



industriales
etsii

Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Industrial

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Caracterización y extracción de lípidos de microalgas

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL

Autor: Eva Miquel Cara
Director: Sergio Sánchez Segado
Codirector: Carlos Godínez Seoane

Cartagena, 27 de Agosto de 2020



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Caracterización y extracción de lípidos de microalgas

Memoria presentada en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial de la Universidad Politécnica de Cartagena para optar al grado de Ingeniero Químico Industrial.

AGRADECIMIENTOS

Quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han prestado su ayuda para realizar este proyecto que pone fin a mis estudios de Ingeniería Química Industrial:

Agradecer a D. Sergio Sánchez Segado y a D. Carlos Godínez Seoane, director y codirector de este proyecto, su excelente labor para guiarme, resolviendo todas las eventualidades que hemos ido encontrando durante estos últimos meses.

Además, me gustaría agradecerle a D. Sergio Sánchez Segado la paciencia y dedicación en todo momento, prestándome su ayuda siempre que he tenido dificultades y preocupándose siempre de que dispusiera de todo lo necesario en el laboratorio.

Quiero agradecer a mi madre su confianza en mí, así como su apoyo incondicional durante toda la carrera.

Y, por último, a mi compañero de laboratorio Ramón Saura Soto por su ayuda.

A todos, gracias.

LISTADO DE FIGURAS

Ilustración 1. Nannochloropsis gaditana (3).	11
Ilustración 2. Diversidad de microalgas. Closterium spp. (A), Euastrum spp. (B), Pleodorina spp. (C), Scenedesmus acutus (D), Scenedesmus spp (E), Chlorella spp. (F), Selenastrum spp (G), Pyrobotrys spp. (H), Synura spp. (I), Cryptomonas spp. (J), Gonium spp. (K), Volvox spp. (L), Ceratium spp. (M), Chlamydomonas spp. (N), Micrasterias spp. (O), Surirella spp. (P), Phacus spp (Q) (2).....	13
Ilustración 3. Fotobiorreactores con microalgas (20).....	23
Ilustración 4. Estructuras químicas del EPA y DHA (25).	32
Ilustración 5. Biosíntesis EPA y DHA (13).	34
Ilustración 6. Formación de ácidos grasos poliinsaturados (19).	35
Ilustración 7. Síntesis de DES a partir de una sal de amonio cuaternario (28).	37
Ilustración 8. Síntesis de DES a partir de HBA y HBD (28).	38
Ilustración 9. Imagen representativa de la interacción entre un enlace de hidrógeno, grupo donante de HBD y anión haluro de un QAS (29).....	39
Ilustración 10. Biodegradabilidad de una IL, ocho disolventes eutécticos y la sal benzoato de sodio (28).	45
Ilustración 11. Cromatógrafo de Gases con detector FID.	50
Ilustración 12. Fases de la cromatografía de gases (32).	57
Ilustración 13. Esquema simplificado de un cromatógrafo de gases (34).	59
Ilustración 14. Representación gráfica de los picos para los patrones 2,4,6,8 y 10.	61
Ilustración 15. Representación gráfica de picos para patrones utilizados. Sección 1.62	
Ilustración 16. Representación gráfica de picos para patrones utilizados. Sección 2.63	
Ilustración 17. Representación gráfica de picos para patrones utilizados. Sección 3.63	
Ilustración 18. Patrón 10 analizado mediante detector FID.	64
Ilustración 19. Patrón 10 analizado mediante detector de masas.....	65
Ilustración 20. Rectas de calibrado para los compuestos: ácido docecanoico ME, ácido tetradecanoico ME y ácido cis-9-hexadecenoico ME.	66
Ilustración 21. Rectas de calibrado para los compuestos: ácido oleico ME, ácido esteárico ME y ácido heptadecanoico ME.	67
Ilustración 22. Rectas de calibrado para los compuestos: ácido cis-10-heptadecenoico ME, ácido tetracosanoico ME y ácido 9,12,15-octadecanoico ME.	67
Ilustración 23. Rectas de calibrado para los compuestos ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexenoico ME, ácido cis-9,12-octadecadienoico ME.	68
Ilustración 24. Rectas de calibrado para los compuestos ácido eicosanoico ME y metil gondoato.....	68
Ilustración 25. Recta de calibrado para el compuesto ácido hexadecanoico ME.....	69
Ilustración 26. Recta de calibrado para los compuestos EPA y ácido docosanoico ME.	69

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de algas.	12
Tabla 2. Clasificación de microalgas atendiendo a su modalidad de crecimiento (13).14	
Tabla 3. Compuestos biológicamente activos en extractos de algas (14).	15
Tabla 4. Propiedades de compuestos en extractos de algas (14).	16
Tabla 5. Contenido de aceite de microalgas (8).....	18
Tabla 6. Sustancias promotoras del crecimiento de diferentes microalgas (8).....	19
Tabla 7. Principales microalgas comercializadas para la nutrición humana (8).....	19
Tabla 8. Optimización en la producción de metabolitos seleccionados (12). LI: irradiación de luz; SR: velocidad de agitación; MM: modo metabólico.....	24
Tabla 9. Métodos de extracción actuales y sus ventajas frente a los métodos de extracción tradicionales.	30
Tabla 10. Clasificación de DES´s (29).	39
Tabla 11. Organismos utilizados en evaluaciones de toxicidad de DES (28).	44
Tabla 12. Solubilidad de los diferentes disolventes eutécticos a emplear en el ensayo.	54
Tabla 13. Composición química del estándar comercial empleado en la preparación de los patrones.	56
Tabla 14. Programa de temperatura utilizado en cromatograma de gases.	59
Tabla 15. Correspondencia de picos y compuestos lipídicos.....	62
Tabla 16. Rendimiento de extracción de lípidos para muestras BLA y ChLA.....	70
Tabla 17. Rendimiento de extracción de lípidos para muestras ChE y TOA.	71
Tabla 18. Rendimiento de extracción de lípidos para muestras TCA y MDA.	72
Tabla 19. Rendimiento de extracción de lípidos para muestra MOA.....	73
Tabla 20. Estudio de la selectividad de los disolventes eutécticos evaluados.....	74

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. OBJETIVOS	9
3. ANTECEDENTES.....	11
3.1. ALGAS	11
3.2. MICROALGAS.....	13
3.2.1. Productos obtenidos de las microalgas	14
3.2.2. Aplicaciones de las microalgas	17
3.2.3. Producción de microalgas	22
3.2.4. Ingeniería genética.....	24
3.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	26
3.3.1. Técnicas de extracción convencionales	26
3.3.2. Técnicas de extracción actuales	27
3.3.3. Extracción de lípidos esenciales / ácidos grasos de cadena larga	30
3.4. ÁCIDOS GRASOS.....	32
3.4.1. Utilidad.....	32
3.4.2. Biosíntesis de las tres familias de ácidos grasos poliinsaturados	33
3.4.3. Fuentes nutricionales de EPA y DHA.....	36
3.5. DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS	36
3.5.1. Clasificación.....	38
3.5.2. Síntesis de DES.....	40
3.5.3. Propiedades fisicoquímicas.....	40
3.5.4. Evaluación ambiental de la liberación de DES	43
3.5.5. Aplicaciones.....	45
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
4.1. MATERIALES.....	49
4.1.1. Muestras de microalga.....	49
4.1.2. Reactivos químicos	49
4.2. DESCRIPCIÓN DE INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPOS	50
4.2.1. Equipos e instrumentación empleada en los ensayos	50
4.2.2. Equipos de análisis	50
4.3. ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE MUESTRAS DE <i>NANNOCHLOROPSIS GADITANA</i>	51
4.3.1. Extracción de lípidos totales mediante una modificación del método de “Bligh and Dyer”	51

4.3.2.	Extracción de lípidos totales con disolventes eutécticos.....	53
4.3.3.	Extracción de lípidos totales mediante transesterificación simultánea usando disoluciones metanol - HCl.....	54
4.3.4.	Preparación de muestras para cromatografía de gases	55
4.3.5.	Preparación de los patrones de calibración.....	56
4.4.	TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	56
4.4.1.	Componentes básicos de un cromatógrafo de gases.....	58
5.	RESULTADOS	61
5.1.	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ALTURA DE PICOS.....	61
5.2.	IDENTIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE PATRONES.....	64
5.3.	RECTAS DE CALIBRADO.....	66
5.4.	RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN	70
6.	CONCLUSIONES	77
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	79

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Las MICROALGAS son microorganismos fotosintéticos altamente eficientes en la fijación de dióxido de carbono y utilización de la energía solar para producir biomasa, produciendo también oxígeno como consecuencia del proceso de fotosíntesis. Debido a sus especiales características, las microalgas se sitúan en una posición preferente con respecto a otras plantas acuáticas a la hora de ser cultivadas. Así, la necesidad de altas cantidades de nitrógeno y fósforo para su crecimiento permite que puedan ser cultivadas en aguas ricas en estos componentes (aguas residuales). Con ello, se consigue no rivalizar con la agricultura en cuanto al uso del suelo y del agua.

Su aclimatación a diferentes medios le confiere al contenido de las mismas una alta riqueza en diferentes compuestos, que posteriormente serán utilizados en la industria, así como en la obtención de carotenoides y otros pigmentos fotoprotectores (antioxidantes), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) y polisacáridos sulfatados (antivirales).

Los ácidos grasos poliinsaturados también denominados PUFA's (Poly Unsaturated Fatty Acids) son ácidos grasos caracterizados por poseer más de un doble enlace entre sus carbonos.

Los carotenoides, se usan cada vez más en alimentación como sustitutos de los pigmentos artificiales y tienen propiedades antioxidantes, previniendo contra el cáncer, el envejecimiento, la arterioesclerosis y enfermedades coronarias, mientras que los PUFA's se usan como compuestos nutracéuticos, antimicrobianos y antiinflamatorios. Los métodos convencionales de extracción de PUFA's de microalgas requieren el uso de múltiples etapas de extracción con disolventes orgánicos que a menudo son caros y potencialmente perjudiciales para la salud, estando prácticamente prohibido su uso durante el procesamiento de aditivos alimentarios.

A pesar de que a escala industrial todavía no se ha conseguido llevar a cabo la extracción de compuestos bioactivos de alto valor añadido (ingredientes funcionales) a partir de la biomasa microalgal, las tecnologías más probadas a nivel de laboratorio son la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos y la extracción con dióxido de carbono supercrítico. La extracción líquido-líquido empleando disolventes orgánicos está fuertemente restringida al uso de una limitada variedad de estos, por lo que la investigación en el uso de nuevos disolventes neotéricos resulta imprescindible para superar las actuales limitaciones que se presentan.

Para ello, en este proyecto se va a investigar el uso de unos nuevos disolventes llamados líquidos eutécticos profundos (DES's), con el objeto de evaluar su idoneidad para la extracción de los PUFA's presentes en la biomasa microalgal. Los DES's son una nueva generación de disolventes formados debido a las

interacciones intermoleculares de tipo puente de hidrógeno que se originan al mezclar un donador de hidrógeno con un aceptor de hidrógeno, dando lugar a una fase líquida a temperatura ambiente. Estos disolventes, presentan la ventaja, de modificar sus propiedades físicoquímicas mediante una selección adecuada de los aceptores y donadores de hidrógeno y de la relación molar de los mismos para adaptarlos a la aplicación buscada.

Las primeras investigaciones realizadas empleando DES's, se llevaron a cabo en el campo de la electroquímica con el objeto de extraer y purificar metales. En los últimos 5 años, el empleo de estos disolventes se ha extendido a otros campos como la síntesis orgánica, biocatálisis y bioingeniería. En esta última área, los DES's, están adquiriendo gran relevancia como medios de extracción de compuestos bioactivos. En la literatura científica existen evidencias de la extracción de compuestos bioactivos tales como ácido fenólico, flavonoides, terpenoides e isoflavonas empleando DES's; consiguiendo mayores rendimientos de extracción en comparación con el uso de disolventes convencionales.

Las características más atractivas de los DES's como agentes de extracción de compuestos bioactivos son su habilidad para aceptar y donar protones y electrones, lo cual facilita la formación de puentes de hidrógeno entre el disolvente y el compuesto a extraer, y la posibilidad de ajustar su polaridad, lo cual los convierte en disolventes ideales para la extracción de diversos grupos de compuestos bioactivos.

Objetivos

2.OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto consiste en analizar y cuantificar el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) de una muestra de microalgas liofilizadas del género *Nannochloropsis gaditana*, así como la realización de ensayos previos de extracción sólido-líquido utilizando disolventes eutécticos (DES's) con el objeto de evaluar la capacidad extractora y selectiva de los PUFA's presentes en la muestra de microalgas.

Para alcanzar este objetivo global se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de la masa microalgal.
- Desarrollo de un método cromatográfico para el análisis de lípidos (PUFA's).
- Síntesis y ensayos de extracción empleando DES's.
- Análisis de los resultados obtenidos.

De acuerdo con estos objetivos específicos, el trabajo se va a articular en los siguientes capítulos:

En el capítulo 3 se plantea una descripción de algas y microalgas incluyéndose los métodos de extracción de compuestos bioactivos, haciendo hincapié en las técnicas de extracción actuales y convencionales de lípidos y llevando a cabo una revisión exhaustiva de los ácidos grasos, así como de los disolventes eutécticos profundos.

En el capítulo 4 se recogen los materiales y métodos utilizados. En el capítulo 5 se muestran los resultados del estudio. En el capítulo 6 se presentan las principales conclusiones extraídas de los capítulos anteriores. Por último, en el capítulo 7 se indica la bibliografía utilizada para la elaboración de la presente memoria.

Antecedentes

3. ANTECEDENTES

3.1. ALGAS

Su distribución casi generalizada en todos los sistemas, así como su relevante papel ecológico las hace imprescindibles para el desarrollo de la vida en el planeta. Están encargadas de liberar el 60% del oxígeno que respiramos y constituyen la base de las cadenas tróficas que soportan alrededor del 70% de la biomasa mundial (1,2).

Este amplio grupo de organismos está formado por diferentes especies que constituyen el fitoplancton marino, así como el de agua dulce. Precisan para su desarrollo de la presencia de agua o de un medio húmedo, del cual obtienen los elementos necesarios (agua y sales minerales) que absorben a través de su superficie y que van a utilizar para realizar la fotosíntesis. Su diversidad biológica es enorme, tal y como se muestra en el resumen presentado en la Tabla 1.

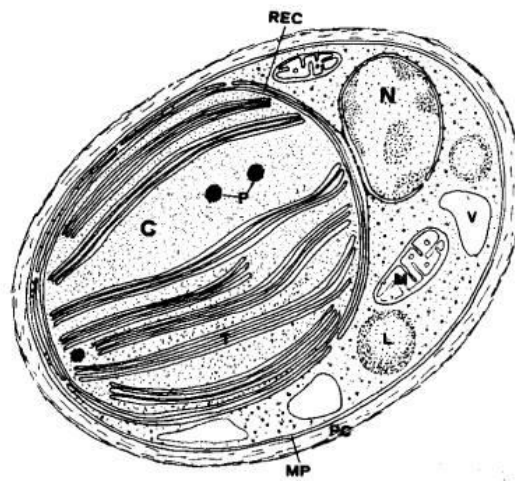


Ilustración 1. Nannochloropsis gaditana (3).

Algas	Cianobacterias	<i>Chroococcales</i>	Incluyen todas las especies unicelulares		
		<i>Oscillatoriales</i>	Se caracterizan por filamentos simples no ramificados		
		<i>Nostocales</i>	Todas las especies exhiben heterocistos		
		<i>Estigonematales</i>	Tienen filamentos ramificados con heterocistos		
	Algas eucariotas	Algas verdes	<i>Chlorophyta</i>	<i>Prasinophyceae</i>	
				<i>Tetraselmis</i>	
				<i>Pyramimonas</i>	
				<i>Micromonas</i>	
			<i>Conjugaphyta</i>	-	
		Algas rojas (<i>Rhodophyta</i>)	El color rojo se debe a la presencia de altas cantidades de ficoeritrina además de la ficocianina azul y clorofila a(4)		
		<i>Prymnesiophyta</i> (<i>Haptophyta</i>)	Grupo de algas unicelulares que consiste en aproximadamente 500 especies, en 50 géneros, con color amarillo verdoso a parduzco de los unicelos flagelados o cocoides		
		Algas Heterocont	<i>Chrysophyta</i>	<i>Chrysophyceae</i>	
				<i>Xanthophyceae</i>	
				<i>Bacillariophyceae</i>	
		<i>Cryptophyta</i>	La mayoría de las especies son unicelos móviles fotosintéticamente activos		
		<i>Dinoflagellata</i>	Grupo amplio con alrededor de 4.000 especies en 550 géneros		
Algas euglenidas	Presentan alto contenido en cloroplastos y gran capacidad de simbiosis con algas verdes				
Algas extremófilas	Toleran y necesitan condiciones ambientales extremas para su crecimiento				

Tabla 1. Clasificación de algas.

3.2. MICROALGAS

Las microalgas convierten la energía solar en energía química a través de la fotosíntesis (7,8). Estos organismos unicelulares forman parte del fitoplancton marino y se encuentran flotando tanto en aguas saladas como dulces, cerca de la superficie donde hay abundancia de luz solar. Además, sirven como indicadores de la calidad del agua (9).

Tienen una capacidad de crecimiento y de generación de biomasa mucho mayor que la de las plantas superiores, ya que no necesitan arraigar o generar estructuras reproductoras, lo que les permite multiplicarse en cuestión de horas. Son capaces de generar biomasa a partir de CO₂ y luz (consumen hasta 2 Kg de CO₂ por kg de biomasa producida), siendo imprescindibles en el mantenimiento de la vida en la Tierra, además de proporcionar compuestos orgánicos de alto valor nutricional y oxígeno para soportar al resto de la vida del planeta (9,10).

