalgas mediante EAU con sistemas binarios, el rendimiento alcanzado varió entre 5.38 y 12.32 %. A su vez, Escorsim *et al*. (2018) encontraron cerca del 6 % de lípidos en relación con la biomasa de *Acutodesmus obliquus,* obtenidos por irradiación ultrasónica y mezclas etanol, valor que corresponde a aproximadamente el 59 % del contenido lipídico total de la microalga. Ese valor fue inferior al máximo obtenido en este estudio, lo que indica que las condiciones de sonicación empleadas consiguieron romper la pared celular de *Chlorella vulgaris* con mayor eficacia. Phan *et al*. (2023), por su parte, alcanzaron un rendimiento de 18.8 % en *Chlorella* sp. al optimizar mediante el método Taguchi, y ese resultado más alto podría deberse al uso de amplitudes muy elevadas (80 %) y a diferencias en la cepa y en el equipo. En conjunto, ambos referentes sitúan los resultados obtenidos dentro de un rango competitivo para una extracción sin control térmico activo.

8.1.2 ANOVA del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de la amplitud, el tiempo y la relación de extracción.

Para la extracción de lípidos, el análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta fue significativo ($F = 7.25$; $p = 0.0080$), lo que confirma que el modelo cuadrático describe adecuadamente la relación entre los factores evaluados, amplitud (A), tiempo (B) y relación (C), y el rendimiento lipídico obtenido. Entre los efectos lineales, la relación de extracción (C) fue el factor con mayor influencia sobre la respuesta ($F = 22.87$; $p = 0.0020$), seguida de la amplitud (A; $F = 14.12$; $p = 0.0071$), mientras que el tiempo de sonicación (B) no fue significativo ($p = 0.2677$). Los términos cuadráticos A^2 y C^2 también resultaron

significativos, indicando curvatura en la respuesta y posibles valores óptimos intermedios, mientras que las interacciones AB, AC y BC no mostraron significancia, en concordancia con Phan *et al*. (2023). De manera similar, Ng *et al*. (2022) identificaron la relación de extracción como un factor determinante en la extracción ultrasónica de lípidos de *Spirulina* spp., con una contribución del 92.1 % sobre el rendimiento lipídico. De forma similar, esos autores observaron que el tiempo de extracción aportó solo un 5.0 %, mientras que la proporción metanol presentó la contribución más baja, de 0.4 %. Esa jerarquía de efectos respalda lo observado en este trabajo, donde el tiempo no mostró un efecto lineal significativo sobre el rendimiento, lo que indica que, dentro del intervalo evaluado, la disponibilidad y proporción de solvente controlan la transferencia de masa en mayor medida que la duración del tratamiento ultrasónico.

La significancia de la amplitud (A) sobre el rendimiento lipídico concuerda con su papel en la disrupción celular. Quesada-Salas *et al*. (2021) reportaron, al optimizar mediante MSR la extracción de lípidos de microalgas con amplitud y tiempo como variables, que una amplitud entre 50 y 80 % fue uno de los parámetros independientes evaluados sobre la extracción total de lípidos durante la disrupción por ultrasonido. Para *Nannochloropsis gaditana*, alcanzaron la mayor recuperación lipídica a 80 % de amplitud durante 30 min, con un contenido de lípidos del 21.7 % en peso seco. Además, los mismos autores señalaron que no consideraron valores de amplitud del 100 % para evitar el calentamiento excesivo y la formación de radicales libres, responsables de la oxidación que afecta la calidad de los lípidos. Así, esto respalda la relevancia estadística de la amplitud en el modelo desarrollado aquí, ya que, al aumentar este factor, se intensifica la cavitación acústica y, en consecuencia, la ruptura de la pared celular y la liberación de la fracción lipídica según reporto Ng *et al.* (2022).

Como punto final, debe señalarse que la falta de ajuste fue significativa ($F = 9.84$; $p = 0.0256$), lo cual representa una limitación del modelo, pues indica que una parte de la variabilidad no explicada no se debe únicamente al error puro y

que el ajuste podría mejorar. Aun así, la significancia global del modelo, la del factor con mayor peso, relación, y la presencia de términos cuadráticos significativos respaldan su utilidad para describir la tendencia del proceso de extracción e identificar condiciones favorables de rendimiento lipídico de acuerdo con Quesada-Salas *et al*. (2021).

8.1.3 Ecuación del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de la amplitud, el tiempo y la relación de extracción

Como modelo polinómico de segundo orden, la superficie de respuesta relaciona el rendimiento lipídico (%) con la amplitud (A), el tiempo (B) y la relación (C). En el centro del diseño, es decir, cuando los tres factores se encuentran en niveles intermedios, el término constante de 15.36875 corresponde al rendimiento previsto. Entre los coeficientes lineales, el de la relación (C) presenta el mayor valor positivo (+1.62575), lo que la identifica como la variable de mayor influencia sobre la respuesta, mientras que la amplitud (A; −0.62545) y el tiempo (B; −0.20665) muestran coeficientes negativos. Dentro del rango analizado, esto sugiere que el aumento de ambos factores tiende a disminuir el rendimiento. Por su baja magnitud, los términos de interacción (AB, AC y BC) concuerdan con su ausencia de significancia, y el término cuadrático C^2 (−0.91950), junto con el término lineal de C, constituye el componente principal de la ecuación. En consecuencia, se observa una curvatura cóncava hacia abajo, asociada con la presencia de un valor óptimo intermedio para la relación tal como lo reportó Ng *et al*. (2022).

El predominio de la relación de extracción coincide con Ng *et al*. (2022), quienes reportaron que este factor explicó el 92.1 % de la variación del rendimiento lipídico en *Spirulina* spp., superando al tiempo y a la proporción de solventes. Esto respalda el comportamiento del modelo actual, donde la relación mostró mayor influencia que el tiempo, cuyo coeficiente negativo y bajo (−0.20665) indicó una contribución limitada. Este efecto puede relacionarse con

una mayor disponibilidad de solvente para favorecer la solubilización y transferencia de lípidos. Respecto a la amplitud, su coeficiente lineal negativo (−0.62545) y su término cuadrático positivo (+0.01313) reflejaron un comportamiento no lineal. Quesada-Salas *et al*. (2021) también señalaron que la amplitud y el tiempo influyen en la extracción ultrasónica. Aunque una mayor amplitud favorece la cavitación, ruptura celular y transferencia de lípidos, niveles elevados pueden generar efectos térmicos u oxidativos. Por ello, la eficiencia depende de equilibrar la intensidad ultrasónica y el tiempo para maximizar la recuperación sin comprometer la estabilidad de la fracción lipídica.

En conjunto, la ecuación está determinada por los términos lineal y cuadrático de la relación, mientras que la amplitud y el tiempo tienen una contribución secundaria y las interacciones presentan una magnitud despreciable. Esta estructura coincide con los efectos identificados en el análisis de varianza y respalda la utilidad del modelo para describir la tendencia del proceso y orientar la elección de condiciones favorables para la extracción lipídica de acuerdo con Quesada-Salas *et al*. (2021).

