



industriales

etsii

**Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Industrial**



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

**ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS
A PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL
*NANNOCHLOROPSIS GADITANA***

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**MÁSTER EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y DE PROCESOS
SOSTENIBLES**

Autor: María Dolores Hernández López
Director: Víctor Manuel Ortiz Martínez
Codirector: Sergio Sánchez Sesgado

Cartagena, 27 de julio de 2022

**ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS A
PARTIR DE BIOMASA MICROALGAL
*NANNOCHLOROPSIS GADITANA***

Memoria presentada en la Escuela Técnica
Superior de Ingeniería Industrial de la
Universidad Politécnica de Cartagena.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a todas las personas que han hecho posible realizar este proyecto para poner fin a mis estudios de máster.

Agradecer a D. Víctor Manuel Ortiz Martínez, director de este trabajo, por su excelente labor como docente y como director del proyecto. Gracias por la confianza y ayuda brindada durante todo el proceso a pesar de las trabas que me han surgido. También agradecer su ayuda y trabajo a D. Sergio Sánchez Ssegado, codirector del trabajo.

Agradecer a mi familia, en especial a mis padres, su apoyo incondicional durante todos mis años de estudio y, por último, a mis compañeros, con los que he compartido grandes momentos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	4
2. ANTECEDENTES	6
2.1. MICROALGAS.....	6
2.1.1. Composición nutricional de las microalgas	7
2.1.1.1. Proteínas.....	8
2.1.1.2. Carbohidratos.....	9
2.1.1.3. Lípidos.....	9
2.2. APLICACIONES DE LAS MICROALGAS.....	10
2.2.1. Producción de biocombustibles	11
2.2.2. Alimentación humana	11
2.2.3. Alimentación animal.....	12
2.2.4. Biofertilizantes.....	12
2.2.5. Cosmética	12
2.2.6. Ácidos grasos poliinsaturados	13
2.2.7. Pigmentos.....	13
2.3. PRODUCCIÓN DE LAS MICROALGAS.	13
2.3.1. Tipos de cultivo	13
2.3.1.1. Cultivos discontinuos (“Batch”).....	14
2.3.1.2. Cultivo semicontinuo	14
2.3.1.3. Cultivo continuo.....	14
2.3.2. Sistemas de cultivo	14
2.3.2.1. Sistemas abiertos.....	15
2.3.2.2. Sistemas cerrados.....	16

2.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	18
2.4.1. Técnicas de extracción convencionales.....	18
2.4.1.1. Extracción mediante disolventes	18
2.4.2. Técnicas de extracción no convencionales.....	19
2.4.2.1. Extracción de líquido a presión	19
2.4.2.2. Extracción de fluido supercrítico.....	19
2.4.2.3. Extracción de fluido subcrítico.....	20
2.4.2.4. Extracción por ultrasonidos	20
2.4.2.5. Extracción asistida por microondas.....	20
2.4.3. Técnicas de extracción de ácidos grasos de cadena larga.....	21
2.4.3.1. Método Soxhlet	21
2.4.3.2. Método Folch.....	22
2.4.3.3. Método Bligh & Dyer	23
2.4.3.4. Método de extracción mediante transesterificación in situ	23
2.5. ÁCIDOS GRASOS.....	23
2.5.1. Clasificación y fuentes de obtención.....	24
2.5.1.1. Microalgas marinas	26
3. NANNOCHLOROPSIS GADITANA.....	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1. Materiales.....	31
4.1.1. Muestra de microalga	31
4.1.2. Reactivos químicos.....	32
4.2. Equipos e instrumentación	33
4.2.1. Instrumentación y equipos empleados.....	33
4.2.2. Equipo analítico	34
4.3. Extracción de lípidos por transesterificación in-situ de <i>Nannochloropsis gaditana</i>.....	35

4.3.1. Método de transesterificación in situ.....	35
4.3.2. Preparación de las disoluciones	37
4.3.3. Procedimiento experimental.....	37
4.4. Cromatografía de gases.....	39
4.4.1. Descripción del equipo.....	39
4.4.2. Tipos de detectores	40
5. RESULTADOS.....	42
5.1. Identificación de los patrones.....	42
5.2. Obtención de las rectas de calibrado	44
5.3. Tratamiento de datos	48
5.4. Determinación de lípidos de la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> . 52	
5.5. Comparación de los pretratamientos de la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i>	54
5.6. Influencia de las variables de los ensayos	58
5.6.1. Pretratamiento NaCl/NaOH	59
5.6.2. Pretratamiento con ultrasonidos	64
6. CONCLUSIONES	70
7. BIBLIOGRAFÍA	73
8. ANEXOS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Ilustración 1. Diversidad de microalgas.	7
Ilustración 2. Hutt Lagoon en Australia, instalaciones de cultivo de <i>Dunaliella</i> [10]..	15
Ilustración 3. Sistema tipo raceway de cultivo de microalgas [10].	16
Ilustración 4. Sistemas de cultivos cerrados. a) Reactor plano. b) Cultivo en bolsas. c) Reactores tubulares horizontales y verticales [10].	17
Ilustración 5. Sistema de extracción Soxhlet [19].	22
Ilustración 6. Fórmula estructural del EPA y DHA [25].	25
Ilustración 7. Beneficios del EPA en la salud cardiovascular [26].....	26
Ilustración 8. <i>Nannochloropsis gaditana</i> [30].	28
Ilustración 9. Muestras de microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> liofilizadas pretratadas por ultrasonidos y NaCl/NaOH, respectivamente.	32
Ilustración 10. Cromatógrafo de gases SAIT [33].	35
Ilustración 11. Reacción de transesterificación [34].....	36
Ilustración 12. Soporte de matraz Erlenmeyer sobre vaso de precipitados.	37
Ilustración 13. Equipo experimental.....	38
Ilustración 14. Esquema de un cromatógrafo de gases.....	39
Ilustración 15. Cromatograma para patrón estándar 12 ppm.	42
Ilustración 16. Recta de calibrado para el pico 1.	45
Ilustración 17. Recta de calibrado para el pico 2.	45
Ilustración 18. Recta de calibrado para el pico 3.	46
Ilustración 19. Recta de calibrado para el pico 4.	46
Ilustración 20. Recta de calibrado para el pico 8.	47
Ilustración 21. Recta de calibrado para el pico 9.	47
Ilustración 22. Recta de calibrado para el pico 13.	48

Ilustración 23. Lípidos del ácido tetradecanoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.	55
Ilustración 24. Lípidos del ácido hexadecanoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.	55
Ilustración 25. Lípidos del ácido cis-9-hexadecenoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.....	56
Ilustración 26. Lípidos del ácido oleico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.	56
Ilustración 27. Lípidos del ácido cis-9,12,15-octadecadienoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.....	57
Ilustración 28. Lípidos del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.	57
Ilustración 29. Efectos pico 2 (NaCl/NaOH).....	59
Ilustración 30. Efectos pico 3 (NaCl/NaOH).....	60
Ilustración 31. Efectos pico 4 (NaCl/NaOH).....	61
Ilustración 32. Efectos pico 8 (NaCl/NaOH).....	61
Ilustración 33. Efectos pico 9 (NaCl/NaOH).....	62
Ilustración 34. Efectos pico 13 (NaCl/NaOH).....	63
Ilustración 35. Efectos pico 2 (Ultrasonidos).....	64
Ilustración 36. Efectos pico 3 (Ultrasonidos).....	65
Ilustración 37. Efectos pico 4 (Ultrasonidos).....	66
Ilustración 38. Efectos pico 8 (Ultrasonidos).....	66
Ilustración 39. Efectos pico 9 (Ultrasonidos).....	67
Ilustración 40. Efectos pico 13 (Ultrasonidos).....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición bioquímica de microalgas [1].	8
Tabla 2. Compuestos bioactivos en microalgas y sus beneficios para la salud [2]...	10
Tabla 3. Algas marinas productoras de PUFA's [27].	27
Tabla 4. Composición bioquímica <i>Nannochloropsis gaditana</i> [31].	29
Tabla 5. Propiedades físicas de los reactivos.	33
Tabla 6. Condiciones de operación procedimiento experimental.	36
Tabla 7. Ácidos grasos presentes en la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> .	43
Tabla 8. Ácidos grasos presentes en la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> a 12 ppm.	43
Tabla 9. Ácidos grasos presentes en la microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> para diferentes patrones estándar.	44
Tabla 10. Resultados del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento NaCl/NaOH.	49
Tabla 11. Resultados del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento de ultrasonidos.	50
Tabla 12. Resultados del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento NaCl/NaOH.	51
Tabla 13. Resultados del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento de ultrasonidos.	51
Tabla 14. Resultados del ácido tetradecanoico.	52
Tabla 15. Resultados del ácido hexadecanoico.	52
Tabla 16. Resultados del ácido cis-9-hezadecenoico.	53
Tabla 17. Resultados del ácido oleico.	53
Tabla 18. Resultados del ácido cis-9,12,15-octadecadienoico.	53
Tabla 19. Resultados del ácido eicosapentaenoico.	54

RESUMEN

Las microalgas son organismos fotosintéticos con la capacidad de transformar la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis dando lugar a una gran variedad de productos de interés industrial, entre los que destaca la biomasa. Además, se pueden cultivar en medios que no son aptos para la agricultura, como aguas salobres, aguas residuales o suelos arcillosos, aprovechando, de esta forma, suelos no cultivables.

La biomasa microalgal dentro de la industria alimentaria para obtener compuestos bioactivos de alto valor añadido y la obtención de biocombustibles es un proceso que se ha estudiado muy frecuentemente en los últimos años. Algunos compuestos como los carotenoides, las clorofilas, los ácidos grasos poliinsaturados y los polisacáridos sulfatados (antivirales) son beneficiosas para la salud.

Nannochloropsis gaditana es una microalga con una fuente importante de compuestos con alto valor comercial entre los que destacan: pigmentos como clorofila-A, β -caroteno, violaxantina y vaucheriaxantina; y ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA).

El EPA es una grasa marina omega-3 con propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y nutracéuticas importantes para nuestro bienestar.

El principal objetivo de este proyecto consiste en el estudio de la extracción de lípidos de la microalga *Nannochloropsis gaditana*, destacando el análisis de EPA. Para ello, se utilizará la transesterificación *in-situ* como método de extracción y la biomasa microalgal estará pretratada con dos procedimientos diferentes: ultrasonidos y tratamiento con NaCl/NaOH. Estos pretratamientos ayudan a debilitar la pared celular de la microalga y así, facilitar la liberación de lípidos durante el proceso de extracción. Para cada tipo de pretratamiento, se van a estudiar diferentes condiciones de trabajo para hallar las condiciones óptimas de cara a maximizar la extracción de lípidos.

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic organisms capable of transforming solar energy into chemical energy through photosynthesis, giving rise to a wide variety of products of industrial interest, including biomass. In addition, they can be grown in environments that are not suitable for agriculture, such as brackish water, wastewater or clay soils, thus taking advantage of uncultivable soils.

Microalgal biomass within the food industry to obtain bioactive compounds with high added value and to obtain biofuels is a process that has been studied very frequently in recent years. Some compounds such as carotenoids, chlorophylls, polyunsaturated fatty acids and sulfated polysaccharides (antivirals) are beneficial to health.

Nannochloropsis gaditana is a microalgae with an important source of compounds with high commercial value, including: pigments such as chlorophyll-A, β -carotene, violaxanthin and vaucherixanthin; and polyunsaturated fatty acids such as eicosapentaenoic acid (EPA).

EPA is an omega-3 marine fat with antimicrobial, anti-inflammatory, and nutraceutical properties important to our well-being.

The main objective of this project is to study the extraction of lipids from the microalgae *Nannochloropsis gaditana*, highlighting the EPA analysis. For this, in-situ transesterification will be used as an extraction method and the microalgal biomass will be pre-treated with two different procedures: ultrasound and NaCl/NaOH treatment. These pretreatments help weaken the cell wall of the microalgae and thus facilitate the release of lipids during the extraction process. For each type of pretreatment, different working conditions will be studied to find the optimal conditions to maximize lipid extraction.



industriales
etsii

**Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Industrial**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La biomasa microalgal presenta una amplia utilización desde la obtención de productos biotecnológicos, producción de biocombustibles o biofertilizantes y alimentación humana y animal [1].

Las microalgas producen una elevada cantidad de moléculas bioquímicas que incluyen lípidos, carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas y minerales. Las microalgas presentan un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, ácidos imprescindibles para el desarrollo y la fisiología humana [2].

El principal objetivo de este trabajo trata de estudiar la extracción de lípidos a partir de biomasa microalgal de la especie *Nannochloropsis gaditana*.

La extracción de lípidos se optimizará con procesos de pretratamiento con soluciones de NaCl/NaOH y ultrasonidos, y se llevará a cabo mediante el método de transesterificación *in-situ* con metanol y HCl. Para cada uno de los pretratamientos se analizarán temperatura, tiempo de extracción y concentración del catalizador (HCl) con el objetivo de obtener los parámetros de operación óptimos.

Para cuantificar el objetivo principal, se han definido una serie de objetivos secundarios:

- Determinación de lípidos de la microalga *Nannochloropsis gaditana* con la que se obtenga el valor óptimo de biomasa microalgal.
- Comparación de los pretratamientos para el cual se obtienen los mejores rendimientos en la obtención de lípidos de la microalga *Nannochloropsis gaditana*.
- Influencia de las diferentes variables, para cada pretratamiento, en la obtención de lípidos de *Nannochloropsis gaditana*.



industriales

etsii

**Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Industrial**



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1. MICROALGAS

Hoy en día, son innegables los problemas climáticos sucedidos a nivel mundial, los cuales incluyen, entre otros, inundaciones, sequías o acidificación de los océanos. La principal responsable de este fenómeno es la actividad humana debido, sobre todo, al desarrollo industrial que constituye un elevado riesgo a la calidad del aire y de las aguas [1].

Los recursos no alterados por la actividad humana y aportados por la naturaleza se consideran renovables. Optar por ellos, y no por recursos más contaminantes como pueden ser los combustibles fósiles, mitiga el daño ambiental. Los recursos naturales renovables pueden convertirse en fuentes de energía, son inagotables y tienen un bajo impacto ambiental. La energía solar, la biomasa, la energía eólica, la geotérmica o la mareomotriz, son algunos ejemplos [3].

Prima, por tanto, el desarrollo de nuevas tecnologías que estén enfocadas al cuidado medioambiental, al aprovechamiento de los residuos como subproductos y a generar energías limpias de bajo costo. Hay que destacar, entre estas tecnologías, los cultivos de microalgas al ser considerados *eco-friendly* ya que incorporan a su metabolismo contaminantes de medios líquidos y gaseosos para generar biomasa [1].

En la Ilustración 1 se observa una amplia variedad de microalgas que se pueden encontrar presentes en todos los ecosistemas de la biosfera.

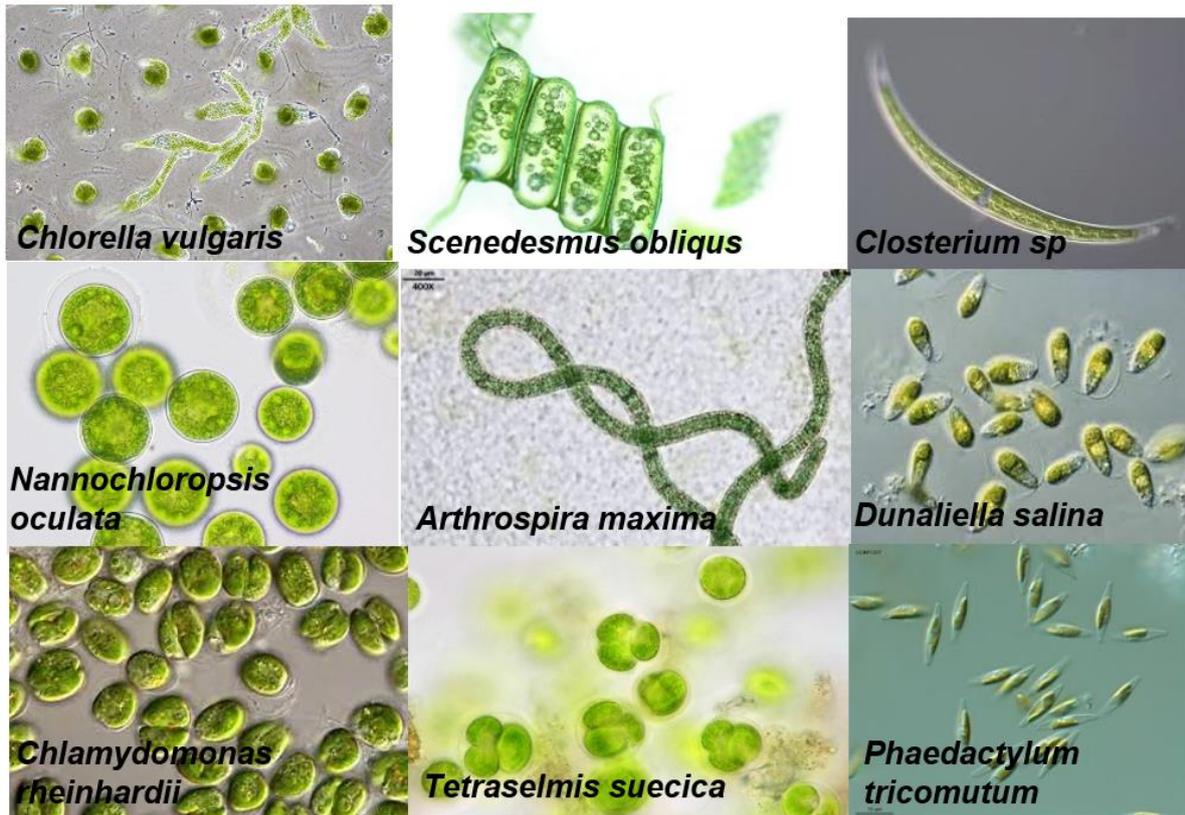


Ilustración 1. Diversidad de microalgas.

La biomasa de las microalgas engloba un amplio abanico que va desde la alimentación humana y animal, a la producción de biocombustibles o biofertilizantes y a la obtención de productos biotecnológicos para su uso en farmacéuticas, medicina y/o cosmética.

Actualmente, el uso de microalgas para consumo humano está limitado a muy pocas especies a causa del estricto control que existe sobre la seguridad alimentaria, la demanda del mercado o la preparación específica de la misma. Los más utilizados son *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* comercializados hoy día como suplementos alimenticios [1].

2.1.1. Composición nutricional de las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares de tamaño microscópico (2-200 μm) que habitan tanto en las aguas dulces como en las aguas saladas. A través del proceso fotosintético producen energía química a partir de energía solar y exhiben una capacidad fotosintética elevada en comparación a la de otras plantas terrestres.

Las microalgas están compuestas por una elevada cantidad de compuestos bioactivos, incluyendo lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales.

El contenido celular varía según el tipo y variedad de alga y de sus respuestas fisiológicas como su fase de crecimiento, los nutrientes, la temperatura o la intensidad lumínica.

La Tabla 1 muestra ejemplos de la composición bioquímica de algunas microalgas.

Tabla 1. Composición bioquímica de microalgas [1].

Especie	Proteínas (% de peso en seco)	Carbohidratos (% de peso en seco)	Lípidos (% de peso en seco)
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	9
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
<i>Isochrysis galbana</i>	41	5	21
<i>Tetraselmis suecica</i>	39	8	7
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7

2.1.1.1. Proteínas

Las proteínas son fundamentales para la membrana celular y el aparato fotosintético de las microalgas.

El contenido proteico de las microalgas puede considerarse muy competitivo con respecto al de fuentes convencionales. Así, la *Spirulina maxima* presenta un contenido del 60-70%, mientras que la *Chlorella vulgaris* puede tener hasta el 58%.

Aunque las microalgas contienen todos los aminoácidos esenciales, la aplicación de las mismas en productos alimentarios ha estado muy limitada debido a su elevado contenido en clorofila y otros compuestos no proteicos que pueden alterar los caracteres organolépticos de los productos finales. Además, debido a la rigidez de la pared celular de algunas especies se produce una disminución de la eficiencia de la extracción de las proteínas.

2.1.1.2. Carbohidratos.

Las microalgas producen elementos de reserva de energía. Estos elementos son sustancias similares al almidón y la glucosa que son las principales almacenadoras de carbono del proceso fotosintético.

La producción de los polisacáridos varía en función del grupo de microalga. Por ejemplo, la síntesis de almidón, amilosa y amilopectina está producido por el género clorofita, mientras que la producción de polímeros de carbohidratos tiene lugar por el género rodofita.

Aunque hoy día el uso de microalgas como fuente de carbohidratos ha estado muy limitado en aplicaciones alimentarias, algunos polisacáridos de las microalgas sí que están adquiriendo mayor importancia en otros campos como el sector farmacéutico.

2.1.1.3. Lípidos.

Los lípidos son las moléculas que mayor atención han recibido para su extracción y comercialización.

Los lípidos de las microalgas incluyen lípidos polares, como fosfolípidos y glicolípidos, y lípidos neutros, como triacilglicerol y ácidos grasos libres.

El perfil microalgal de los ácidos grasos está compuesto por ácidos grasos saturados e insaturados. Esta variabilidad depende de la variedad de microalga y de las

condiciones de cultivo como la fase de crecimiento, la temperatura, la salinidad, el pH, la intensidad lumínica o la disponibilidad de nutrientes.

Entre sus muchas aplicaciones, destacar su alto valor como nutracéuticos y en el sector de la alimentación como ingrediente añadido a diversos productos.

En la Tabla 2 se indican algunos de los compuestos bioactivos de ácidos grasos poliinsaturados que podrían suponer beneficiosos para la salud [2].

Tabla 2. Compuestos bioactivos en microalgas y sus beneficios para la salud [2].