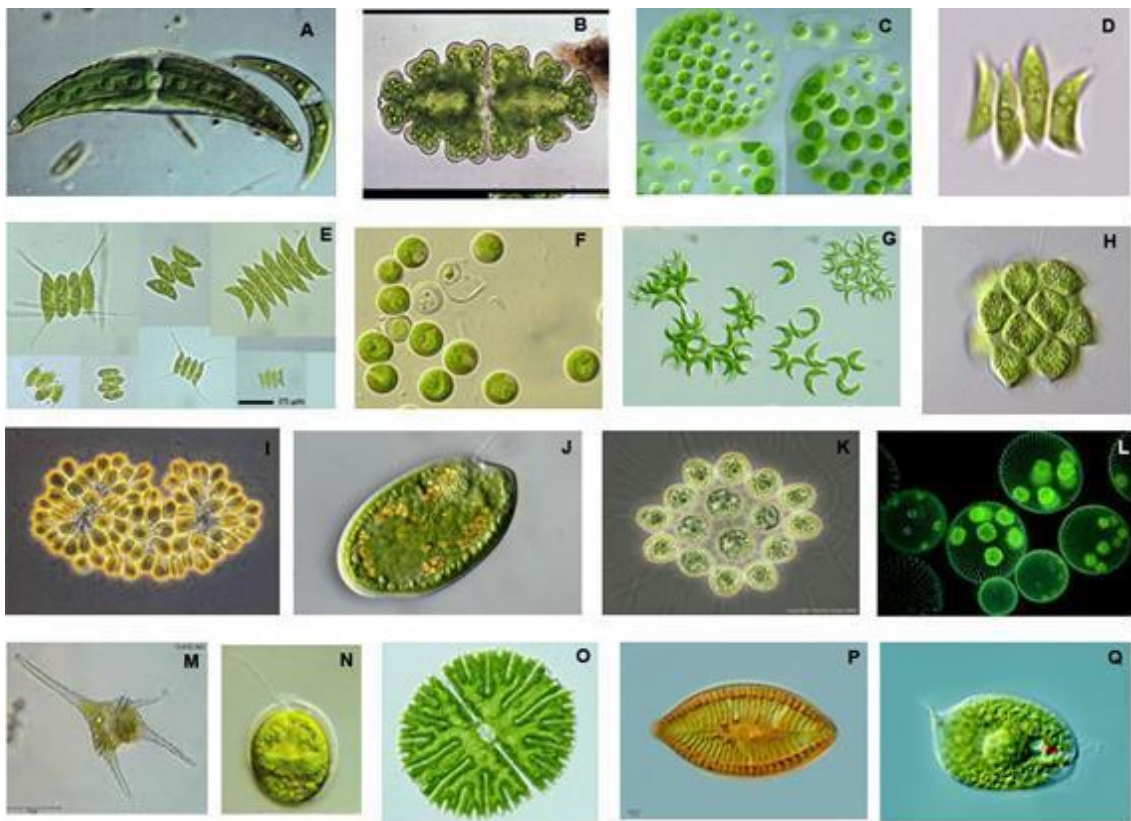


Ilustración 2. Diversidad de microalgas. *Closterium spp.* (A), *Euastrum spp.* (B), *Pleodorina spp.* (C), *Scenedesmus acutus* (D), *Scenedesmus spp.* (E), *Chlorella spp.* (F), *Selenastrum spp.* (G), *Pyrobotrys spp.* (H), *Synura spp.* (I), *Cryptomonas spp.* (J), *Gonium spp.* (K), *Volvox spp.* (L), *Ceratium spp.* (M), *Chlamydomonas spp.* (N), *Micrasterias spp.* (O), *Surirella spp.* (P), *Phacus spp.* (Q) (2).

El medio marino constituye dos tercios de nuestro planeta y abarca una parte considerable de su biodiversidad. Sin embargo, la biotecnología de microalgas solo comenzó a desarrollarse a mediados del siglo pasado (8). Actualmente la explotación biotecnológica de las microalgas constituye la base de múltiples actividades económicas; ofreciendo una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas (12).

Tipos de microalgas	
Fotoautótrofas	Obtienen la energía de la luz solar. Son fotosintéticas
Fotoheterótrofas	Obtienen energía de la luz solar y también de compuestos orgánicos
Mixotróficas	Pueden crecer en forma autótrofa o en forma heterótrofa
Heterótrofas	Requieren compuestos orgánicos para su nutrición, crecen en ausencia de luz

Tabla 2. Clasificación de microalgas atendiendo a su modalidad de crecimiento (13).

3.2.1. Productos obtenidos de las microalgas

Entre los distintos productos obtenidos de las microalgas encontramos: ácidos grasos poliinsaturados esenciales (omega 3 y omega 6), carbohidratos, minerales (como yodo, hierro y calcio), proteínas, lípidos, carotenoides y antioxantina (de gran importancia como antioxidantes y beneficiosos para la vista, la piel y la salud celular) (9). Es importante el contenido que presentan en vitaminas, destacando entre ellas la vitamina B12, además de otros metabolitos que se utilizan como aditivos para alimentos y piensos, cosméticos y la producción de energía.

Compuestos biológicamente activos en extractos de algas	Polisacáridos	Alga marrón (<i>Phaeophyta</i>)	Alginato			
			Celulosa			
			Fucoidan			
			Laminarina			
		Alga roja (<i>Rhodophyta</i>)	Agar			
			Carragenina			
			Celulosa			
			Furcellaran			
			Mannan			
			Porphyra			
		Alga verde (<i>Chlorophyta</i>)	Xilano			
			Amilosa, amilopectina			
			Celulosa			
			Inulina			
			Mannan			
	Pectina					
	Pigmentos	Ficobilinas	Ficocianina	Cianobacteria		
			Ficoeritrina	Alga roja		
		Carotenoides	Caroteno	α - caroteno		
				β - caroteno		
				Licopeno		
			Xantofila	Astaxantina		
				Fucoxantina		
				Zeaxantina		
		Clorofilas	Luteína			
			Clorofila a			
			Clorofila b			
			Clorofila c			
		Compuestos con actividad antioxidante	Glutati3n		-	
			Vitaminas		Vitamina C y E	
			Carotenoides		α - caroteno y β - caroteno	
	Polifenoles		Fucoxantina y astaxantina			
	Aminoácidos tipo micosporina		Fucol, ácido fen3lico, flavonoles, isoflavonas, etc			
	Sustancias / hormonas promotoras del crecimiento vegetal	Plantas hormonales (Fitohormonas)	Micosporina-glicina			
			Citoquininas			
			Auxinas			
			Giberelinas			
			Ácido abscísico			
		Betaínas		Etileno		
		Poliaminas		-		
		Esteroles	Fucosterol			
			Colesterol			
Ergosterol						
24 - metilcolesterol						
Otros compuestos	Vitaminas		B ₁₂ , K, C, E, A, D			
	Minerales		K, Ca, Mg, Na, Zn, Cu, Co, I, B			
	Péptidos y proteínas		-			
	Lípidos	Ácidos grasos	Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)	Ácido γ - linolenico		
				Ácido araquid3nico		
		Ácido eicosapentanoico (EPA)				
		Ácido Docohexanoico (DHA)				
	Diterpenos	Esteroles				
		Dolabellanes				
		Hidroazulenoides				
Xenicanes						
Sesquiterpenoides extendidos						

Tabla 3. Compuestos biológicamente activos en extractos de algas (14).

Las propiedades de los compuestos biológicamente activos en extractos de algas se presentan a continuación (14). Todo ello es recogido en la Tabla 4.

Propiedades de compuestos en extractos de algas		
Extractos de algas	Antibacteriano	Proteínas
		Polifenoles
		Polisacáridos
		Pigmentos: clorofila y carotenoides
		PUFA's
	Antifúngico	PUFA's
		Pigmentos: clorofila y carotenoides
		Terpenos
		Fenoles
	Antioxidante	Proteínas
		Aminoácidos tipo microspirina
		Glutación
		Polifenoles
		Polisacáridos
		PUFA's
		Carotenoides
		Tocoferol
	Ascorbato	
	Antiinflamatorio	Proteínas
		Carotenoides
		Polisacáridos
		Esteroles – Fucosterol
		Polifenoles - Florotanninos
		Derivados de porfina: Feoforbida a y fenitina a
	Antitumoral	Polifenoles
		Carotenoides
		Polisacáridos
	Antivírico	Proteínas
Diterpenos		
Polifenoles		
Polisacáridos		
Carotenoides		

Tabla 4. Propiedades de compuestos en extractos de algas (14).

La composición media de proteínas, carbohidratos y lípidos de biomasa de microalgas expresada en base a materia seca es de:

- Valor medio de proteínas: 45,68.
- Valor medio de carbohidratos: 26,2.
- Valor medio de lípidos: 13,07.

3.2.2. Aplicaciones de las microalgas

La aportación de las microalgas en el desarrollo sostenible de la economía puede traducirse en la posibilidad de su uso como generadoras de energía limpia, así como de biocombustibles de segunda generación. Sus aplicaciones abarcan distintos campos; desde la farmacología, acuicultura, alimentación y agricultura hasta aplicaciones industriales entre las que cabe destacar su uso como fuente de energía, disminución del contenido de nitrógeno y fósforo en aguas residuales y fijación del CO₂ (9,15).

3.2.2.1. Usos energéticos

En los últimos años, las microalgas, además de ser utilizadas como proteínas unicelulares, se proyectan como fábricas de células vivas para la producción de biocombustibles ya que son fotoautótrofas con requisitos nutricionales mínimos (8,11).

La necesidad de buscar nuevas fuentes alternativas de energía debido al elevado precio del petróleo, a la necesidad de independencia energética y a factores medioambientales, ha fomentado el cultivo de algas para propósitos energéticos, enfocados a la obtención de biodiésel mediante transesterificación; reemplazos de diesel y gasolina ecológica mediante conversión hidrotérmica catalítica directa y mejora catalítica; producción de bioaceite y biochar por conversión termoquímica, y obtención de otros biocombustibles como bioetanol, biohidrógeno y biometano (8,11).

Para la utilización de microalgas en la producción de biodiesel, el factor más importante a tener en cuenta es la producción de lípidos, la cual, depende a su vez de la obtención de biomasa de microalgas así como de la cantidad de lípidos contenidos en la misma (15).

Microalga	Contenido de aceite (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis suecia</i>	15-23

Tabla 5. Contenido de aceite de microalgas (8).

Conseguir un elevado contenido de lípidos, en el interior de las células, es difícil de lograr ya que el déficit de nutrientes (azufre, fósforo y sobre todo nitrógeno) y unas elevadas intensidades luminosas dificultan la aparición de condiciones de estrés fisiológico, lo cual, conlleva a una menor producción de microalgas (15).

La extracción de los lípidos intracelulares se puede realizar con ruptura celular previa o sin ella, extrayendo los lípidos con disolventes químicos convencionales, o con métodos alternativos como la “Extracción Acuosa”, que conlleva una reducción de costes, seguridad y consecución tanto de lípidos como de fracciones ricas en proteína (15).

3.2.2.2. Biofertilizantes y promotores del crecimiento vegetal

La fijación del nitrógeno constituye uno de los efectos beneficiosos de las microalgas en su uso como biofertilizante (4).

En el crecimiento de la planta, la función de los reguladores difiere de los fertilizantes, ya que los primeros alteran la división celular, el alargamiento de raíces y brotes, el inicio de la floración y otros metabolismos funcionales, mientras que los fertilizantes suministran los nutrientes necesarios para obtener un normal crecimiento de la planta (14).

En la Tabla 6 se listan algunas de las sustancias promotoras del crecimiento vegetal encontradas en las microalgas.

Ejemplos de cianobacteria	Sustancias promotoras del crecimiento
<i>Cylindrospermum sp.</i>	Vitamina B12 (Venkataraman y Neelakantan, 1967)
<i>Tolypothrix tenuis</i>	Vitamina B12 (Okuda y Yamaguchi, 1960)
<i>Nostoc muscorum, Hapalosiphon fontinalis</i>	Vitamina B12 (Mista y Kaushik, 1989)
<i>Nostoc, Hapalosiphon</i>	Auxina como ácido indol-3-acético, ácido indol-3-propiónico o 3-metil indol (Mista y Kaushik, 1989)

Tabla 6. Sustancias promotoras del crecimiento de diferentes microalgas (8).

3.2.2.3. Consumo humano

En la Tabla 7, se pueden observar las principales especies de microalgas destinadas a consumo humano, así como los principales productos obtenidos.

Microalga	Productos	Producción mundial (t / año)
<i>Spirulina (Arthrospira)</i>	Polvos, bebidas, tabletas, patatas fritas, pasta y extracto líquido	3000
<i>Chlorella</i>	Tabletas, polvos, néctar	2000
<i>Dunaliella Salina</i>	Polvos β -caroteno	1200
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Cápsulas, cristales polvos	500

Tabla 7. Principales microalgas comercializadas para la nutrición humana (8).

3.2.2.4. Pigmentos

Las algas contienen una concentración promedio de entre 0,1% y 2% de carotenoides. De los diferentes tipos de carotenoides, sólo se utilizan comercialmente el β -caroteno y la astaxantina, como colorantes y suplementos de alimentación humana y animal. El β -caroteno se usa como colorante y aditivo alimentario, para mejorar la salud y la fertilidad del grano de ganado vacuno (8,17).

3.2.2.5. Antioxidantes

El funcionamiento clásico de los antioxidantes como conservantes de alimentos se ha ampliado al uso terapéutico, destacando en la prevención y control de ciertos tumores (12).

En general, las microalgas son ricas en carotenoides. Éstos son potentes antioxidantes biológicos, algunos de los cuales han sido reconocidos por exhibir un fuerte capacidad antioxidante, capaces de absorber la energía de la excitación de los radicales libres de oxígeno (ROS) en su compleja cadena anillada (12).

3.2.2.6. Proteínas

Las proteínas de las algas poseen un alto potencial bioactivo y propiedades funcionales muy interesantes para la salud humana. Un grupo atractivo son las ficobiliproteínas, derivadas de algas, que se caracterizan por tener actividad hepatoprotectora, antiinflamatoria y antioxidante. Sekar y Chandramohan (2008) describieron propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, antitumorales, y protectoras del hígado de las ficobiliproteínas (14).

3.2.2.7. Enzimas

Las microalgas presentan ventajas en comparación con otras células microbianas, ya que se aprovecha su gran potencial en cuanto a producción de enzimas para su uso en aplicaciones industriales. No obstante, las microalgas se encuentran en desventaja por necesitar un mayor tiempo de cultivo en comparación con bacterias, levaduras, etc. (11).

3.2.2.8. Ácidos grasos poliinsaturados

Las microalgas constituyen una fuente importante de ácidos grasos poliinsaturados que son esenciales para el desarrollo humano. Las principales fuentes de ácidos grasos poliinsaturados (Polyunsaturated fatty acids, PUFA's) en la actualidad son el pescado y sus aceites. Sin embargo, su olor y su sabor limitan su uso como aditivos alimentarios. Estas limitaciones se han superado empleando los PUFA's de las microalgas como aditivos a leches infantiles y a pollos para producir huevos enriquecidos con omega-3 (15).

El ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) son los ácidos grasos poliinsaturados más destacables y junto a ellos podemos incluir el

ácido graso omega-6 (Ácido γ -linolénico y ácido araquidónico). El desarrollo del sistema nervioso, así como las habilidades visuales en los primeros meses de vida se ven fortalecidos con el empleo del DHA como suplemento de dietas y de fórmulas infantiles. El EPA es importante para disminuir el exceso de lípidos en sangre (ácido graso hipolipemiante). Además, disminuye el riesgo de formar una placa de ateroma, disminuye la agregación plaquetaria y aumenta la vasodilatación reduciendo la presión arterial (15).

3.2.2.9. Alimentación animal

Un inconveniente de las microalgas en su uso como alimento animal es su elevado contenido en celulosa, lo cual, dificulta su digestión en los animales impidiendo que puedan reemplazar a las proteínas procedentes de pescado o soja. El consumo excesivo de microalgas podría ocasionar en determinados animales (pollos) una modificación del color de la piel y de los huevos. (15).

3.2.2.10. Uso farmacéutico

Varias algas unicelulares (por ejemplo, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas pyrenoidosa*) poseen actividad antibacteriana in vitro contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas. También se ha informado que se obtiene una amplia gama de actividades antifúngicas activas in vitro a partir de extractos de algas verdes, diatomeas y dinoflagelados (8).

3.2.2.11. Uso sanitario

De entre los compuestos químicos producidos por microalgas y cianobacterias en relación con su uso en el ámbito sanitario podemos encontrar:

- Esteroles: presentan propiedades hipocolesterolémicas (fitosteroles).
- Pigmentos: utilizados como marcadores fluorescentes (ficobilina y ficocianina pueden ser utilizadas en ensayos de inmunidad).
- Compuestos antimicrobianos: la actuación en múltiples objetivos celulares del EPA se encuentra aún en desarrollo.
- Compuestos antivirales: los exopolisacáridos sulfatados de microalgas marinas interfieren en la Etapa I del crecimiento viral (adsorción e invasión de células) de algunos virus envueltos.
- Compuestos antitumorales: existe una evidencia bien establecida que confirma que los carotenoides microalgales poseen quimiopreventivos

potentes contra las características de cáncer. La astaxantina ceto-carotenoide roja producida por microalgas destaca por su sobresaliente actividad antitumoral (12).

3.2.2.12. Cosmética

Algunas microalgas producen metabolitos que pueden ser utilizados para la producción de productos cosméticos como son los protectores solares, los cuales, incorporan micosporina para la protección ante la radiación ultravioleta. Entre estas microalgas cabe destacar: *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella salina* (8).

3.2.3. Producción de microalgas

La biotecnología de microalgas es un área de investigación relativamente nueva que ofrece un aumento exponencial en los últimos años paralelamente a la aparición rápida de instalaciones y productos a base de microalgas.

La producción de microalgas incluye tanto microalgas eucariotas como cianobacterias procariotas. A pesar de ser microorganismos diferentes, las bases de su producción, el tipo de producto y sus aplicaciones son similares. Las microalgas más cultivadas son *Chlamydomonas*, *Chlorella* y *Spirulina*. (18).

3.2.3.1. Sistemas de cultivo de microalgas

3.2.3.1.1. Sistema de cultivo fotoautotrófico

Dentro de este sistema de cultivo de biomasa microalgal distinguimos tres alternativas utilizando fotobiorreactores: a) sistema de estanque abierto; b) fotobiorreactor cerrado con luz solar natural y c) fotobiorreactor cerrado con iluminación artificial (19).

En estanque abierto las condiciones de cultivo son similares al entorno natural y en él tiene lugar un cultivo masivo de microalgas. Los fotobiorreactores cerrados son similares a los fotobiorreactores convencionales, pero se diferencian en que necesitan luz y dióxido de carbono (19).

3.2.3.1.2. Sistema de cultivo heterotrófico

La producción heterotrófica requiere un organismo que pueda crecer en medios económicos y esterilizables, adaptarse rápidamente a nuevos entornos y soportar tensiones hidrodinámicas en el fermentador y ambientes periféricos. Además, puede ser una alternativa al cultivo fotoautotrófico.

3.2.3.2. Producción en fotobiorreactores

La mayoría de la producción industrial actual de microalgas ocurre en exteriores abiertos o estanques donde las condiciones de procesamiento están lejos de ser óptimas. De hecho, es difícil controlar la temperatura, la distribución de luz, la concentración de CO₂ en el mismo y prevenir la contaminación microbiana que reduciría la tasa de rendimiento y la calidad del producto o productos finales (12).

La próxima generación de biorreactores de microalgas para la fabricación de productos de valor añadido recurrirán a biorreactores cerrados en los que los rendimientos del producto serán optimizados por la manipulación informada de las condiciones de cultivo seleccionadas para cada especie de microalgas de acuerdo con sus características fisiológicas y de crecimiento (12).



Ilustración 3. Fotobiorreactores con microalgas (20).

3.2.4. Ingeniería genética

En los últimos años, ha habido un interés creciente en la ingeniería genética de microalgas, como una herramienta potencial para la producción económicamente factible de materiales a granel y para mejorar la productividad de compuestos con alto valor añadido. La falta de promotores adecuados y otras secuencias reguladoras son, además de la baja eficiencia y la inestabilidad de la expresión de transgenes, las principales dificultades para prevenir la transformación nuclear de nuevas cepas de microalgas (16).