8.1.4 Efecto de la amplitud ultrasónica y la relación hexano:etanol.

En términos de rendimiento, la amplitud ultrasónica fue la variable de mayor impacto, y los valores más altos se situaron alrededor del 30 %. Este resultado coincide de manera exacta con Phan *et al*. (2023), ya que indicaron que la amplitud ultrasónica tuvo el mayor peso estadístico en la producción lipídica de *Chlorella* sp., lo que confirma que la intensidad de la cavitación determina la ruptura de la pared celular. En relación con la proporción de solventes, el nivel óptimo se presentó en la relación intermedia 3:1, y no en los extremos, lo que puede atribuirse al equilibrio de polaridad del sistema binario. De acuerdo con Escorsim y colaboradores (2018), las mezclas etanol permiten recuperar tanto lípidos polares como neutros y, por ello, ofrecen mejores resultados que los solventes puros, mientras que un exceso de hexano (4:1) desplaza ese equilibrio hacia la fracción apolar y disminuye la recuperación total, tal como se observó en

la corrida de menor rendimiento.

8.1.5 Efecto de la amplitud ultrasónica y el tiempo de sonicación.

Cuando se combinaron una amplitud alta y un mayor tiempo de sonicación, la recuperación de lípidos aumentó, lo que podría indicar una interacción complementaria entre ambos factores. De manera notable, el valor óptimo de 15 min coincide con el reportado por Phan *et al*. (2023), quienes también establecieron 15 min como el tiempo de reacción ideal junto con la relación 3:1. Aun así, la literatura advierte que el tiempo tiene un límite funcional, ya que se ha documentado que periodos prolongados de sonicación pueden reducir el rendimiento por la degradación de los lípidos bajo exposición sostenida a las ondas ultrasónicas. En cambio, Hadrich *et al*. (2018) informaron que tiempos más largos, de 30 min, y temperaturas elevadas favorecieron la extracción, lo que puede sugerir que el tiempo óptimo depende de la especie y del sistema de solventes, y que el valor de 15 min de este estudio se sitúa en una zona de equilibrio entre disrupción suficiente y preservación del extracto.

8.1.6 Efecto de la amplitud ultrasónica y la relación hexano:etanol.

El comportamiento más curvilíneo apareció en esta superficie, y los mayores rendimientos se dieron, al parecer, en una región intermedia de ambas variables. Tal patrón es consistente con el modelo de Hadrich *et al*. (2018), cuya superficie de respuesta presentó una forma hiperbólica con un máximo ajustado a tiempos altos de ultrasonido y un valor central de la relación de solventes, lo que respalda la existencia de un punto óptimo intermedio en lugar de una respuesta lineal. La caída del rendimiento hacia relaciones más altas, por exceso de hexano, refuerza la importancia del balance de polaridad: Phan *et al*. (2023) confirmaron igualmente que la proporción 3:1 hexano maximiza la recuperación al conjugar la afinidad por lípidos neutros y polares.

8.2 Fase 2. Optimización del cultivo de *Chlorella vulgaris*.

8.2.1 Rendimiento de optimización de biomasa.

La producción de biomasa (0.6616–0.7804 g/L) se vio favorecida por niveles altos de fósforo y carbono, con el máximo en una concentración intermedia de nitrógeno. Estos valores son comparables a los de Ratomski y Hawrot-Paw (2021), quienes obtuvieron la mayor producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* (727 mg/L) precisamente bajo la condición de mayor disponibilidad de nutrientes, lo que confirma que la suficiencia nutricional, y no su restricción, maximiza el crecimiento celular. En la misma línea, se ha advertido que una restricción excesiva de nitrógeno o fósforo limita la densidad celular máxima y, con ello, la productividad global del cultivo, lo que explica por qué las corridas con baja disponibilidad de KH_2PO_4 presentaron los menores rendimientos de biomasa.

8.2.1.1 ANOVA del modelo de superficie de respuesta para la obtención de biomasa en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

Con concentraciones elevadas de glucosa, la tendencia a una mayor acumulación de biomasa concuerda con la base metabólica del cultivo mixotrófico. Al optimizar las condiciones de cultivo mixotrófico de *Chlorella* sp. y analizar distintas fuentes de nitrógeno, entre ellas $NaNO_3$, y de carbono, Yu *et al*. (2023) informaron que el contenido de biomasa y la acumulación de lípidos estuvieron fuertemente determinados por las fuentes de carbono y nitrógeno, así como por las variaciones de pH, y que con glucosa como única fuente de carbono se obtuvo la mayor tasa específica de crecimiento, de 1.22 día/1. Esta evidencia respalda la observación de que, en el presente estudio, las corridas con alta glucosa favorecieron el rendimiento de biomasa, ya que el carbono orgánico permite que la microalga complemente la fijación fotosintética con asimilación heterotrófica, lo que parece potenciar la producción de energía y la síntesis de componentes celulares.

En cuanto al nitrógeno, el hecho de que los mayores rendimientos se observaran en el nivel intermedio y no en el máximo coincide con la función reguladora de este nutriente en el crecimiento microalgal. Rincon *et al*. (2024) señalaron que el cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris* requiere fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno para favorecer la producción de biomasa. Estos autores reportaron que cultivos con 15 g/L de glucosa y 1 g/L de nitrato de potasio alcanzaron concentraciones de biomasa de hasta 4.85 g/L. En comparación, los menores valores obtenidos en este estudio podrían relacionarse con el intervalo reducido de glucosa utilizado (0.2–0.8 g/L), lo que confirma la importancia conjunta de las fuentes de carbono y nitrógeno. En general, los resultados mostraron que el crecimiento de *C. vulgaris* dependió del equilibrio entre los nutrientes evaluados, con una respuesta favorable a niveles altos de glucosa y fosfato y concentraciones intermedias de nitrógeno, comportamiento coherente con el metabolismo mixotrófico descrito por Yu *et al*. (2023).

8.2.1.2 Ecuación del modelo de superficie de respuesta para la obtención de biomasa en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

La concentración de biomasa de *Chlorella vulgaris* se describió mediante un modelo cuadrático en función de $NaNO_3$ (A), KH_2PO_4 (B) y glucosa (C). En el punto central, el modelo estimó una biomasa de 0.7311 g/L. Entre los efectos lineales, KH_2PO_4 presentó la mayor contribución positiva (+0.0185), seguido de $NaNO_3$ (+0.0048), mientras que la glucosa mostró un efecto ligeramente negativo (−0.0007). Esto indicó que el fósforo y el nitrógeno favorecieron la producción de biomasa, en concordancia con Rincón *et al*. (2024), quienes destacan la importancia del equilibrio nutricional en el crecimiento microalgal. La interacción KH_2PO_4 × glucosa (BC) presentó el mayor coeficiente (+0.0491), sugiriendo que el efecto de la glucosa dependió del nivel de fósforo. Finalmente, los términos A^2 (−0.0314) y C^2 (−0.0225) indicaron posibles concentraciones óptimas intermedias, mientras que B^2 (+0.0097) mostró una curvatura positiva que debe

interpretarse junto con los demás términos del modelo.