Compuestos bioactivos	Especies	Beneficios para la salud
Ácido araquidónico (AA)	<i>P. Cruentum</i> , <i>Parietochloris incisa</i> , <i>Porphyridium purpureum</i>	Favorece el crecimiento visual, normal y funcional de la infancia
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	<i>Nannochloropsis sp.</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>Porphyridium cruentum</i>	Beneficios cardiovasculares, desarrollo mental, antiinflamatorio
Ácido docosahexaenoico (DHA)	<i>Crythcodinium cohnii</i> , <i>Schizokytrium spp.</i> , <i>Ulkenia spp.</i>	Beneficios cardiovasculares, mejora en el desarrollo del sistema nervioso y de las funciones cerebrales

2.2. APLICACIONES DE LAS MICROALGAS

Tradicionalmente, las microalgas han sido cultivadas para fines muy diferentes como suplementos nutritivos, fármacos, cosméticos, biorremediación, biocombustibles, biomasa o biofertilizantes.

En la actualidad, se han planteado y puesto en marcha diversas aplicaciones de las microalgas en numerosos campos tecnológicos, en cultivo continuo o masivo, vivas o

procesadas, libres o inmovilizadas, algunas de las cuales aún se encuentran en plena explotación comercial [5].

2.2.1. Producción de biocombustibles

Debido a los retos energéticos que existen hoy día por las reservas de combustibles fósiles, se ha demostrado que la biomasa de las microalgas podría proporcionar de forma aproximada el 25% de las necesidades energéticas mundiales.

Se pueden destacar las principales ventajas para producir biocombustibles a partir de ellas: elevadas tasas de crecimiento y disminución de tiempos de generación; alto contenido de ácidos grasos y lípidos; mínimos requisitos de tierra; captura del CO₂ desde fuentes contaminantes y utilización, como fuente de nutrientes, del agua residual. El cultivo puede producirse en estanques con poca profundidad, agua salina o en suelos de capa dura.

El diésel microalgal o biodiésel de tercera generación produce una disminución de emisión de CO₂ de hasta un 78% en comparación con el diésel del petróleo [1].

2.2.2. Alimentación humana

Debido al alto contenido de lípidos, vitaminas, ácidos grasos y carbohidratos que presentan las microalgas, las aplicaciones para el desarrollo de productos de valor agregados es muy importante, principalmente como suplementos alimenticios. Hoy día, el consumo de microalgas a nivel humano está limitado a escasas especies debido sobre todo al control estricto existente sobre seguridad alimentaria, la demanda del mercado o la preparación específica de las mismas. Las tres especies más demandadas en el mercado como suplementos alimenticios son *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella* [1, 6].

Además, también cabe destacar su comercialización por su poder medicinal. *Chlorella* disminuye el colesterol sanguíneo, protege contra la insuficiencia renal y ayuda al desarrollo de *Lactobacillus* intestinales. Sin embargo, el alto contenido de β -caroteno en *Dunaliella* es su principal fuente de comercialización [1].

2.2.3. Alimentación animal

Aproximadamente, el 30% de la producción mundial de microalgas está enfocado para consumo animal. *Chlorella*, *Spirulina* y *Scenedesmus* son algunas de las especies de algas más utilizadas debido a que mejoran la respuesta inmune de los animales, la infertilidad, mejoran la piel o el pelo y controlan su peso. Se utilizan en un amplio rango de alimentación de animales como los perros, gatos, caballos, vacas, toros reproductores, aves ornamentales y peces de acuario. Sin embargo, la alimentación prolongada a altas concentraciones no es recomendable, sobre todo en las dietas a base de cianobacterias.

También se destaca su utilización en acuicultura como principal fuente de alimentación para moluscos filtradores y estados larvarios de crustáceos y peces [1, 6].

2.2.4. Biofertilizantes

Las microalgas son utilizadas también como biofertilizantes y acondicionadores del suelo. Su utilización para la producción de carbón vegetal (biochar) le confiere un alto valor como fertilizante. Además, reducen el peligro de erosión al recubrir suelos removidos o quemados [1, 7].

2.2.5. Cosmética

En la industria cosmética, especies de microalgas como *Arthrospira* y *Chlorella* se utilizan para diferentes fines como puede ser el cuidado de la piel, como productos regenerantes o refrescantes. Extractos de *Arthrospira* actúan como antienvjecimiento mientras que extractos de *C. vulgaris* favorecen la producción de colágeno.

2.2.6. Ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son imprescindibles para el desarrollo y la fisiología humana. Actualmente, la principal fuente de estos compuestos se encuentra en los peces, pero con una utilización de aceites muy limitada por el peligro de acumulación de sustancias tóxicas en el pez, su poca estabilidad oxidativa y por la mezcla entre distintos tipos de ácidos grasos. Las microalgas presentan una fuente significativa de estos ácidos, aunque, actualmente, solo se encuentra comercialmente disponible el ácido docosahexaenoico (DHA).

2.2.7. Pigmentos

Los pigmentos producidos a partir de microorganismos, como las microalgas, han ganado mucho peso para su uso en alimentación, como colorante natural y para su uso en cosmética, como aditivo. Hoy en día, existen una gran variedad de pigmentos carotenoides, pero comercialmente solo unos pocos están disponibles: β -caroteno, astaxantina y, en menor medida, luteína, bixina y zeaxantina. La principal relevancia nutricional de los carotenoides es su capacidad de actuar como provitamina A, convirtiéndose luego en vitamina A. Otro pigmento relevante es la clorofila, que presenta propiedades antioxidantes y desintoxicantes convirtiéndola en una fuente importante de vitaminas y minerales [1].

2.3. PRODUCCIÓN DE LAS MICROALGAS.

2.3.1. Tipos de cultivo

A escala comercial existen tres tipos de cultivo masivo de microalgas en función de cómo opere el sistema. En los tres métodos se puede trabajar con capacidades de miles de litros o unidades más pequeñas, siendo posible cultivar varias especies de microalgas.

2.3.1.1. Cultivos discontinuos (“Batch”)

Los cultivos discontinuos se suelen utilizar para estudios fotoautotróficos, aunque tienen una población celular muy difícil de definir. Son cultivos cuya población pasa por todas las fases de crecimiento: latencia, exponencial y estacionaria; produciendo cambios fisiológicos en la población conforme avanza el tiempo de cultivo.

La principal ventaja de estos cultivos es su fácil manejo y su adecuación a la hora de estudiar cinéticas y parámetros que inciden en el crecimiento celular.

2.3.1.2. Cultivo semicontinuo

En los cultivos semicontinuos, generalmente al final de la fase exponencial, se recoge parte del volumen para su utilización siendo esta cantidad retirada sustituida con medio de cultivo fresco. Si las condiciones de cultivo son cuidadosamente controladas se pueden llegar a mantener sistemas de interior para la producción de microalgas durante varias semanas.

2.3.1.3. Cultivo continuo

El cultivo continuo mantiene, durante largos periodos de tiempo. la población en fase exponencial de crecimiento. La principal ventaja de estos cultivos es que si se añaden nutrientes de igual forma en la que son retirados del medio, las muestras son idénticas aun siendo tomadas a distintos tiempos. Todos los factores de crecimiento deben mantenerse constantes para obtener cultivos continuos [8].

2.3.2. Sistemas de cultivo

Los métodos de cultivo de microalgas pueden tener diferentes metabolismos: fotoautótrofos, heterótrofos y mixotróficos. Actualmente, el único método rentable a nivel económico y técnico es el de producción fotoautótrofa.

Existen dos tipos de diseños básicos: sistemas abiertos o sistemas cerrados también llamados fotobiorreactores [9].

2.3.2.1. Sistemas abiertos

Los cultivos abiertos (también llamados de canales o estanques) son los sistemas más frecuentes los cuales comprenden tanto medios naturales como artificiales con variedad de diseños.

En la Ilustración 2 se observa un ejemplo de estanque de cultivo natural de *Dunaliella salina*.



Ilustración 2. Hutt Lagoon en Australia, instalaciones de cultivo de *Dunaliella* [10].

Existen los de tipo extensivo que utiliza grandes superficies (entre 5-50 hectáreas) sin agitación mecánica; y los de tipo intensivo que son estanques horizontales con poca profundidad de tipo carrusel o de canales, también llamados “raceway” como el mostrado en la Ilustración 3.



Ilustración 3. Sistema tipo raceway de cultivo de microalgas [10].

La mayor ventaja de estos sistemas es su bajo costo y su facilidad de construcción y operación. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones por no estar protegidos como pérdidas por evaporación, difusión de CO₂ a la atmósfera, baja accesibilidad a la luz además de requerir grandes áreas de trabajo y ser muy sensibles a la contaminación del medio por parte de otros microorganismos, tales como bacterias u otras especies de algas.

Por ello, las producciones comerciales de estos sistemas se suelen traducir a especies que soportan condiciones de pH y temperatura extremas [1, 9, 10].

2.3.2.2. Sistemas cerrados

Los sistemas de cultivo abiertos suponen una serie de dificultades. Para paliar estos problemas, se han desarrollado los fotobiorreactores. Los cultivos cerrados permiten aislar el medio de cultivo del exterior disminuyendo el riesgo de contaminación.

Los principales sistemas de cultivo cerrados son los fotobiorreactores los cuales tienen infinidad de diseños: reactores planos o en placas; reactores tubulares; y reactores anulares. En menor medida también existen los que tienen forma de domo como los que están en bolsas plásticas.

En la Ilustración 4 se muestran diferentes ejemplos de cultivos cerrados.

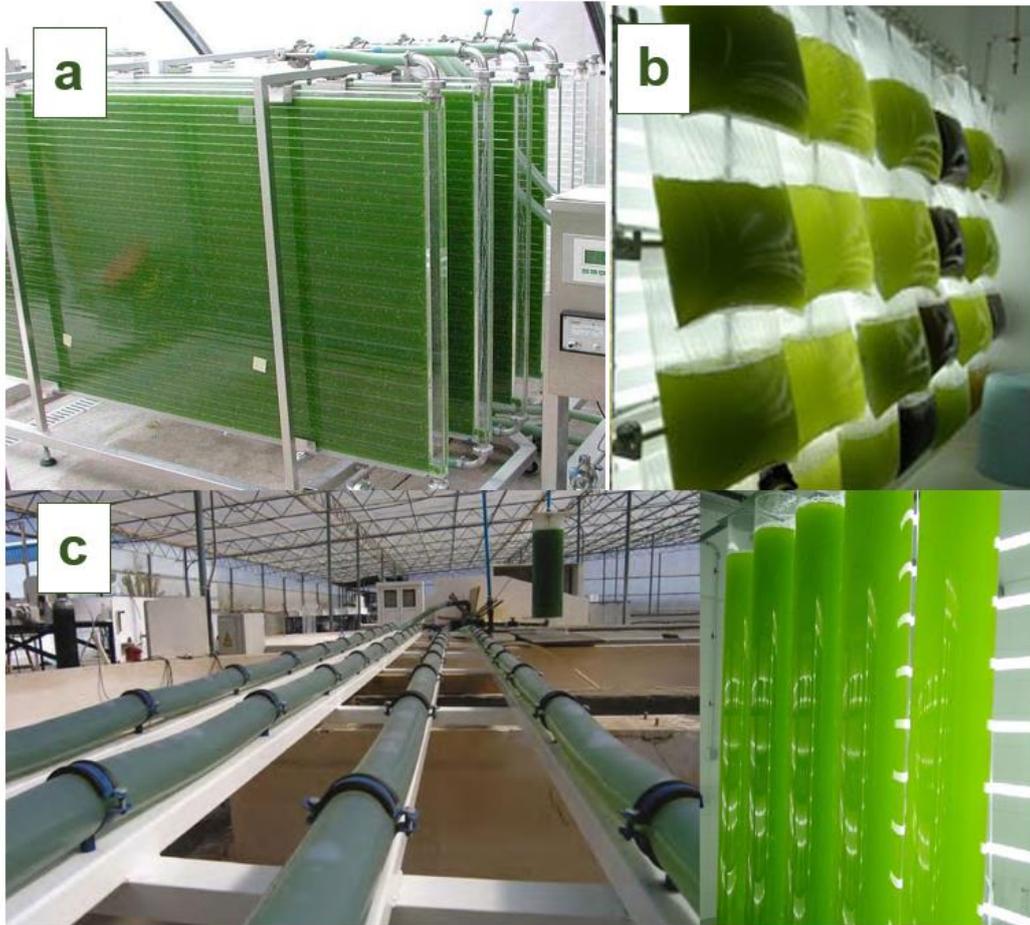


Ilustración 4. Sistemas de cultivos cerrados. a) Reactor plano. b) Cultivo en bolsas. c) Reactores tubulares horizontales y verticales [10].

A pesar de su elevado costo, los cultivos cerrados presentan una serie de puntos a favor frente a los cultivos abiertos: control de las condiciones como pH, luz, temperatura o concentración de CO_2 , permiten el monocultivo de algas, previenen la evaporación del agua y se obtienen concentraciones celulares mayores, además de la posibilidad de cultivar todo el año [1, 9, 10].

2.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

El método de extracción de los compuestos de interés de las microalgas es, junto al sistema de cultivo, el proceso que mayor coste produce en las instalaciones. Actualmente, existen nuevas técnicas de extracción que sustituyen a las más convencionales por ser más respetuosas con el medio ambiente. Además, los métodos de extracción convencionales requieren tiempos de extracción más largos y los rendimientos son más bajos, mientras que los no convencionales mejoran el rendimiento y la calidad del extracto [11].

2.4.1. Técnicas de extracción convencionales

2.4.1.1. Extracción mediante disolventes

En este método de extracción la materia tratada es expuesta a diferentes disolventes los cuales absorben compuestos de interés u otros agentes como sabores y colorantes. A continuación, las muestras pasan por un proceso de centrifugación y filtración para eliminar cualquier residuo sólido y así se obtiene el extracto de interés.

Los disolventes más usados en los procedimientos de extracción son los disolventes orgánicos como hexano, éter, cloroformo o etanol. Los disolventes se pueden emplear para extraer compuestos orgánicos polares y no polares como fenoles o plaguicidas organoclorados.

Es un proceso de bajo costo y fácil operación. Como inconveniente se encuentra la utilización de sustancias tóxicas como disolventes las cuales hay que recuperar mediante evaporación o concentración.

Por todo ello, este proceso se ha ido sustituyendo por otros métodos menos tóxicos y más respetuosos con el medio ambiente [12].

2.4.2. Técnicas de extracción no convencionales

2.4.2.1. Extracción de líquido a presión

En la extracción de líquido presurizado se consiguen alcanzar altos rendimientos con una extracción rápida y bajo consumo de disolvente. El proceso se lleva a cabo en un entorno libre de oxígeno, sin oscuridad y debido a la alta presión aplicada inhibe las enzimas nativas evitando la degradación de algunos compuestos [13].

Utiliza disolventes orgánicos a altas presiones y temperaturas garantizando una extracción rápida. Conforme va aumentando la temperatura de trabajo, la constante dieléctrica del disolvente disminuye produciendo una disminución de la polaridad del disolvente. Esta característica es de especial interés ya que la temperatura permite igualar la polaridad del disolvente a la polaridad de los compuestos a recuperar [12].

2.4.2.2. Extracción de fluido supercrítico

La extracción mediante fluido supercrítico (SFE) es una de las técnicas más atractiva debido al bajo impacto ambiental que presenta junto con su viabilidad económica.

Los compuestos extraídos pertenecen a fuentes naturales como plantas, microalgas o subproductos alimentarios. Además, hay mucha variedad de fluidos supercríticos que pueden usarse como, etileno, nitrógeno o metano, siendo el CO₂ el más comúnmente utilizado debido a su seguridad y bajo costo.

El principal objetivo de este método de extracción es una alta selectividad, cortos tiempos de extracción y el uso de disolventes orgánicos no tóxicos [12, 13].

La SFE se ha utilizado en varias especies de microalgas con el fin de obtener sustancias de interés para la industria alimentaria. Mendes et al. [14] utilizaron CO₂ supercrítico para extraer di-olefinas de *Botryococcus braunii*. Mendes et al. [15] también usaron *Chlorella vulgaris* para extraer carotenos.

2.4.2.3. Extracción de fluido subcrítico

La extracción con agua subcrítica (SWE) utiliza agua a elevada presión y temperatura, pero sin llegar a superar las condiciones supercríticas (220 bares y 374°C). Es un método rápido con altos rendimientos que reduce considerablemente el uso de disolventes.

El uso de SWE proporciona ventajas con respecto a las técnicas convencionales de extracción tales como una mayor calidad de los extractos, menores tiempos de extracción y ser una técnica sostenible [12].

Este método de extracción se ha empleado para obtener componentes antioxidantes de la microalga *Spirulina platenses* por Herrero et al. [16].

2.4.2.4. Extracción por ultrasonidos

La extracción por ultrasonidos es un método rápido y eficiente que no tiene efecto sobre la estructura química y las propiedades biológicas de los bioproductos. Además de reducir el tiempo de extracción, también disminuye la temperatura y el consumo de disolvente. Es un método de baja inversión y fácil implementación.

El método radica en una interacción de las microalgas con ondas acústicas a una determinada frecuencia. Las ondas destruyen la pared de la célula por un efecto de cavitación [13, 17].

Faerman et al. [18], utilizaron ondas acústicas a baja frecuencia (20-40 kHz) en la microalga *Porphyridium sp.* rompiendo la pared de la microalga demostrando una fuerte destrucción celular, mejor incluso que con ondas de alta frecuencia (1-30 MHz) [18].

2.4.2.5. Extracción asistida por microondas

La principal ventaja de la extracción asistida por microondas es su corto tiempo de extracción (desde unos pocos segundos hasta media hora). Además, es un método que consume menos disolventes, presenta un alto rendimiento de extracción, es no

tóxico y se puede utilizar para grandes volúmenes, aunque los costes de mantenimiento siguen siendo elevados [13].

Trata de una radiación electromagnética con una longitud de onda de 0,001 m a 1 m que rompe las células debido al choque inducido por estas ondas de alta frecuencia, afectando la polaridad de las moléculas de la microalga [12, 17].

2.4.3. Técnicas de extracción de ácidos grasos de cadena larga

2.4.3.1. Método Soxhlet

El método Soxhlet sigue siendo el método estándar de trabajo para la extracción de aceite de microalgas. El dispositivo consiste en un balón, en el cual se halla un disolvente orgánico (calentado hasta su punto de ebullición), un tubo de extracción donde se coloca la microalga y un condensador. Una vez calentado el disolvente, se condensa gradualmente y sus vapores caen sobre el tubo Soxhlet en el cual está colocada la muestra de microalga, donde se acumula el disolvente con los lípidos extraídos hasta llenar el tubo, produciéndose la extracción de los analitos. Cuando el disolvente condensado alcanza el nivel de la parte superior del sifón lateral, el disolvente junto con los compuestos extraídos, asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este procedimiento es repetido hasta completar la extracción total de los lípidos de microalga.

En la Ilustración 5 se puede observar el equipo de extracción Soxhlet.

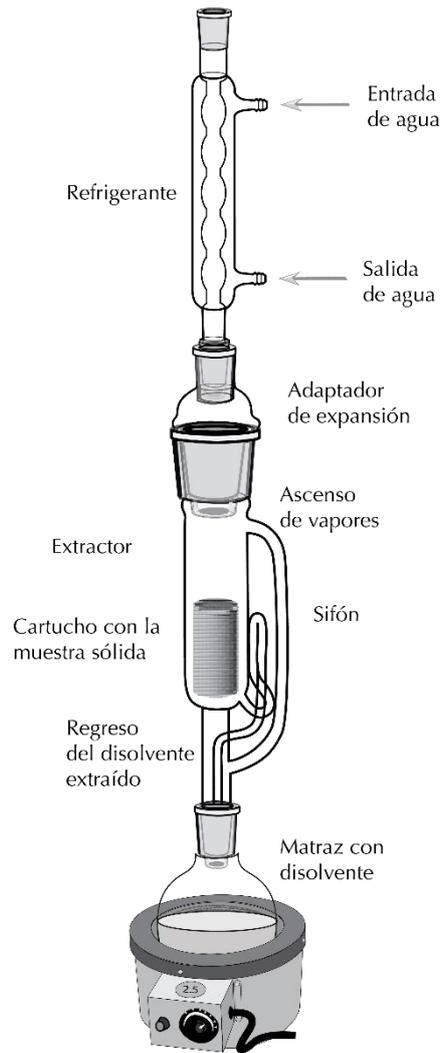


Ilustración 5. Sistema de extracción Soxhlet [19].

Este método presenta una gran variedad de disolventes de extracción. El más recomendado es el éter de petróleo por ser no polar ya que será selectivo en la extracción de lípidos no polares de las microalgas. Como inconveniente presenta una alta volatilidad produciendo una elevada pérdida de disolvente durante el proceso de extracción [20].

2.4.3.2. Método Folch

Uno de los primeros métodos de extracción fue propuesto por Folch et al. [21] en 1957 basada en solventes químicos. Este método consistía en la extracción mediante una combinación de solvente apolar y polar para extraer lípidos tanto polares como no

polares. Estas propiedades fueron originalmente aprovechadas para desarrollar una mezcla cloroformo-metanol 2:1 (v/v) [20, 21].

2.4.3.3. Método Bligh & Dyer

Una modificación del método de Folch dio lugar al desarrollo del método de Bligh & Dyer. Este método de extracción consiste en la homogeneización de la biomasa a alta velocidad con una mezcla de metanol-cloroformo 2:1 [20]. Es un método con el que se han obtenido buenos resultados en la extracción de aceite de microalgas, pero presenta el inconveniente de ser poco respetuoso con el medio ambiente debido a la toxicidad de los disolventes [17].

2.4.3.4. Método de extracción mediante transesterificación *in situ*

La transesterificación *in situ* consiste en la transesterificación directa de los lípidos de la biomasa de las microalgas sin una extracción previa de los mismos utilizando catalizadores ácidos o básicos. Como ventaja se encuentra la cuantificación que hace de todos los ácidos grasos como ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) independientemente de la eficiencia de la extracción.