3.2.4.1. Optimización de la síntesis de metabolitos

Según el modo y la composición nutricional del medio de cultivo, las microalgas poseen diferentes productividades y presentan diferentes composiciones bioquímicas (12).

Característica	Compuesto activo	Fuente microalgal	Medio de cultivo	Condiciones de proceso	Configuración de reactor	Productividad
(a) Condiciones óptimas para la producción de metabolitos seleccionados sin características antioxidantes por microalgas						
Antitumoral, antiinflamatorio	Astaxantina	<i>Chlorella zofingiensis</i>	Glucosa suplementada de Bristol 50 g L ⁻¹ ; C/N = 180	T: 30 °C pH: 6.5 LI: ausencia de luz SR: 130 rpm; MM: heterotrópico	Batch (250 mL)	Astaxantina: 10.3 mg L ⁻¹
(b) Condiciones óptimas para la producción de metabolitos seleccionados con características antioxidantes por microalgas						
Antioxidante	β-caroteno	<i>Dunaliella salina</i>	Medio descrito por Shaish et. al (1992)	T: 25°C pH: 7.5 ± 0.5 LI: 281 ± 89 μmol photon m ⁻² s ⁻¹ FR: 38 cm ⁻¹ s ⁻¹ R: 0.7 g MJ ⁻¹	Tubular cerrado semicontinuo al aire libre (55 L)	Biomasa: 2 gm ⁻² d ⁻¹ Carotenoides totales: 102.5 ± 33.1 mg m ⁻² d ⁻¹ (β-caroteno: 10% de biomasa)

Tabla 8. Optimización en la producción de metabolitos seleccionados (12). LI: irradiación de luz; SR: velocidad de agitación; MM: modo metabólico.

Podemos observar en la Tabla 8 cómo distintos factores del proceso, tales como la temperatura, el pH y la presencia o ausencia de luz, van a jugar un papel importante en la obtención de un tipo de metabolitos u otros.

3.2.4.2. Recuperación de metabolitos

La concentración relativamente baja de biomasa obtenida (1–5 g / L), debido al límite de penetración de la luz, junto con el pequeño tamaño de celda (2–20 µm en diámetro), hace que la cosecha sea un proceso costoso; el cual va a depender en gran medida de los productos deseados y de las especificaciones del mercado. La recuperación de los metabolitos de microalgas generalmente implica la trituración mecánica para liberar el contenido celular, seguido de la extracción de los compuestos de interés (12).

3.2.4.3. Economía de los procesos basados en microalgas

El principal problema subyacente en la producción de compuestos de alto valor añadido a partir de microalgas es cómo producirlos a través de procesos que sean lo suficientemente económicos como para atraer el interés del mercado. La mayoría de estos compuestos pueden ser sintetizados a través de rutas químicas, utilizando bibliotecas de microalgas únicamente para fines de identificación, pero la fabricación de estos productos está limitada por la no disponibilidad de los procesos de producción, por lo que ha sido invertido un gran esfuerzo en el diseño y operación de nuevas configuraciones de fotobiorreactor.

Existen varios problemas en la producción de microalgas a gran escala en la actualidad:

- Se requiere una gran cantidad de biomasa.
- Los procesos de separación y purificación son elevados.

Parece que el futuro de las microalgas se limitará a la obtención de productos químicos complejos que no pueden ser fácilmente sintetizados a través de procesos químicos. La competitividad de los bioprocesos basados en microalgas exigirá nuevas cepas mejoradas con un crecimiento más rápido y mayor rendimiento del compuesto, a través de la selección clásica o manipulación genética dirigida (12).

3.2.4.4. Principales inconvenientes en el desarrollo de la microalga en el mercado

Los principales inconvenientes que limitan la expansión de la biotecnología de microalgas son los altos costes de producción y la pequeña escala de los sistemas de producción. En consecuencia, menos de 20.000 t de biomasa son producidas en todo el mundo, a un coste superior a 5 € / kg. Dicho coste limita

las aplicaciones de las microalgas a productos de alto valor en el mercado como los alimentos para humanos y algunas especialidades de acuicultura. A consecuencia de las bajas capacidades de producción, la industria alimentaria no considera que esta biomasa esté disponible de manera realista para su inclusión en procesos de producción de alimentos a gran escala (18).

3.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Una de las técnicas futuras más prometedoras para la extracción de compuestos bioactivos es la extracción con fluidos supercríticos (SFE) debido a las ventajas que ofrece y a su eficiencia económica. Entre estas ventajas, destacan el uso mínimo o nulo de disolventes orgánicos, facilitando la extracción de los compuestos sin pérdida de su actividad, una tasa de extracción rápida y alto rendimiento. El extracto obtenido está completamente libre de metales pesados y sales inorgánicas ya que no son extraíbles por este método incluso si están presentes en la materia prima. Los compuestos biológicamente activos presentes en supercríticos están libres de disolventes de extracción; por lo tanto, no se gasta energía para la eliminación del disolvente. La mayor parte del CO₂ utilizado como disolvente se recicla, disminuyendo así el consumo por masa extraída (14).

Debido a las numerosas ventajas citadas anteriormente de las nuevas técnicas de extracción, se incrementa cada vez más el reemplazo de los métodos tradicionales por estos últimos. Muchos autores incluso demuestran la superioridad de nuevas tecnologías verdes (p. ej., mayor rendimiento) sobre la extracción con disolventes orgánicos, los cuales implican la descarga de sustancias potencialmente peligrosas para el medio ambiente y también pueden dañar las propiedades funcionales de los extractos por estrés hidrotérmico (14).

3.3.1. Técnicas de extracción convencionales

3.3.1.1. Extracción con disolventes

Algunos de los disolventes más ampliamente utilizados en los procedimientos de extracción son hexano, éter, cloroformo, acetonitrilo, benceno y etanol mezclados en diferentes proporciones con agua. Estos disolventes pueden emplearse tanto para la extracción de compuestos polares como no polares,

tales como, alcaloides, pesticidas organoclorados, fenoles, hidrocarburos aromáticos, ácidos grasos y aceites, entre otros. Sin embargo, su uso se encuentra muy restringido en la industria alimentaria debido a su toxicidad y peligrosidad para el medioambiente (21).

Por tanto, resulta necesario el desarrollo de tecnologías sostenibles que consideren la minimización del uso de disolventes tóxicos, disminuyan la generación de residuos y reduzcan el consumo energético. Entre las diversas técnicas que cumplen con estos requisitos, las más adecuadas para la extracción de compuestos bioactivos de microalgas son: extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción con líquidos presurizados (PLE), extracción asistida por ultrasonidos (EAU), extracción asistida por microondas (MAE) y campo eléctrico de pulso (PEF) (22).

3.3.2. Técnicas de extracción actuales

3.3.2.1. Extracción de fluido subcrítico

Consiste en el uso de agua a alta temperatura y una presión por debajo de las condiciones supercríticas (SWE). Esta técnica se ha convertido en una herramienta útil para reemplazar los métodos de extracción tradicionales ya que presenta una serie de ventajas importantes como son cortos tiempos de tratamiento, altos rendimientos de extracción, y reducción en el uso de disolventes. Por lo tanto, esta novedosa técnica de extracción está ganando una creciente atención debido a las ventajas que ofrece en comparación a otros enfoques de extracción tradicionales (21).

Las técnicas SWE se llevan a cabo utilizando agua caliente (de 100 a 374 °C, siendo esta última la temperatura crítica del agua) y a alta presión (generalmente de 10 a 60 bar) para mantener el agua en estado líquido. Los parámetros del disolvente, como la constante dieléctrica y la solubilidad, se ven afectadas por la temperatura cuando el agua se mantiene en estado líquido. Por lo tanto, aunque el valor de la constante dieléctrica del agua a temperatura ambiente es casi de 80, este valor puede reducirse de hasta aproximadamente 30 a 250 °C. En estas condiciones se obtiene un valor similar al presentado por algunos disolventes orgánicos como etanol o metanol. Lo mismo ocurre con el parámetro de solubilidad, que disminuye, acercándose a valores parecidos a los de los compuestos menos polares. Por lo tanto, esta técnica se puede utilizar para la extracción de compuestos bioactivos naturales no polares y reemplazar a los disolventes orgánicos (21).

3.3.2.2. Extracción de fluido supercrítico

Características de esta técnica de extracción actual, tales como la utilización de un ambiente libre de oxígeno, temperaturas no muy elevadas y la posibilidad de extracción de lípidos de polaridad baja, evitan la extracción de impurezas (21). Esto permite que destaque por su alta selectividad, cortos tiempos de extracción y una mayor prevención de la contaminación.

El dióxido de carbono (CO₂) es el fluido supercrítico más empleado debido a su mínima alteración de los compuestos bioactivos, lo que permite preservar sus propiedades curativas o funcionales (21).

Para mejorar la solubilidad y la selectividad del proceso, se utilizan los llamados codisolventes o modificadores que actúan como potenciadores de solubilidad. Entre los codisolventes se incluyen el hexano, metanol, etanol, isopropanol, acetonitrilo, y diclorometano, entre otros. Sin embargo, se recomienda el etanol debido a su menor toxicidad y miscibilidad en CO₂, aunque sus aplicaciones son limitadas ya que presenta propiedades desfavorables con respecto a la seguridad y a las consideraciones ambientales (21).

3.3.2.3. Extracción de líquido a presión

La técnica de PLE es conocida como extracción acelerada o presurizada, donde se utilizan disolventes orgánicos a alta temperatura (50 a 200 °C) y presión (1450 a 2175 psi) para garantizar una velocidad de extracción rápida de compuestos. Al aumentar la temperatura, la constante dieléctrica del disolvente disminuye y, en consecuencia, disminuye su polaridad por lo que, la temperatura podría usarse para igualar la polaridad del disolvente a la de los compuestos a recuperar (21).

3.3.2.4. Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) se ha propuesto como alternativa a la extracción convencional, debido a su mayor rendimiento y menor consumo de disolvente (21). Su mayor eficiencia de extracción está relacionada con el fenómeno llamado cavitación acústica. Cuando la intensidad del ultrasonido es suficiente, el ciclo de expansión puede crear cavidades o microburbujas en el líquido. Una vez formadas, las burbujas absorberán la energía de las ondas de sonido, creciendo durante los ciclos de expansión y comprimiéndose durante el ciclo de compresión, liberando ondas de choque de condiciones extremas de presión y temperatura (varios cientos de atmósferas y alrededor de 5000 K de temperatura). Por lo tanto, la implosión de burbujas de cavitación puede golpear la superficie de la matriz sólida y desintegrar las células causando la liberación

de los compuestos deseados. Hoy en día, esta técnica se utiliza ampliamente para la extracción de moléculas valiosas. Por ejemplo, se ha utilizado para la extracción de proteínas, azúcares, complejos de polisacáridos-proteínas y, aceites. La EAU debe ser cuidadosamente utilizada en la extracción de compuestos inestables, como carotenoides, ya que se ha observado una degradación importante en comparación con otras tecnologías (21).

3.3.2.5. Extracción asistida por microondas

La técnica MAE se ha aplicado principalmente para la recuperación de compuestos bioactivos naturales con capacidad antioxidante como los compuestos fenólicos y carotenoides. Otros compuestos como terpenoides, alcaloides, y las saponinas también se han recuperado utilizando esta técnica. La mayoría de estos estudios concluyeron que el uso de MAE permitió reducir el consumo de disolvente y el tiempo de extracción con un rendimiento de extracción equivalente o superior al de otros métodos (21).

La extracción de los compuestos activos naturales puede verse afectada por una gran variedad de factores, siendo el disolvente el más crítico. Los tres principales parámetros físicos para seleccionar el disolvente apropiado son: i) solubilidad, ii) constante dieléctrica, y iii) factores de disipación (21).

3.3.2.6. Campo eléctrico de pulso

La técnica de extracción PEF se considera una alternativa interesante para compuestos bioactivos ya que tiene un tiempo de extracción corto (generalmente inferior a 1 s), funciona a bajas temperaturas, tiene pérdidas de energía mínimas y permite la descomposición exitosa de las paredes celulares (22).

Asimismo, debido al ahorro significativo de energía, sumado a una considerable reducción de los costes de operación, ambas características significativas de esta técnica hacen de esta una prometedora opción con un alto potencial en lo que se refiere a la obtención de bioproductos basados en microalgas (22).

Métodos de extracción actuales
El uso de PLE permite alcanzar el grado alimenticio de extractos obtenidos solo con agua o con otros, generalmente reconocidos como disolventes seguros, como el etanol
La técnica de PLE permite establecer la correlación entre las actividades funcionales y los compuestos encontrados
La técnica PLE presenta mayor o iguales eficiencias de extracción de carotenoides de <i>Haematococcus pluvialis</i> y <i>Dunaliella salina</i> en comparación con la extracción tradicional con disolvente
La técnica MAE, frente a técnicas tradicionales, se identifica como el mejor proceso de extracción de pigmentos debido a la elevada velocidad, reproducibilidad, calentamiento homogéneo y alto rendimiento de extracción.
Las técnicas SFE, MAE y PLE son tecnologías verdes emergentes que tienen el potencial de reemplazar la extracción tradicional con disolventes orgánicos (22).

Tabla 9. Métodos de extracción actuales y sus ventajas frente a los métodos de extracción tradicionales.

3.3.3. Extracción de lípidos esenciales / ácidos grasos de cadena larga

Los lípidos tienen diferentes tipos de interacciones, las cuales deben de romperse para poder extraerlos de la célula vegetal. Los disolventes orgánicos polares (como, por ejemplo, los alcoholes) tienden a romper los puentes de hidrógeno entre los lípidos polares. Si hay presentes fuerzas iónicas fuertes dentro de la mezcla disolvente-microalga, pueden romperse al hacer el medio más alcalino. Por tanto, el hecho de escoger un tipo de disolvente u otro dependerá de la especie de microalga (23).

En este sentido, para ambas tareas de disrupción y extracción celular, el uso del disolvente apropiado es necesario para recuperar eficientemente los ácidos grasos de la biomasa. Además, el disolvente debe ser económico, no tóxico, volátil y altamente selectivo a los componentes lipídicos de la célula. Para este propósito, cloroformo, metanol, n-hexano y propanol, son algunos de los disolventes que se evalúan en la extracción de lípidos (22).

El proceso de extracción de lípidos debe, no solo ser específico, sino a su vez selectivo hacia las fracciones de lípidos deseadas. Los métodos de extracción *Soxhlet* y el método *Bligh & Dyer* son los comúnmente usados en la extracción de lípidos a partir de biomasa de microalgas (23).

3.3.3.1. Método de Soxhlet

En éste se utiliza hexano, aunque se pueden utilizar otros disolventes como éter etílico. Sin embargo, el hexano es aquel que presenta buenos resultados además de tener un bajo coste. El hexano es menos tóxico que otros disolventes como el cloroformo y tiene baja afinidad por los contaminantes no lipídicos, así como una alta selectividad por fracciones de lípidos neutros (23).

3.3.3.2. Método de Bligh & Dyer

En este caso se utiliza una mezcla de cloroformo-metanol y la eficiencia conseguida a partir de este método es mucho mayor con respecto al anterior. Presenta, por tanto, buenos resultados. Sin embargo, la desventaja de esta técnica es el uso de cloroformo ya que resulta dañino para el medio ambiente y, además, para altos contenidos de lípidos (mayor al 2%), el método requiere de algunas variaciones como un cambio en la composición de la mezcla del disolvente o el tiempo de extracción (23).

Los resultados de extracción encontrados para este método son, de hecho, mejores que los obtenidos por otras técnicas como extracciones simples con diferentes disolventes orgánicos, no solo en términos de eficiencia de extracción, sino también porque el uso de fluidos supercríticos permite una disminución significativa en el tiempo de extracción (22).

3.3.3.3. Extracción de lípidos mediante transesterificación in situ

La transesterificación in situ se refiere a la transesterificación directa de lípidos en una matriz de biomasa sin extracción previa de lípidos y ofrece la ventaja de cuantificar todos los ácidos grasos como ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES), independientemente de la eficiencia de extracción de lípidos (24).

Este proceso está ganando reconocimiento como un procedimiento de medición de lípidos para algas. Además, la falta de descripción detallada de la metodología utilizada dificulta la adopción de este método. La transesterificación de lípidos se puede llevar a cabo utilizando ambos catalizadores, ácidos y básicos, o una combinación de ambos (24).

3.4. ÁCIDOS GRASOS

A lo largo de la historia los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA's) se han obtenido a partir de microalgas. La aparición de distintos tipos de ácidos grasos poliinsaturados, entre los que destacan omega 3 y omega 6, viene determinada por el número de carbonos de la cadena y la posición que ocupe el primer doble enlace en relación con el carbono que incorpora el grupo metilo (-CH₃), que es el último carbono de la cadena.

3.4.1. Utilidad

Los efectos beneficiosos de los ácidos omega-3 han sido ampliamente reconocidos, tanto a nivel preventivo, en el control de enfermedades cardiovasculares, así como en la disminución de posibles complicaciones de carácter inflamatorio en determinados casos de cirugía. Son múltiples sus niveles de actuación, entre los cuales podemos destacar los siguientes:

- Retraso en la aparición de placas de ateroma en las arterias por acumulación de lípidos.
- Reducción de la presión arterial.
- Menor probabilidad de muerte súbita en cardiópatas.
- Disminución de la aparición de infartos cardíacos.

La FDA (*Food and Drug Administration*) declara que es seguro tomar hasta 3 g de omega-3 por día para reducir el riesgo de enfermedad coronaria cardíaca (CHD) y mantener la salud (25).

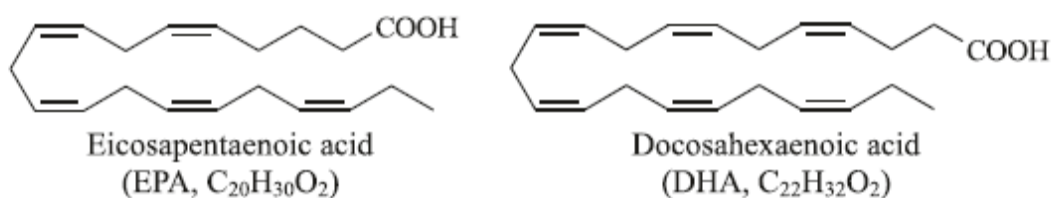


Ilustración 4. Estructuras químicas del EPA y DHA (25).

El ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) son los dos componentes bioactivos responsables de los beneficios del aceite de pescado para la salud. Nuestro organismo no es capaz de sintetizarlos, por lo que han de ser obtenidos de fuentes externas. Por esta razón se denominan ácidos grasos esenciales. Además del pescado como fuente externa, estos también están disponibles comercialmente en distintas clases de microalgas, tales como *Bacillariophyceae* (diatomeas) *Chlorophyceae*, *Chrysophyceae*, *Cryptophyceae*, *Eustigmatophyceae* y *Prasinophyceae* (25,19).