En el cultivo mixotrófico de *Chlorella* sp., la interacción entre nutrientes inorgánicos y carbono orgánico es fundamental para favorecer el crecimiento celular. En el modelo obtenido, los coeficientes positivos asociados al fosfato y a la glucosa, así como su interacción (BC), reflejaron esta relación. Foerster (2023) reportó que las fuentes de carbono y nitrógeno influyen significativamente en la producción de biomasa y lípidos, y que la glucosa permitió alcanzar una tasa específica de crecimiento de 1.22 día^{-1}. Esto respalda la participación de la glucosa en el crecimiento mixotrófico y su interacción con el fosfato. Respecto al nitrógeno, el término cuadrático negativo ($A^2 = -0.0314$) indicó un comportamiento no lineal. Rincón *et al*. (2024) señalaron que el nitrógeno desempeña un papel esencial en la acumulación de biomasa de *Chlorella vulgaris* en condiciones mixotróficas. De manera similar, Jahromi (2022) indicó que tanto la deficiencia como el exceso de nitrógeno pueden limitar el crecimiento, sugiriendo la existencia de una concentración óptima intermedia. Un comportamiento semejante se observó para la glucosa ($C^2 = -0.0225$), cuyo término negativo indicó que concentraciones elevadas de carbono orgánico no necesariamente favorecen un mayor crecimiento.

En síntesis, Yalcin (2024) menciona que la ecuación presenta una estructura acorde con los principios del metabolismo mixotrófico, al reunir efectos lineales positivos de los tres nutrientes, una interacción importante entre fosfato y glucosa, y curvaturas cóncavas hacia abajo para el nitrógeno y el carbono, lo que respalda la utilidad del modelo para describir la respuesta de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y orientar la selección de condiciones nutricionales favorables.

8.2.1.3 Efecto de la $NaNO_3$ y el KH_2PO_4

El máximo de biomasa se ubicó hacia concentraciones intermedias de $NaNO_3$ y niveles altos de KH_2PO_4, mientras que el bajo fósforo (0.07 g/L) limitó el crecimiento. Esto coincide con la observación de que la limitación de nitrógeno

restringe el crecimiento global del cultivo y de que un balance adecuado de macronutrientes es necesario para sostener la densidad celular. El papel determinante del fósforo es congruente con lo reportado por Ratomski y Hawrot-Paw (2021), cuyo mayor rendimiento de biomasa se asoció con la condición con mayor aporte conjunto de nitrógeno y fósforo, lo que respalda que la disponibilidad de fósforo actúa como un factor clave del desarrollo celular bajo las condiciones evaluadas según Hernández (2022).

8.2.1.4 Efecto del $NaNO_3$ y la relación $C_6H_{12}O_6$.

La mayor biomasa se obtuvo combinando $NaNO_3$ intermedio con niveles medios a altos de $C_6H_{12}O_6$, y disminuyó cuando el carbono fue bajo. Este comportamiento es propio del metabolismo mixotrófico: el cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris* con glucosa mejora el rendimiento de biomasa al sumar la energía química del carbono orgánico a la fotosíntesis. La interacción observada entre la fuente de nitrógeno y la de carbono refleja lo descrito por los modelos de superficie de respuesta que evalúan glucosa y nitrato de sodio como factores independientes, donde la respuesta de crecimiento depende de la relación entre ambos y no del aumento aislado de uno de ellos, concordando con García-Segovia (2024).

8.2.1.5 Efecto del KH_2PO_4 y la relación $C_6H_{12}O_6$.

La biomasa fue favorecida por el incremento conjunto de fósforo y $C_6H_{12}O_6$, alcanzando valores cercanos a 0.78 g/L. Esta sinergia coincide con los sistemas de cultivo que integran glucosa y fósforo para potenciar la producción de biomasa de *Chlorella* en condiciones mixotróficas. Asimismo, se ha documentado que concentraciones crecientes de glucosa se asocian con mayores rendimientos en *Chlorella vulgaris* cuando el resto de los nutrientes no resultan limitantes, lo que explica que la mejor respuesta se concentrara en la región de alto fósforo y carbono del diseño siendo comparables con Ghaderi (2021).

8.2.2 Rendimiento de optimización de Lípidos

El contenido lipídico (12.66–19.27 %) fue mayor cuando se redujo la concentración de $NaNO_3$ y se incrementó la de $C_6H_{12}O_6$, en el extremo opuesto a las condiciones que maximizaron la biomasa. La expresión típica del estrés por nitrógeno sigue este esquema: cuando el nitrógeno es escaso o está ausente, *Chlorella vulgaris* incrementa su contenido lipídico, pero disminuye la producción de biomasa, pigmentos y proteínas. Este patrón inverso también fue reportado por Ratomski y Hawrot-Paw (2021), quienes observaron el contenido más alto de lípidos (11.81 %) con la menor dosis de nutrientes y el más bajo (5.75 %) con la mayor disponibilidad, lo que parece corroborar el equilibrio fisiológico entre el crecimiento y la acumulación de lípidos.

8.2.2.1 ANOVA del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

El análisis de varianza mostró que el modelo cuadrático para la concentración de lípidos de *Chlorella vulgaris* fue significativo (F = 9.51; p = 0.0036), indicando una adecuada relación entre $NaNO_3$ (A), KH_2PO_4 (B) y glucosa (C) y la respuesta obtenida. Entre los efectos lineales, solo $NaNO_3$ fue significativo (F = 14.43; p = 0.0067), mientras que KH_2PO_4 y glucosa no mostraron efectos individuales significativos. Las interacciones AB (p = 0.0129) y AC (F = 31.26; p = 0.0008) también fueron significativas, siendo AC la de mayor influencia. Asimismo, los términos cuadráticos B^2 (p = 0.0062) y C^2 (p = 0.0099) evidenciaron un comportamiento curvo, lo que sugiere la existencia de concentraciones intermedias óptimas de fosfato y glucosa.

El nitrógeno fue el único factor lineal significativo, lo que concuerda con su importancia en el metabolismo de *Chlorella vulgaris*. Rincón *et al*. (2024) señalaron que este nutriente es esencial en cultivos mixotróficos y que, junto con una fuente de carbono, favorece la acumulación de biomasa en presencia de luz.

Esto coincide con los resultados obtenidos, donde el nitrógeno mostró un efecto individual significativo y también participó en interacciones con el fosfato y la glucosa. En particular, la interacción con la glucosa presentó mayor influencia, lo que indicó que el efecto del nitrógeno sobre la biomasa dependió de la disponibilidad conjunta de las demás fuentes nutricionales.

Resulta especialmente importante la alta significancia de la interacción $NaNO_3$ × glucosa (AC), pues evidencia la dependencia mutua entre la fuente nitrogenada y el carbono orgánico propia del régimen mixotrófico. Al optimizar las condiciones de cultivo mixotrófico de *Chlorella* sp. y evaluar distintas fuentes de nitrógeno, entre ellas $NaNO_3$, y de carbono, Yu *et al*. (2023) informaron que el contenido de biomasa y la acumulación lipídica estuvieron fuertemente influenciados por las fuentes de carbono y nitrógeno, así como por las variaciones de pH, y alcanzaron con glucosa como única fuente de carbono la mayor tasa específica de crecimiento, de 1.22 día/1. Esta evidencia respalda la significancia de la interacción AC observada, ya que la asimilación conjunta de nitrógeno y carbono orgánico regula con mayor peso la eficiencia del crecimiento bajo condiciones mixotróficas que el aporte aislado de cada nutriente, lo que podría explicar que ni el fosfato ni la glucosa fueran significativos como efectos lineales independientes, pese a su contribución mediante las interacciones y los términos cuadráticos.