En relación con el método convencional de dos pasos de extracción de lípidos, la transesterificación *in situ* de un solo paso es un método confiable y preciso para medir los rendimientos de las FAMEs que solo requiere una pequeña cantidad de biomasa de microalga [22, 23].

2.5. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) son compuestos orgánicos que se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos, plantas y animales acuáticos. Son una categoría de ácidos grasos de cadena larga, generalmente con 18 o más átomos de carbono.

Debido a las propiedades físicas y bioquímicas que presentan, los PUFA's juegan un papel clave en la supervivencia y crecimiento de los microorganismos y animales acuáticos en un entorno hostil.

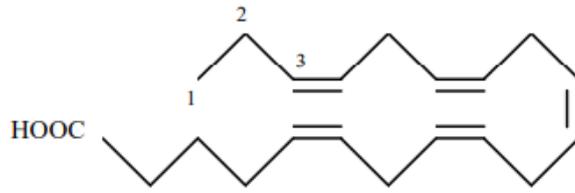
Las microalgas, un grupo de microorganismos unicelulares que crecen tanto en sistemas de agua dulce como salada, son una fuente importante de producción de PUFA's en el planeta. Debido a la alta productividad de biomasa, contenido de aceite y porcentajes de PUFA's en ácidos grasos totales, algunas cepas de algas se consideran buenas fuentes de ácidos grasos poliinsaturados [24, 25].

2.5.1. Clasificación y fuentes de obtención

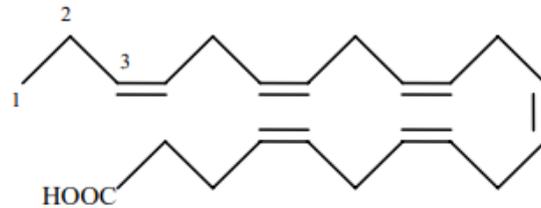
Los ácidos grasos poliinsaturados se clasifican en familias o series de ácidos según la posición del primer doble enlace desde donde se posiciona el metilo terminal. Las más importantes presentan en las posiciones 3, 6 ó 9 el primer doble enlace, dando lugar a las cadenas omega-3, omega-6 y omega-9, respectivamente.

Los PUFA's omega-3 están constituidos por el ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido α -linolénico (ALA) y ácido estearidónico (SA). El ácido α -linolénico se obtiene en vegetales de hoja verde, como las espinacas, coles o lechuga, y en aceites vegetales como el de soja o linaza. El EPA y el DHA se encuentran mayoritariamente en aceites de pescado, como el arenque, la caballa y el salmón, aunque también se encuentran muy presentes en algunas algas.

En la Ilustración 6 se muestra la fórmula del ácido eicosapentaenoico y del ácido docosahexaenoico.



Ácido Eicosapentaenoico, EPA.
(todo-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico; 20:5n3)



Ácido Docosahexaenoico, DHA.
(todo-cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico;
22:6n3)

Ilustración 6. Fórmula estructural del EPA y DHA [25].

El grupo de ácidos grasos omega-6 está compuesto por el ácido linoleico (LA), ácido γ -linolénico (GLA) y ácido araquidónico (AA). La principal fuente de estos ácidos grasos son las plantas. Aceites de muchas semillas, como el girasol, algodón, soja y maíz son fuentes de ácido linoleico. Las semillas de taginastes, onagra y borraja son las principales fuentes del ácido γ -linolénico. Mientras que el ácido araquidónico se suele obtener de huevos, carnes y derivados lácteos [25].

En la Ilustración 7, se observan los beneficios que aporta el EPA en nuestra salud.

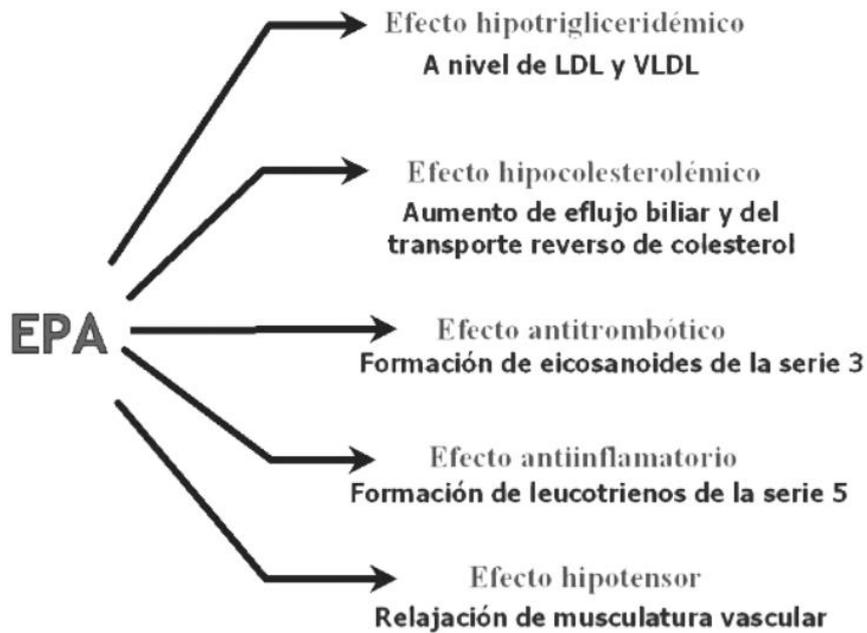


Ilustración 7. Beneficios del EPA en la salud cardiovascular [26].

2.5.1.1. Microalgas marinas

Las microalgas son un grupo muy variado de microorganismos capaces de sintetizar EPA y/o DHA.

La principal ventaja de utilizar microalgas como alternativa a la utilización de los aceites de pescado son, su biomasa carente de partículas y metales pesados, su buen sabor, ausencia de colesterol y su menor contenido en sodio. Además, pueden tener una producción estable durante todo el año.

En la Tabla 3, se puede observar algunas algas marinas productoras de PUFA's.

Tabla 3. Algas marinas productoras de PUFA's [27].**PUFA's (% en peso del total de ácidos grasos)**

Organismos	16:02	16:03	16:04	17:03	18:02	18:03	20:03	20:04	20:05	21:05	22:06
<i>Tetraslims sp.</i>	-	-	-	-	36,4	3,9	-	2,9	9,7	1,8	1,03
<i>Dunaliella salina</i>	3,1	2,2	8,6	-	-	45,3	-	14,3	2,7	0,1	-
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	1,2	-	-	0,4	3,6	1,5	-	3,6	14	3,1	-
<i>Chlorella sp.</i>	-	17,9	-	-	10,2	40,7	-	-	-	-	-
<i>Dunaliella sp.</i>	1,8	3,9	6	-	13,9	16	-	4,8	1,4	-	-
<i>Isochrysis sp.</i>	1,7	-	-	-	6,3	3,7	-	-	16,3	-	5,9
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1,2	6,5	5,5	-	3,1	-	-	8,6	20,1	7,4	-
<i>Navicula sp.</i>	-	-	-	-	6,5	1,3	-	0,9	26,7	-	0,8
<i>Chaetoceros sp.</i>	7,7	3,2	-	2	0,9	1,3	1,2	2,6	14,5	4,5	1,5

3. NANNOCHLOROPSIS GADITANA

Entre la infinidad de especies de microalgas que tienen aplicación dentro del campo de la biotecnología, cabe destacar la importancia de la *Nannochloropsis gaditana*. Organismo aislado de la Bahía de Cádiz, es una especie que, en general, ha sido conocida en el medio marino, aunque también puede encontrarse en agua dulce y salobre [28, 29].

En la Ilustración 8 se observa una imagen de la microalga *Nannochloropsis gaditana*.

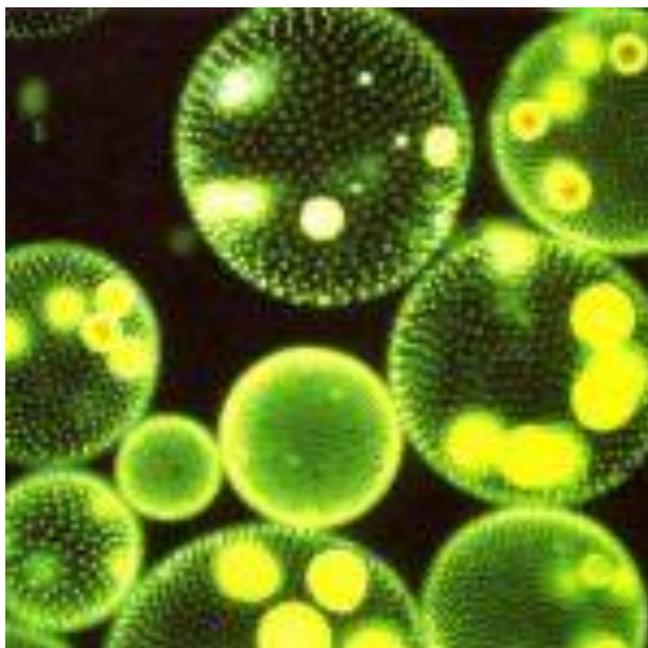


Ilustración 8. *Nannochloropsis gaditana* [30].

Es una especie extremadamente pequeña (aproximadamente 2 micras) de forma esférica, inmóvil, desprovista de flagelos y con una pared celular resistente.

Pertenece a la clase *Eustigmatophyceae* e igual que las otras dos especies pertenecientes a esta clase (*N. salina* y *N. oculata*) presenta clorofila A, β -caroteno, vaucheriaxantina y violaxantina. La principal diferencia entre ellas es la presencia de α -caroteno en *N. gaditana* y la carencia del mismo en otras especies [29, 30, 31].

Nannochloropsis gaditana es una microalga única que contiene más de 65 propiedades nutricionales que incluyen todos los aminoácidos, grasas esenciales, minerales, vitaminas, oligoelementos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, enzimas y coenzimas [30]. Se utiliza mucho en la acuicultura para el cultivo de zooplancton, pero también se ha reconocido su amplio valor nutricional para la dieta humana por su composición bioquímica.

La Tabla 4 muestra la composición bioquímica de la microalga.

Tabla 4. Composición bioquímica *Nannochloropsis gaditana* [31].

COMPOSICIÓN	%
Lípidos	28
Proteínas	52
Carbohidratos	12
EPA	37
ARA	5
Clorofila A	0,89
Vitamina C	0,85

Esta microalga también es conocida como fuente de pigmentos, por ejemplo, la clorofila A y, principalmente, por ser una buena fuente de ácidos grasos como el ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido graso poliinsaturado muy importante en la prevención de varias enfermedades [32].



industriales

etsii

**Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Industrial**



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se va a recopilar los materiales e instrumentación utilizados para llevar a cabo el procedimiento experimental. Además, se va a proceder a explicar tanto los ensayos experimentales como el método de análisis.

4.1. Materiales

En esta sección, se citan las muestras de microalga y los reactivos empleados para llevar a cabo los ensayos.

4.1.1. Muestra de microalga

Muestra de microalga liofilizada del género *Nannochloropsis gaditana*, proporcionadas por el departamento de Ingeniería Química de la Universidad Politécnica de Cartagena, pretratadas por dos procedimientos:

- Ultrasonidos.
- Tratamiento con NaCl/NaOH.

En la Ilustración 9 se puede observar la microalga liofilizada con los diferentes pretratamientos.



Ilustración 9. Muestras de microalga *Nannochloropsis gaditana* liofilizadas pretratadas por ultrasonidos y NaCl/NaOH, respectivamente.

4.1.2. Reactivos químicos

Los reactivos químicos utilizados en el procedimiento experimental son los siguientes:

- Agua destilada.
- Metanol.
- Ácido clorhídrico.
- Hexano.
- Patrones estándar de ésteres metílicos.

A continuación, en la Tabla 5 se detallan las principales propiedades físicas de los reactivos utilizados.

Tabla 5. Propiedades físicas de los reactivos.

	Ácido clorhídrico	Alcohol metílico	n-Hexano
Nombre IUPAC	Cloruro de hidrógeno	Metanol	Hexano
Estructura molecular	$\text{:}\ddot{\text{Cl}}\text{—H}$	HO—CH_3	
Peso molecular (g/mol)	36,46	32,04	86,2
Densidad (g/ml)	0,00149	0,79	0,65
Temperatura de fusión (°C)	-26	-97	-95
Temperatura de ebullición (°C)	48	65	69
Temperatura de inflamación (°C)	N.A.	12	-22

4.2. Equipos e instrumentación

En esta sección se detallan los equipos e instrumentación con los cuales se ha trabajado durante la experimentación.

4.2.1. Instrumentación y equipos empleados

El equipo experimental empleado consta de las siguientes partes:

- Tubos de ensayo de vidrio.
- Pipeta Pasteur.
- Micropipetas.

- Matraz Erlenmeyer de 100 mL.
- Matraz aforado de 25 mL.
- Probeta de 100 mL
- Vaso de precipitados de 200 mL.
- Vidrio de reloj.
- Baño termostático.
- Embudo de vidrio.
- Agitadores magnéticos
- Termómetro.
- Balanza de precisión.
- Placas calefactoras.
- Bomba peristáltica.

4.2.2. Equipo analítico

El equipo analítico utilizado para el análisis de muestras es un cromatógrafo de gases Agilent 6890N proporcionado por el Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica (SAIT) de la Universidad Politécnica de Cartagena.

Este sistema, que se muestra en la Ilustración 10, proporciona una solución de alta sensibilidad, excelente fiabilidad y con un amplio rango dinámico.



Ilustración 10. Cromatógrafo de gases SAIT [33].

4.3. Extracción de lípidos por transesterificación *in situ* de *Nannochloropsis gaditana*

El procedimiento de extracción de lípidos se llevó a cabo mediante transesterificación *in situ* con la microalga *Nannochloropsis gaditana* pretratada con dos procedimientos diferentes: ultrasonidos y tratamiento con NaCl/NaOH.

4.3.1. Método de transesterificación *in situ*

La reacción de transesterificación es la reacción de una grasa o aceite con un alcohol para formar ésteres y glicerol. Para mejorar la velocidad y el rendimiento de la reacción se usa un ácido como catalizador [34]. La Ilustración 11 muestra la reacción de transesterificación entre un triglicérido y un alcohol:

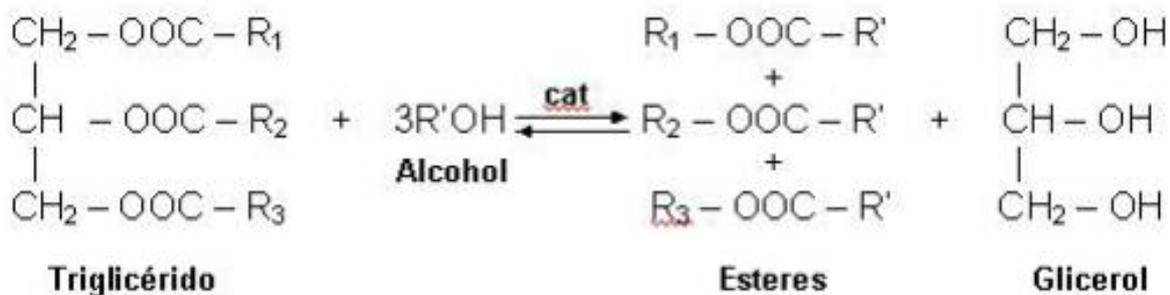


Ilustración 11. Reacción de transesterificación [34].

La transesterificación es el método utilizado en este trabajo, donde la biomasa procedente de la microalga *Nannochloropsis gaditana* se mezcla con un alcohol de cadena corta (metanol).

El procedimiento experimental consta de un estudio de distintas variables capaces de influir en la extracción de lípidos de microalgas. Las variables para estudiar son la concentración de ácido clorhídrico, la temperatura y el tiempo de extracción con *Nannochloropsis gaditana* pretratada de dos formas diferentes: ultrasonidos y tratamiento con NaCl/NaOH. Este estudio se basa en 8 ensayos que se realizarán por duplicado para cada una de las muestras de microalgas pretratadas y así poder observar cuales son las condiciones óptimas para extraer la mayor cantidad de lípidos. En la Tabla 6 se puede observar las condiciones de trabajo de cada ensayo:

Tabla 6. Condiciones de operación procedimiento experimental.

Ensayo	Temperatura (°C)	Concentración metanol-HCl (% v/v)	Tiempo de extracción (h)
1	60	5	1,5
2	70	5	1,5
3	60	10	1,5
4	70	10	1,5
5	60	5	3
6	70	5	3
7	60	10	3
8	70	10	3

4.3.2. Preparación de las disoluciones

- Disolución metanol-HCl 5% (v/v).
- Disolución metanol-HCl 10% (v/v).

4.3.3. Procedimiento experimental

En primer lugar, se pesan 0,5 gramos de microalga *Nannochloropsis gaditana* liofilizada en vidrio de reloj.

En un matraz Erlenmeyer de 100 mL de capacidad se introduce la muestra de microalga y se añaden 45 mL de disolución metanol-HCl (preparada anteriormente). A continuación, el matraz Erlenmeyer se introduce en un vaso de precipitados con agua sobre un calefactor para fijar la temperatura de extracción, intentando mantener esta temperatura lo más constante posible, como se muestra en la Ilustración 12.

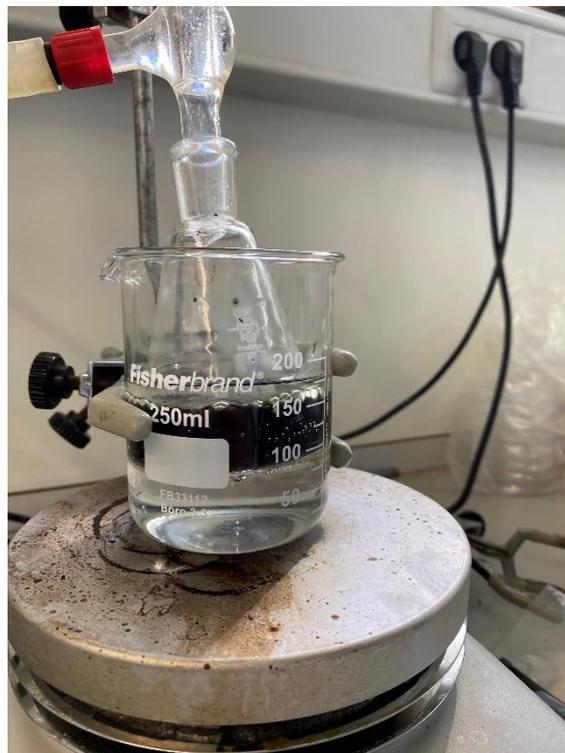


Ilustración 12. Soporte de matraz Erlenmeyer sobre vaso de precipitados.

Una vez alcanzada la temperatura deseada en la muestra, se pone en marcha la agitación y la bomba peristáltica manteniendo la mezcla a reflujo durante el tiempo de extracción necesario.

La ilustración 13 muestra el equipo experimental completo:



Ilustración 13. Equipo experimental.

Finalizada la extracción, se deja enfriar el matraz Erlenmeyer que contiene la microalga y la mezcla metanol-HCl.

Seguidamente, se añaden 10 mL de hexano dejando durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación para realizar la extracción. Pasado el tiempo se deja reposar la mezcla hasta que se formen dos fases y se debe coger la capa superior de hexano y llevarlo a un matraz aforado de 25 mL. Este proceso hay que realizarlo 3 veces. Una vez recogida la mayor cantidad de hexano posible en las extracciones, se enrasa el matraz aforado con hexano y se guardan las muestras en el congelador para su posterior análisis cromatográfico.

4.4. Cromatografía de gases

La técnica cromatográfica es una técnica de separación analítica. Este procedimiento puede trabajar en continuo con una gran eficiencia de separación y un mayor control de las condiciones cromatográficas.

La cromatografía de gases destaca como la más utilizada debido a su capacidad de separación de compuestos volátiles. Además, es específica para separar compuestos con un peso molecular por debajo de 100 y con una temperatura de trabajo por debajo de los 400 °C [30].

4.4.1. Descripción del equipo

El cromatógrafo de gases se encuentra compuesto por los elementos descritos en la Ilustración 14:

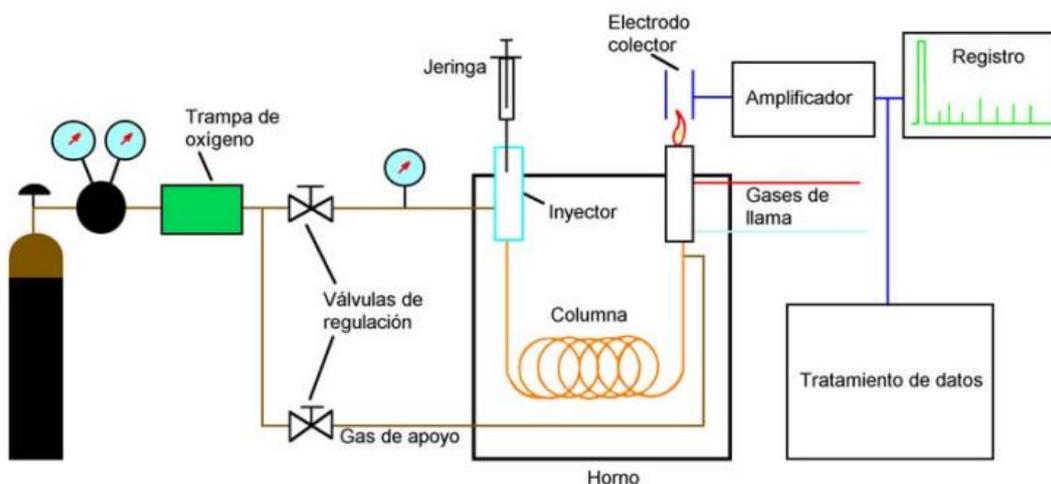


Ilustración 14. Esquema de un cromatógrafo de gases.