3.4.2. Biosíntesis de las tres familias de ácidos grasos poliinsaturados

Dentro de los ácidos grasos derivados del ácido oleico, los ácidos omega 3 más importantes obtenidos a través de procedimientos de elongación y desaturación aerobias de su cadena, son por orden: el ácido alfa linolénico (9,12,15-C18:3, ALN), el ácido eicosapentaenoico (5,8,11,14,17-C20:5, EPA) y ácido docosahexaenoico (4,7,10,13,16,19-C22:6, DHA). La diferencia fundamental entre estos ácidos se encuentra en su fuente de obtención, ya que el ALN ha de obtenerse de fuentes vegetales, mientras que el EPA y DHA también se encuentran presentes en animales marinos.

La Ilustración 5 muestra la intervención de las enzimas elongasas y desaturasas en la síntesis de DHA y EPA a partir de aceites vegetales (13).

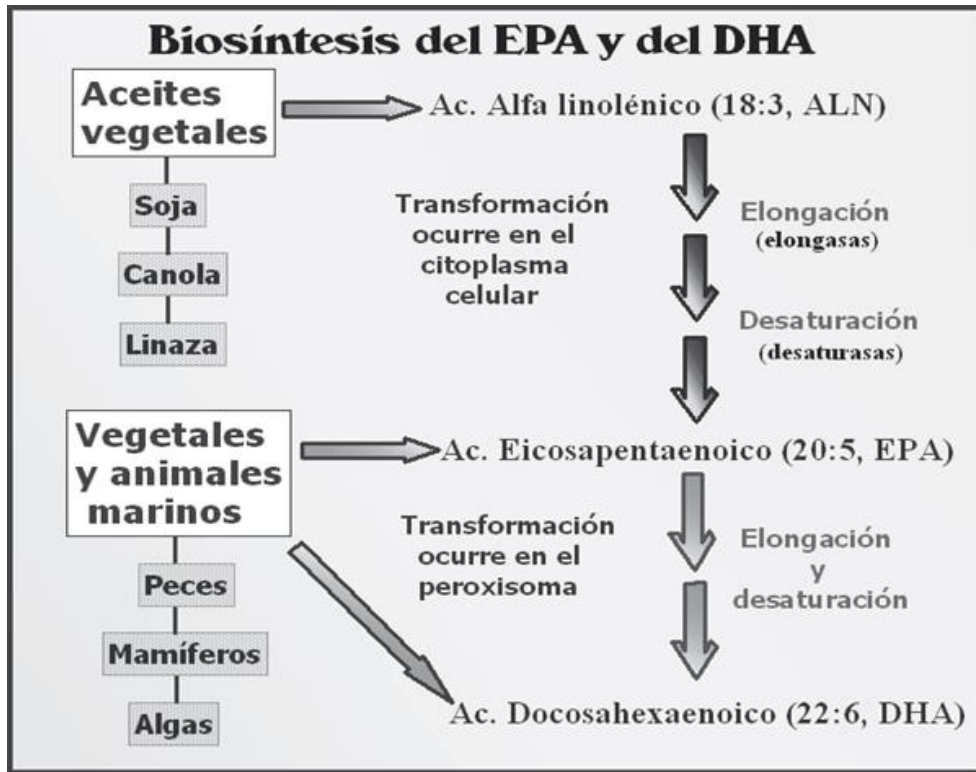


Ilustración 5. Biosíntesis EPA y DHA (13).

La biosíntesis de EPA ocurre en dos etapas. En la primera, se produce ácido oleico a partir de acetato, seguido de la conversión de ácido oleico a ácido linoleico y ácido α -linolénico. Después de varios pasos posteriores de desaturación y alargamiento, se forman PUFA's incluyendo EPA.

La biosíntesis comienza con la carboxilación de acetilo, Co-A, para formar acetato o piruvato por la acción del enzima glucolítico. A continuación, el acetyl Co-A se convierte en malonil Co-A, que se utiliza para derivar una reacción de condensación y extender el grupo acetilo al ácido esteárico y desaturar a ácido oleico. Todo ello es mostrado en la ilustración 6.

El EPA realiza muchas funciones vitales en la membrana biológica y sirve como precursor de una variedad de reguladores de lípidos en el metabolismo celular (19).

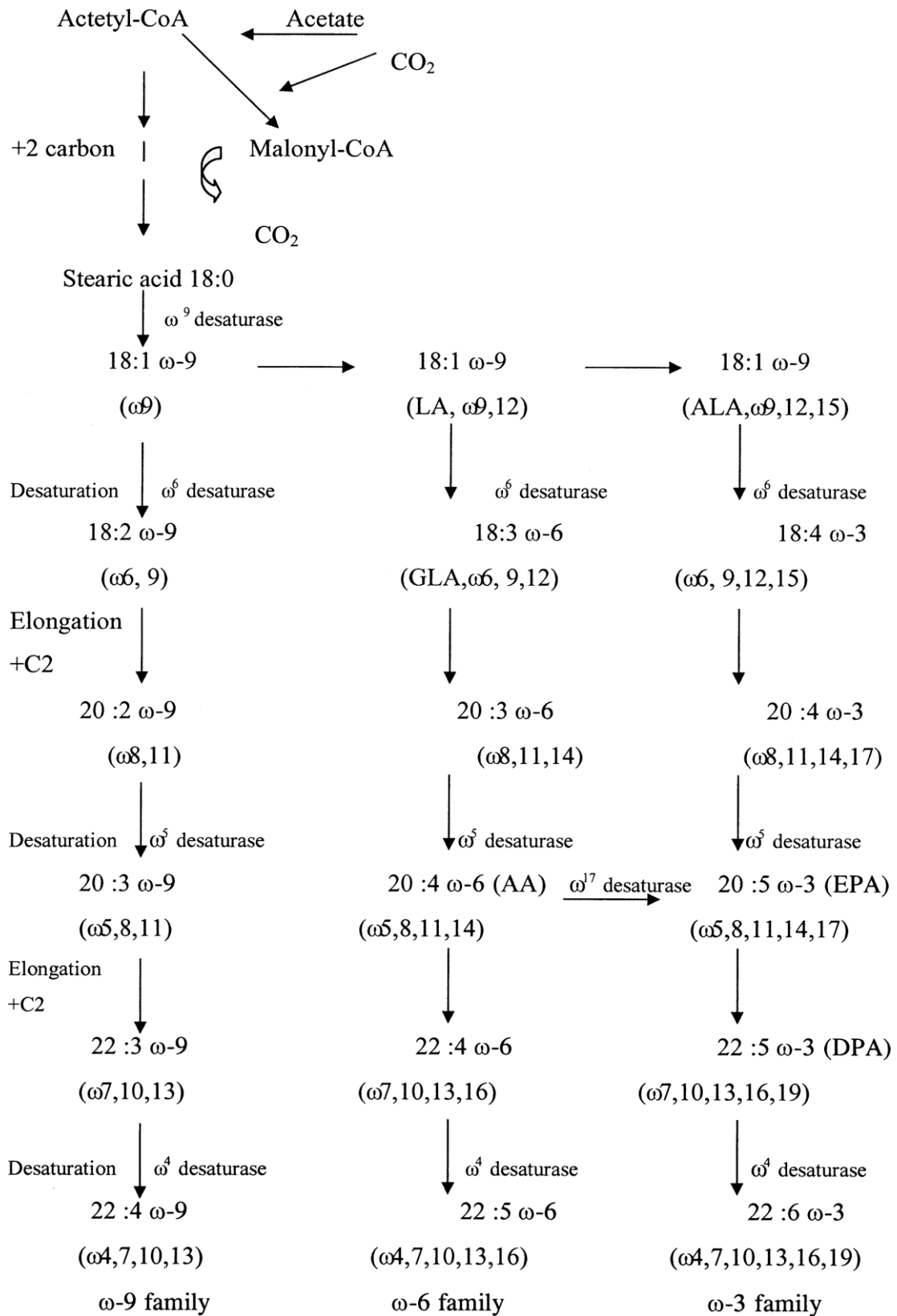


Ilustración 6. Formación de ácidos grasos poliinsaturados (19).

3.4.3. Fuentes nutricionales de EPA y DHA

Debido a su elevado contenido en EPA y DHA (de aproximadamente un 30%), los aceites de origen marino y los productos obtenidos de diversas industrias, como la acuicultura del salmón, constituyen las principales fuentes de ácidos grasos de cadena larga omega 3 para la nutrición tanto humana como animal en forma de aceite y de harinas de pescado. El inconveniente de estos productos es su olor desagradable (13).

Esta característica tan negativa ha ejercido una fuerte presión para que la industria alimentaria ponga en marcha su maquinaria para encontrar alternativas que permitan sustituir estos productos, dirigiendo su mirada hacia el mundo de las microalgas como fuente importante para la obtención sobre todo de DHA, de forma eficiente, limpia y renovable (13).

3.5. DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS

En los últimos 20 años, los líquidos iónicos a temperatura ambiente han atraído una considerable atención especialmente en los campos de catálisis, electroquímica, química de materiales y más recientemente para el pretratamiento de la biomasa. En las primeras etapas de estos estudios de investigación, los científicos se centraron en la formación de líquidos iónicos mediante la mezcla de sales metálicas, principalmente zinc, aluminio, estaño y cloruros de hierro, con sales de amonio cuaternario. A pesar de que ambas sales tienen puntos de fusión muy altos, su mezcla adecuada conduce a la formación de una fase líquida, la llamada mezcla eutéctica. Estas mezclas eutécticas se caracterizan generalmente por una depresión muy grande del punto de fusión, generalmente mayor de 150 °C (26).

Para superar el alto precio de los ILs, una nueva generación de disolventes, llamados disolventes eutécticos profundos (DES's), ha surgido a principios de este siglo (26). Los llamados DES's pueden tener un carácter iónico, y se obtienen por la formación de un complejo entre un aceptor de hidrógeno y un donante de enlace de hidrógeno. La deslocalización de la carga que se produce es responsable de la disminución del punto de fusión de la mezcla en relación con los puntos de fusión de las materias primas (27).

En combinación con donantes de enlaces de hidrógeno como la urea, ácidos carboxílicos renovables (por ejemplo, oxálico, cítrico, succínico o ácidos aminos) o polioles renovables (por ejemplo, glicerol, carbohidratos), el cloruro de colina, ChCl, es capaz de formar rápidamente un DES. Aunque la mayoría de los DES's utilizan ChCl como especie iónica, los DES's no pueden considerarse como ILs

porque (1) no están completamente compuestos de especies iónicas y (2) también se pueden obtener de especies no iónicas (26).

En comparación con los ILs tradicionales, los DES's derivados de ChCl reúnen muchas ventajas como (1) bajo precio, (2) fácil síntesis, ya que se obtienen mezclando dos componentes, por lo tanto, se evitan así todos los problemas de purificación y eliminación de residuos que generalmente se encuentran con los ILs, (3) la mayoría de ellos son biodegradables y biocompatibles y presentan propiedades fisicoquímicas (densidad, viscosidad, índice de refracción, conductividad, tensión superficial, inercia química, etc.) muy similares a los ILs comunes (26).

Los enlaces de hidrógeno entre el HBD y el anión haluro son considerados los más representativos en los disolventes eutécticos, como se observa en la Ilustración 7 (28).

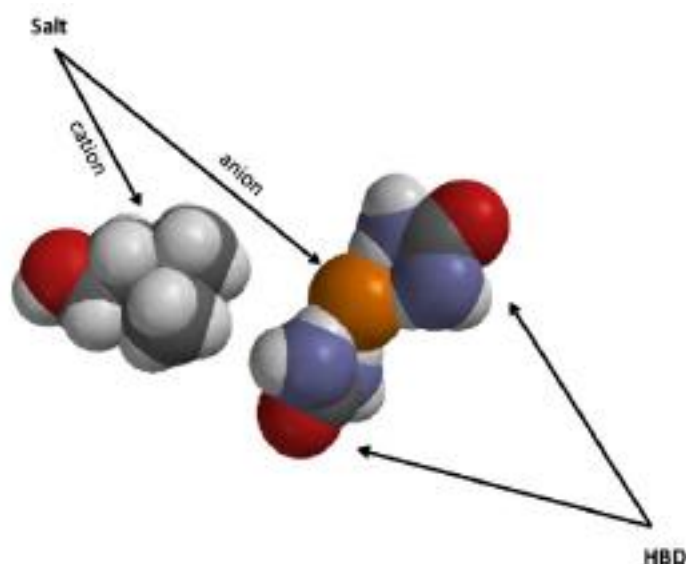


Ilustración 7. Síntesis de DES a partir de una sal de amonio cuaternario (28).

La vasta red de enlaces de hidrógeno es responsable de las características intrínsecas de los DES's. La Ilustración 8 muestra los componentes comunes de los DES.

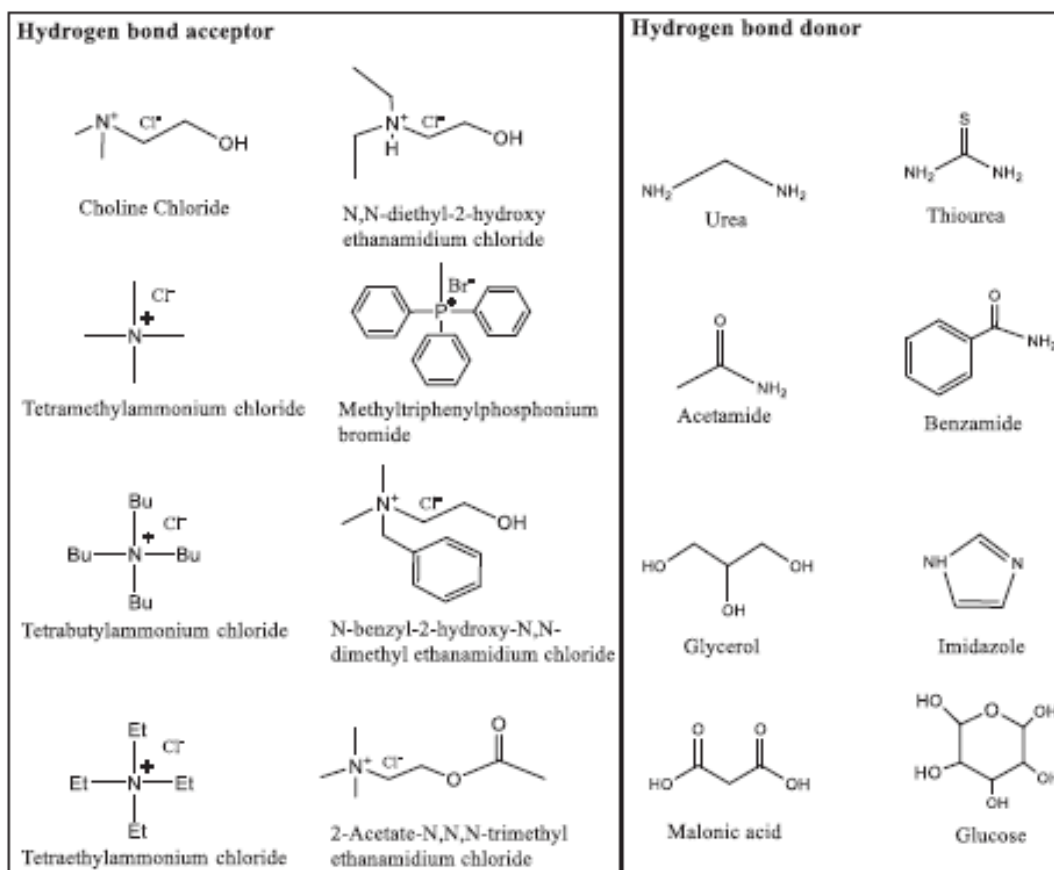


Ilustración 8. Síntesis de DES a partir de HBA y HBD (28).

Actualmente, se promueven nuevos DES's basados en la combinación de HBAs y HBDs de origen renovable y llamados disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) (28). Su descubrimiento ocurrió en un intento de exponer y comprender la solubilidad de los compuestos intracelulares, los cuales, presentan una polaridad intermedia, siendo insolubles tanto en agua como en fase lipídica (28).

3.5.1. Clasificación

Los DES's se clasifican en cuatro categorías dependiendo de la naturaleza del agente complejante utilizado. Los DES's Tipo I están compuestos de una sal de amonio cuaternario (QAS) y cloruro de metal; los de tipo II están compuestos de QAS e hidrato de cloruro de metal; los de tipo III está compuesto por QAS y un donador de enlace de hidrógeno (HBD) y los de tipo IV están compuestos de cloruro de metal y HBD, como se muestra en la Tabla 10 (29). Smith y col. (2014) describieron los DES mediante la siguiente fórmula: $Cat^+ - X^- zY$; en el que Cat

+ representa los cationes de varios sulfonios, fosfonios, o sales de amonio, X⁻ es el anión haluro de la sal, Y es un ácido Lewis o de Brönsted, y z es el número de moléculas de Y (28).

Tipos	Fórmula general	Términos	Ejemplo
Tipo I	Cat ⁺ X ⁻ + zMCL _x	M = Zn, In, Sn, Al, Fe	ChCl + ZnCl ₂
Tipo II	Cat ⁺ X ⁻ + zMCl _x ·yH ₂ O	M = Cr, Ni, Cu, Fe, Co	ChCl + CoCl ₂ ·6H ₂ O
Tipo III	Cat ⁺ X ⁻ + zRZ	Z = OH, COOH, CONH ₂	ChCl + Urea
Tipo IIV	MCl _x + zRZ	M = Zn, Al y Z = OH, CONH ₂	ZnCl ₂ + Urea

Tabla 10. Clasificación de DES's (29).

3.5.1.1. Disolventes eutécticos profundos tipo III.

Los DES's Tipo III son un tipo de disolventes iónicos que comprenden mezclas de sales de amonio cuaternario, fosfonio o sulfonio con donantes de enlaces de hidrógeno (HBD), tales como aminas, amidas, alcoholes y ácidos carboxílicos (29). El hidrogeno del grupo donante de enlaces interactúa con el anión de amonio cuaternario, fosfonio o sal de sulfonio aumentando su tamaño tal y como se muestra en la Ilustración 9. Esto, a su vez, disminuye la interacción con el catión y así disminuye el punto de fusión de la mezcla (29).

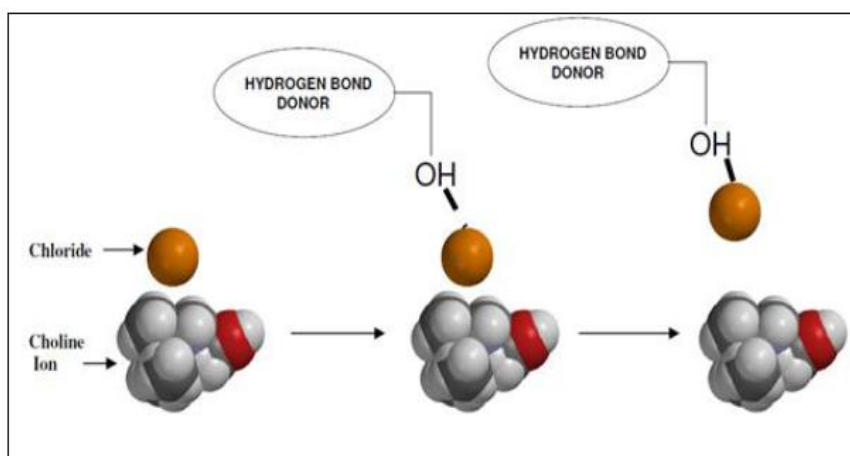
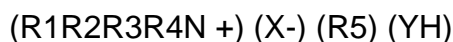


Ilustración 9. Imagen representativa de la interacción entre un enlace de hidrógeno, grupo donante de HBD y anión haluro de un QAS (29).