Fue favorable que la falta de ajuste no resultara significativa ($F = 6.42$; $p = 0.0522$), pues esto indica que el modelo se ajusta adecuadamente a los datos experimentales y que la variabilidad no explicada corresponde al error puro. En conjunto, la significancia global del modelo, la del nitrógeno como factor decisivo, la importancia de la interacción $NaNO_3$ × glucosa y la presencia de términos cuadráticos significativos respaldan la validez del modelo para describir la respuesta de crecimiento de *Chlorella vulgaris* y orientar la identificación de condiciones nutricionales favorables acorde con Yan (2024).

8.2.2.2 Ecuación del modelo de superficie de respuesta para la obtención de lípidos en función de $NaNO_3$, KH_2PO_4, $C_6H_{12}O_6$.

El modelo cuadrático describió el contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris* en función de $NaNO_3$ (A), KH_2PO_4 (B) y glucosa (C). En el punto central del diseño, el contenido lipídico estimado fue de 16.15 %. Entre los efectos lineales, $NaNO_3$ presentó el coeficiente negativo de mayor magnitud (−0.7950), seguido de la glucosa (−0.3075), mientras que KH_2PO_4 mostró un efecto positivo moderado (+0.2000). La interacción $NaNO_3$ × glucosa (AC; −1.66) presentó el mayor coeficiente absoluto del modelo, en contraste con $NaNO_3$ × KH_2PO_4 (AB; +0.9800). El término B^2 (−1.11) indicó una curvatura asociada con un posible nivel óptimo intermedio de fosfato, mientras que C^2 (+1.01) y A^2 (+0.0160) mostraron curvatura positiva (Xie *et al*., 2020).

Es especialmente importante el signo negativo del coeficiente lineal del nitrógeno, ya que concuerda con la relación inversa bien establecida entre la disponibilidad de nitrógeno y la acumulación de lípidos en microalgas. Cuando este nutriente escasea, y por ello aumenta la relación carbono:nitrógeno, el metabolismo tiende a desviarse hacia la síntesis de lípidos. Al optimizar las condiciones de cultivo mixotrófico de *Chlorella* sp. y evaluar distintas fuentes de nitrógeno, entre ellas $NaNO_3$, y de carbono, Yu *et al*. (2023) observaron que el contenido de biomasa y la acumulación de lípidos estuvieron fuertemente condicionados por las fuentes de carbono y nitrógeno, así como por las variaciones del pH. Esta evidencia respalda el comportamiento descrito por la ecuación, en la que el nitrógeno determina la respuesta lipídica tanto por su efecto lineal negativo como por su papel principal en la interacción con la glucosa.

La mayor magnitud de la interacción $NaNO_3$ × glucosa (AC) confirma la dependencia mutua entre la fuente nitrogenada y el carbono orgánico característica del cultivo mixotrófico, donde el equilibrio entre ambos sustratos

define la distribución del carbono entre crecimiento celular y almacenamiento de lípidos. En un estudio sobre la optimización del cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris* mediante MSR, Rincon *et al*. (2024) indicaron que este sistema requiere carbono y nitrógeno en el medio para favorecer la acumulación de biomasa en presencia de luz, y que la fuente de carbono influye de forma notable en el perfil de ácidos grasos. Esto apoya la relevancia estadística de la interacción AC, ya que el efecto de la glucosa sobre el contenido lipídico no es independiente, sino que parece estar condicionado por la concentración de nitrógeno disponible, lo que explica el elevado coeficiente negativo asociado con dicha interacción.

En conjunto, la forma de la ecuación, dominada por el efecto lineal negativo del nitrógeno, la interacción opuesta $NaNO_3$ × glucosa y la curvatura cóncava hacia abajo del fosfato, es coherente con los principios del metabolismo lipídico microalgal en condiciones mixotróficas y respalda la utilidad del modelo para describir la acumulación de lípidos en *Chlorella vulgaris* y orientar la elección de condiciones nutricionales favorables de acuerdo con lo que reportaron Liu *et al.* (2022).

8.2.2.3 Efecto de la $NaNO_3$ y el KH_2PO_4

En la región de baja concentración de $NaNO_3$, cercana a 0.10 g/L, se concentró el mayor contenido lipídico, y este disminuyó a medida que aumentó el nitrógeno, con el fósforo como factor secundario. Esto concuerda con el hallazgo de que la limitación de nitrato por debajo de un umbral crítico desvía el metabolismo celular hacia la síntesis de lípidos de reserva. La preeminencia del nitrógeno sobre el fósforo refuerza lo señalado en estudios de optimización, donde una elevada relación carbonoógeno se cita como el principal disparador de la acumulación lipídica en microalgas respaldados con Sakarika & Kornaros (2017).

8.2.2.4 Efecto del $NaNO_3$ y la relación $C_6H_{12}O_6$.

Los mayores porcentajes de lípidos correspondieron a baja disponibilidad de nitrógeno combinada con alta $C_6H_{12}O_6$, lo que maximiza la relación carbonoógeno. Se ha demostrado que concentraciones más altas de glucosa se asocian con mayores contenidos lipídicos en *Chlorella vulgaris* bajo condiciones mixotróficas, en coincidencia con la corrida de máximo rendimiento (0.10 g/L $NaNO_3$ y 0.80 g/L $C_6H_{12}O_6$). Este efecto interactivo respalda que el carbono y el nitrógeno deben analizarse de forma conjunta, pues la acumulación lipídica responde a su relación más que a sus niveles individuales de acuerdo con lo señalado con Xie *et al.* (2020).

8.2.2.5 Efecto del KH_2PO_4 y la relación $C_6H_{12}O_6$.

El contenido lipídico se mantuvo en un intervalo intermedio (15–18 %), favorecido por un balance entre fósforo y carbono más que por el aumento aislado de cada uno. En *Chlorella vulgaris*, la restricción de fósforo también se ha asociado con un incremento en la acumulación de lípidos, aunque este efecto es menos pronunciado que el observado bajo limitación de nitrógeno. La relación entre ambos nutrientes concuerda, además, con la evidencia de que el suministro de carbono orgánico necesita un entorno nutricional equilibrado para reflejarse en una mayor acumulación lipídica, lo que podría explicar la respuesta curvilínea observada por Liu *et al*. (2022).

8.2.3 Optimización dentro de las dos variables

La solución de deseabilidad (0.210 g/L $NaNO_3$, 0.28 g/L KH_2PO_4 y 0.8 g/L $C_6H_{12}O_6$; D = 0.807) no correspondió al punto de máximo contenido lipídico individual, sino a una condición de compromiso que conjuga una alta producción de biomasa (0.7804 g/L) con un contenido lipídico aceptable (16.39 %). Esta estrategia es necesaria porque una restricción demasiado severa de nitrógeno o fósforo, aunque incrementa el porcentaje de lípidos, disminuye la densidad celular y, en consecuencia, la productividad lipídica volumétrica del cultivo. Precisamente, esa relación opuesta es abordada por el enfoque empleado, ya

que el estrés por nitrógeno maximiza el contenido lipídico, pero reduce la biomasa. La función de deseabilidad, al parecer, permite dar prioridad a la obtención total de lípidos en lugar de a un único parámetro, con lo cual mejora el rendimiento del proceso como reportó Mauricio (2023).

8.2.4 Determinación de ácidos grasos

Esta verificación es importante antes de atribuir dichos valores específicamente al extracto de *C. vulgaris*, puesto que la composición de los extractos microalgales puede variar de acuerdo con la cepa, las condiciones de cultivo, el procedimiento de extracción y la matriz en la que son incorporados.