Este procedimiento comienza cuando se inyecta una pequeña cantidad de la muestra en una corriente de gas inerte a alta temperatura; la corriente gaseosa atraviesa la columna cromatográfica que es la encargada de separar los componentes de la mezcla mediante un mecanismo de adsorción (cromatografía gas-sólido), de partición

(cromatografía gas-líquido) o una mezcla de ambos. Los componentes separados emergerán de la columna a intervalos pequeños y pasarán por un sistema de detección [30].

4.4.2. Tipos de detectores

En cromatografía de gases un detector ideal debe tener una sensibilidad adecuada, alta fiabilidad, manejo sencillo, buena estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal y semejante para los analitos y con un tiempo de respuesta corto.

Algunos de los detectores más utilizados son:

- Detector de ionización de llama (FID): funciona como un quemador donde se produce una mezcla del efluente con hidrógeno y aire encendiéndose eléctricamente. Es el más ampliamente utilizado debido a su respuesta universal, ya que es selectivo para compuestos con enlaces C-H.
- Detector de conductividad térmica (TCD): su respuesta viene por la diferencia de conductividad térmica que existe entre un gas portador puro y un gas portador mezclado con otra sustancia. Es uno de los primeros detectores utilizados y uno de los que aún tiene una gran aplicación [35].
- Espectrómetro de masas: instrumento acoplado al cromatógrafo basado en la ionización de moléculas y en la separación de iones dentro de una muestra según su relación masa/carga [36].

La técnica cromatográfica de gases presenta multitud de aplicaciones, entre las que se pueden destacar el análisis de compuestos orgánicos volátiles en matrices plásticas y agroalimentarias, o el análisis medioambiental para la determinación de compuestos orgánicos volátiles, hidrocarburos aromáticos policíclicos o bifenilos policlorados [33].



industriales

etsii

**Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Industrial**



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

RESULTADOS

5. RESULTADOS

En el presente capítulo se van a comentar los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, explicando en cada caso la influencia de cada uno de los factores que se han modificado.

5.1. Identificación de los patrones

El tratamiento de datos mediante el cromatógrafo de gases se llevó a cabo por el SAIT de la UPCT, como ya se ha comentado anteriormente. El equipo fue el encargado de identificar los patrones con el detector de masas incorporado en el cromatógrafo.

A continuación, en la Ilustración 15 se muestra un ejemplo de cromatograma para el estándar 12 ppm, donde el eje de ordenadas corresponde a la altura del pico y el eje de abscisas al tiempo de elución.

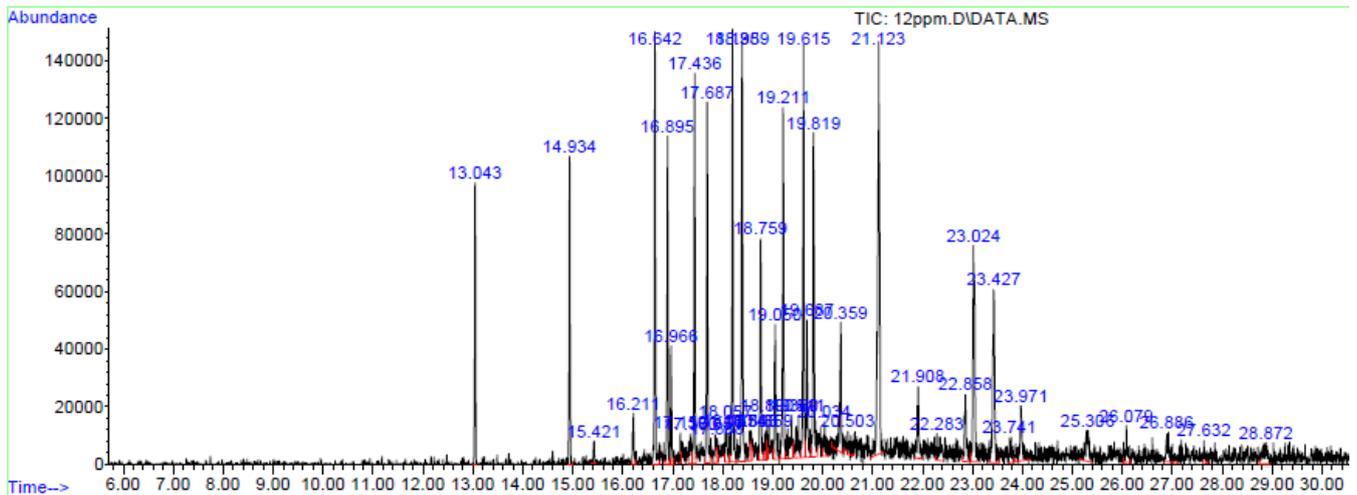


Ilustración 15. Cromatograma para patrón estándar 12 ppm.

Los picos que se observan en la gráfica corresponden a cada uno de los ácidos grasos presentes en la microalga *Nannochloropsis gaditana* mientras que el área que se encuentra por debajo de estos picos corresponde a su concentración en la microalga. De todos los picos que aparecen se hace una selección de los que coinciden con los 16 ácidos grasos metilados de *Nannochloropsis gaditana*, siendo estos tiempos de aparición ya determinados por el grupo de investigación en estudios anteriores.

En la Tabla 7 se pueden observar los ácidos grasos presentes en la microalga.

Tabla 7. Ácidos grasos presentes en la microalga *Nannochloropsis gaditana*.

	Éster metílico	Ret Time 2021
Pico 1	Dodecanoic acid, ME	13,04
Pico 2	Tetradecanoic acid, ME	14,93
Pico 3	Hexadecanoic acid, ME	16,64
Pico 4	cis 9-hexadecenoic acid, ME	16,89
Pico 5	Heptadecanoic acid, ME	17,43
Pico 6	cis 10_Heptadecenoic acid, ME	17,68
Pico 7	Stearic acid	18,19
Pico 8	Oleic acid C18:1	18,39
Pico 9	cis 9,12-octadecadienoic acid, ME	18,76
Pico 10	9,12,15-octadecatrienoic acid, ME (linolenato)	19,20
Pico 11	Eicosanoic acid, ME	19,61
Pico 12	Methyl gondoate	19,82
Pico 13	5,8,11,14,17 Eicosapentaenoic acid, ME	21,14
Pico 14	Tetracosanoic acid, ME	23,03
Pico 15	4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, ME	23,44

A partir de estos datos, se hace una selección con los picos de la gráfica que coinciden en tiempo de retención con los que se encuentra en la Tabla 7. Quedando, por tanto, los resultados expuestos en la Tabla 8 para el patrón estándar de 12 ppm.

Tabla 8. Ácidos grasos presentes en la microalga *Nannochloropsis gaditana* a 12 ppm.

Éster metílico	Ret Time 2021	12 ppm	
		Tiempo	Área
Dodecanoic acid, ME	13,04	13,043	1207907
Tetradecanoic acid, ME	14,93	14,934	1448534
Hexadecanoic acid, ME	16,64	16,642	2106812
cis 9-hexadecenoic acid, ME	16,89	16,895	1569524
Heptadecanoic acid, ME	17,43	17,436	1817466
cis 10_Heptadecenoic acid, ME	17,68	17,687	1897520
Stearic acid	18,19	18,195	2138927
Oleic acid C18:1	18,39	18,389	2621920
cis 9,12-octadecadienoic acid, ME	18,76	18,759	1241876
9,12,15-octadecatrienoic acid, ME (linolenato)	19,20	19,211	1811073
Eicosanoic acid, ME	19,61	19,615	2160084
Methyl gondoate	19,82	19,819	2017782
5,8,11,14,17 Eicosapentaenoic acid, ME	21,14	21,123	3781141
Tetracosanoic acid, ME	23,03	23,024	2004465
4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, ME	23,44	23,427	1707961

5.2. Obtención de las rectas de calibrado

Para obtener la concentración de lípidos se necesitan rectas de calibrado de patrones estándar que son los que contienen los ácidos grasos.

Las rectas de calibrado se realizan con la agrupación de las concentraciones de los patrones estándar realizadas desde los 4 ppm hasta los 14 ppm y con las áreas de los picos identificados, partiendo de los datos presentes en la Tabla 9.

Tabla 9. Ácidos grasos presentes en la microalga *Nannochloropsis gaditana* para diferentes patrones estándar.

	Éster metílico	4 ppm		6 ppm		8 ppm	
		Tiempo	Área	Tiempo	Área	Tiempo	Área
Pico 1	Metil éster ácido dodecanoico	13,042	384470	13,039	635936	13,042	863211
Pico 2	Metil éster ácido tetradecanoico	14,932	440859	14,934	806904	14,934	1034844
Pico 3	Metil éster ácido hexadecanoico	16,641	536943	16,641	896623	16,641	1122279
Pico 4	Metil éster ácido cis-9-hexadecenoico	16,894	364177	16,892	680250	16,894	920587
Pico 8	Metil éster ácido oléico	18,388	608209	18,386	1312542	18,387	1517551
Pico 9	Metil éster ácido cis-9,12,15-octadecadienoico	18,756	345053	18,755	593585	18,755	771601
Pico 13	Metil éster ácido eicosapentaenoico	21,116	958001	21,124	1913227	21,121	2291066

	Éster metílico	10 ppm		12 ppm		14 ppm	
		Tiempo	Área	Tiempo	Área	Tiempo	Área
Pico 1	Metil éster ácido dodecanoico	13,042	1154982	13,043	1207907	13,043	1842002
Pico 2	Metil éster ácido tetradecanoico	14,935	1292916	14,934	1448534	14,935	2050682
Pico 3	Metil éster ácido hexadecanoico	16,643	1625606	16,642	2106812	16,646	2649903
Pico 4	Metil éster ácido cis-9-hexadecenoico	16,894	1265821	16,895	1569524	16,896	1924653
Pico 8	Metil éster ácido oléico	18,388	2445591	18,389	2621920	18,392	3554198
Pico 9	Metil éster ácido cis-9,12,15-octadecadienoico	18,76	1493815	18,759	1241876	18,756	2157981
Pico 13	Metil éster ácido eicosapentaenoico	21,123	3211280	21,123	3781141	21,126	5147353

A continuación, de la Ilustración 16-22 se muestran las rectas de calibrado para los distintos ésteres metílicos:

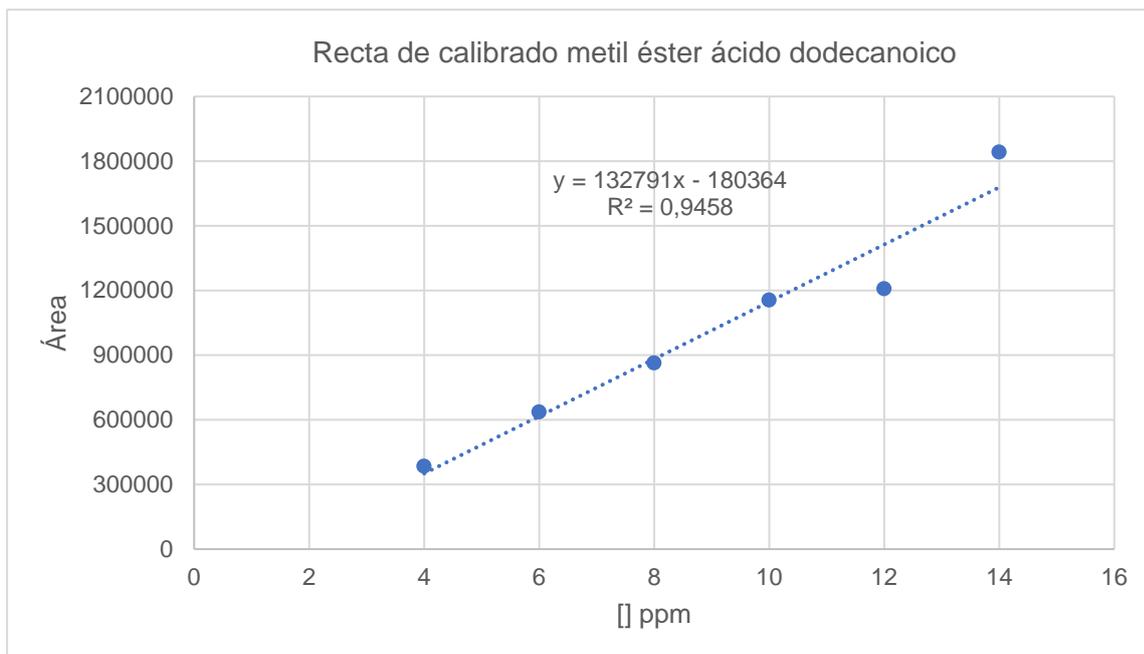


Ilustración 16. Recta de calibrado para el pico 1.

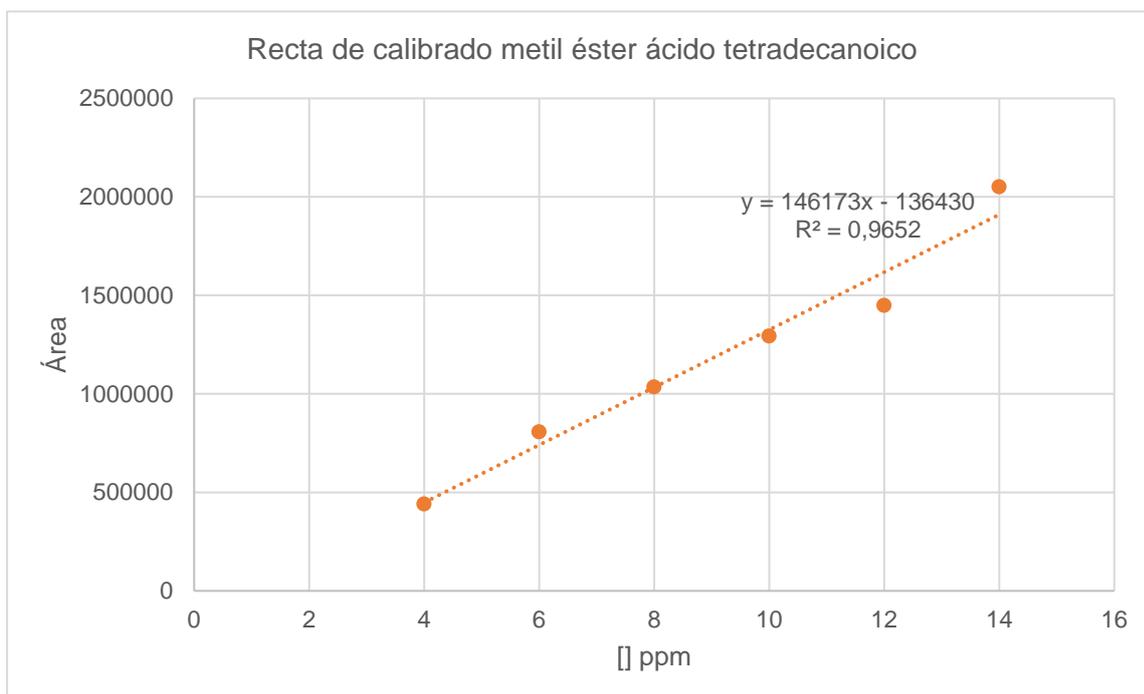


Ilustración 17. Recta de calibrado para el pico 2.

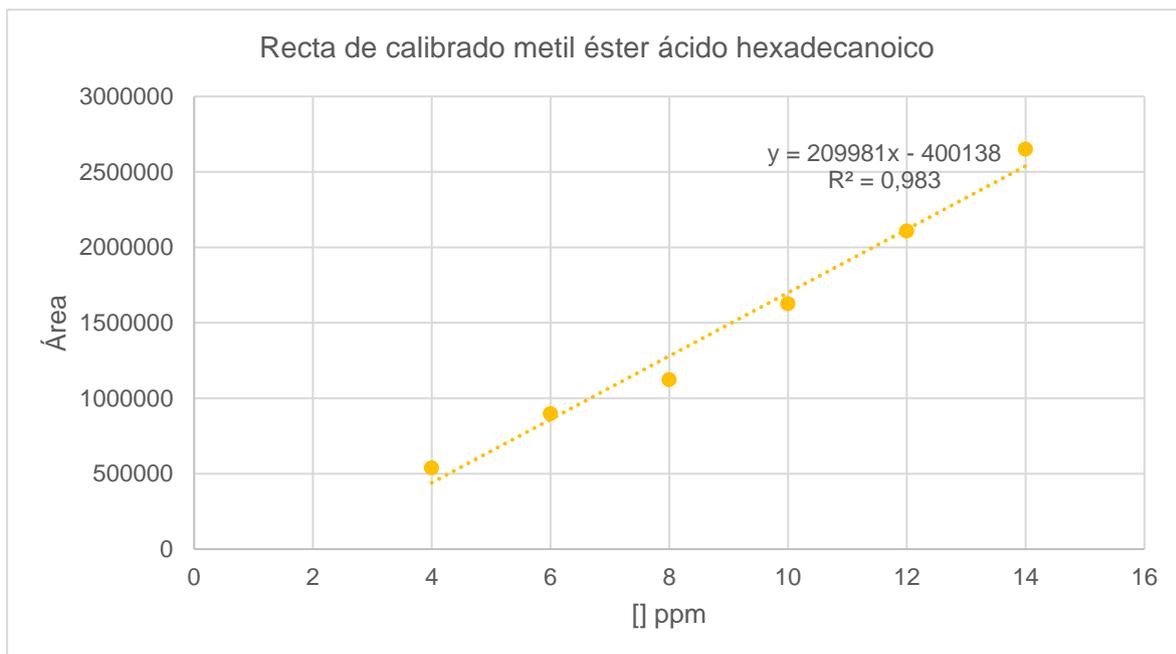


Ilustración 18. Recta de calibrado para el pico 3.

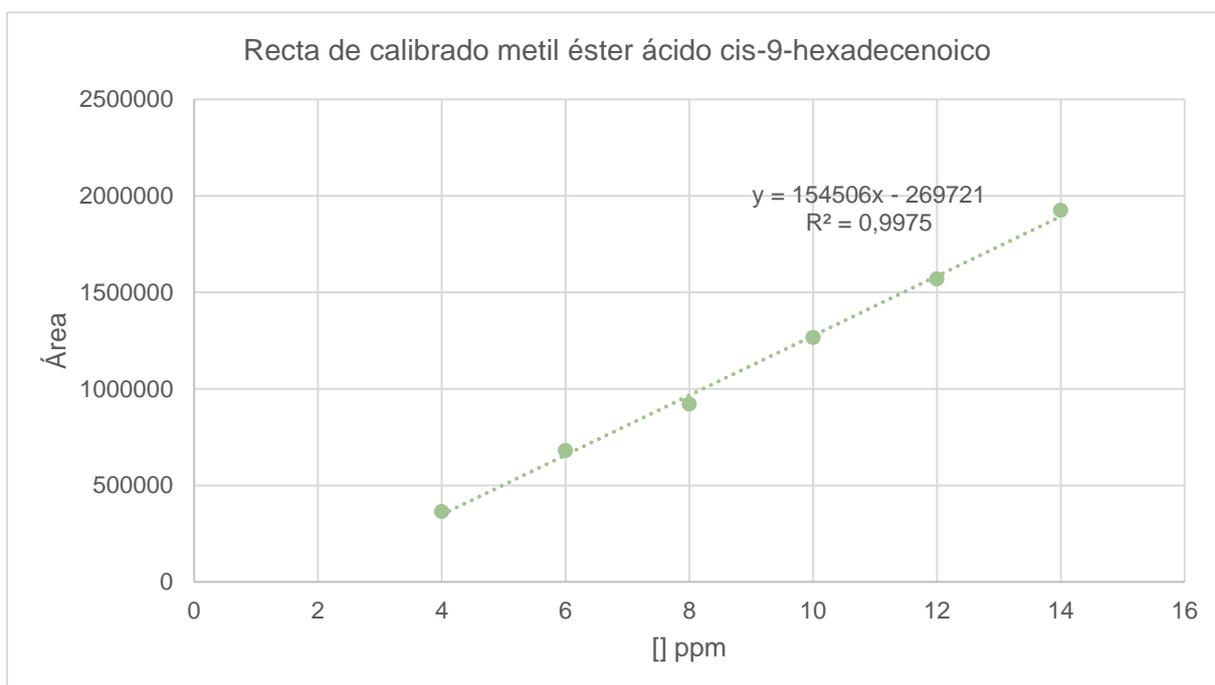


Ilustración 19. Recta de calibrado para el pico 4.

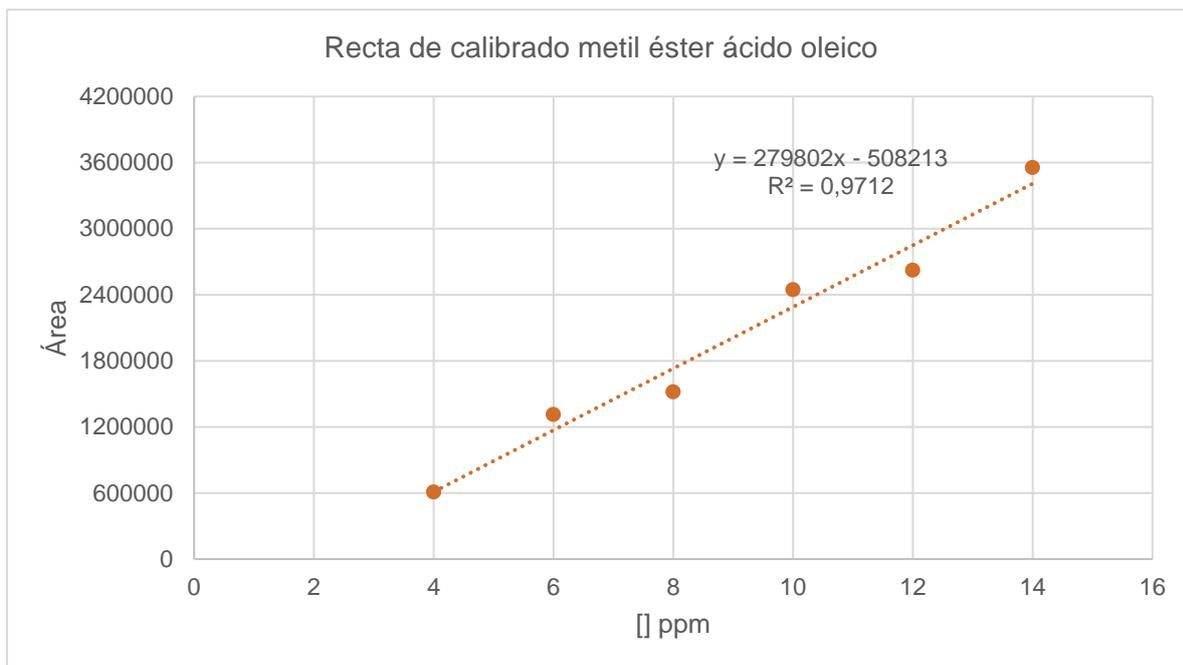


Ilustración 20. Recta de calibrado para el pico 8.