La fórmula general de DES (Ecuación 1) se puede describir mediante la siguiente expresión (29).



Ecuación 1. Fórmula general de DES.

Dónde,

$R_1R_2R_3R_4N^+$ = catión de amonio cuaternario, fosfonio o sulfonio,

X^- = anión haluro,

R_5 = grupo R presente en HBD

YH = grupo donante de enlaces de hidrógeno.

3.5.2. Síntesis de DES

La preparación de DES's requiere mezclar sus componentes con un calentamiento suave o disolver los componentes en un disolvente adecuado y luego evaporar el disolvente. La pureza de los materiales de partida determina la pureza de los DES's sintetizados y no se requieren más pasos de purificación. La eliminación de los pasos posteriores de purificación, hace que el coste de estos disolventes sea similar al de los disolventes moleculares y alrededor del 20% de los ILs comparables (29).

3.5.3. Propiedades fisicoquímicas

La evaluación de los DES's como disolventes de nueva generación para reemplazar a los disolventes moleculares e ILs para diversas aplicaciones requiere conocimientos sobre su estado físico, propiedades químicas y térmicas (29).

3.5.3.1. Presión de vapor y volatilidad

La escasez de la literatura sobre equilibrios vapor-líquido de los DES's muestra la necesidad de estudios sistemáticos de esta propiedad en función de los tipos de sal y HBD a diferentes temperaturas (30).

3.5.3.2. Densidad

La densidad es la propiedad termofísica más estudiada para los DES's. La mayoría de los DES's tienen densidades en el rango de 1.0–1.35 g / cm a 298,15 K, aunque los DES's que contienen sales metálicas como $ZnCl_2$ tienen densidades en el rango de 1.3–1.6 g/cm (30).

Algunos investigadores informaron de que el método de preparación de DES (calentamiento de la mezcla o molienda) tiene un efecto sobre las propiedades termofísicas de estos, y aunque este efecto es mayor para la viscosidad que para la densidad, los efectos estéricos (la relación molar de la sal / HBD), la fuerza y extensión de iones-HBD determina el comportamiento de la densidad para el DES analizado (30).

3.5.3.3. Viscosidad

La mayoría de los DES's exhiben viscosidades relativamente altas (> 100 cP) a temperatura ambiente. Esta propiedad generalmente suele tener su origen fundamentalmente en los puentes de hidrógeno que existen entre sus componentes, lo que da lugar a una menor movilidad de especies libres dentro del DES. En general, las viscosidades de las mezclas eutécticas se ven afectadas principalmente por la naturaleza química de los componentes (tipo de sales de amonio y HBD, relación molar de la sal / HBD, etc.), la temperatura y el contenido de agua (26).

Otras fuerzas que intervienen en la alta viscosidad son las fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas. Se ha comprobado que la viscosidad de los DES's basados en ChCl dependen estrechamente de la naturaleza del HBD. (26).

3.5.3.4. Conductividad iónica

Debido a sus viscosidades relativamente altas, la mayoría de los DES's exhiben conductividades iónicas bajas. Las conductividades de los DES's en general aumentan significativamente a medida que aumenta la temperatura debido a una disminución de la viscosidad. Teniendo en cuenta que la relación HBD / HBA impacta significativamente sobre las viscosidades de los DES's, está claro que este parámetro también influye significativamente en sus conductividades (26).

3.5.3.5. Propiedades interfaciales

La tensión superficial depende en gran medida de la resistencia de fuerzas intermoleculares entre los HBD y la correspondiente sal y, por lo tanto, los DES's son fluidos con alta tensión superficial. La tensión superficial de los DES's es notablemente alta para la mayoría de los sistemas estudiados y representa una medida de la intensidad de los enlaces de hidrógeno. La presencia de los grupos hidroxilo en el catión conducen a una mayor tensión superficial debido a su mayor capacidad para formar enlaces de hidrógeno (30).

3.5.3.6. Polaridad

La polaridad del disolvente es un término comúnmente utilizado en el contexto de la capacidad de un disolvente para solvatar especies cargadas o neutras (dipolares o apolares). Los disolventes se dividen en tres categorías principales: disolventes no polares (por ejemplo, hidrocarburos), disolventes próticos polares (por ejemplo, agua y alcoholes) y disolventes apróticos polares (por ejemplo, acetona y dimetilsulfóxido), según su comportamiento como medio (29).

3.5.3.7. Acidez o alcalinidad

La función Hammett se ha utilizado ampliamente para evaluar la acidez y basicidad de determinados disolventes no acuosos (26). Para un indicador ácido débil, la función de Hammett H_{-} se define por la Ecuación 2.

$$H_{-} = pK (HI) + \log ([I] / [HI])$$

Ecuación 2. Función de Hammett.

Donde $pK(HI)$ es la constante de ionización termodinámica del indicador en agua, e $[I^-]$ y $[HI]$ representan las concentraciones molares de formas aniónicas y neutras del indicador, respectivamente (26).

Debido a la débil alcalinidad de la mezcla eutéctica ChCl-urea, este DES es capaz de absorber una pequeña cantidad de gas como el CO_2 . En presencia de 1 atm de CO_2 , el valor H_+ de ChCl / urea disminuye de 10.86 a 6.25. Después de burbujear N_2 , se recupera el valor H_+ inicial, lo que sugiere que la acidez o basicidad de este DES se puede cambiar de forma reversible burbujear CO_2 y N_2 a través de la solución alternativamente. La naturaleza química de los HBD tiene un fuerte efecto sobre la fuerza ácida o básica de los DES correspondientes. Cuando se usan polioles derivados del azúcar como HBD en combinación con ChCl, el DES obtenido siempre exhibe un pH neutro (26).

3.5.4. Evaluación ambiental de la liberación de DES

Las propiedades “verdes” de los disolventes eutécticos profundos se basan en su no volatilidad y en la posible bondad de sus constituyentes principales (28).

3.5.4.1. Citotoxicidad y fitotoxicidad de DES

Algunos investigadores han sugerido que la deslocalización de carga que ocurre durante la formación de los DES es responsable de que tengan mayor toxicidad que sus componentes individuales (28). A pesar de que todavía no se ha demostrado de manera concluyente que esto ocurra con los DES, los estudios que usan ILs a base de colinio han llegado a la misma conclusión.

Típicamente, las mezclas de DES en concentraciones mínimas son inofensivas, pero las fluctuaciones en sus concentraciones o en sus proporciones molares alteran su toxicidad significativamente (28). El proceso de detección del HBD debe realizarse con mucho cuidado con el objetivo de seleccionar candidatos relativamente seguros (por ejemplo, biomateriales renovables).

DES	In vitro	Bacteria	<i>Vibrio fischeri</i>
			<i>Escherichia coli</i>
			<i>Staphylococcus aureus</i>
			<i>Salmonella enteritidis</i>
			<i>Aspergillus niger</i>
			<i>Listeria monocytogenes</i>
			<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
			<i>Propionibacterium</i>
		Virus	<i>Herpes Simplex</i>
		Células de pescado	CCO
		Células humanas	MCF-7
			PC3
			A375
			OKF6
			HepG2
			HT29
			H413
		Fungi	<i>Aspergillus niger</i>
			<i>Candida albicans</i>
	<i>Candida cylindracea</i>		
	<i>Lentinus triginus</i>		
	<i>Panerochaete chrysosporium</i>		
	Plantas	<i>Triticum aestivum</i>	
<i>Allium sativum</i>			
In vivo	Animales	<i>Mice</i>	
	Organismos marinos	<i>Hydra sinensis</i>	
		<i>Cyprinus carpio</i>	

Tabla 11. Organismos utilizados en evaluaciones de toxicidad de DES (28).

3.5.4.1.1. Biodegradabilidad de los DES

El perfil de toxicidad de los DES's tiene ramificaciones a tener en cuenta en sus numerosas aplicaciones biológicas; por lo tanto, se necesita una evaluación rigurosa de esta característica. No obstante, la capacidad de ajuste de los DES's podría ser su mayor activo. Esta característica permite alterar la estructura y las

propiedades de los HBA y HBD, que parecen ser de vital importancia en los perfiles de toxicidad de los DES's. La gran variedad de diferentes HBA y HBD fomentan que puedan existir alternativas viables para los problemas de toxicidad (28).

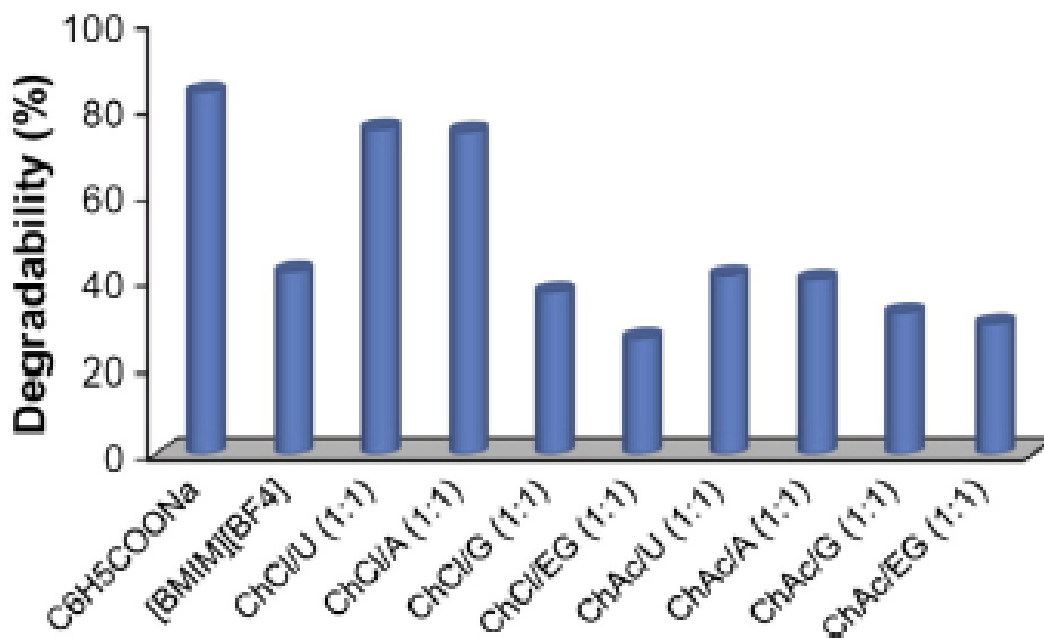


Ilustración 10. Biodegradabilidad de una IL, ocho disolventes eutécticos y la sal benzoato de sodio (28).

3.5.5. Aplicaciones

El enfoque en DES actualmente se limita a aplicaciones materiales, químicas y electroquímicas. (28).

3.5.5.1. Perspectivas biológicas

Como alternativas a los líquidos iónicos, los disolventes eutécticos profundos se pueden aplicar a una gran variedad de procesos biológicos industriales, como extracciones y separaciones, o biocatálisis (28).

3.5.5.1.1. Aplicaciones biotecnológicas

3.5.5.1.1.1. *Extracción / purificación / separación de productos naturales*

Típicamente, el objetivo de extraer y recuperar productos naturales de los organismos vivos es recolectar metabolitos secundarios, los cuales desempeñan funciones críticas relacionadas con la defensa de la naturaleza y respuestas al estrés. Las técnicas utilizadas para extraerlos son características para cada tipo de organismo. Por ejemplo, la extracción de compuestos bioactivos naturales a partir de materiales vegetales requiere enfoques mecánicos, mientras que las biotransformaciones y la ingeniería genética se utilizan para extraer los compuestos bioactivos naturales de microorganismos (28).

La recuperación de compuestos bioactivos a partir de fitomateriales sólidos utilizando tanto las técnicas tradicionales como las técnicas modernas a menudo se ven influenciadas por varios problemas. Factor problemático común a la mayoría de estas técnicas tradicionales viene determinado por las características inherentes de los disolventes utilizados, tales como el requerimiento de grandes cantidades de los mismos para su uso, así como los complejos procesos de reciclaje que acarrearán. A su vez, estas técnicas adolecen de largos periodos de extracción y degradación térmica de los compuestos bioactivos naturales.

3.5.5.1.2. Biotransformaciones en solventes eutécticos profundos

3.5.5.1.2.1. *DES basados en biocatálisis*

Las biotransformaciones utilizan las estructuras enzimáticas de los microorganismos para producir metabolitos específicos. Para un rendimiento óptimo, la biocatálisis requiere disolventes y/o codisolventes adecuados. Los DES's aumentaron las eficiencias enzimáticas al mejorar la enantioselectividad y regioselectividad de las enzimas (28).

En general, existe una superioridad de los DES's sobre los disolventes tradicionales, en términos de rendimientos de reacción, pureza de los productos, disponibilidad de reactivos, tiempo de reacción, enantioselectividad y regioselectividad del catalizador, el reciclaje del catalizador y el disolvente, y la estabilidad y actividad del biocatalizador (28).

Mientras que la mayoría de las enzimas requieren ambientes acuosos para ser catalíticamente activos, el exceso de agua a menudo conduce a una hidrólisis competitiva y no deseada de reacciones secundarias que ocurren entre grupos enzimáticos y moléculas polares. Estas reacciones secundarias pueden provocar la degradación del sustrato y producto y/o la desnaturalización del catalizador (28).

Aunque las enzimas raramente funcionan bien en cantidades excesivas de agua, la adición de pequeñas cantidades de agua a los DES's aumenta tanto su actividad como su estabilidad. Por lo tanto, es importante que el contenido de agua de los DES's se mantenga a niveles mínimos. Dai y col. (2015) informaron que las concentraciones ideales de agua en DES no deben ser > 50% (v / v). La razón es que, bajo altas concentraciones de agua, algunos HBD forman hidrógeno adicional que se une con moléculas de H₂O, que a menudo conducen a la desintegración de los DES's. La limitada solubilidad de las enzimas en disolventes acuosos y DES, se pueden mejorar moliendo la enzima para facilitar su dispersión en los DES's (28).

Materiales y métodos

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Muestras de microalga

Muestra de microalgas liofilizadas del género *Nannochloropsis gaditana*.

4.1.2. Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados en la fase experimental atendiendo al procedimiento usado de extracción de lípidos totales son los siguientes:

a) Extracción de lípidos totales

- Disolución cloroformo-metanol 2:1 (v/v).
- Disolución de HCl 0,1 M.
- Disolución de cloruro de magnesio al 0,5% (m/v).
- Disolución metanol – HCl al 5%.
- Hexano 99%.

b) Extracción de lípidos con disolventes eutécticos

- Betaine Hydro. Ethylene Glycol. Viscoso a temperatura ambiente.
- Choline Chloride - Lactic Acid. Viscoso a temperatura ambiente.
- Betaine - Lactic Acid. Viscoso a temperatura ambiente.
- Choline Chloride - Ethylene Glycol. Viscoso a temperatura ambiente.
- Thymol - Octanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.
- Thymol - Hexanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.
- Thymol - Camphor. Líquido a temperatura ambiente.
- Menthol - Decanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.
- Menthol - Octanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.
- Menthol. Hexanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.

4.2. DESCRIPCIÓN DE INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPOS

4.2.1. Equipos e instrumentación empleada en los ensayos

- Tubos de ensayo de vidrio.
- Pipetas Pasteur.
- Baño de ultrasonidos.
- Centrifugadora.
- Baño termostático.
- Matraz Erlenmeyer.
- Agitadores magnéticos.
- Campana de gases.
- Estufa.
- Balanza de precisión.
- Bomba peristáltica / eléctrica de laboratorio.
- Micropipetas de 2-20 y 10-100 μL .
- Cronómetro digital.
- Termómetro.

4.2.2. Equipos de análisis

- Cromatógrafo de Gases con detector FID. Para separar, identificar y cuantificar los componentes presentes en las muestras líquidas.



Ilustración 11. Cromatógrafo de Gases con detector FID.

4.3. ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES DE MUESTRAS DE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA*

Para llevar a cabo la extracción de lípidos de muestras de microalgas se efectuaron los siguientes procedimientos:

- a) Extracción de lípidos totales mediante una modificación del método de “Bligh and Dyer”.
- b) Extracción y transesterificación simultánea usando disoluciones metanol - HCl.

4.3.1. Extracción de lípidos totales mediante una modificación del método de “Bligh and Dyer”

4.3.1.1. Preparación de disoluciones

Se han preparado las siguientes disoluciones para realizar la extracción:

- Disolución cloroformo-metanol 2:1 (v/v). Pudiéndose almacenar en el frigorífico hasta 3 meses desde su preparación.
- Disolución de HCl 0,1M. Empleada para la desnaturalización de proteínas presente en la muestra de microalgas.
- Disolución de cloruro de magnesio al 0,5% (m/v). Esta disolución puede ser conservada a temperatura ambiente hasta 2 meses después de su preparación.
- Disolución metanol - HCl al 5%.

4.3.1.2. Procedimiento

Se pesan 100 mg de la microalga a estudiar en un tubo de ensayo de vidrio, al que añadiremos 3 ml de la disolución cloroformo-metanol preparada previamente. La muestra se coloca en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos; pasados los cuales, se procederá al centrifugado de la misma. Esta centrifugación se realizará durante un periodo de tiempo de 25 minutos y a 3500 rpm.

Haciendo uso de una pipeta Pasteur, se recoge la fase líquida, transfiriendo la misma a otro tubo, procurando no arrastrar durante esta actividad el residuo de microalgas (fase sólida) depositado en el fondo del tubo.

A este residuo de microalgas que ha quedado separado de la fase líquida, se le añade 1ml de disolución cloroformo – metanol, agitándolo durante unos minutos. Recogemos el disolvente (fase líquida) con una pipeta Pasteur, con cuidado de no arrastrar el residuo de microalgas nuevamente. Repetiremos esta operación de adición de disolvente y recogida de fase líquida hasta que el disolvente adquiera una coloración clara, siendo suficiente con 5 extracciones.

Si por error se hubiese depositado algún resto de residuo en el tubo en el que se ha recogido la fase líquida, bastaría con centrifugarlo durante 30 minutos a 3500 rpm.

4.3.1.3. Separación de proteínas

Al tubo donde se han recogido los disolventes, se le adicionan 3 ml de la disolución de HCl 0,1M y 0,3 ml de la disolución de cloruro de magnesio al 0,5%. Seguidamente agitamos los tubos manualmente y a continuación, centrifugamos cada una de las muestras a 3500 rpm durante 5 minutos. Una vez finalizada, se obtendrá una fase superior acuosa, una interfase de proteínas y una fase inferior de cloroformo, conteniendo esta última a los lípidos.