La elevada proporción de EPA y DHA fue la principal característica del perfil analizado, ya que conjuntamente representaron aproximadamente entre 63,47 y 63,81 % de los ácidos grasos reportados. Sin embargo, debido a que los ácidos oleico, linoleico y linolénico se encontraron por debajo de 0,01 %, sería conveniente revisar que la identificación de los picos, las unidades y la asignación de EPA y DHA correspondan al informe cromatográfico original.

El predominio de los ácidos grasos poliinsaturados en los cuatro tratamientos contando una referencia control y las corridas 5, 7 y 17 de las optimizaciones del medio las cuales dieron más porcentaje de lípidos totales las cuales indica que el producto conservó una proporción elevada de esta fracción lipídica después de la incorporación del extracto. La similitud entre el control y los tratamientos también sugiere que las corridas no ocasionaron modificaciones en el perfil general de ácidos grasos. Esta estabilidad se observó principalmente en los contenidos de ácidos grasos saturados y poliinsaturados, cuyos promedios permanecieron próximos entre los tratamientos. La variabilidad observada en el tratamiento 3, principalmente en C16:0, ácidos grasos saturados, poliinsaturados y DHA, podría deberse a diferencias en la homogeneidad de las muestras o durante su preparación y análisis, aunque esta explicación requiere confirmación experimental. En general, los resultados permitieron caracterizar la composición

lipídica del extracto antes de su incorporación al alimento. El predominio de ciertos ácidos grasos reflejó la composición del extracto de *Chlorella vulgaris* bajo las condiciones de cultivo y extracción utilizadas. Asimismo, las variaciones entre tratamientos podrían relacionarse con las condiciones de extracción, las cuales pudieron favorecer la recuperación de determinadas fracciones lipídicas.

8.3 Fase 3. Aplicación del extracto lipídico y evaluación de las propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y color instrumental del helado vegetal.

Los valores de pH (C: 6.78 ± 0.02; T1: 6.83 ± 0.08; T2: 6.71 ± 0.08; T3: 6.80 ± 0.08) no difirieron significativamente ($p > 0.05$), lo que confirma que la fracción lipídica no aportó grupos ionizables capaces de desplazar el equilibrio ácido-base. En sistemas donde la base vegetal sí determina el pH, esta estabilidad se observa como un contraste, ya que Ng *et al*. (2024) informaron que el pH aumentó de 7.2 a 7.5 al incrementar la proporción de leche de soya en un postre congelado. Esa diferencia es coherente, puesto que en el diseño actual la base de soya se mantuvo fija y únicamente cambió el extracto. Por otra parte, Fanari *et al*. (2025) indican que la incorporación de *Chlorella vulgaris* puede alterar el pH de matrices vegetales, y que esto no haya ocurrido aquí quizá respalde que el empleo del lípido aislado, en lugar de la biomasa, reduce el efecto sobre este parámetro.

El contenido de sólidos solubles fue significativamente mayor en T1 (30.67 ± 1.16 %) en comparación con el control (25.67 ± 0.58 %), mientras que T2 y T3 se ubicaron en una posición intermedia. La incorporación del extracto lipídico de *Chlorella vulgaris* modificó la concentración aparente de sólidos solubles del helado vegetal, aunque sin mostrar un efecto dependiente de la dosis, ya que T1 presentó un valor mayor que T3 (Fanari *et al*., 2025). Por ello, el aumento de °Brix no puede atribuirse únicamente a la cantidad de lípidos incorporados, debido a que estos no contribuyen directamente a la medición de sólidos solubles. Este comportamiento podría relacionarse con compuestos polares coextraídos

durante la extracción o con interacciones entre los componentes del extracto y la matriz vegetal del helado, como señala Yun *et al*. (2021).

Además, los valores obtenidos se ubicaron por encima del rango de 21–26 °Brix descrito para helados de base vegetal elaborados con leches de leguminosa, lo que evidencia una mayor concentración de sólidos solubles en las formulaciones desarrolladas y resulta congruente con lo reportado para matrices vegetales adicionadas con *Chlorella vulgaris*.

Los sólidos totales no mostraron diferencias significativas, salvo T2 (30.49 ± 0.66 %), que fue inferior al resto (C: 32.67; T1: 33.10; T3: 32.68 %). Debido a que la base de soya, el endulzante y la grasa vegetal se mantuvieron constantes, estos componentes aportaron la mayor parte de los sólidos, por lo que el extracto al 1–3 % resultó marginal. Frente a lo observado con biomasa microalgal, esto difiere, ya que Agustini *et al*. (2016) reportaron un efecto significativo de la adición de *Spirulina platensis* sobre los sólidos totales del helado. Como diferencia metodológica clave, aquí se empleó la fracción lipídica purificada. En este sentido, Ng *et al*. (2024) registraron sólidos totales de 20.61 a 28.99 % en postres de soya, y los valores del presente trabajo son superiores, lo que parece reflejar una formulación con mayor carga de sólidos.

En T2, la humedad fue significativamente mayor, 69.51 ± 0.66 %, que en los demás tratamientos (C: 67.33; T1: 66.90; T3: 67.32 %), lo que corresponde de forma estrictamente complementaria con su menor contenido de sólidos totales. La relación inversa entre sólidos y humedad coincidió con Ng *et al*. (2024), quienes relacionaron un mayor contenido de sólidos con menor proporción de agua. La variación de T2 y la ausencia de una tendencia con la dosis podrían deberse a una distribución desigual del extracto lipídico incorporado, como sugieren las variaciones de humedad descritas por Fanari *et al*. (2025).

El contenido de cenizas no mostró cambios estadísticamente significativos, indicando un aporte mínimo de minerales del extracto lipídico de *Chlorella vulgaris*. Esto podría atribuirse a la purificación, que redujo componentes no lipídicos, incluidos los minerales.

A diferencia de lo informado por Agustini et al. (2016), quienes observaron un efecto significativo de la incorporación de biomasa de *Spirulina* sobre la composición del producto, incluido el contenido mineral, en el presente estudio se utilizó una fracción lipídica purificada y no la biomasa microalgal completa. Los valores observados fueron del mismo orden que el intervalo de 0.33 a 0.98 % reportado por Ng et al. (2024) en postres congelados elaborados con soya, por lo que el contenido de cenizas podría atribuirse principalmente a la base de soya.

El overrun aumentó de forma dependiente de la dosis y significativa. La coincidencia con la sustitución grasa por lípidos vegetales es notable: Wang *et al*. (2022) reportaron un aumento del overrun de 18.37 % (sin sustitución) a 29.74 % (40 % de sustitución de una fracción lipídica de soya), un valor de partida casi idéntico al control de este estudio. Dichos autores atribuyeron el incremento a la mayor capacidad espumante de los lípidos frente a los glóbulos de grasa láctea y al aumento de la viscosidad aparente de la mezcla. La misma tendencia ascendente con microalgas fue descrita por Boyanova *et al*. (2022), con un overrun que pasó de 30.6 % en el control a 48.3 % al incrementar la concentración de *Spirulina*. Así, la fracción lipídica de *Chlorella vulgaris* favoreció la incorporación y estabilización del aire, probablemente al reforzar la red de glóbulos grasos parcialmente coalescidos.