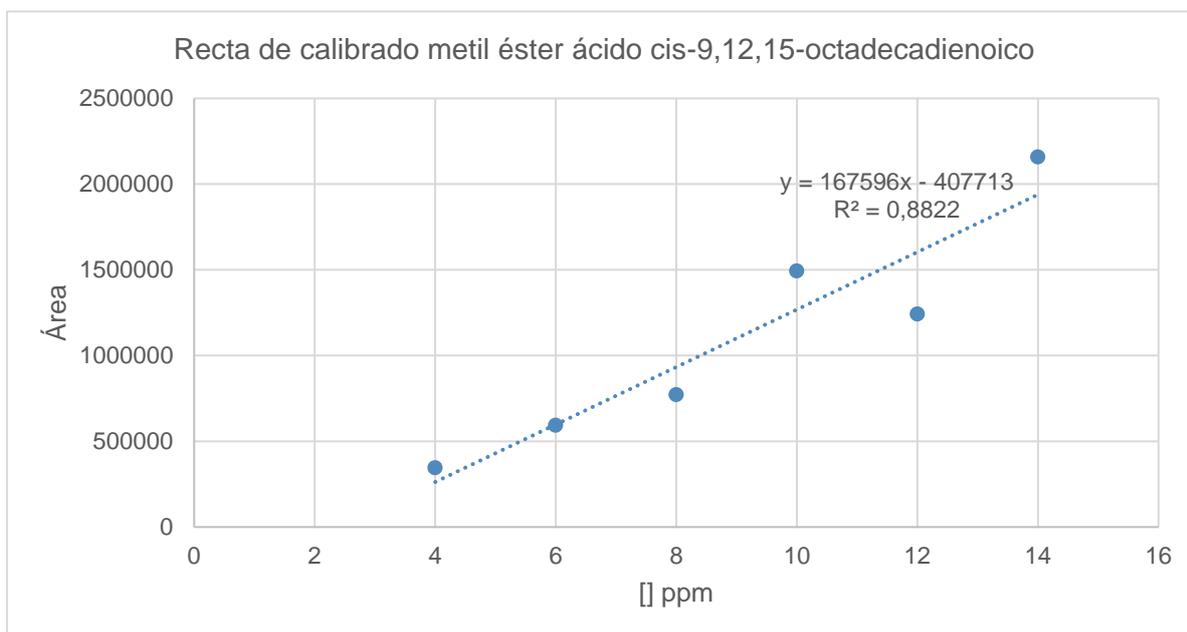


Ilustración 21. Recta de calibrado para el pico 9.

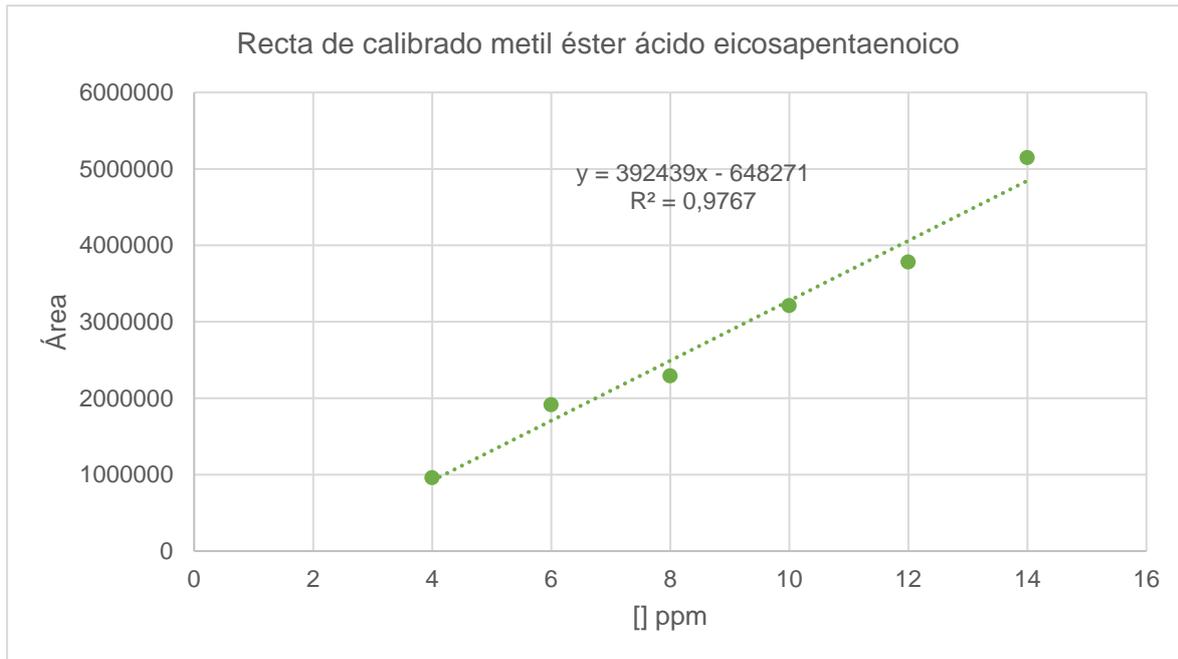


Ilustración 22. Recta de calibrado para el pico 13.

5.3. Tratamiento de datos

Una vez obtenidas las rectas de calibrado de cada ácido graso, se procede a la determinación de las concentraciones de cada ácido graso. Para ello, se sustituye el valor de área en su recta de calibrado correspondiente. Como ejemplo, se va a seguir el paso a paso del cálculo con el ácido eicosapentaenoico.

Ejemplo de cálculo:

Recta de calibrado del ácido eicosapentaenoico:

$$y = 392439 \cdot x - 648271$$

La muestra del primer ensayo para NaCl obtiene un área de 583700. Como el eje de ordenadas corresponde al área (mientras que el eje de abscisas a la concentración), se sustituye este valor en la recta de calibrado:

$$583700 = 392439 \cdot x - 648271$$

$$x = 3,139 \text{ ppm}$$

Pero esta concentración obtenida corresponde a la concentración de los 2 mL de muestra diluida con hexano para poder medirlo en el cromatógrafo, por lo que se tiene que calcular la concentración de ácido graso de los 40 µL de los extractos originales:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$3,139 \text{ ppm} \cdot 2 \text{ mL} = C_2 \cdot 0,04 \text{ mL}$$

$$C = 156,963 \text{ ppm}$$

Esta concentración de lípidos es a 25 mL de volumen, correspondiente al matraz aforado donde se llevó la muestra y se enrasó con hexano por lo que, se tiene que multiplicar por este valor y así obtener la cantidad de lípidos totales extraídos en unidad de masa.

$$C = 156,963 \text{ ppm} \cdot 0,025 \text{ L} = 3,924 \text{ mg}$$

Seguidamente, esta cantidad se divide por la cantidad de microalga utilizada en el ensayo: 0,5 g.

$$C = \frac{3,924 \text{ mg}}{500 \text{ mg}} = 0,007848 \text{ mg}$$

Finalmente, este resultado se pasa a microgramos para un manejo más sencillo.

$$C = 7,7848 \text{ µg}$$

Obteniendo, de esta forma, la cantidad de lípidos presentes en 0,5 gramos de microalga *Nannochloropsis gaditana* tratada previamente con NaCl/NaOH y las condiciones del ensayo 1.

A continuación, se puede observar en las Tablas 10 y 11 los resultados de los cálculos anteriores para el ácido eicosapentaenoico para cada uno de los pretratamientos.

Tabla 10. Resultados del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento NaCl/NaOH.

Ácido eicosapentaenoico - NaCl/NaOH						
$y = 392439 x - 648271$						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (µg)
1.1	583700	3,139	156,963	3,924	0,008	7,848
2.1	743184	3,546	177,283	4,432	0,009	8,864
3.1	959466	4,097	204,839	5,121	0,010	10,242
4.1	498378	2,922	146,093	3,652	0,007	7,305

5.1	632937	3,265	163,237	4,081	0,008	8,162
6.1	781779	3,644	182,200	4,555	0,009	9,110
7.1	432203	2,753	137,661	3,442	0,007	6,883
8.1	786825	3,657	182,843	4,571	0,009	9,142

Ácido eicosapentaenoico - NaCl/NaOH - Duplicado						
$y = 392439 x - 648271$						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (µg)
1.2	1134039	4,542	227,081	5,677	0,011	11,354
2.2	985641	4,163	208,174	5,204	0,010	10,409
3.2	892305	3,926	196,282	4,907	0,010	9,814
4.2	978317	4,145	207,241	5,181	0,010	10,362
5.2	273689	2,349	117,465	2,937	0,006	5,873
6.2	388822	2,643	132,134	3,303	0,007	6,607
7.2	595318	3,169	158,444	3,961	0,008	7,922
8.2	523717	2,986	149,321	3,733	0,007	7,466

Tabla 11. Resultados del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento de ultrasonidos.

Ácido eicosapentaenoico - Ultrasonidos						
$y = 392439 x - 648271$						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (µg)
1.1	668196	3,355	167,729	4,193	0,008	8,386
2.1	1027533	4,270	213,511	5,338	0,011	10,676
3.1	801060	3,693	184,657	4,616	0,009	9,233
4.1	1030011	4,277	213,827	5,346	0,011	10,691
5.1	691970	3,415	170,758	4,269	0,009	8,538
6.1	440285	2,774	138,691	3,467	0,007	6,935
7.1	424882	2,735	136,729	3,418	0,007	6,836
8.1	336706	2,510	125,494	3,137	0,006	6,275

Ácido eicosapentaenoico – Ultrasonidos - Duplicado						
$y = 392439 x - 648271$						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (µg)
1.2	562858	3,086	154,308	3,858	0,008	7,715
2.2	867664	3,863	193,143	4,829	0,010	9,657
3.2	1140143	4,557	227,859	5,696	0,011	11,393
4.2	1056699	4,345	217,227	5,431	0,011	10,861
5.2	715132	3,474	173,709	4,343	0,009	8,685
6.2	468404	2,845	142,274	3,557	0,007	7,114
7.2	623478	3,241	162,031	4,051	0,008	8,102

8.2	235208	2,251	112,563	2,814	0,006	5,628
------------	--------	-------	---------	-------	-------	-------

Como ya se ha comentado anteriormente, se realizaron duplicados de los ensayos para cada uno de los pretratamientos por lo que se hace una media de los duplicados para cada pretratamiento, como se puede observar en las siguientes Tablas (12 y 13), calculándose además los valores de desviación estándar aceptables para cada caso.

Tabla 12. Resultados del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento NaCl/NaOH.

Ensayo	Lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ microalga)	Lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ microalga) DUP	Valor medio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ microalga)	Desviación estándar
1	7,848	11,354	9,601	2,479
2	8,864	10,409	9,636	1,092
3	10,242	9,814	10,028	0,303
4	7,305	10,362	8,833	2,162
5	8,162	5,873	7,018	1,618
6	9,110	6,607	7,858	1,770
7	6,883	7,922	7,403	0,735
8	9,142	7,466	8,304	1,185

Tabla 13. Resultados del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento de ultrasonidos.

Ensayo	Lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ microalga)	Lípidos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ microalga) DUP	Valor medio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ microalga)	Desviación estándar
1	8,386	7,715	8,051	0,475
2	10,676	9,657	10,166	0,720
3	9,233	11,393	10,313	1,527
4	10,691	10,861	10,776	0,120
5	8,538	8,685	8,612	0,104
6	6,935	7,114	7,024	0,127
7	6,836	8,102	7,469	0,895
8	6,275	5,628	5,951	0,457

Todo este procedimiento se realiza para cada pico diferenciando entre los ensayos realizados y los dos pretratamientos utilizados y, así, poder determinar el método más

adecuado en la extracción de lípidos totales de la microalga *Nannochloropsis gaditana*.

5.4. Determinación de lípidos de la microalga *Nannochloropsis gaditana*

El método de trabajo descrito se realiza para cada ácido graso quedando los resultados expuestos en las Tablas 14-19.

Tabla 14. Resultados del ácido tetradecanoico.

Ensayo	Metil éster ácido tetradecanoico			
	NaCl/NaOH		Ultrasonidos	
	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar
1	5,684	0,855	5,489	0,521
2	6,132	0,278	6,652	0,534
3	6,270	0,303	6,574	0,604
4	5,650	1,511	6,834	0,907
5	4,298	0,860	6,437	0,805
6	5,291	1,551	4,608	0,458
7	4,728	0,523	4,334	0,542
8	6,233	0,340	4,436	0,082

Tabla 15. Resultados del ácido hexadecanoico.

Ensayo	Metil éster ácido hexadecanoico			
	NaCl/NaOH		Ultrasonidos	
	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar
1	17,108	3,985	15,483	1,323
2	18,062	2,758	19,720	1,754
3	18,519	0,040	19,036	2,795
4	15,714	4,727	18,328	0,638
5	12,913	4,340	17,041	1,027
6	15,695	6,142	13,982	0,448
7	14,574	1,575	12,665	2,271
8	18,278	2,079	10,493	0,210

Tabla 16. Resultados del ácido cis-9-hezadecenoico.

Ensayo	Metil éster ácido cis-9-hexadecenoico			
	NaCl/NaOH		Ultrasonidos	
	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar
1	20,253	6,001	16,863	3,003
2	20,946	4,456	23,713	3,040
3	21,954	2,632	22,059	2,801
4	18,225	4,964	24,004	2,254
5	12,814	5,983	21,216	0,503
6	17,918	8,045	15,517	1,790
7	16,078	0,110	13,773	2,531
8	19,458	1,722	10,777	0,627

Tabla 17. Resultados del ácido oleico.

Ensayo	Metil éster ácido oleico			
	NaCl/NaOH		Ultrasonidos	
	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar
1	6,446	-	4,338	2,123
2	6,294	0,755	4,849	2,437
3	6,296	0,318	4,604	1,980
4	5,835	0,350	4,857	2,283
5	5,707	-	4,640	1,964
6	6,733	-	2,905	-
7	5,736	0,199	2,794	-
8	6,498	0,219	-	-

Tabla 18. Resultados del ácido cis-9,12,15-octadecadienoico.

Ensayo	Metil éster ácido cis-9,12,15-octadecadienoico			
	NaCl/NaOH		Ultrasonidos	
	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar
1	8,271	-	-	-
2	7,858	-	7,765	-
3	8,127	-	-	-
4	7,647	-	7,584	0,546
5	-	-	7,221	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	7,279	0,005	-	-

Tabla 19. Resultados del ácido eicosapentaenoico.

Ensayo	Metil éster ácido eicosapentaenoico			
	NaCl/NaOH		Ultrasonidos	
	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar	µg lípidos/mg microalga	Desviación estándar
1	9,601	2,479	8,051	0,475
2	9,636	1,092	10,166	0,720
3	10,028	0,303	10,313	1,527
4	8,833	2,162	10,776	0,120
5	7,018	1,618	8,612	0,104
6	7,858	1,770	7,024	0,127
7	7,403	0,735	7,469	0,895
8	8,304	1,185	5,951	0,457

Como se puede observar en las Tablas, para el pretratamiento con NaCl/NaOH, en la mayoría de los casos, es el ensayo 3 con el que mayor cantidad de lípidos se obtienen bajo esas condiciones de extracción.

De forma parecida pasa en el pretratamiento con ultrasonidos que, en general, se obtiene la mayor cantidad de lípidos en el ensayo 4.

Es decir, en el caso de pretratamiento de NaCl/NaOH las condiciones óptimas serían a 60°C, con concentración de HCl 10% (% v/v) y 1,5 horas de tiempo de reacción mientras que con pretratamientos con ultrasonidos las mejores condiciones serían a 70°C, con concentración de HCl 10% (% v/v) y 1,5 horas de tiempo de reacción.

5.5. Comparación de los pretratamientos de la microalga *Nannochloropsis gaditana*.

En este capítulo, se van a comentar los resultados de comparación de los dos pretratamientos utilizados, como se pueden observar en las Ilustraciones 23-28.

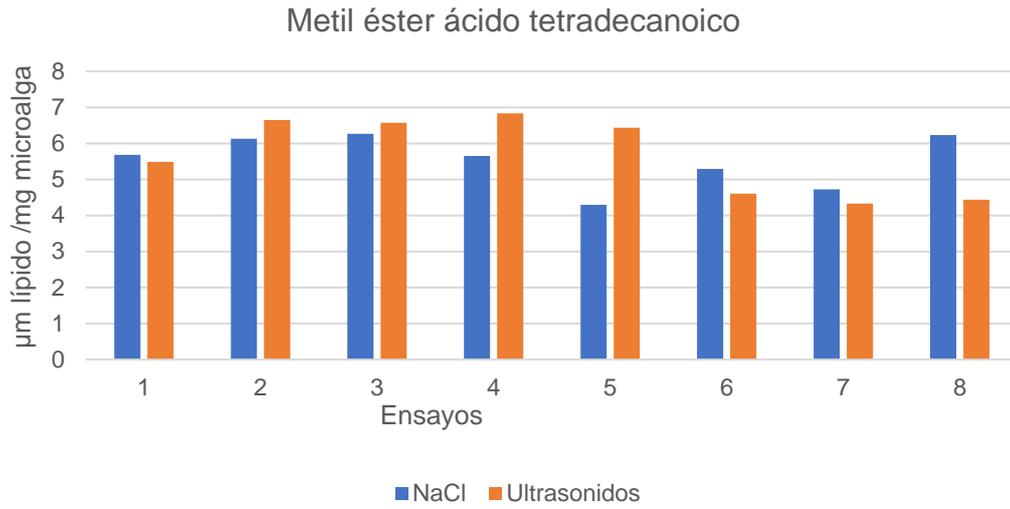


Ilustración 23. Lípidos del ácido tetradecanoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.

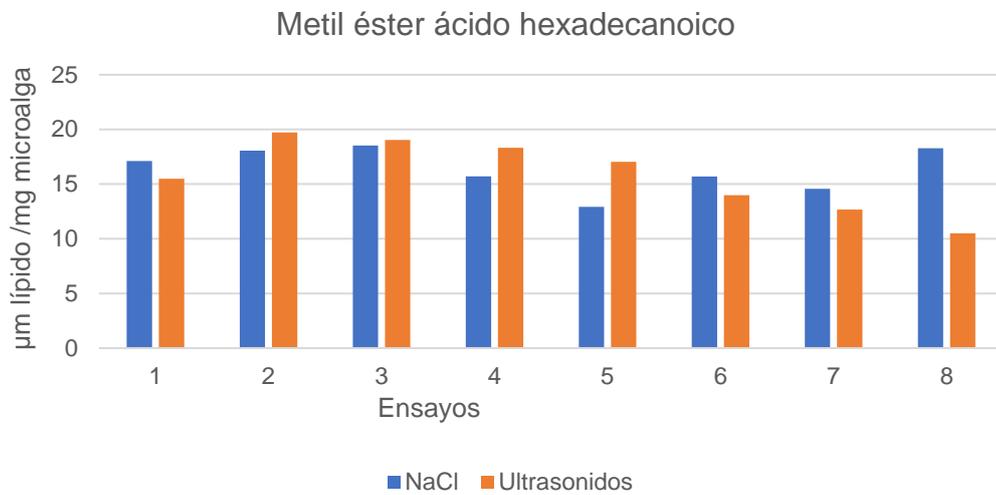


Ilustración 24. Lípidos del ácido hexadecanoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.

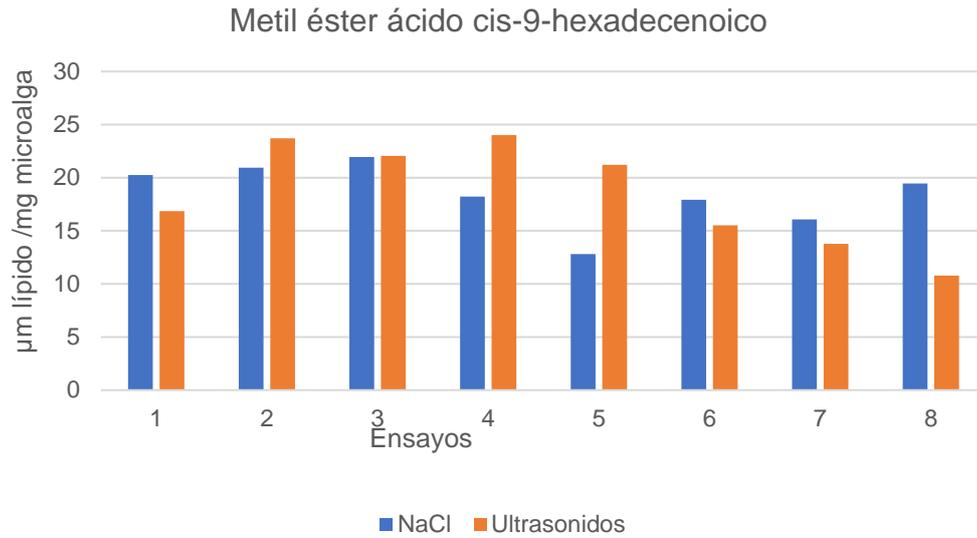


Ilustración 25. Lípidos del ácido cis-9-hexadecenoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.