Mediante una pipeta Pasteur, se recoge la fase inferior de cloroformo, procurando no arrastrar la fase acuosa y la interfase de proteínas. Esta fase recogida se introduce ahora en un tubo de vidrio limpio y seco que previamente ha sido tarado. Este tubo que contiene la fase de cloroformo es introducido en un baño termostático a una temperatura comprendida entre 45 – 50 °C hasta evaporar el cloroformo en su totalidad.

Una vez evaporado todo el cloroformo, procedemos a pesar el tubo anotando el valor correspondiente a la cantidad de lípidos obtenida. Por último, se realizarán sucesivas extracciones con hexano.

4.3.1.4. Transesterificación de los lípidos extraídos

Se tomaron 5 ml de la disolución de hexano que contenía los lípidos extraídos y se transesterificó con 25 ml de disolución metanol - HCl al 5% v/v a 70°C durante 1,5 h a reflujo. Se dejó enfriar y se procedió a la extracción empleando 5 ml de hexano hasta completar un volumen de 25 ml.

4.3.2. Extracción de lípidos totales con disolventes eutécticos

4.3.2.1. Disolventes eutécticos a utilizar

- Thymol - Octanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.
- Thymol- Hexanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.
- Thymol - Camphor. Líquido a temperatura ambiente.
- Menthol - Decanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.
- Menthol - Octanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.
- Menthol - Hexanoic Acid. Líquido a temperatura ambiente.

4.3.2.2. Procedimiento

Comenzamos el ensayo colocando 100 mg de la microalga *Nannochloropsis gaditana* en un tubo de ensayo de vidrio, al que añadiremos posteriormente, 3 ml del disolvente eutéctico a emplear e introduciremos un agitador magnético en cada uno de estos tubos manteniéndolo durante una hora a temperatura ambiente, tras lo cual, pondremos las muestras en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos.

Posteriormente, centrifugaremos las muestras durante 25 minutos a 3500 rpm. Una vez finalizado el centrifugado, eliminaremos el líquido eutéctico de estos tubos, transfiriéndolo a otro tubo de vidrio distinto de los usados hasta ahora, procurando no arrastrar el residuo de microalgas depositado en el fondo y lo guardaremos.

Continuaremos el proceso añadiendo 3 ml de disolución cloroformo – metanol al residuo de microalgas y agitaremos; volviendo a colocar las muestras en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Finalizado este tiempo, centrifugaremos durante 25 minutos a 3500 rpm. A partir de aquí se repiten los pasos descritos en los apartados 4.3.1.2 y 4.3.1.3.

4.3.3. Extracción de lípidos totales mediante transesterificación simultánea usando disoluciones metanol - HCl

4.3.3.1. Preparación de disoluciones

Se ha preparado la siguiente disolución para realizar la extracción:

- Disolución metanol – HCl al 5%.

4.3.3.2. Disolventes eutécticos empleados

- Choline Chloride- Lactic Acid (1:2). Código: ChLA.
- Betaine - Lactic Acid (1:2). Código: BLA.
- Choline Chloride - Ethylene Glycol (1:2). Código: ChE.
- Thymol - Octanoic Acid (1:1). Código: TOA.
- Thymol - Camphor (7:3). Código: TCA.
- Menthol - Decanoic Acid (1:1). Código: MDA.
- Menthol - Octanoic Acid (1:1). Código: MOA.

4.3.3.3. Procedimiento

Este ensayo comenzará comprobando la solubilidad de los distintos disolventes eutécticos en agua, hexano, acetona y metanol a temperatura ambiente.

Disolventes eutécticos	Solubilidad en agua (H₂O)	Solubilidad en hexano (C₆H₁₄)	Solubilidad en acetona (C₃H₆O)	Solubilidad en metanol (CH₃OH)
Timol - Ácido octanoico	NO	SI	SI	SI
Timol - Alcanfor	NO	SI	SI	SI
Mentol - Ácido decanoico	NO	SI	SI	SI
Mentol - Ácido octanoico	NO	SI	SI	SI
Cloruro de colina - Ácido láctico	SI	NO	SI	SI
Betaína - Ácido láctico	SI	NO	NO	SI
Cloruro de colina - Etilenglicol	SI	NO	SI	SI

Tabla 12. Solubilidad de los diferentes disolventes eutécticos a emplear en el ensayo.

Teniendo en cuenta el estudio de solubilidad realizado, procedemos a pesar 0,5 g de la muestra de microalgas a estudiar en este experimento para introducir la misma en un matraz Erlenmeyer, donde la mezclaremos con 36,5 g de disolvente eutéctico. Introducimos un agitador magnético en el interior del matraz y calentamos la mezcla a 70 °C. Una vez alcanzada esta temperatura se pone en marcha la bomba peristáltica manteniendo la mezcla a reflujo durante 1,5 horas.

Finalizado este tiempo, se para el reflujo y filtramos el contenido del matraz en la campana de gases. Debemos limpiar el matraz con la mínima cantidad de agua posible (para aquellos DES's solubles en agua), o bien, con hexano (para aquellos DES's insolubles en agua). Para recuperar todas las partículas que hayan podido quedar adheridas en las paredes del matraz.

De igual modo, limpiaremos el filtro con una mínima cantidad de agua o hexano según proceda para eliminar todo el disolvente eutéctico. Recogeremos entonces el líquido filtrado, lo etiquetaremos y guardaremos en el congelador a la vez que etiquetamos el sólido separado, secándolo en una estufa a 60 °C, durante 24 horas para pesarlo posteriormente.

Una vez pesado el residuo sólido de microalga, lo introducimos en un matraz de Erlenmeyer y lo mezclaremos con 36,5 g de metanol – HCl al 5%. Volvemos a introducir un agitador magnético y calentamos la mezcla a 70 °C durante 1,5 horas a reflujo.

Continuamos realizando 4 extracciones con 5 ml de hexano durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Después de cada extracción hay que recoger la capa superior de hexano e introducirla en un matraz aforado de 25 ml. Juntamos las 4 extracciones en el matraz y enrasamos a 25 ml con hexano.

La microalga recibida, sin tratamiento previo, se sometió al proceso de extracción con la disolución metanol – HCl al 5% en las mismas condiciones descritas anteriormente.

4.3.4. Preparación de muestras para cromatografía de gases

Se prepararon 2 ml formado por:

- 40 µL muestra de la extracción de hexano obtenida.
- 33 µL patrón interno.
- Hexano 99% hasta enrasar.

4.3.5. Preparación de los patrones de calibración

Como estándar interno se utilizó hexanoato de metilo, el cual se preparó por transesterificación de 6,5 µL de ácido hexanoico con 2 ml de una disolución metanol - HCl 5% v/v según lo descrito en el apartado 4.3.1.4. Para la preparación de los patrones, se transesterificaron 0,2 ml de un estándar comercial cuya composición se muestra en la Tabla 13, con 3 ml de disolución metanol - HCl 5% v/v completando hasta un volumen total de 10 ml con hexano.

Compuesto	Concentración (µg/ml)	Fórmula
Ácido dodecanoico	1000	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
Ácido Tetradecanoico	1000	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Ácido Hexadecanoico	1000	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Ácido Palmitoleico	1000	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ácido Heptadecanoico	1000	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
Ácido cis-10-Heptadecenoico	1000	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
Ácido Octadecanoico	1000	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Ácido Oleico	1000	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Ácido Linoleico	1000	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Ácido Linolénico	1000	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Ácido Eicosanoico	1000	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
Ácido cis-11-Eicosanoico	1000	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
Ácido Docosanoico	1000	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Ácido Eicosapentaenoico	1000	C ₂₀ H ₃₀ O ₂

Tabla 13. Composición química del estándar comercial empleado en la preparación de los patrones.

Se mezclaron los volúmenes adecuados de cada disolución transesterificada para obtener patrones que tuvieran una concentración de 4 µg/ml de hexanoato de metilo y 2, 4, 6, 8 y 10 µg/ml del estándar comercial. Estas disoluciones se enrasaron con hexano hasta un volumen total de 2ml.

4.4. TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

La cromatografía de gases es un método usual que tiene como objetivo conseguir una separación de los distintos compuestos de una mezcla basándose en la distribución diferencial de sustancias entre una fase estacionaria y una fase

móvil. Con ello conseguimos un mejor análisis de la pureza de la sustancia a estudiar (31).

La fase estacionaria puede ser sólida o líquida y queda unida (inmovilizada) sobre la superficie de un sólido inerte (columna), mientras que la fase móvil o comúnmente llamado gas portador suele ser un gas inerte, como el helio o el nitrógeno. Este gas será el encargado de realizar la distribución diferencial de las sustancias. Para ello, pasará a través de la columna, que contiene la fase estacionaria, transportando las sustancias de la muestra a distintas velocidades según sus propiedades, quedando fijadas a dicha fase (31).

Posteriormente, la sustancia fijada en la fase estacionaria pasará al detector y se quemará en el horno, lo cual originará una señal registrada como un pico en el detector frente al tiempo (31).

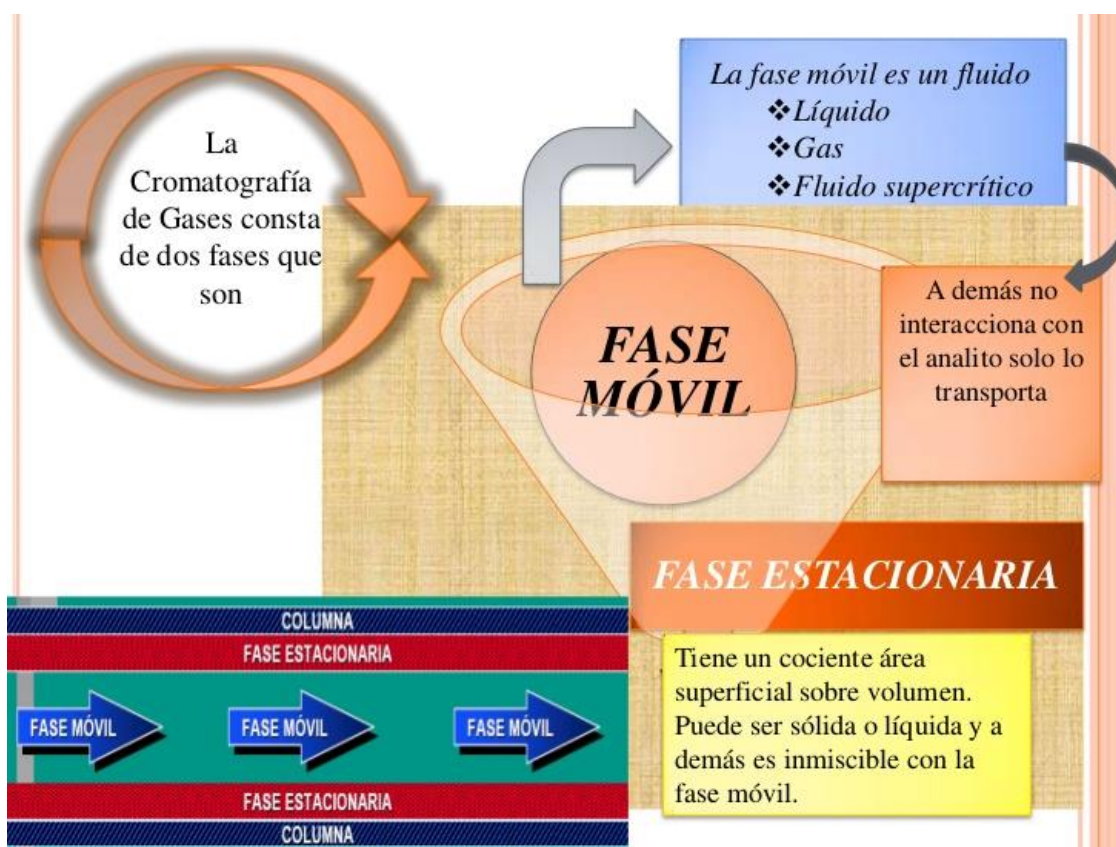


Ilustración 12. Fases de la cromatografía de gases (32).

4.4.1. Componentes básicos de un cromatógrafo de gases

- Un cromatógrafo de gases consta de un sistema de suministro de fase móvil, un sistema de inyección de muestras, una columna cromatográfica situada en un horno termostatzado y un detector (33).
- Como fase móvil se suelen utilizar distintos tipos de gases como nitrógeno, helio o argón entre otros. El gas suele venir determinado por el tipo de detector que se va a utilizar (33).
- Sistema de inyección de muestras. Para que la separación sea eficaz es necesario un sistema que permita la inyección de una muestra de tamaño adecuado de forma rápida. La muestra se inyecta a través de un tapón de goma en una cámara de vaporización situada en la cabeza de la columna. El uso de inyectores automáticos es preferible ante el sistema de inyección manual (33).
- Columna cromatográfica situada en el horno termostatzado. En ella se va a producir la separación de los analitos. Podemos clasificar las columnas en dos grupos: empaquetadas y capilares. Las columnas capilares poseen mayor resolución, mayor sensibilidad y menor tiempo de análisis, por lo que han sustituido prácticamente a las empaquetadas (33).
- Detectores. El detector es el sistema encargado de indicar la presencia de solutos que salen de la columna cromatográfica (33). Un detector debe presentar una correcta sensibilidad, amplio intervalo de temperatura de trabajo y un tiempo de respuesta corto.

Algunos de los detectores más importantes son:

- Detector de ionización de llama (FID). La respuesta del detector se debe a la combustión de los compuestos orgánicos en una llama de aire–hidrógeno. Se mide la intensidad de corriente entre dos electrodos situados a los lados de la llama. Es uno de los detectores más utilizados (33).
- Detector de conductividad térmica. Este detector responde a cualquier soluto cuya conductividad térmica sea diferente a la del gas portador. Suele emplearse para aquellas especies que no producen respuesta en el FID (33).

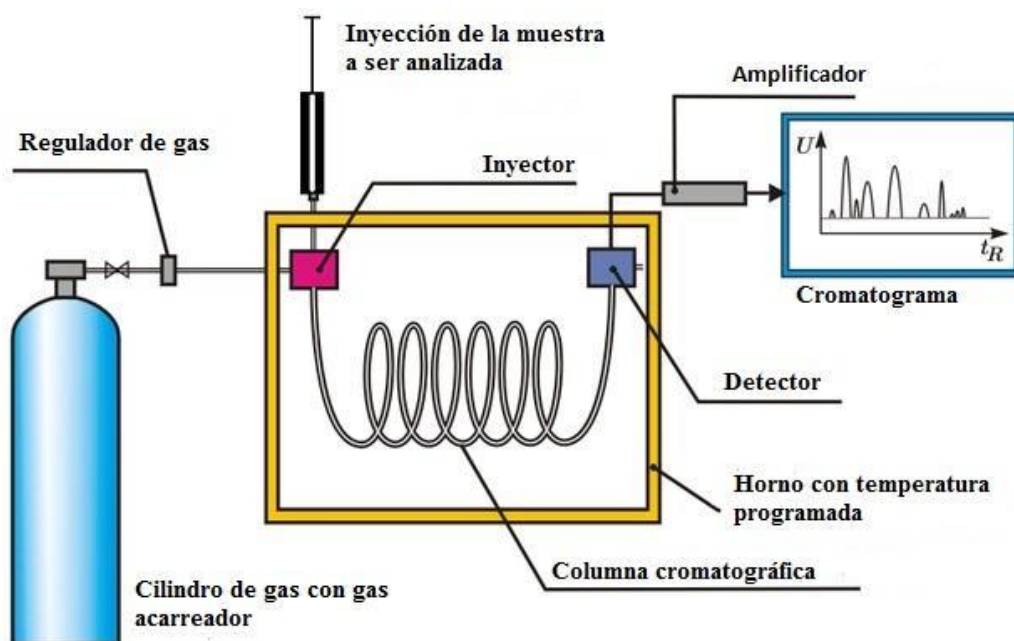


Ilustración 13. Esquema simplificado de un cromatógrafo de gases (34).

En el presente estudio, se utilizó un cromatógrafo Varian/Bruker 450GC, una columna capilar DB-23 como fase estacionaria y nitrógeno como gas portador. Para el análisis se inyectó 1 μ L de muestra utilizando el siguiente programa de temperatura:

Velocidad ($^{\circ}$ C / min)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)
Inicial	100	1
25	200	1
5	250	7

Tabla 14. Programa de temperatura utilizado en cromatograma de gases.

Resultados

5. RESULTADOS

Se observó que el patrón interno elegido para la preparación de muestras para cromatografía de gases no resultó adecuado, ya que su concentración variaba con la concentración del estándar. A pesar de ello, se logró obtener un buen resultado en las rectas de calibrado sin necesidad de utilizar un patrón interno.

5.1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ALTURA DE PICOS

En la ilustración 14 se muestran los picos correspondientes a los patrones utilizados.

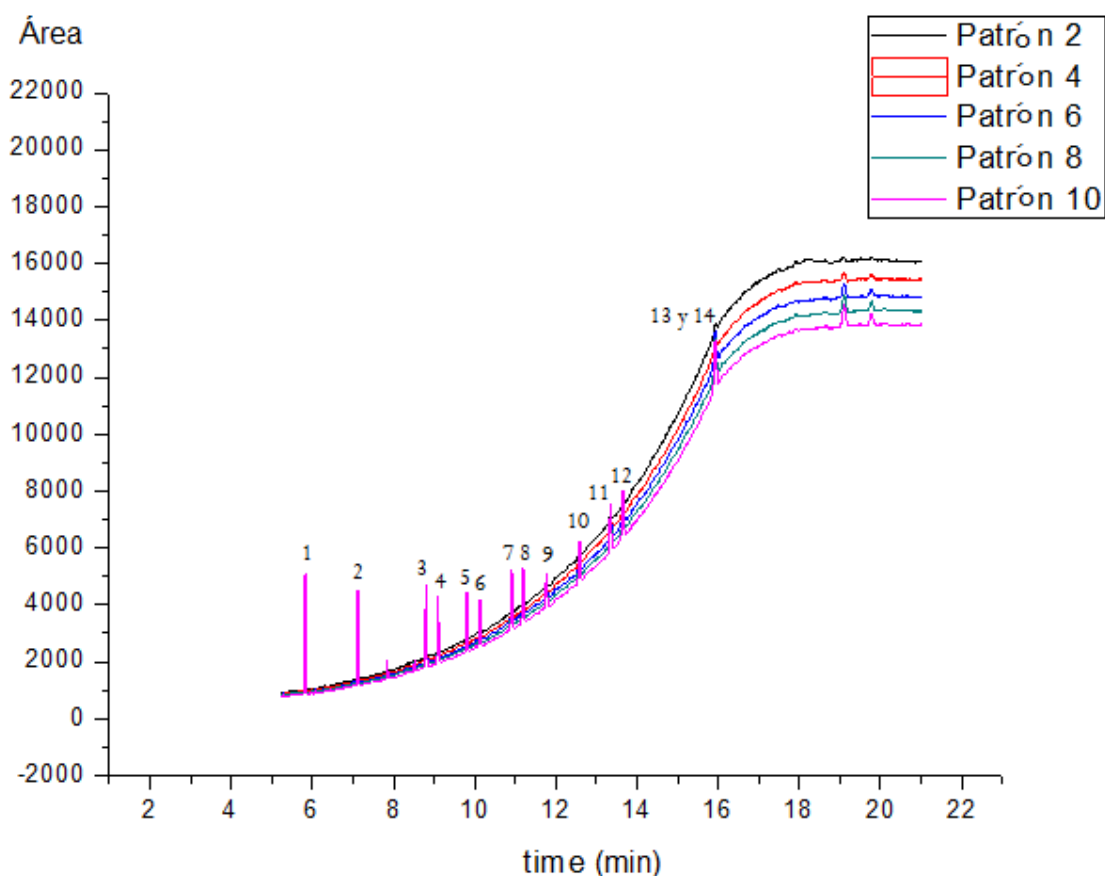


Ilustración 14. Representación gráfica de los picos para los patrones 2,4,6,8 y 10.