El índice de derretimiento disminuyó de forma progresiva y significativa entre todos los tratamientos, lo que evidencia un claro efecto de respuesta a la dosis sobre la estabilidad estructural. Esta mejora concuerda con el mecanismo descrito por Ng *et al*. (2024), quienes observaron que las proteínas de soya y guisante confieren estabilidad estructural al helado mediante una mayor

coalescencia parcial de la grasa, con menores tasas de fusión y mejor retención de forma. De igual modo, Wang *et al*. (2022) reportaron mejores propiedades de fusión con sustituciones de 30–50 % de lípidos de soya. La reducción de 17 puntos porcentuales entre el control y T3 confirma que el extracto lipídico, integrado a la fase grasa, refuerza la matriz frente al derretimiento.

La gravedad específica aumentó con la concentración del extracto lipídico, siendo T3 (623.67 ± 6.51) significativamente mayor que el control (577.33 ± 26.80); T1 y T2 fueron intermedios (AB). El intervalo es prácticamente idéntico al de Ng *et al*. (2024), quienes reportaron un incremento de 589.0 a 634.4 kg/m³ al aumentar el contenido de soya y de sólidos en el postre. Una mayor viscosidad aparente, que Wang *et al*. (2022) asociaron con la inclusión de lípidos de soya en la formulación, se relaciona con una mezcla más compacta. El aumento simultáneo del overrun y de la gravedad específica no es contradictorio, ya que esta última se determina en la mezcla, la cual tiene mayor densidad debido al extracto y a los sólidos, mientras que el overrun se mide después del batido del producto congelado.

En T2 se observó la mayor luminosidad (36.34 ± 0.63), significativamente superior a los demás tratamientos. Como este valor no correspondió a la mayor dosis de extracto, el cambio en L* podría relacionarse con la microestructura y la incorporación de aire, que favorecen la dispersión de la luz. Este comportamiento difiere parcialmente de Durmaz *et al*. (2020), quienes señalaron que el color del helado depende del tipo y concentración de microalga, aunque el cacao pudo reducir este efecto, como también sugieren Fanari *et al*. (2025).

Por otra parte, los parámetros a* y b* no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Los valores positivos de a* indicaron que no hubo desplazamiento hacia tonalidades verdes, mientras que la estabilidad de b* mostró ausencia de cambios hacia tonos amarillos o azules. Estos resultados sugieren que los pigmentos residuales del extracto no modificaron de manera

importante el color del helado. El tono pardo del cacao y el menor contenido de clorofila de la fracción lipídica respecto a la biomasa pudieron favorecer esta estabilidad cromática. En conjunto, los resultados respaldan el uso del cacao como matriz enmascarante para incorporar la fracción lipídica de *Chlorella vulgaris*.

8.3.1 Evaluación sensorial

En el control y en T1 se observaron las intensidades más altas de cremosidad, suavidad en boca, sabor a chocolate, dulzor y aroma a chocolate, mientras que T2 y T3 incrementaron de manera evidente el sabor a microalga y, en menor medida, el sabor a soya. Entre los tratamientos, la intensidad del color café y la uniformidad del color se mantuvieron similares. Dado que T1 (1 %) conservó un perfil cercano al control, este comportamiento dependiente de la dosis coincide con los reportado por Agustini *et al*. (2016), quienes ubicaron una concentración óptima de microalga alrededor de 1.2 % en helado, antes de que las notas no deseadas afectaran la aceptación. Al aparecer descriptores de microalga en T2–T3, la dosis parece haber superado la capacidad de enmascaramiento del cacao, lo que coincide con la influencia de la concentración de microalga sobre el perfil sensorial descrita por Durmaz *et al*. (2020) y con el aumento de notas atípicas, como umami/salado, que Fanari *et al*. (2025) asocian con *Chlorella vulgaris.*

8.3.2 Interpretación general de la fase de aplicación

En conjunto, el extracto lipídico de *Chlorella vulgaris* modificó principalmente las propiedades tecnológicas del helado, como el overrun (18 a 25 %), el índice de derretimiento (77.5 a 60.2 %) y la gravedad específica (577 a 624), mientras que las variables fisicoquímicas, pH, sólidos totales y cenizas, junto con las coordenadas a* y b*, se mantuvieron estables (Durmaz *et al*., 2020).

El extracto mostró potencial como ingrediente lipídico funcional, ya que su incorporación mejoró propiedades tecnológicas del helado, en concordancia con

Wang *et al*. (2022) y Boyanova *et al*. (2022). En general, T3 presentó el mejor desempeño tecnológico, mientras que T1 mostró un mejor equilibrio sensorial al conservar características similares al control. Además, la estabilidad de a* y b* respaldó al cacao como una matriz adecuada para enmascarar cambios de color asociados con la fracción lipídica de *Chlorella vulgaris*.

9 CONCLUSIONES

Para la variable de biomasa se vio su aumento al momento de aumentar los reactivos de KH_2PO_4 y $C_6H_{12}O_6$, en valores entre 0.6616 a 0.7804 g/L, mientras que para la variable de lípidos los mejores resultados se encontraron en valores bajos de $NaNO_3$ y un alto aporte de $C_6H_{12}O_6$ en donde se obtuvieron valores entre 12.66 a 19.27 %. La optimización simultánea por la función de deseabilidad (D = 0.807) estableció como condición de compromiso 0.210 g/L de $NaNO_3$, 0.28 g/L de KH_2PO_4 y 0.8 g/L de $C_6H_{12}O_6$, con la que el modelo predijo 0.7804 g/L de biomasa y 16.39 % de lípidos, priorizando la obtención global de lípidos sobre cualquier respuesta individual.

La EAU funcionó como un método eficaz para obtener la fracción lipídica, siendo un apoyo la MSR permitiendo optimizar los valores, los cuales rondaron entre los 5.38 a 12.32%, las condiciones que permitieron el mejor resultado fueron 30 % de amplitud, 15 min de sonicación y una relación hexano:etanol de 3:1, siendo la amplitud la que presentó mayor efecto en el proceso.

En cuanto a la fracción lipídica, el perfil se caracterizó por el predominio de ácidos grasos poliinsaturados, cuyo contenido osciló entre 63.46 y 63.81 % en peso, destacando la presencia de EPA y DHA en concentraciones de 19.06 a 19.82 % y 43.94 a 44.48 % en peso, respectivamente.

La incorporación del extracto lipídico en un helado de chocolate a base de soya demostró ser viable. Como ingrediente lipídico funcional, este extracto mejoró las propiedades tecnológicas de forma dependiente de la dosis. El overrun aumentó de 18 a 25 %, y mientras que la gravedad específica aumentó aproximadamente 8.03 **%**, al pasar de 577.33 ± 26.80 en el control a 623.67 ± 6.51 en T3, el índice de derretimiento disminuyó de 77.5 a 60.2 % presentando cambios importantes; de manera distinta, las variables fisicoquímicas, pH, sólidos totales y cenizas, junto con las coordenadas cromáticas a* y b*, permanecieron sin variaciones relevantes, lo que podría indicar que la matriz de cacao

enmascaró eficazmente el color y que el empleo de la fracción lipídica purificada redujo el impacto sensorial en comparación con la biomasa completa. Aunque el tratamiento T3 registró el mejor desempeño tecnológico, T1 pareció ofrecer el mejor equilibrio sensorial al mantener los atributos del control.