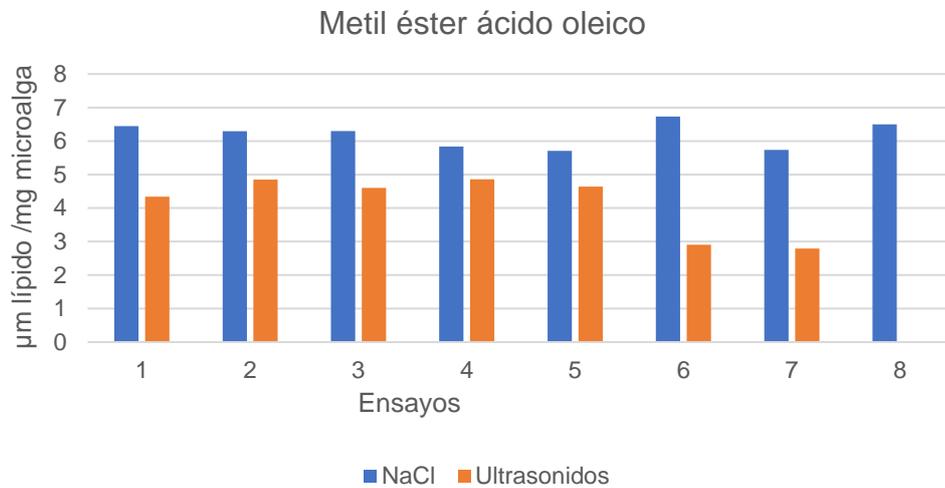


Ilustración 26. Lípidos del ácido oleico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.

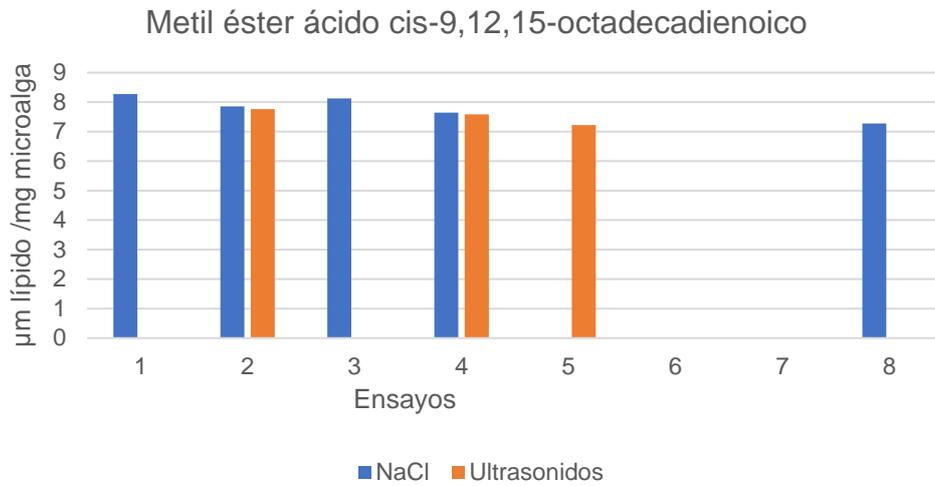


Ilustración 27. Lípidos del ácido cis-9,12,15-octadecadienoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.

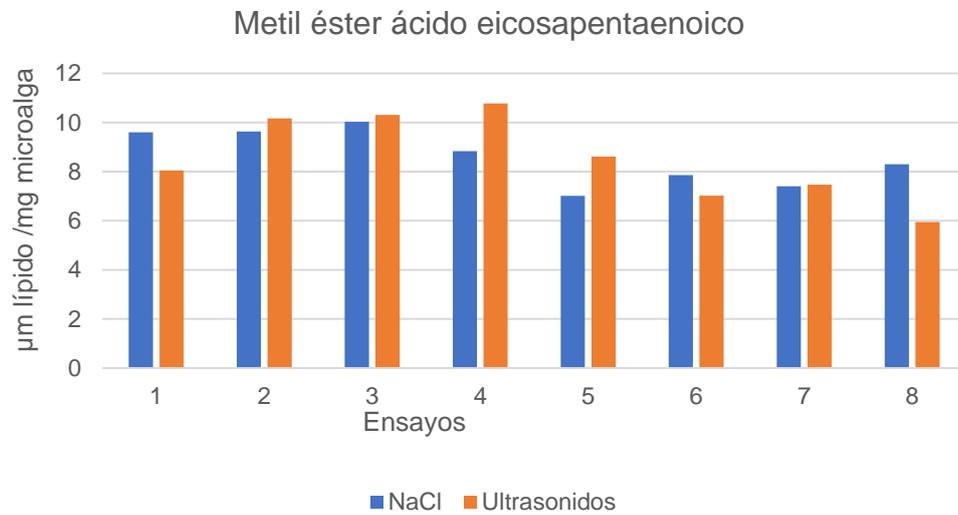


Ilustración 28. Lípidos del ácido eicosapentaenoico con pretratamiento de NaCl/NaOH y ultrasonidos.

En las gráficas se observa que la cantidad de lípidos extraídos varía más en función del ensayo realizado y del pretratamiento utilizado.

En la Ilustración 21, se observa que la cantidad de metil éster del ácido tetradecanoico obtenida no es significativa en comparación con otros ácidos grasos. Sucediendo lo mismo con el ácido oleico. Sin embargo, con el ácido oleico se obtienen mayores cantidades de lípidos con pretratamiento de NaCl/NaOH.

El ácido cis-9,12,15-octadecadienoico puede despreciarse debido a que no se obtienen lípidos de microalga en todos los ensayos no siendo, por tanto, un resultado definitorio el obtenido en este trabajo.

Con el ácido hexadecanoico se obtienen grandes cantidades de lípidos de microalga. Destacar el pretratamiento con ultrasonidos para este ácido graso, pero sin despreciar la cantidad obtenida con NaCl/NaOH. De igual forma, se obtienen buenos resultados en cuanto a cantidad de lípidos de microalga con el ácido cis-9-hexadecenoico.

Destacando la obtención del ácido eicosapentaenoico (EPA), que es el ácido graso que aporta mayor interés, se observa como en los 4 primeros ensayos se obtiene más cantidad de lípidos siendo, por tanto, el tiempo un valor a destacar pues una vez obtenido todo el contenido lipídico de la microalga a la hora y media, no se produce mayor cantidad del mismo para mayor tiempo (3 h). Centrándonos en esos 4 ensayos a hora y media, se observa que en el ensayo 3 y 4 se obtiene mayor cantidad de lípidos ya que en ellos se trabaja con una concentración al 10% de HCl (% v/v). En los ensayos 3 y 4, la temperatura solo afecta al pretratamiento en sí, produciéndose mayor cantidad de lípidos en pretratamiento NaCl/NaOH con 60°C (ensayo 3) mientras que con 70°C (ensayo 4) se obtiene mayor cantidad en pretratamiento con ultrasonidos.

5.6. Influencia de las variables de los ensayos

En este apartado se va a observar cómo le afectan las condiciones de los ensayos: temperatura, tiempo de reacción y concentración de HCl. Para ello, se procede al cálculo de los efectos de cada una de estas variables utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Efecto} = \frac{\sum \text{valores nivel alto} - \sum \text{valores nivel bajo}}{4}$$

5.6.1. Pretratamiento NaCl/NaOH

En las siguientes ilustraciones (29-34), se observa la influencia de estos parámetros en cada pico en pretratamiento con NaCl/NaOH.

- Efectos metil éster ácido tetradecanoico (pico 2)

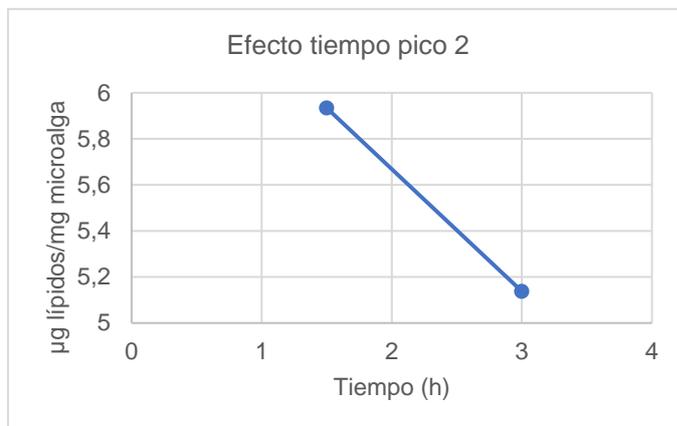
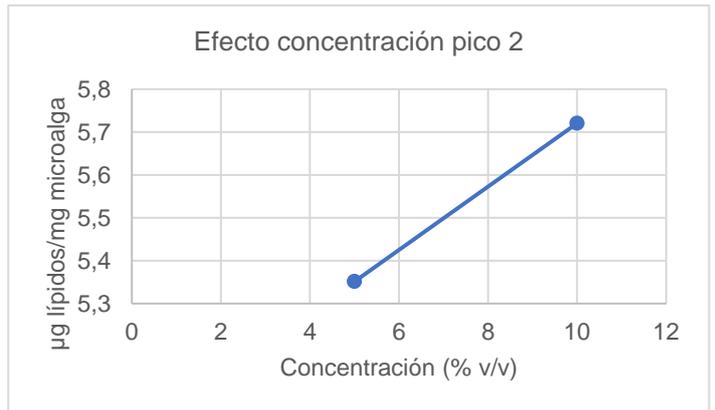
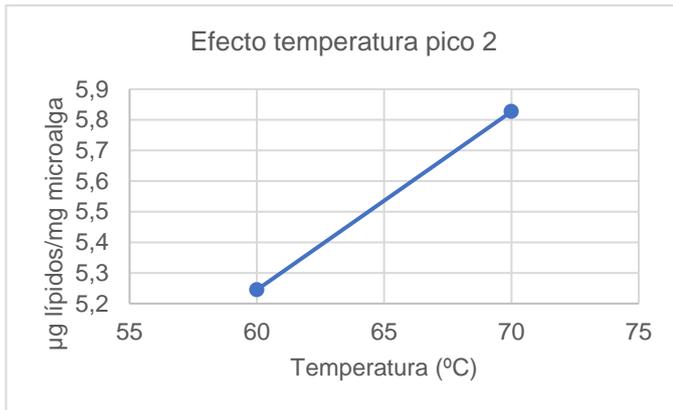


Ilustración 29. Efectos pico 2 (NaCl/NaOH).

- Efectos metil éster ácido hexadecanoico (pico 3)

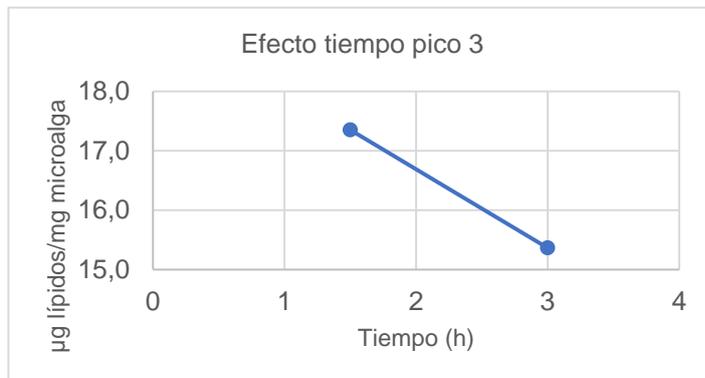
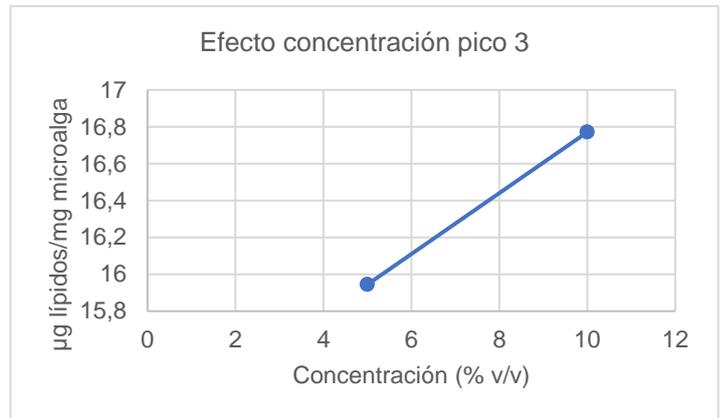
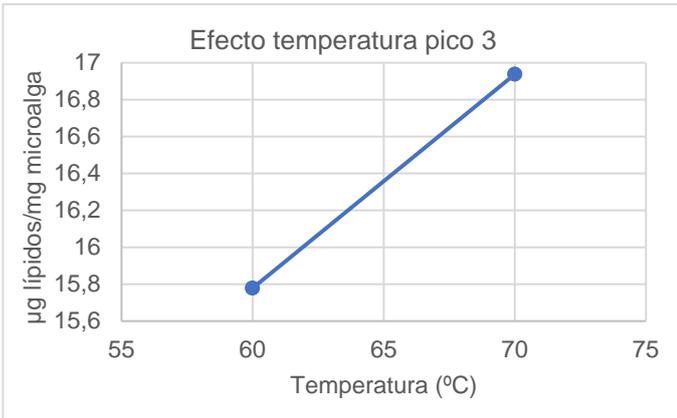
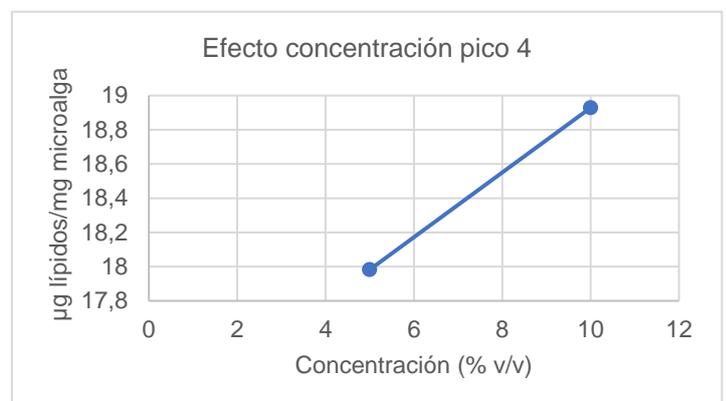
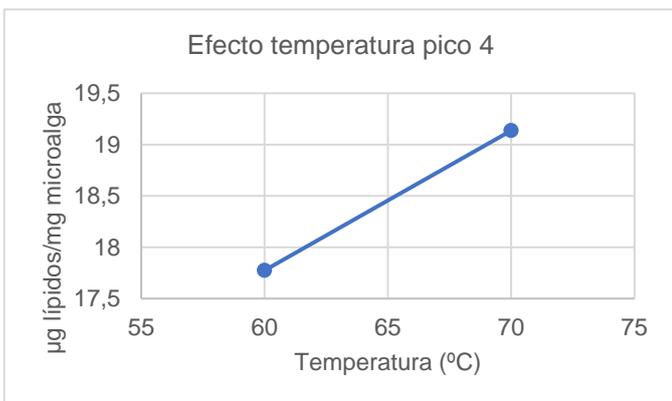


Ilustración 30. Efectos pico 3 (NaCl/NaOH).

- Efectos metil éster ácido cis-9-hexadecenoico (pico 4)



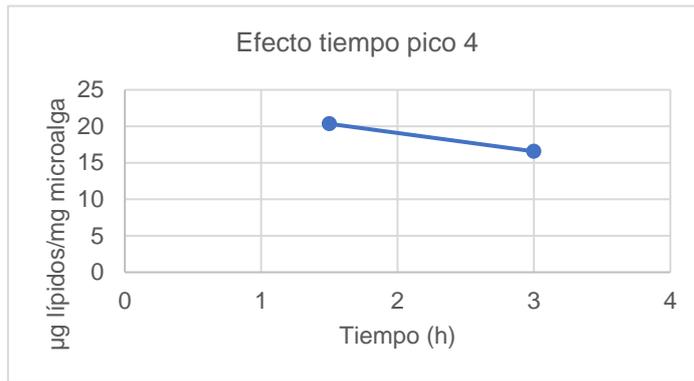


Ilustración 31. Efectos pico 4 (NaCl/NaOH).

- Efectos metil éster ácido oleico (pico 8)

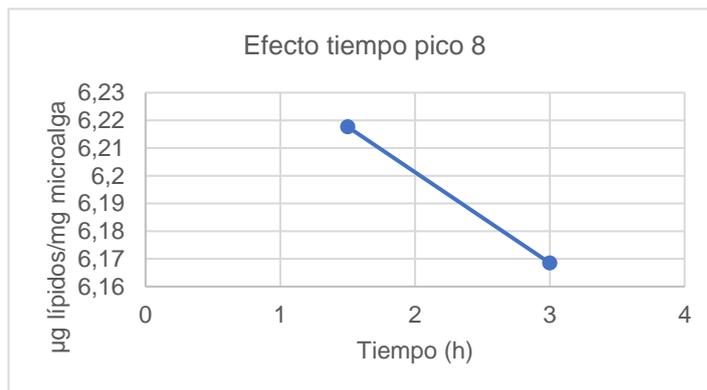
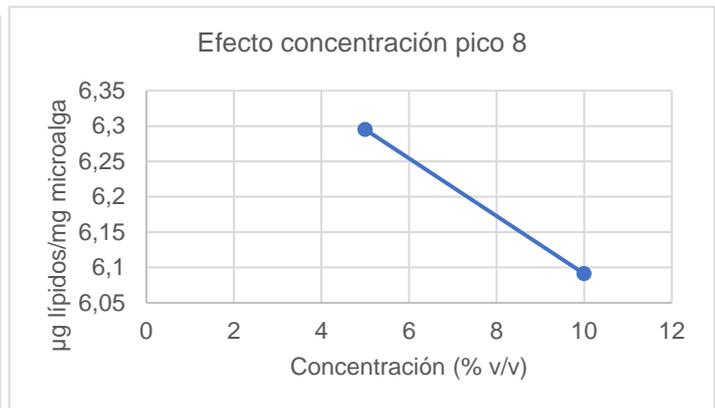
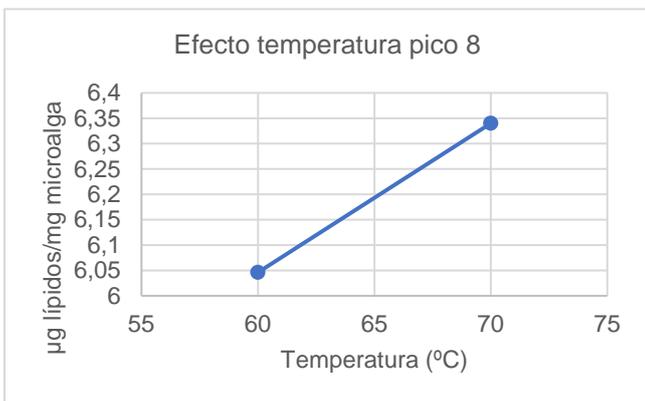


Ilustración 32. Efectos pico 8 (NaCl/NaOH).