A continuación, se identificaron los picos observados en el cromatograma con los siguientes compuestos lipídicos:

Número de pico	Compuesto lipídico
1	Ácido dodecanoico ME
2	Ácido tetradecanoico ME
3	Ácido hexadecanoico ME
4	Ácido cis-9-hexadecenoico ME
5	Ácido heptadecanoico ME
6	Ácido cis-10-heptadecenoico ME
7	Ácido esteárico ME
8	Ácido oleico ME
9	Ácido cis-9,12-octadecadienoico ME
10	Ácido 9,12,15 -octadecanoico ME
11	Ácido eicosanoico ME
12	Gondoato de metilo
13	Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico ME
14	Ácido docosanoico ME

Tabla 15. Correspondencia de picos y compuestos lipídicos.

Para un mejor visualización de los picos encontrados, se decidió dividir la gráfica anterior en tres secciones.

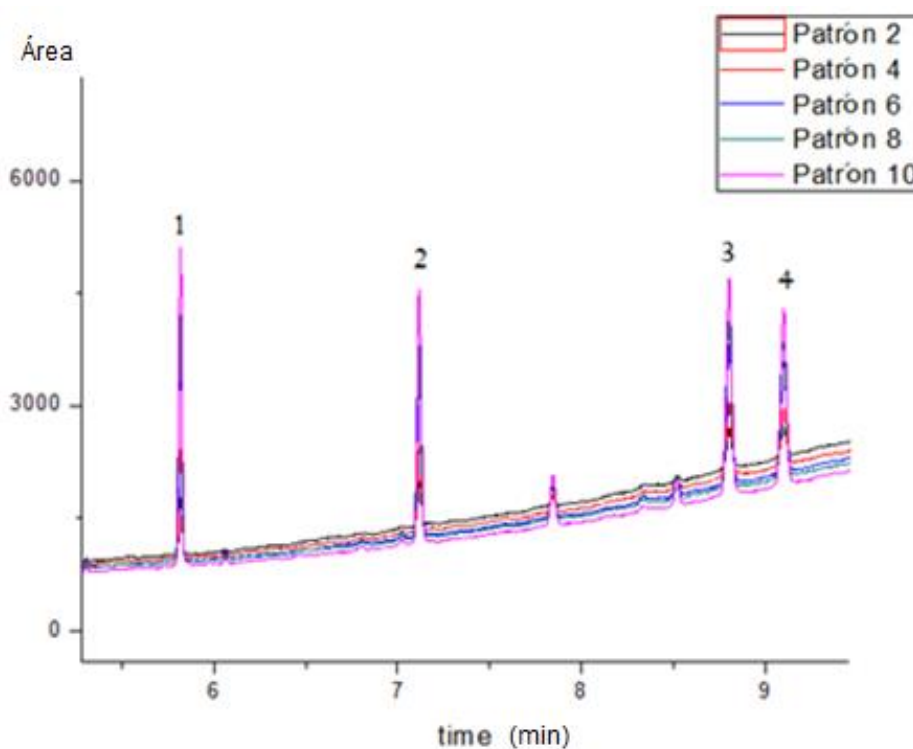


Ilustración 15. Representación gráfica de picos para patrones utilizados. Sección 1.

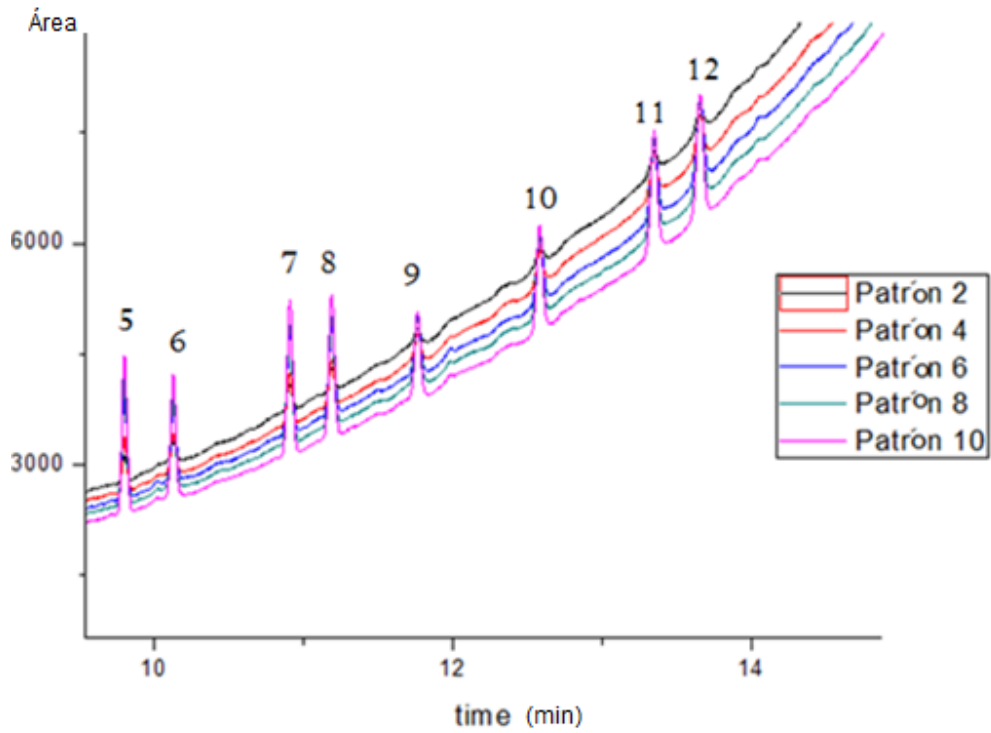


Ilustración 16. Representación gráfica de picos para patrones utilizados. Sección 2.

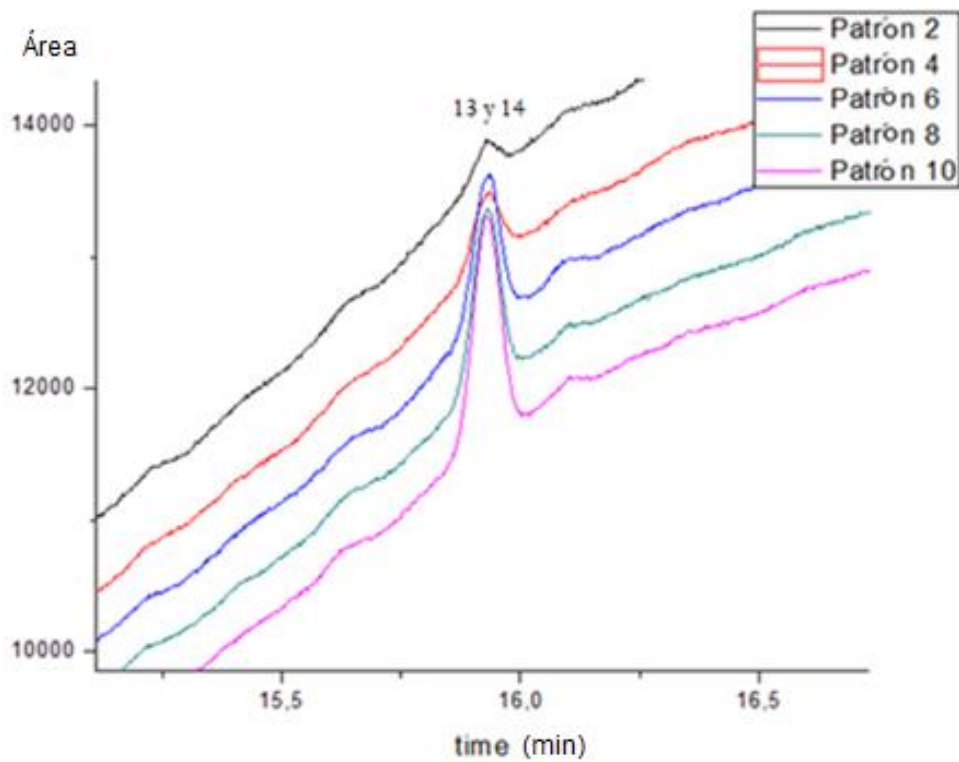


Ilustración 17. Representación gráfica de picos para patrones utilizados. Sección 3.

Podemos observar cómo, para nuestros patrones, al aumentar la concentración aumenta la altura y el área de los picos.

5.2. IDENTIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE PATRONES

Debido a que el detector FID del cromatógrafo instalado en nuestro laboratorio no nos permite identificar los compuestos sin realizar un análisis previo de los compuestos individuales, se recurrió al SAIT de la UPCT para llevar a cabo la identificación de los patrones mediante un cromatógrafo de gases con detector de masas para, después, compararlos con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio. Para la comparación, escogimos el patrón 10 ya que es el que presenta los picos más altos.

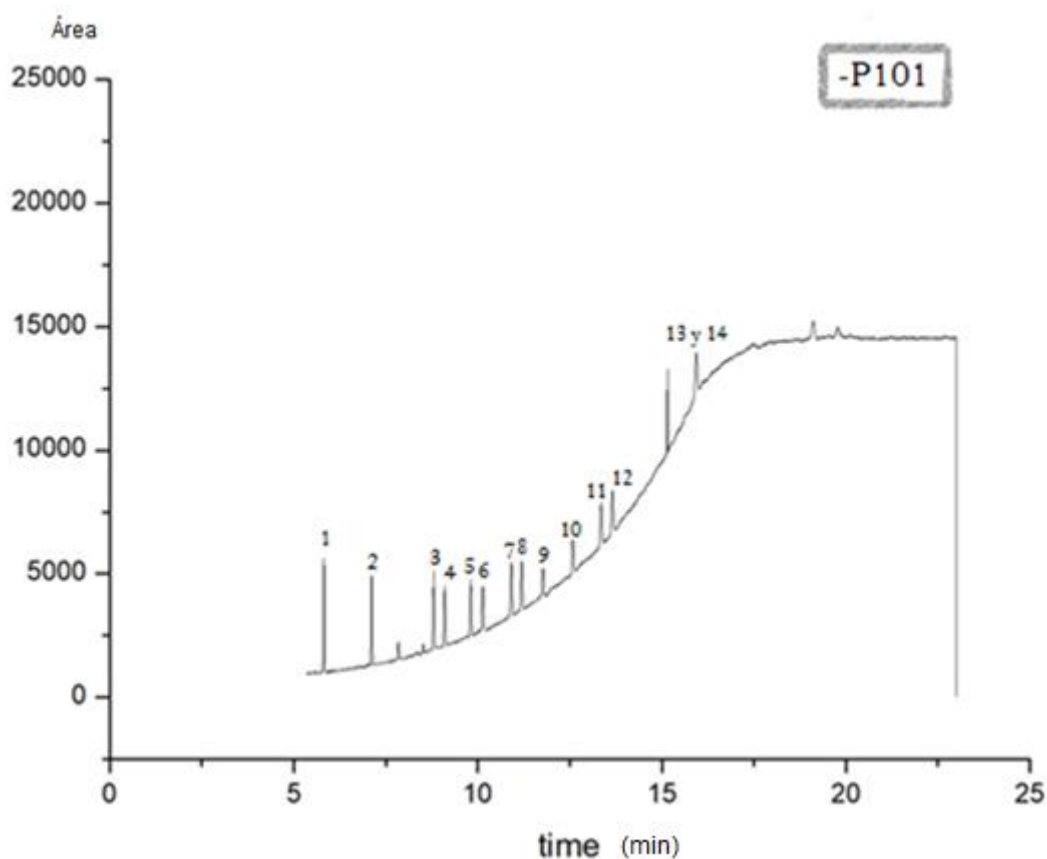


Ilustración 18. Patrón 10 analizado mediante detector FID.

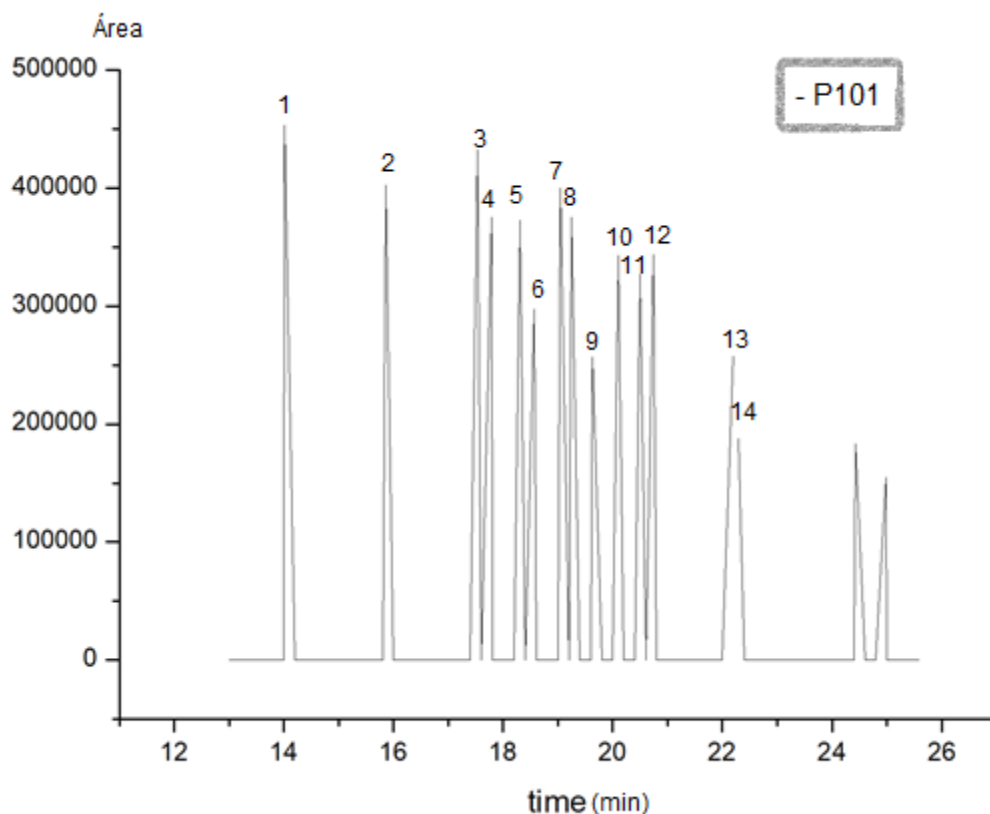


Ilustración 19. Patrón 10 analizado mediante detector de masas.

Los análisis realizados en el SAIT se llevaron a cabo utilizando un programa de temperatura más largo y trabajando con helio como fase móvil. De ahí que nuestros tiempos de retención sean más cortos. Sin embargo, el orden de elución de los compuestos permanece inalterado en ambos métodos. En la ilustración 19, obtenida mediante detector de masas, se observa cómo los picos 13 y 14 eluyen a tiempos muy próximos. Estos se corresponden con los compuestos de EPA y ácido docosanoico a 21'57" y 21'63" respectivamente. Si atendemos al cromatograma de la ilustración 18, obtenido en nuestro laboratorio, observamos que los picos 13 y 14 aparecen fusionados en un único pico, haciendo imposible la distinción entre EPA y ácido docosanoico. Esta diferencia se atribuye a que la utilización de helio como fase móvil permite una mejor resolución de los picos que el nitrógeno.

Con respecto al resto de los compuestos no se encontró ninguna dificultad para identificarlos con nuestro método descrito en el apartado 4.4.1.

5.3. RECTAS DE CALIBRADO

La recta de calibrado nos va a permitir obtener la concentración de los compuestos analizados en cada muestra. A partir de ésta se podrá obtener la cantidad de lípidos totales para los 0,5 g de microalgas tomados en nuestras muestras inicialmente.

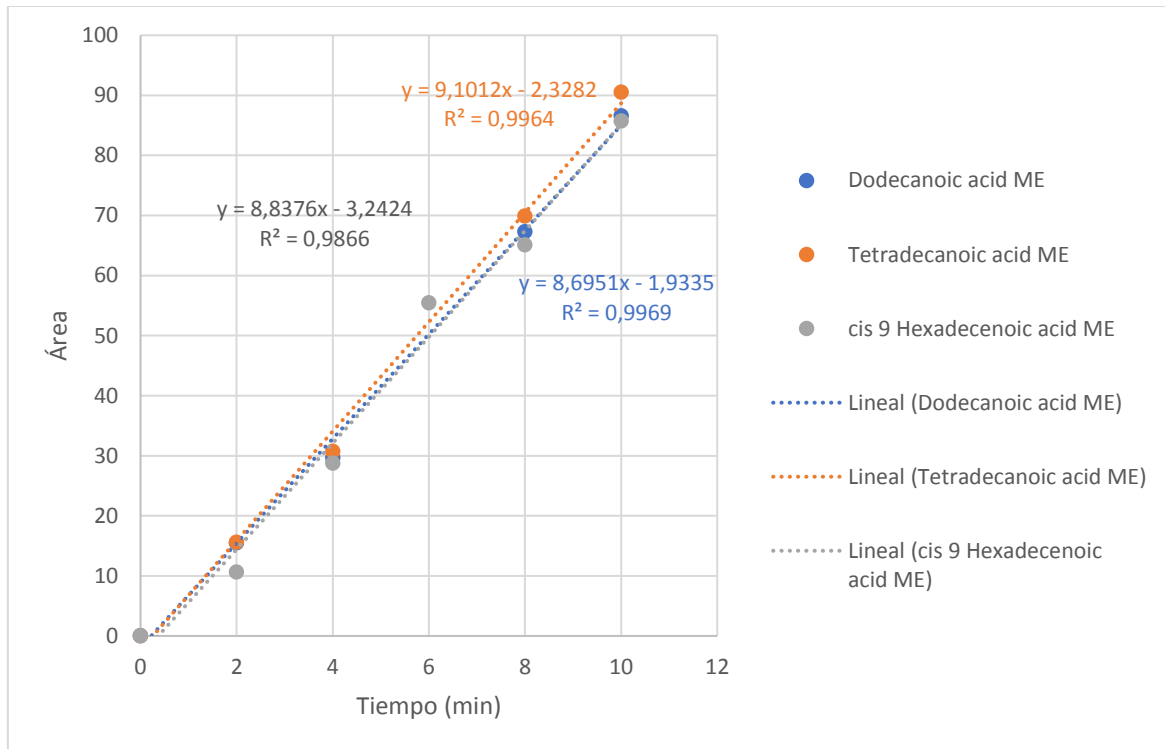


Ilustración 20. Rectas de calibrado para los compuestos: ácido docecanoico ME, ácido tetradecanoico ME y ácido cis-9-hexadecenoico ME.