Con éxito, el estudio integró la producción de biomasa, la extracción optimizada de lípidos y su aprovechamiento alimentario, y aportó evidencia original sobre la incorporación de la fracción lipídica de *Chlorella vulgaris* en un helado de base vegetal, una combinación que, al parecer, no se había documentado antes en la literatura científica de acceso abierto revisada por pares. Cabe destacar el potencial funcional del helado, y nutracéutico del aceite, debido a que la fracción lipídica añadida contiene una proporción elevada de EPA y DHA, dos de los principales ácidos grasos omega, con probadas cualidades en la salud cardiovascular, procesos inflamatorios a nivel celular, entre otros.

10 RECOMENDACIONES

Para hacer la comprobación de la combinación de valores de las optimizaciones las cuales nos dieron mejores resultados guiándonos por las MSR, esto para poder revisar que la estadística sea la correcta para poder repetir el experimento. En otros artículos los investigadores han aplicado esta misma metodología para poder bajar la probabilidad de que encuentren un problema en el escalamiento del experimento (Phan *et al*., 2023; Shekhar *et al*., 2023).

También recomendamos evaluar la estabilidad oxidativa cuando la muestra se almacena, una de las pruebas más usadas es el índice de peróxidos. Debido a que se expone a condiciones ambientales (oxígeno, luz y temperatura) ya que los ácidos grasos pueden verse afectados su beneficio nutricional y sensorial. Algunos autores recomiendan tener un resguardo con protección de luz, oxígeno y temperaturas frías (4 °C) (Goh *et al*., 2023; García-Segovia *et al*., 2024).

Se puede optar por una microencapsulación, los materiales más usados comúnmente son maltodextrina, goma arábiga, etc; esto para ayudar a evitar la oxidación, apoya a que se disuelva uniformemente para no afectar al momento del sensorial por los sabores a microalgas, este consejo es importante ya que ayuda a que los fisicoquímicos tengan valores más cercanos a los esperados, porque la microencapsulación nos apoya a mantener los beneficios tecnológicos y funcionales del extracto sin afectar la aceptación del producto (García-Segovia *et al*., 2024).

En estudios futuros, para poder hacer pruebas recomiendo tomar como base inicial el T1, esto porque es el que presentó mayor afinidad con la versión control en los valores fisicoquímicos y sensoriales. El T3 presentó mejores propiedades tecnológicas, pero, en lo sensorial fue el menos aceptado. Por eso la recomendación es trabajar en rangos entre ellos dos y complementarlo con la microencapsulación para obtener mejores resultados generales.

Se aconseja realizar diferentes pruebas en el producto final como vida útil, pruebas de viabilidad económica y el impacto ambiental del mismo. Como una variante para poder formular alimentos funcionales, el agregado del extracto lipídico a una matriz alimentaria es una buena alternativa, únicamente se debe de ver factores ambientales, microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales antes de ver la opción de hacer un escalamiento a planta piloto.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K. Y., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., & Schenk, P. M. (2012). Microalgal biofactories: A promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories, 11*, 96. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-96

Agustini, T. W., Ma'ruf, W. F., Widayat, W., Suzery, M., Hadiyanto, H., & Benjakul, S. (2016). Application of *Spirulina platensis* on ice cream and soft cheese with respect to their nutritional and sensory perspectives. *Jurnal Teknologi, 78*(4–2), 245–251. https://doi.org/10.11113/jt.v78.8216

Angelini, F., Bellini, E., Marchetti, A., Salvatori, G., Villano, M., Pontiggia, D., & Ferrari, S. (2024). Efficient utilization of monosaccharides from agri-food byproducts supports *Chlorella vulgaris* biomass production under mixotrophic conditions. *Algal Research, 77*, 103358. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103358

AOAC International. (2019). *Official methods of analysis of AOAC International* (21.ª ed.). AOAC International.

Arora, N., & Philippidis, G. P. (2021). Insights into the physiology of *Chlorella vulgaris* cultivated in sweet sorghum bagasse hydrolysate for sustainable algal biomass and lipid production. *Scientific Reports, 11*, 6779. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86372-2

Bito, T., Okumura, E., Fujishima, M., & Watanabe, F. (2024). Chemical compounds, bioactivities, and applications of *Chlorella vulgaris* in food, feed and medicine. *Applied Sciences, 14*(23), 10810. https://doi.org/10.3390/app142310810

Blanco-Llamero, C., García-García, P., & Señoráns, F. J. (2021). Combination of synergic enzymes and ultrasounds as an effective pretreatment process to break microalgal cell wall and enhance algal oil extraction. *Foods, 10*(8), 1928. https://doi.org/10.3390/foods10081928

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37*(8), 911–917. https://doi.org/10.1139/o59-099

Boyanova, P., Gradinarska, D., Dobreva, V., Panayotov, P., Momchilova, M., & Zsivanovits, G. (2022). Effect of *Spirulina platensis* on the quality and antioxidants characteristics of ice cream. *BIO Web of Conferences, 45*, 01009. https://doi.org/10.1051/bioconf/20224501009

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances, 25*(3), 294–306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

Durmaz, Y., Kilicli, M., Toker, O. S., Konar, N., Palabiyik, I., & Tamtürk, F. (2020). Using spray-dried microalgae in ice cream formulation as a natural colorant: Effect on physicochemical and functional properties. *Algal Research, 47*, 101811. https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101811

Escorsim, A. M., da Rocha, G., Vargas, J. V. C., Mariano, A. B., Ramos, L. P., Corazza, M. L., & Cordeiro, C. S. (2018). Extraction of *Acutodesmus obliquus* lipids using a mixture of ethanol and hexane as solvent. *Biomass and Bioenergy, 108*, 470–478. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.10.035

Fanari, F., Comaposada, J., Aymerich, T., Claret, A., Guerrero, L., & Castellari, M. (2025). Development of vegetable creams enriched with different microalgae species: A study on the physicochemical and sensory stability over time. *Foods, 14*(7), 1230. https://doi.org/10.3390/foods14071230

Foerster, I., Seames, W., Oleksik, J., Kubátová, A., & Ross, A. (2023). A comprehensive study of techniques to optimize the extraction of lipids from the autotrophic strain of the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Life, 13*(10), 1997. https://doi.org/10.3390/life13101997

García-Segovia, P., Uribe-Wandurraga, Z. N., Igual, M., Mullor, J. L., & Martínez-Monzó, J. (2024). Lipid extract of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* as a bioactive ingredient. *Food Science and Technology International*. https://doi.org/10.1177/10820132241264419

Ghaderi, S., *et al*. (2021). Qualitative analysis of the structural,

thermal and rheological properties of a plant ice cream based on soy and sesame milks. *Food Science & Nutrition, 9*(3), 1289–1299. https://doi.org/10.1002/fsn3.2037

Ghodrat Jahromi, K., Heydari Koochi, Z., Kavoosi, G., & Shahsavar, A. (2022). Manipulation of fatty acid profile and nutritional quality of *Chlorella vulgaris* by supplementing with citrus peel fatty acid. *Scientific Reports, 12*, 8151. https://doi.org/10.1038/s41598-022-12309-y