- Efectos metil éster ácido cis-9,12,15-octadecadienoico (pico 9)

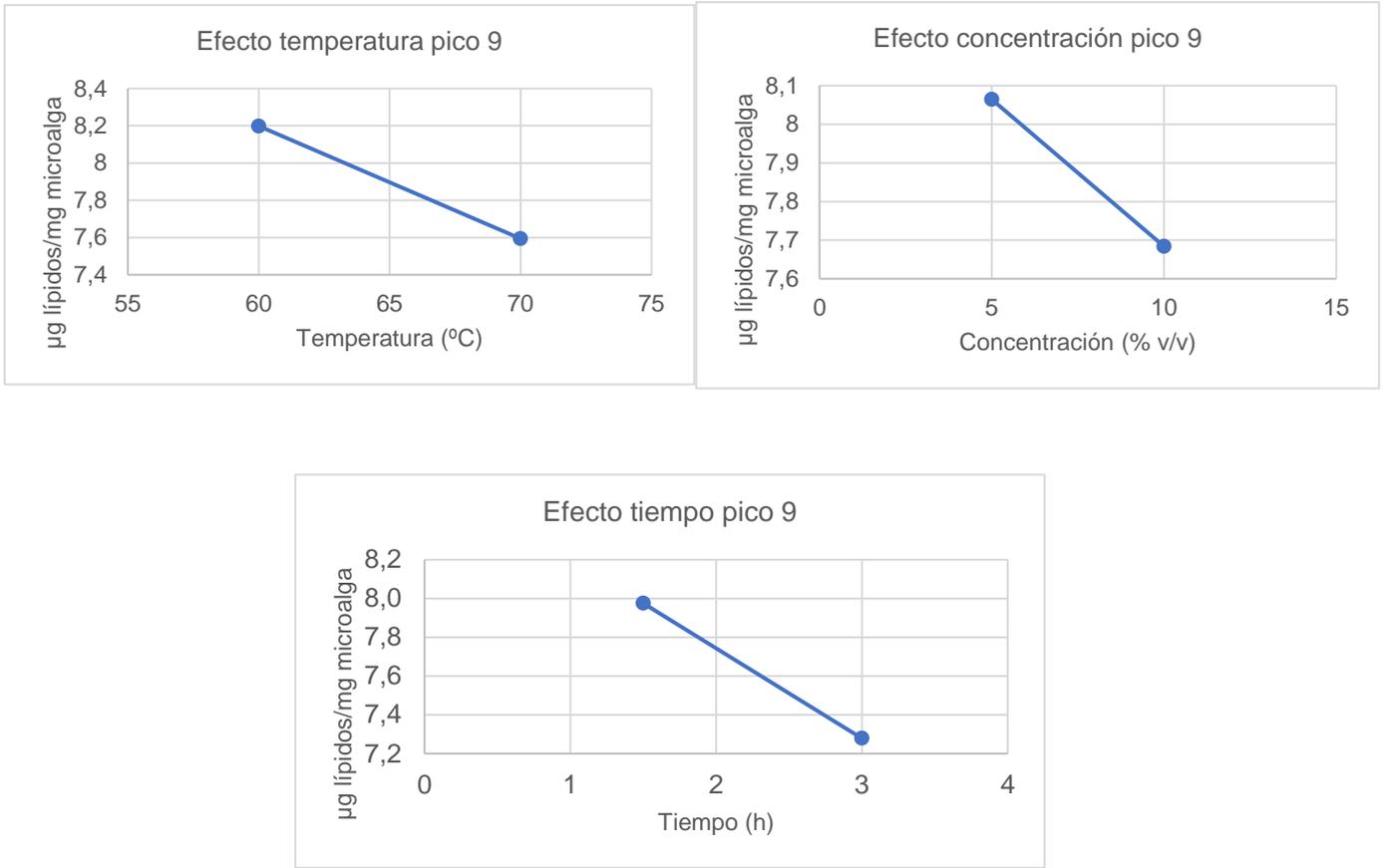
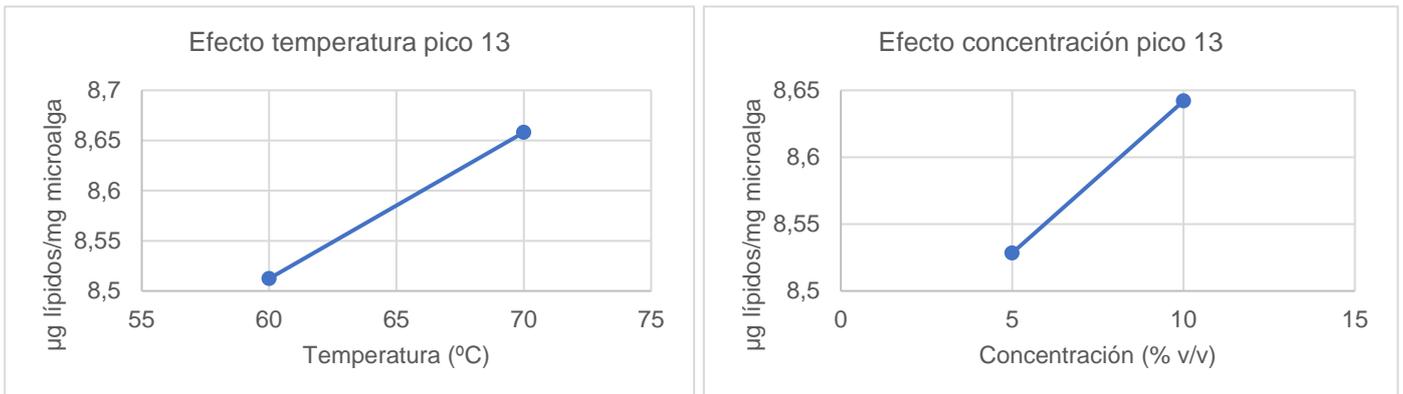


Ilustración 33. Efectos pico 9 (NaCl/NaOH).

- Efectos metil éster ácido eicosapentaenoico (pico 13)



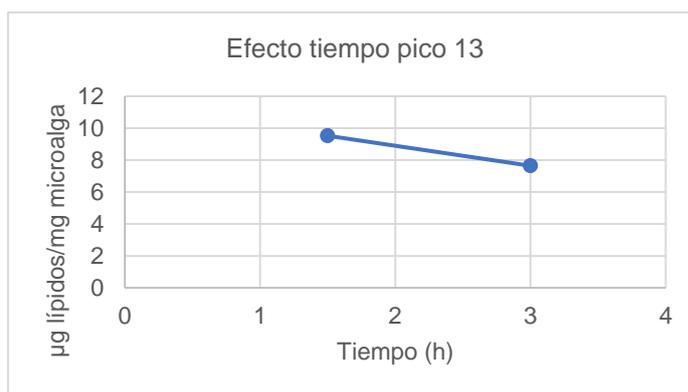


Ilustración 34. Efectos pico 13 (NaCl/NaOH).

Como se puede observar en las gráficas, una de las variables que afecta en mayor medida a los lípidos de la microalga *Nannochloropsis gaditana* es la concentración de HCl. Esto es debido a que el ácido clorhídrico penetra en la pared celular e interacciona con los ácidos grasos presentes en la microalga. Por ello, se observa como el aumento de la concentración de HCl al 10% (% v/v) favorece la extracción de lípidos totales teniendo un efecto positivo en los picos. El pico 8 no sigue esta tendencia positiva, pero se asocia a un error que pueden producirse en el laboratorio mientras que con el pico 9 se decide despreciar el valor por no obtenerse lípidos de biomasa microalgal en todos los ensayos.

La temperatura también es un factor importante a tener en cuenta ya que, en general, un aumento de ella produce un incremento de los lípidos extraídos. Esto se debe a que la biomasa microalgal puede degradarse a elevadas temperaturas. Es, por tanto, un factor positivo en la extracción de lípidos de microalga a excepción del pico 9, que puede despreciarse por no obtenerse lípidos en todos los ensayos.

En cambio, el aumento del tiempo no tiene un efecto positivo en la obtención de lípidos de la microalga ya que la reacción de transesterificación que tiene lugar durante el procedimiento extrae los lípidos presentes en la microalga durante la primera hora y media.

5.6.2. Pretratamiento con ultrasonidos

En las siguientes ilustraciones (35-40), se observa la influencia de estos parámetros en cada pico en pretratamiento con ultrasonidos.

- Efectos metil éster ácido tetradecanoico (pico 2)

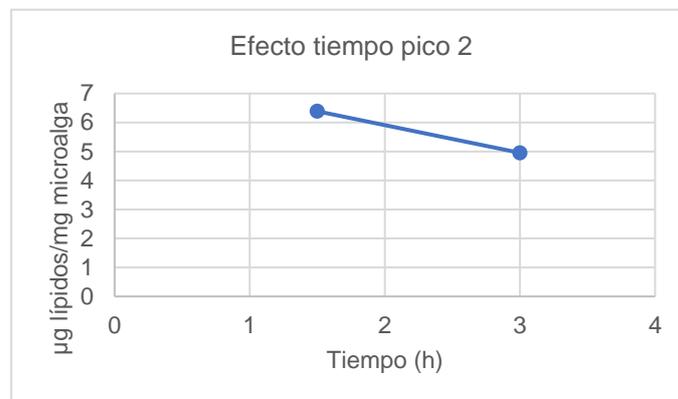
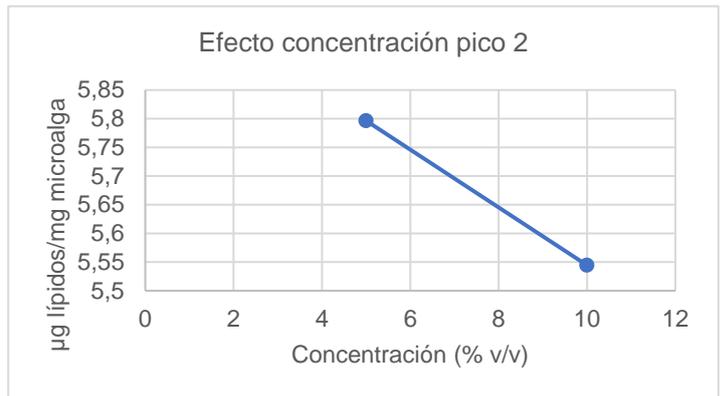
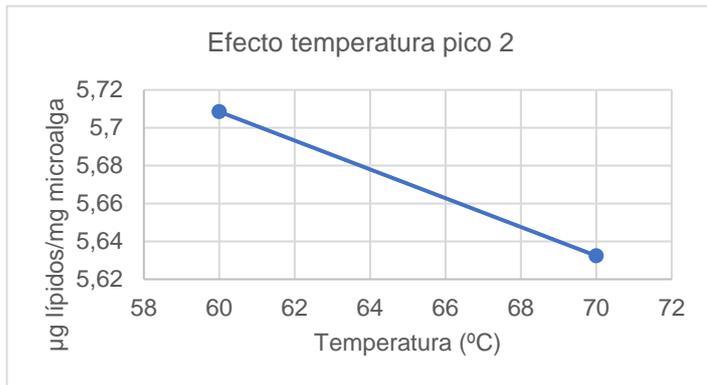


Ilustración 35. Efectos pico 2 (Ultrasonidos).

- Efectos metil éster ácido hexadecanoico (pico 3)

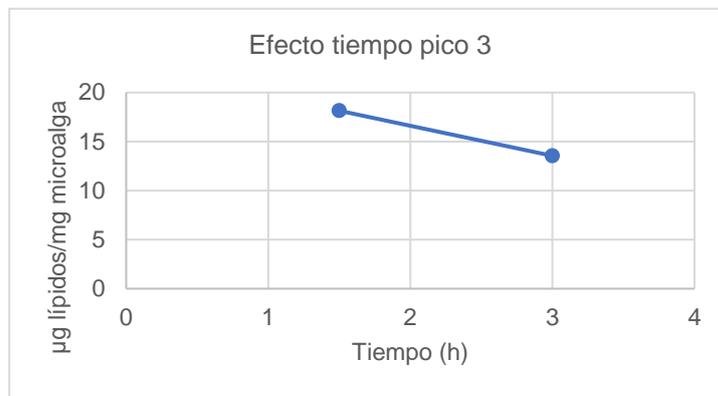
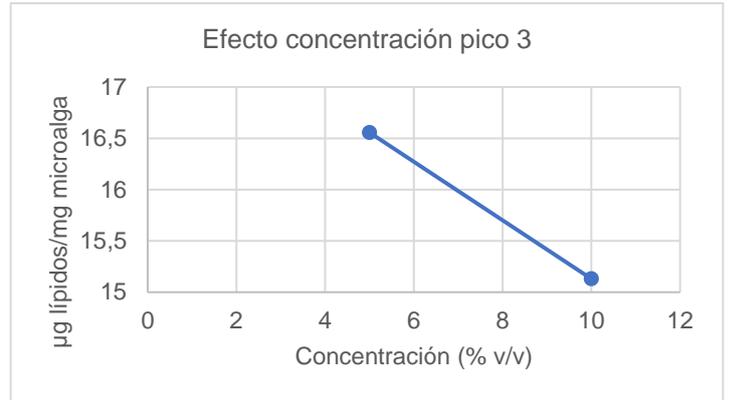
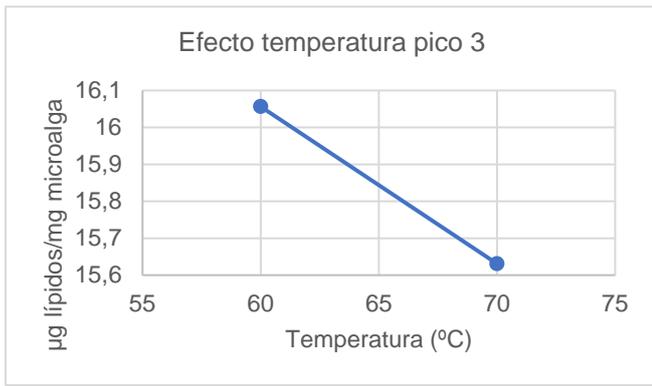
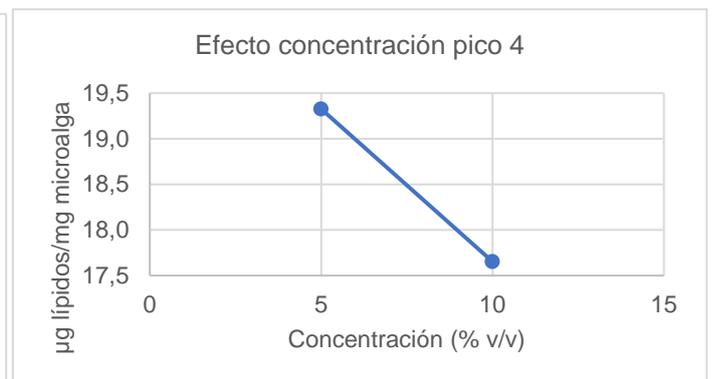
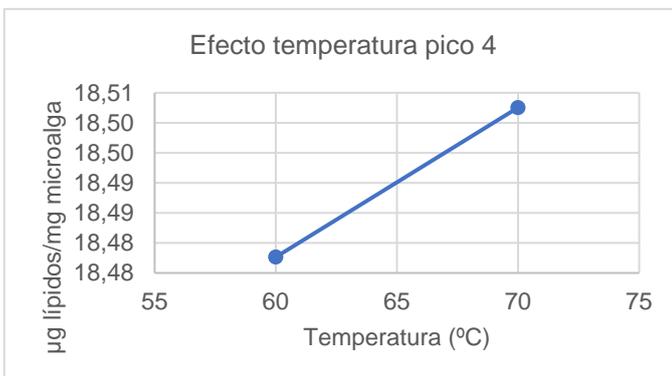


Ilustración 36. Efectos pico 3 (Ultrasonidos).

- Efectos metil éster ácido cis-9-hexadecenoico (pico 4)



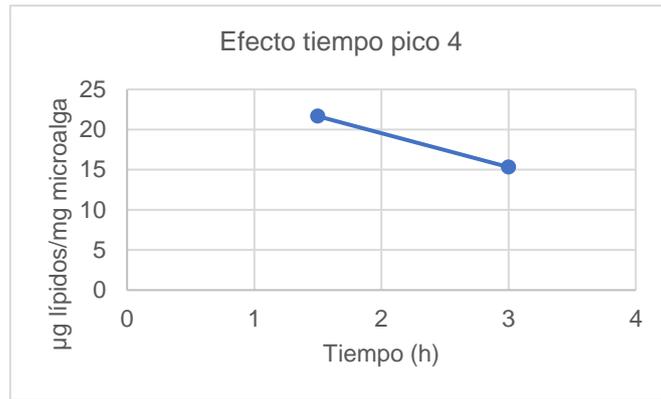


Ilustración 37. Efectos pico 4 (Ultrasonidos).

- Efectos metil éster ácido oleico (pico 8)

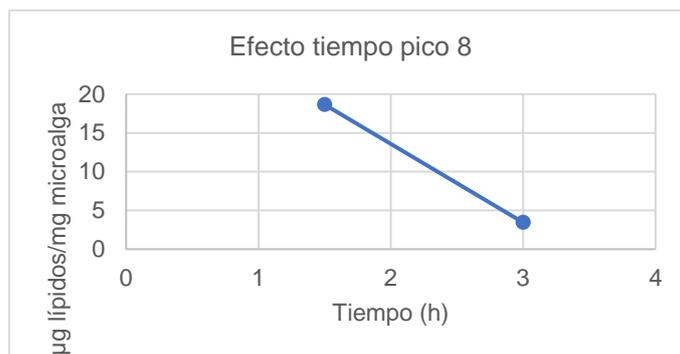
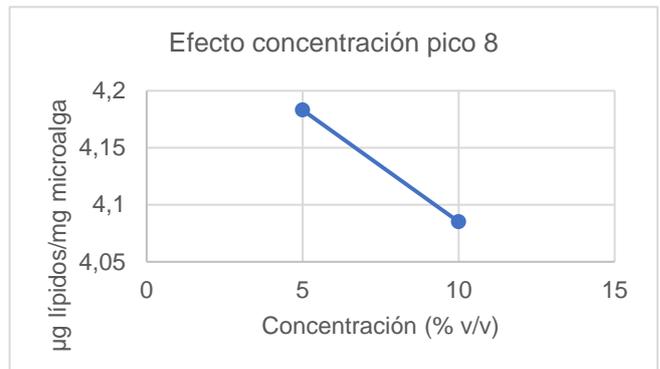
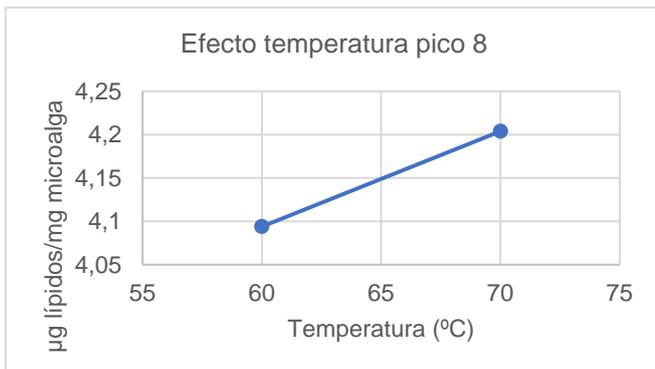


Ilustración 38. Efectos pico 8 (Ultrasonidos).

- Efectos metil éster ácido cis-9,12,15-octadecadienoico (pico 9)

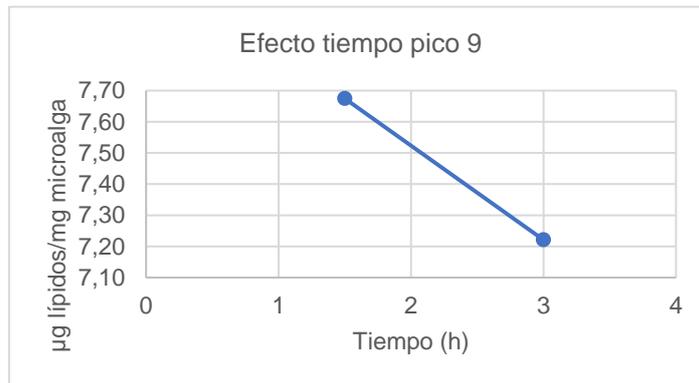
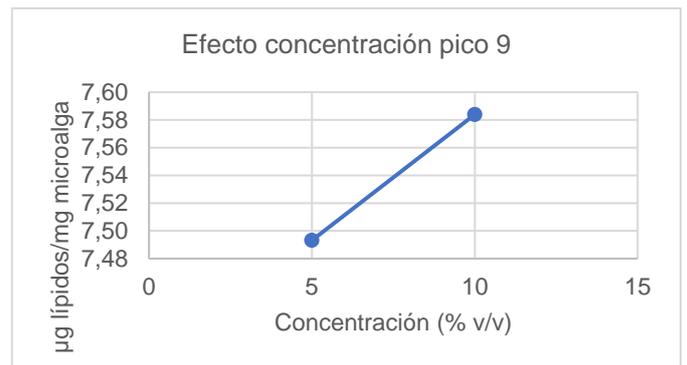
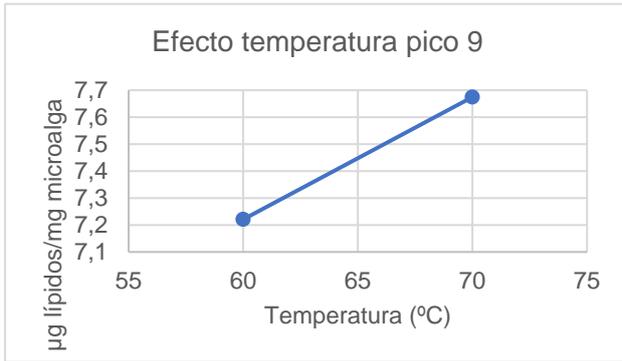
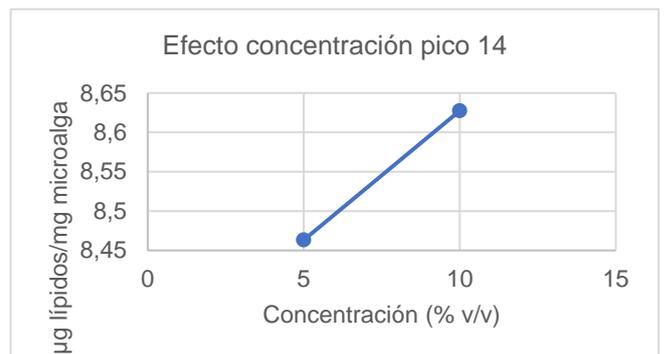
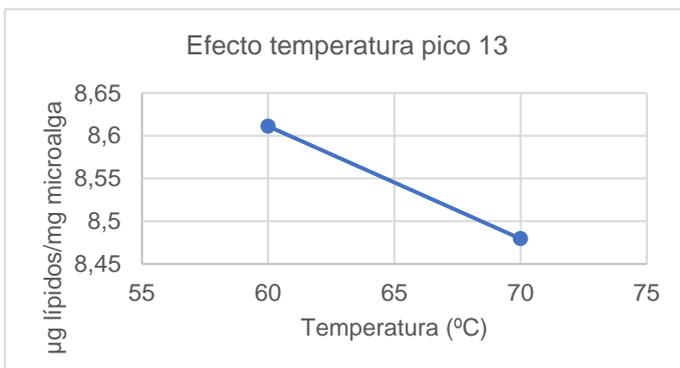


Ilustración 39. Efectos pico 9 (Ultrasonidos).

- Efectos metil éster ácido eicosapentaenoico (pico 14)



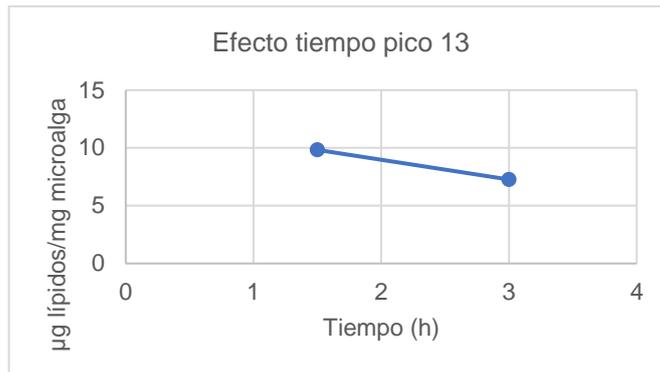


Ilustración 40. Efectos pico 13 (Ultrasonidos).