Gil, M. D. (2024). Effect of macro and microalgae addition on nutritional, physicochemical, sensorial, and functional properties of a vegetable cream. *Foods, 13*(11), 1651. https://doi.org/10.3390/foods13111651

Goff, H. D., & Hartel, R. W. (2013). *Ice cream* (7.ª ed.). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6096-1

Goh, T. H., Tan, K. M., & Kassim, M. A. (2023). Green ultrasonication-assisted extraction of microalgae *Chlorella* sp. for polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich lipid extract using alternative solvent mixture. *Bioprocess and Biosystems Engineering, 46*(10), 1499–1512. https://doi.org/10.1007/s00449-023-02917-x

Grubišić, M., Peremin, I., Djedović, E., Šantek, B., & Ivančić Šantek, M. (2024). Cultivation of a novel strain of *Chlorella vulgaris* S2 under phototrophic, mixotrophic, and heterotrophic conditions, and effects on biomass growth and composition. *Fermentation, 10*(6), 270. https://doi.org/10.3390/fermentation10060270

Hadrich, B., Akremi, I., Dammak, M., Barkallah, M., Fendri, I., & Abdelkafi, S. (2018). Optimization of lipids' ultrasonic extraction and production from *Chlorella* sp. using response-surface methodology. *Lipids in Health and Disease, 17*, 87. https://doi.org/10.1186/s12944-018-0702-z

Hernández, H., Nunes, M. C., Prista, C., & Raymundo, A. (2022). Innovative and healthier dairy products through the addition of microalgae: A review. *Foods, 11*(5), 755. https://doi.org/10.3390/foods11050755

Liu, T., Chen, Z., Xiao, Y., Yuan, M., Zhou, C., Liu, G., Fang, J., &

Yang, B. (2022). Biochemical and morphological changes triggered by nitrogen stress in the oleaginous microalga *Chlorella vulgaris*. *Microorganisms, 10*(3), 566. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030566

Markowska, J., Tyfa, A., Drabent, A., & Stępniak, A. (2023). The physicochemical properties and melting behavior of ice cream fortified with multimineral preparation from red algae. *Foods, 12*(24), 4481. https://doi.org/10.3390/foods12244481

Mauricio, T., Couto, D., Lopes, D., Conde, T., Pais, R., Batista, J., Melo, T., Pinho, M., Moreira, A. S. P., Trovão, M., Barros, A., Cardoso, H., Silva, J., Domingues, P., & Domingues, M. R. (2023). Differences and similarities in lipid composition, nutritional value, and bioactive potential of four edible *Chlorella vulgaris* strains. *Foods, 12*(8), 1625. https://doi.org/10.3390/foods12081625

Murray, J. M., Delahunty, C. M., & Baxter, I. A. (2001). Descriptive sensory analysis: Past, present and future. *Food Research International, 34*(6), 461–471. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00070-9

Ng, C. K. Z., Leng, W. Q., Lim, C. H., & Du, J. (2024). Physicochemical property characterization, amino acid profiling, and sensory evaluation of plant-based ice cream incorporated with soy, pea, and milk proteins. *Journal of Dairy Science, 107*(12), 10268–10279. https://doi.org/10.3168/jds.2024-25008

Nurko, E., & Nakilcioğlu, E. (2025). Optimization of *Spirulina*-enriched vegan cake formulation using response surface methodology. *Food Science & Nutrition*. https://doi.org/10.1002/fsn3.70116

Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food and Bioprocess Technology, 6*(1), 36–60. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9

Pavlov, V. A., Grigorenko, A. V., Astafieva, A. P., & Vlaskin, M. S. (2025). Growth of *Chlorella vulgaris* under atmospheric CO_2 in lab-scale

photobioreactors: Effects of aeration rate and growth model comparison. *Bioengineering,* *12*(12), 1294. https://doi.org/10.3390/bioengineering12121294

Phan, T. M., Huynh, B. V., Darsono, S. N. A. C., Pham, T. L., & Bui, H. M. (2023). Ultrasound-assisted lipid extraction from *Chlorella* sp.*:* Taguchi design and life cycle assessment. *Molecular Biotechnology*. https://doi.org/10.1007/s12033-023-00836-6

Ratomski, P., & Hawrot-Paw, M. (2021). Influence of nutrient-stress conditions on *Chlorella vulgaris* biomass production and lipid content. *Catalysts, 11*(5), 573. https://doi.org/10.3390/catal11050573

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35*, 265–278. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007

Sakarika, M., & Kornaros, M. (2017). Kinetics of growth and lipids accumulation in *Chlorella vulgaris* during batch heterotrophic cultivation: Effect of different nutrient limitation strategies. *Bioresource Technology, 243*, 356–365. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.110

Shamah-Levy, T., Romero-Martínez, M., Barrientos-Gutiérrez, T., Cuevas-Nasu, L., Bautista-Arredondo, S., Colchero, M. A., Gaona-Pineda, E. B., Lazcano-Ponce, E., Martínez-Barnetche, J., Alpuche-Arana, C., & Rivera-Dommarco, J. (2022). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2022. Resultados nacionales*. Instituto Nacional de Salud Pública. https://doi.org/10.21149/spm.v65.8404

Shekhar, S., Prakash, P., Singha, P., Prasad, K., & Singh, S. K. (2023). Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Allium sativum* leaves using response surface methodology and artificial neural network coupled with genetic algorithm. *Foods, 12*(9), 1925. https://doi.org/10.3390/foods12091925

Stone, H., Sidel, J., Oliver, S., Woolsey, A., & Singleton, R. C. (1974). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food*

Technology, 28(11), 24–34.

Uribe-Wandurraga, Z. N., Martínez-Sánchez, I., Savall, C., García-Segovia, P., & Martínez-Monzó, J. (2021). Microalgae fortification of low-fat oil-in-water food emulsions: An evaluation of the physicochemical and rheological properties. *Journal of Food Science and Technology, 58*(10), 3701–3711. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04828-1

Wang, W., Wang, M., Xu, C., Liu, Z., Gu, L., Ma, J., Jiang, L., Jiang, Z., & Hou, J. (2022). Effects of soybean oil body as a milk fat substitute on ice cream: Physicochemical, sensory and digestive properties. *Foods, 11*(10), 1504. https://doi.org/10.3390/foods11101504

Ward, V. C. A., & Rehmann, L. (2019). Fast media optimization for mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris*. *Scientific Reports, 9*, 19262. https://doi.org/10.1038/s41598-019-55870-9

Xie, Z., Lin, W., Liu, J., & Luo, J. (2020). Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for biomass production by using pH-stat culture medium: Glucose-Acetate-Phosphorus (GAP). *Bioresource Technology, 313*, 123506. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123506

Yalcin, B., Kamiloglu, S., & Kilic-Akyilmaz, M. (2024). Investigation of the use of microalgae in ice cream formulation. *ITU Journal of Food Science and Technology, 2*(2), 47–56.

Yan, X., Shan, S., Li, X., Xu, Q., Yan, X., Ruan, R., & Cheng, P. (2024). Carbon and energy metabolism for the mixotrophic culture of *Chlorella vulgaris* using sodium acetate as a carbon source. *Frontiers in Microbiology, 15*, 1436264. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1436264

Yun, H.-S., Kim, Y.-S., & Yoon, H.-S. (2021). Effect of different cultivation modes (photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic) on the growth of *Chlorella* sp. and biocompositions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9*, 774143. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.774143