En este caso, utilizando pretratamiento con ultrasonidos, con la variable concentración de HCl se obtiene mayor cantidad de lípidos (favoreciendo la extracción) con un 10% (% v/v) en el pico 13 (ácido eicosapentaenoico). Sin embargo, en el resto de ácidos grasos tiene un efecto negativo cuando se hace el sumatorio total de estas cantidades de lípidos.

La variable temperatura afecta de forma negativa a la producción de lípidos de microalga cuando se utiliza pretratamiento con ultrasonidos. Se considera que con este pretratamiento se degrada la biomasa microalgal a 60°C, no necesitando un aumento de esta para conseguir una mayor degradación.

De igual forma que sucede en el otro caso, con pretratamiento con ultrasonidos se obtiene un efecto negativo con el aumento del tiempo ya que toda la extracción de lípidos de la biomasa microalgal tiene lugar a la hora y media.



industriales
etsii

**Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Industrial**

CONCLUSIONES



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas tras la realización del trabajo son las siguientes:

- ✓ La determinación óptima de lípidos de biomasa microalgal de *Nannochloropsis gaditana* con diferentes condiciones de ensayo ha dado buenos resultados. Obteniéndose un valor mayor de lípidos de microalga con una concentración de HCl al 10% (% v/v) y con un tiempo de hora y media. Esto es debido a que el ácido clorhídrico penetra en la pared celular de la microalga interaccionando con los ácidos grasos que se encuentran presentes en ella. Además, un mayor tiempo no significa que haya una mayor extracción, pues se ha demostrado que la reacción de transesterificación tiene lugar durante la primera hora y media. Sin embargo, el valor de la temperatura se encuentra influenciado por el pretratamiento al que se ha sometido la microalga previamente.
- ✓ Con un pretratamiento de NaCl/NaOH se ha observado como la temperatura produce un efecto positivo en la producción de lípidos de biomasa microalgal debido a que esta biomasa se degrada a elevadas temperaturas. En cambio, en el pretratamiento con ultrasonidos se ha demostrado que con una mayor temperatura no se produce una mayor degradación de la biomasa microalgal, obteniéndose una mayor cantidad de lípidos a menor temperatura.
- ✓ Estas variables, afectan de forma positiva o negativa a la producción total de cantidad de lípidos de la microalga *Nannochloropsis gaditana*, pero en función del pretratamiento empleado. Por tanto, con pretratamiento de NaCl/NaOH se produce un efecto positivo en el aumento de la concentración de HCl y de la temperatura, pero no se produce este efecto cuando se aumenta el tiempo. Mientras que, con pretratamiento de ultrasonidos, se observa, en general, un efecto negativo para los tres valores a ensayar.
- ✓ En ambos pretratamientos se obtiene ácido eicosapentaenoico (EPA), siendo este ácido graso el que mayor valor aporta a nivel nutricional. La mayor cantidad de este ácido graso se obtiene con pretratamiento de ultrasonidos en el ensayo 4, sin

despreciar la cantidad obtenida con NaCl/NaOH que también se puede considerar significativa.



industriales
etsii

**Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Industrial**



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hernández-Pérez, A., & Labbé, J.I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572014000200001>
- [2] Martínez, A. (2021). Las microalgas y la salud en la actualidad, una revisión bibliográfica. Trabajo Fin de Máster. Universitat Oberta de Catalunya, España.
- [3] Cuál es la importancia de los recursos naturales. Consultado el 18/07/2022. <https://www.ecologiaverde.com/cual-es-la-importancia-de-los-recursos-naturales-3094.html>
- [4] Pérez, D.J., & Menone, M.L. (2017). Algas, helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología. Laboratorio de Ecotoxicología, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras, Universidad Nacional de Mar de Plata, Argentina.
- [5] Gómez, L.M. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, XIX(2), 3-20.
- [6] Camacho, P., & Flórez-Castillo, J.M. (2020). Microalgas y sus aplicaciones biotecnológicas. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15543.14247>
- [7] Catalá, E. (2013). Contribución al estudio del crecimiento y las posibilidades del aprovechamiento termoquímico de las microalgas *Nannochloropsis gaditana* y *Nannochloropsis oculata*. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante, España.
- [8] Abalde, J., Alonso, J. A., & Universidade da Coruña. (1995). *Microalgas*. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña.
- [9] Braidá, V., Campot, M.P., & Tartaglia, C. (2016). Diseño de procesos para la obtención de biocombustibles de microalgas. Trabajo Fin de Grado. Universidad ORT, Uruguay.

- [10] Valera, J. (2018). Estudio de viabilidad técnico-económica de una planta de producción de microalgas con fines de valoración energética. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Madrid, España.
- [11] Pérez-Loredo, M.G., Hernández-De Jesús, L. & Barragán-Huerta, B.E. (2017). Biblioteca virtual SciELO: Extracción de compuestos bioactivos de Pitaya Roja (*Stenocereus stellatus*) aplicando pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimáticos. *Revista Agrociencia*, 51(2).
- [12] Gil-Chávez, J., Villa, J.A., Ayala-Zavala, F., Heredia, B., Sepúlveda, D., Yahia, E.M., & González-Aguilar, G.A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12005>
- [13] Ventura, S., Nobre, B., Ertekin, F., Hayes, M., García-Vaquero, M., Vieira, F., Koc, M., Gouveia, L., Aires-Barros, M., & Palabra, A. (2017). Extraction of value-added compounds from microalgae. *Microalgae-Based biofuels and bioproducts*. 461-483. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101023-5.00019-4>.
- [14] Mendes, R. L., Nobre, B. P., Cardoso, M. T., Pereira, A. P., & Palavra, A. F. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*, 356, 328-334.
- [15] Mendes, R. L., Fernandes, H. L., Coelho, J., Reis, E. C., Cabral, J. M. S., Novais, J. M., et al. (1995). Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*, 53(1), 99-103.
- [16] Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98(1), 136-148.
- [17] Palomino, A. (2013). Extracción de aceite de microalgas. Trabajo Fin de Grado. Universidad del Valle, Colombia.
- [18] Faerman, V., Mukmenev, I., & Shreiber, I. (2002). Sonication of microalgae and its precipitation. *Acta Acustica united with Acustica*, 88(Compendex), 592-593.

- [19] Extracción sólido-líquido Soxhlet. Consultado el 20/07/2022. <https://www.dequimica.info/extraccion-solido-liquido>
- [20] Kafarov, V., & Guzmán, A., & González, A.D. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de microalgas. *PROSPECTIVA*, 7(2),53-60. ISSN: 1692-8261.
- [21] Folch, J., Lees, M., & Stanley, G.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5)
- [22] Laurens, L.M.L., Quinn, M., van Wychen, S., Templeton, D., & Wolfrum, E.J. (2012) Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potencial as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(1), 167-178. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5814-0>
- [23] Tang, Y., Zhang, Y., Rosenberg, J., Betenbaugh, M., & Wang, F. (2016). Optimization of one-step in situ transesterification method for accurate quantification of EPA in *Nannochloropsis gaditana*. *Applied Sciences*, 6(11), 343. <https://doi.org/10.3390/app6110343>
- [24] Lu, Q., Li, H., Xiao, Y., & Liu, H. (2021). A state-of-the-art review on the synthetic mechanisms production technologies and practical application of polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Algal Research*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102281>
- [25] Ramírez, A.F. (2005). Purificación de ácido eicosapentaenoico (EPA) mediante reacciones enzimáticas. Tesis Doctoral. Universidad de Almería, España.
- [26] Valenzuela, A., & Sanhueza, J. (2009) Aceites de origen marino: su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos. *Revista chilena de nutrición*, 36(3). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182009000300007>
- [27] Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., el Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., Bakri, Y., & Wahby, I. (2015). Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology*, 215, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400>

- [28] Bermúdez, M. (2020). Revisión: Impacto de la aplicación de técnicas “ómicas” en microalgas en el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas. Análisis de las potenciales aplicaciones de *Nannochloropsis gaditana*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Cádiz, España.
- [29] Lubián, L.M. (1982). *Nannchloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa*, 4, 287-294.
- [30] Nannochloropsis gaditana celular regeneration. Consultado el 07/07/2022. <https://www.marine-phytoplankton.com.au/nannochloropsis-gaditana-cellular-regeneration/>
- [31] Nannochloropsis gaditana. Consultado el 07/07/2022. <https://www.seaweed.es/algas/nannochloropsis-gaditana/>
- [32] Marcilla, A., Gómez-Siurana, A., Gomis, C., Chápuli, E., Catalá, M.C., & Valdés, F.J. (2009). Characterization of microalgal species through TGA/FTIR análisis: Application to *Nannochloropsis* sp. *Thermochimica Acta*, 484(1-2), 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.12.005>
- [33] Cromatografía de gases. Consultado el 10/07/2022. <https://www.upct.es/sait/es/tecnicas-de-separacion-y-afines/cromatografia-de-gases/>
- [34] Loaiza, F.E. (2003). Cinética de la reacción de transesterificación del aceite de higuierilla en la obtención de biodiesel. Trabajo Fin de Grado. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- [35] Tema 3. Cromatografía de gases. (s.f.).
- [36] Espectrometría de masas. (s.f.).



industriales
etsii

**Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Industrial**



**Universidad
Politécnica
de Cartagena**

ANEXOS

8. ANEXOS

En este apartado, se pueden observar las Tablas para la determinación de las concentraciones de cada ácido graso para cada pretratamiento:

Pretratamiento con NaCl/NaOH

Tabla A1. Resultados pico 2.

Pico 2							Pico 2-Dup						
y = 146173 x - 136430							y = 146173 x - 136430						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
1.1	160546	2,032	101,584	2,540	0,005	5,079	1.2	231271	2,516	125,776	3,144	0,006	6,289
2.1	210631	2,374	118,716	2,968	0,006	5,936	2.2	233592	2,531	126,570	3,164	0,006	6,328
3.1	242706	2,594	129,687	3,242	0,006	6,484	3.2	217645	2,422	121,115	3,028	0,006	6,056
4.1	131470	1,833	91,638	2,291	0,005	4,582	4.2	256415	2,688	134,377	3,359	0,007	6,719
5.1	150412	1,962	98,117	2,453	0,005	4,906	5.2	79305	1,476	73,794	1,845	0,004	3,690
6.1	237079	2,555	127,763	3,194	0,006	6,388	6.2	108835	1,678	83,895	2,097	0,004	4,195
7.1	118378	1,743	87,160	2,179	0,004	4,358	7.2	161619	2,039	101,951	2,549	0,005	5,098
8.1	242094	2,590	129,478	3,237	0,006	6,474	8.2	213972	2,397	119,859	2,996	0,006	5,993

Tabla A2. Resultados pico 3.

Pico 3							Pico 3-Dup						
$y = 209981 x - 400138$							$y = 209981 x - 400138$						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
1.1	800183	5,716	285,817	7,145	0,014	14,291	1.2	1273476	7,970	398,516	9,963	0,020	19,926
2.1	953178	6,445	322,247	8,056	0,016	16,112	2.2	1280770	8,005	400,252	10,006	0,020	20,013
3.1	1152961	7,396	369,819	9,245	0,018	18,491	3.2	1157756	7,419	370,961	9,274	0,019	18,548
4.1	638959	4,949	247,426	6,186	0,012	12,371	4.2	1200470	7,623	381,132	9,528	0,019	19,057
5.1	942235	6,393	319,642	7,991	0,016	15,982	5.2	426699	3,938	196,884	4,922	0,010	9,844
6.1	1282889	8,015	400,757	10,019	0,020	20,038	6.2	553336	4,541	227,038	5,676	0,011	11,352
7.1	730420	5,384	269,205	6,730	0,013	13,460	7.2	917485	6,275	313,748	7,844	0,016	15,687
8.1	1258529	7,899	394,956	9,874	0,020	19,748	8.2	1011630	6,723	336,166	8,404	0,017	16,808

Tabla A3. Resultados pico 4.

Pico 4							Pico 4-Dup						
$y = 154506 x - 269721$							$y = 154506 x - 269721$						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
1.1	719732	6,404	320,199	8,005	0,016	16,010	1.2	1244211	9,799	489,927	12,248	0,024	24,496
2.1	830027	7,118	355,892	8,897	0,018	17,795	2.2	1219498	9,639	481,929	12,048	0,024	24,096
3.1	1202080	9,526	476,293	11,907	0,024	23,815	3.2	972076	8,037	401,860	10,047	0,020	20,093
4.1	639737	5,886	294,312	7,358	0,015	14,716	4.2	1073560	8,694	434,702	10,868	0,022	21,735
5.1	783679	6,818	340,893	8,522	0,017	17,045	5.2	260785	3,434	171,678	4,292	0,009	8,584
6.1	1189185	9,442	472,120	11,803	0,024	23,606	6.2	486067	4,892	244,582	6,115	0,012	12,229
7.1	728760	6,462	323,120	8,078	0,016	16,156	7.2	719111	6,400	319,998	8,000	0,016	16,000
8.1	1008087	8,270	413,514	10,338	0,021	20,676	8.2	857587	7,296	364,810	9,120	0,018	18,241

Tabla A4. Resultados pico 8.

Pico 8							Pico 8-Dup						
y = 279802 x - 508213							y = 279802 x - 508213						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
							1.2	213238	2,578	128,922	3,223	0,006	6,446
2.1	136444	2,304	115,199	2,880	0,006	5,760	2.2	255981	2,731	136,560	3,414	0,007	6,828
3.1	171258	2,428	121,420	3,035	0,006	6,071	3.2	221643	2,608	130,424	3,261	0,007	6,521
4.1	117131	2,235	111,748	2,794	0,006	5,587	4.2	172451	2,433	121,633	3,041	0,006	6,082
5.1	130498	2,283	114,136	2,853	0,006	5,707							
6.1	245395	2,693	134,668	3,367	0,007	6,733							
7.1	117971	2,238	111,898	2,797	0,006	5,595	7.2	149466	2,351	117,526	2,938	0,006	5,876
8.1	236422	2,661	133,065	3,327	0,007	6,653	8.2	201717	2,537	126,863	3,172	0,006	6,343

Tabla A5. Resultados pico 9.

Pico 9							Pico 9-Dup						
y = 167596 x - 407713							y = 167596 x - 407713						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
							1.2	146744	3,308	165,415	4,135	0,008	8,271
							2.2	119070	3,143	157,159	3,929	0,008	7,858
3.1	137077	3,251	162,531	4,063	0,008	8,127							
							4.2	104904	3,059	152,932	3,823	0,008	7,647
8.1	80006	2,910	145,504	3,638	0,007	7,275	8.2	80463	2,913	145,641	3,641	0,007	7,282

Tabla A6. Resultados pico 13.

Pico 13							Pico 13-Dup						
y = 392439 x - 648271							y = 392439 x - 648271						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
1.1	583700	3,139	156,963	3,924	0,008	7,848	1.2	1134039	4,542	227,081	5,677	0,011	11,354
2.1	743184	3,546	177,283	4,432	0,009	8,864	2.2	985641	4,163	208,174	5,204	0,010	10,409
3.1	959466	4,097	204,839	5,121	0,010	10,242	3.2	892305	3,926	196,282	4,907	0,010	9,814
4.1	498378	2,922	146,093	3,652	0,007	7,305	4.2	978317	4,145	207,241	5,181	0,010	10,362
5.1	632937	3,265	163,237	4,081	0,008	8,162	5.2	273689	2,349	117,465	2,937	0,006	5,873
6.1	781779	3,644	182,200	4,555	0,009	9,110	6.2	388822	2,643	132,134	3,303	0,007	6,607
7.1	432203	2,753	137,661	3,442	0,007	6,883	7.2	595318	3,169	158,444	3,961	0,008	7,922
8.1	786825	3,657	182,843	4,571	0,009	9,142	8.2	523717	2,986	149,321	3,733	0,007	7,466

Pretratamiento con ultrasonidos

Tabla A7. Resultados pico 2.

Pico 2							Pico 2-Dup						
y = 146173 x - 136430							y = 146173 x - 136430						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
1.1	206062	2,343	117,153	2,929	0,006	5,858	1.2	162957	2,048	102,408	2,560	0,005	5,120
2.1	274546	2,812	140,579	3,514	0,007	7,029	2.2	230421	2,510	125,485	3,137	0,006	6,274
3.1	222966	2,459	122,935	3,073	0,006	6,147	3.2	272897	2,800	140,015	3,500	0,007	7,001
4.1	225642	2,477	123,851	3,096	0,006	6,193	4.2	300655	2,990	149,509	3,738	0,007	7,475
5.1	206670	2,347	117,361	2,934	0,006	5,868	5.2	273238	2,803	140,131	3,503	0,007	7,007
6.1	114054	1,714	85,681	2,142	0,004	4,284	6.2	151911	1,973	98,630	2,466	0,005	4,932
7.1	94555	1,580	79,011	1,975	0,004	3,951	7.2	139375	1,887	94,342	2,359	0,005	4,717
8.1	119568	1,751	87,567	2,189	0,004	4,378	8.2	126327	1,798	89,879	2,247	0,004	4,494

Tabla A8. Resultados pico 3.

Pico 3							Pico 3-Dup						
y = 209981 x - 400138							y = 209981 x - 400138						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
1.1	978861	6,567	328,363	8,209	0,016	16,418	1.2	821705	5,819	290,941	7,274	0,015	14,547
2.1	1360414	8,384	419,217	10,480	0,021	20,961	2.2	1152046	7,392	369,601	9,240	0,018	18,480
3.1	1032769	6,824	341,199	8,530	0,017	17,060	3.2	1364738	8,405	420,247	10,506	0,021	21,012
4.1	1101363	7,151	357,533	8,938	0,018	17,877	4.2	1177124	7,511	375,573	9,389	0,019	18,779
5.1	970194	6,526	326,299	8,157	0,016	16,315	5.2	1092161	7,107	355,341	8,884	0,018	17,767
6.1	800912	5,720	285,990	7,150	0,014	14,300	6.2	747642	5,466	273,306	6,833	0,014	13,665
7.1	528762	4,424	221,187	5,530	0,011	11,059	7.2	798558	5,709	285,430	7,136	0,014	14,271
8.1	468746	4,138	206,896	5,172	0,010	10,345	8.2	493718	4,257	212,842	5,321	0,011	10,642

Tabla A9. Resultados pico 4.

Pico 4							Pico 4-Dup						
y = 154506 x - 269721							y = 154506 x - 269721						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
1.1	903669	7,594	379,723	9,493	0,019	18,986	1.2	641184	5,896	294,780	7,369	0,015	14,739
2.1	1328624	10,345	517,244	12,931	0,026	25,862	2.2	1062935	8,625	431,264	10,782	0,022	21,563
3.1	971183	8,031	401,571	10,039	0,020	20,079	3.2	1216015	9,616	480,802	12,020	0,024	24,040
4.1	1115276	8,964	448,202	11,205	0,022	22,410	4.2	1312256	10,239	511,947	12,799	0,026	25,597
5.1	1019461	8,344	417,195	10,430	0,021	20,860	5.2	1063440	8,629	431,427	10,786	0,022	21,571
6.1	611034	5,700	285,023	7,126	0,014	14,251	6.2	767442	6,713	335,638	8,391	0,017	16,782
7.1	470882	4,793	239,668	5,992	0,012	11,983	7.2	692104	6,225	311,258	7,781	0,016	15,563
8.1	368920	4,133	206,672	5,167	0,010	10,334	8.2	423754	4,488	224,417	5,610	0,011	11,221

Tabla A10. Resultados pico 8.

Pico 8							Pico 8-Dup						
y = 279802 x - 508213							y = 279802 x - 508213						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
1.1	145301	2,336	116,782	2,920	0,006	5,839	1.2	126894	2,270	113,492	2,837	0,006	5,675
2.1	227351	2,629	131,444	3,286	0,007	6,572	2.2	191482	2,501	125,034	3,126	0,006	6,252
3.1	163828	2,402	120,092	3,002	0,006	6,005	3.2	208939	2,563	128,153	3,204	0,006	6,408
4.1	216110	2,589	129,435	3,236	0,006	6,472	4.2	217711	2,594	129,721	3,243	0,006	6,486
5.1	166480	2,411	120,566	3,014	0,006	6,028	5.2	219524	2,601	130,045	3,251	0,007	6,502
							6.2	142114	2,324	116,212	2,905	0,006	5,811
							7.2	117126	2,235	111,747	2,794	0,006	5,587

Tabla A11. Resultados pico 9.

Pico 9							Pico 9-Dup						
y = 167596 x - 407713							y = 167596 x - 407713						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
							2.2	112863	3,106	155,307	3,883	0,008	7,765
4.1	74836	2,879	143,962	3,599	0,007	7,198	4.2	126558	3,188	159,393	3,985	0,008	7,970
							5.2	76372	2,888	144,420	3,611	0,007	7,221

Tabla A12. Resultados pico 13.

Pico 13							Pico 13-Dup						
y = 392439 x - 648271							y = 392439 x - 648271						
Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)	Muestra	Área	[] (2mL)	[] (40 µL)	mg	mg/500mg	Lípidos (microg.)
1.1	668196	3,355	167,729	4,193	0,008	8,386	1.2	562858	3,086	154,308	3,858	0,008	7,715
2.1	1027533	4,270	213,511	5,338	0,011	10,676	2.2	867664	3,863	193,143	4,829	0,010	9,657
3.1	801060	3,693	184,657	4,616	0,009	9,233	3.2	1140143	4,557	227,859	5,696	0,011	11,393
4.1	1030011	4,277	213,827	5,346	0,011	10,691	4.2	1056699	4,345	217,227	5,431	0,011	10,861
5.1	691970	3,415	170,758	4,269	0,009	8,538	5.2	715132	3,474	173,709	4,343	0,009	8,685
6.1	440285	2,774	138,691	3,467	0,007	6,935	6.2	468404	2,845	142,274	3,557	0,007	7,114
7.1	424882	2,735	136,729	3,418	0,007	6,836	7.2	623478	3,241	162,031	4,051	0,008	8,102
8.1	336706	2,510	125,494	3,137	0,006	6,275	8.2	235208	2,251	112,563	2,814	0,006	5,628