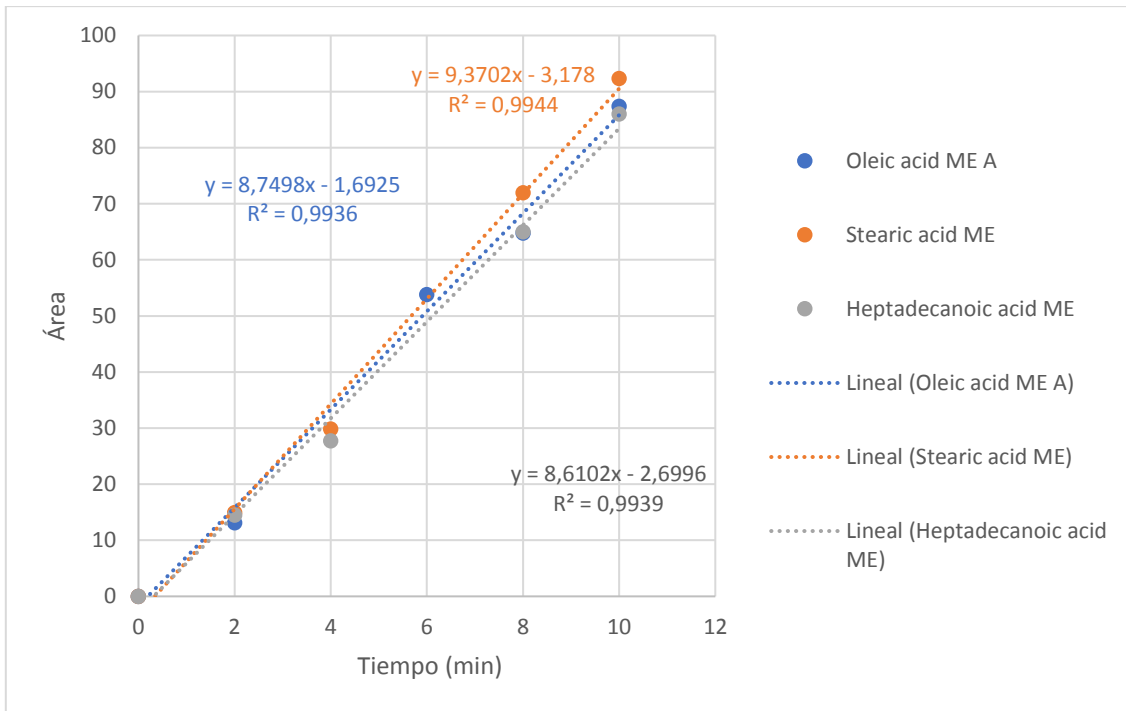


Ilustración 21. Rectas de calibrado para los compuestos: ácido oleico ME, ácido esteárico ME y ácido heptadecanoico ME.

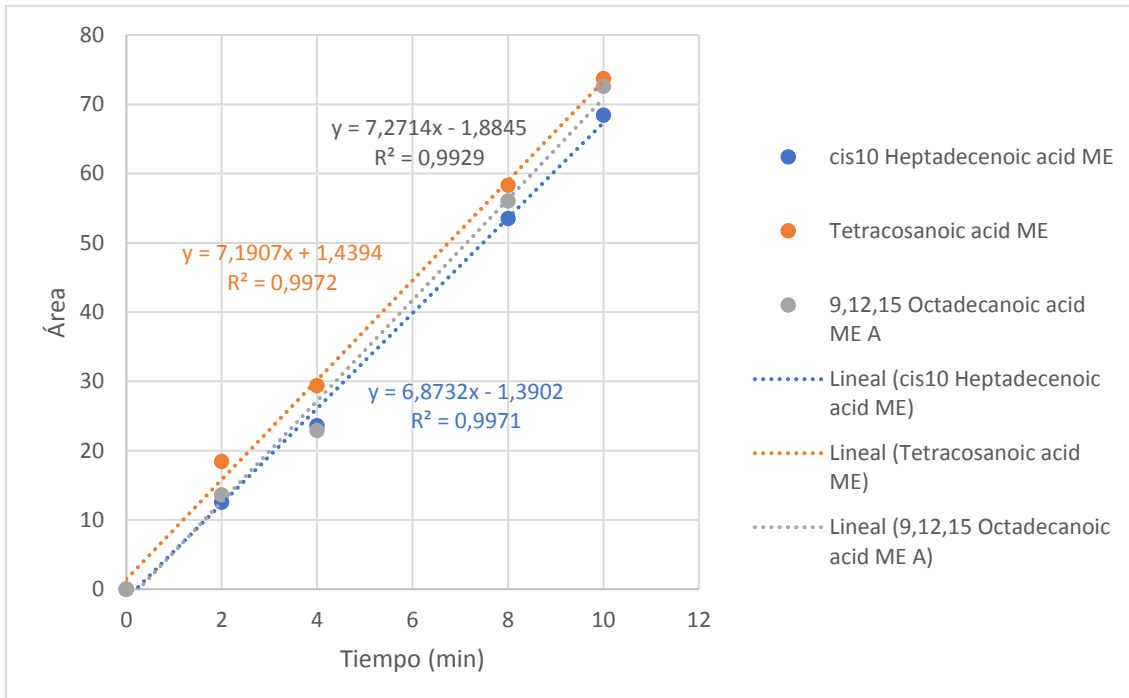


Ilustración 22. Rectas de calibrado para los compuestos: ácido cis-10-heptadecenoico ME, ácido tetracosanoico ME y ácido 9,12,15-octadecanoico ME.

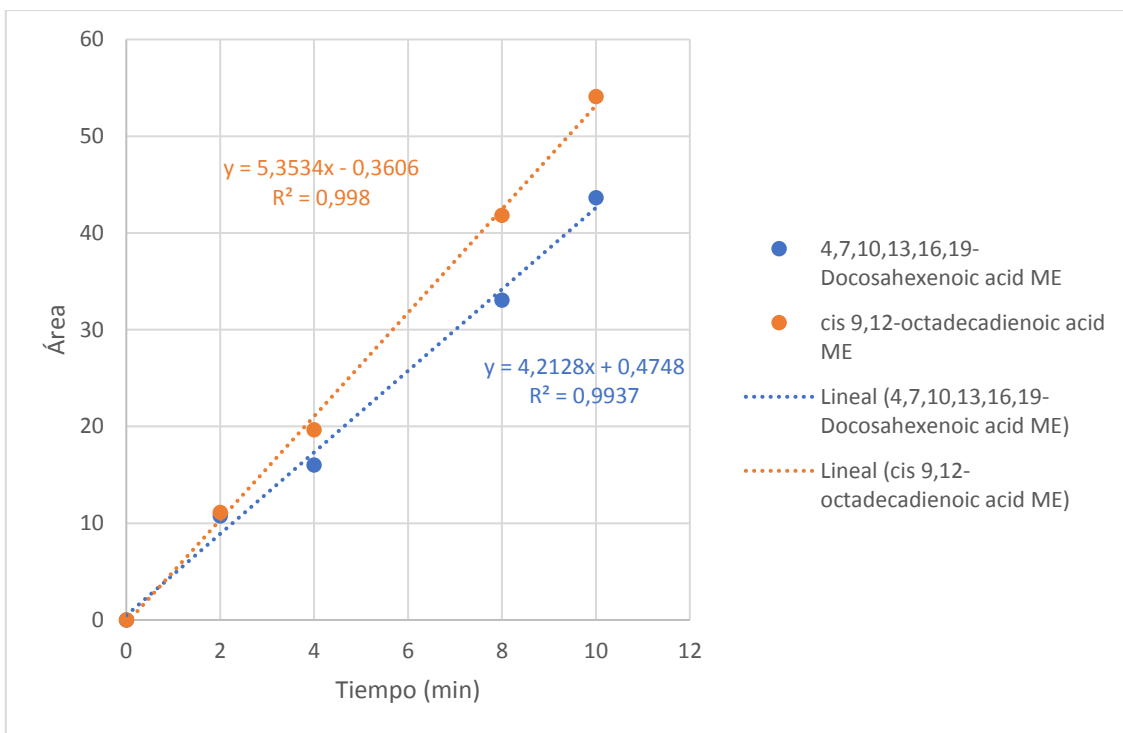


Ilustración 23. Rectas de calibrado para los compuestos ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexenoico ME, ácido cis-9,12-octadecadienoico ME.

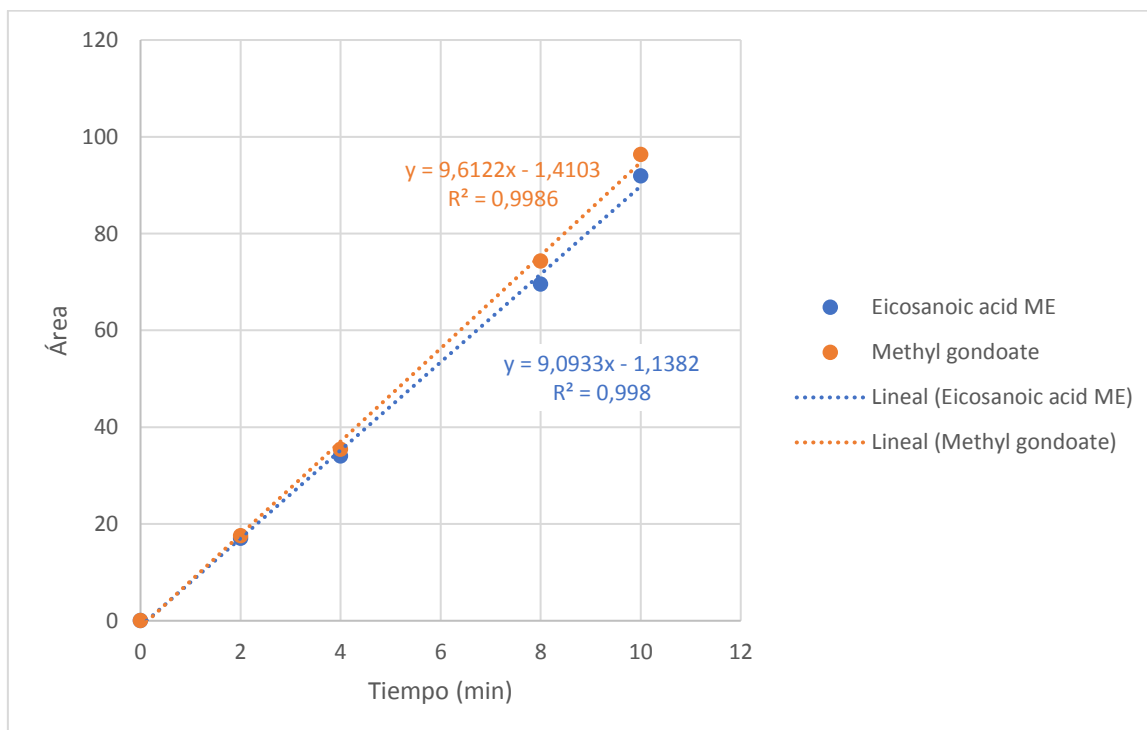


Ilustración 24. Rectas de calibrado para los compuestos ácido eicosanoico ME y metil gondoato.

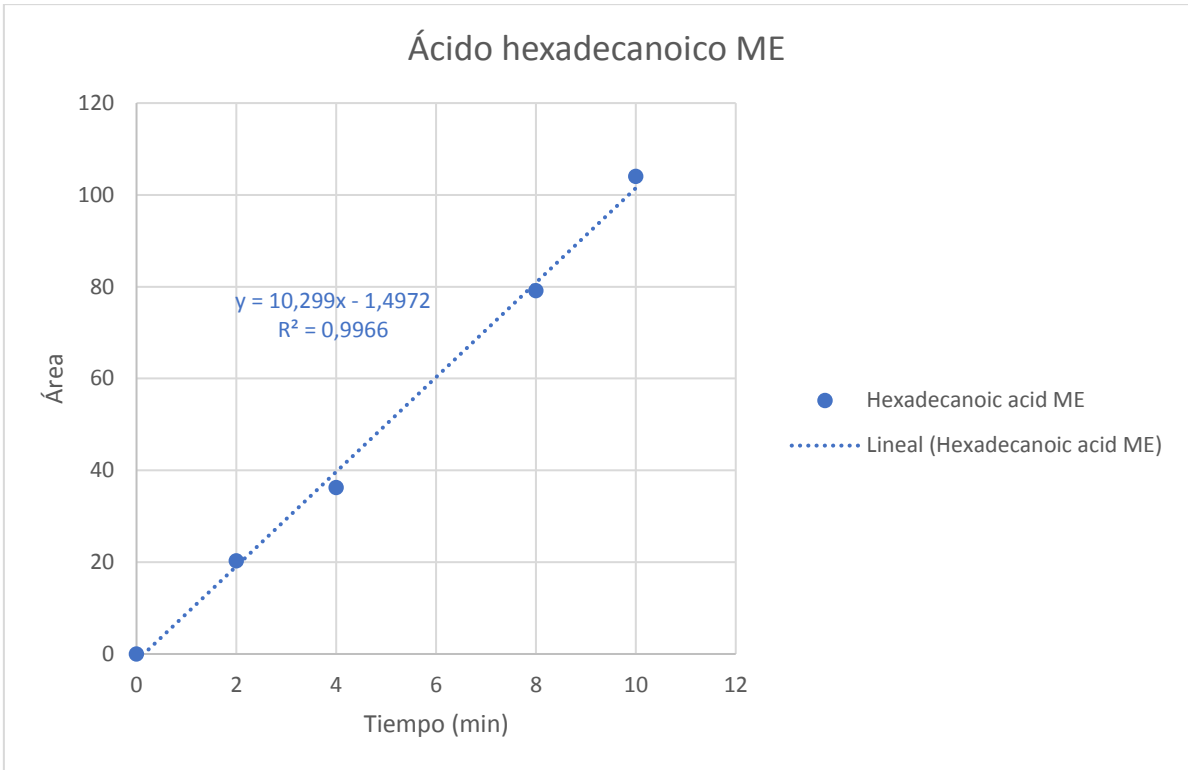


Ilustración 25. Recta de calibrado para el compuesto ácido hexadecanoico ME.

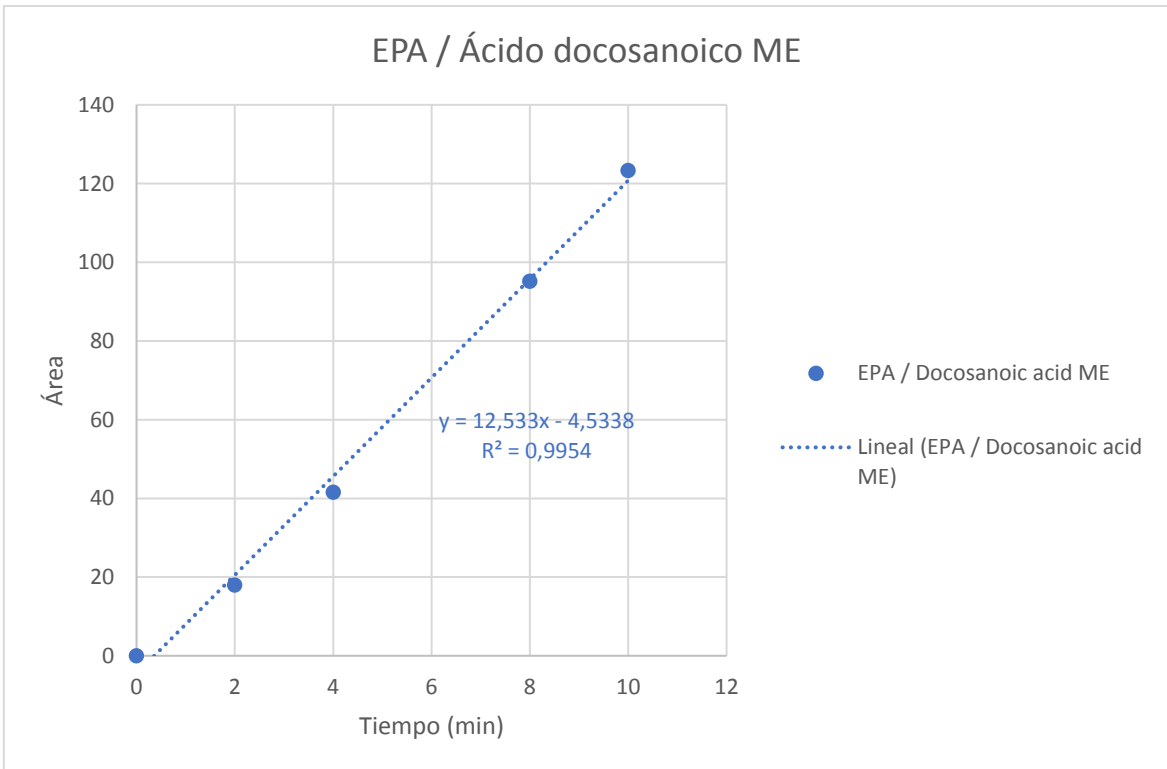


Ilustración 26. Recta de calibrado para los compuestos EPA y ácido docosanoico ME.

5.4. RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

Los resultados obtenidos, tanto para la microalga sin tratar como para la microalga tratada con los disolventes eutécticos, se presentan en las Tablas 16 a 19. Como referencia se utilizó el contenido en lípidos de la microalga sin tratar etiquetada como muestra Y, en la cual se realizó la extracción de lípidos utilizando una disolución de metanol-HCl al 5%. Como puede observarse en la Tabla 16, se identificaron los ácidos dodecanóico, tetradecanóico, hexadecanóico, cis-9-hexadecanóico, cis-10-heptadecanóico, esteárico, oleico, cis-9,12-octadecanóico y el 9,12,15-octadecanóico siendo los ácidos hexadecanóico, cis-9,12-octadecanóico y el 9,12,15-octadecanóico los mayoritarios en la microalga analizada.

Compuestos lipídicos	Concentración muestra Y (μg en 25 ml)	BLA		ChLA	
		Concentración lipídica (μg en 25 ml)	Rendimiento de extracción	Concentración lipídica (μg en 25 ml)	Rendimiento de extracción
Ácido dodecanoico ME	381,08	0,00	1,00	302,52	0,21
Ácido tetradecanoico ME	417,97	0,00	1,00	403,94	0,03
Ácido hexadecanoico ME	3820,48	2265,06	0,41	2262,57	0,41
Ácido cis-9-hexadecenoico ME	736,23	490,20	0,33	666,25	0,10
Ácido cis-10-heptadecenoico ME	275,34	0,00	1,00	0,00	1,00
Ácido esteárico ME	439,85	453,08	-0,03	431,06	0,02
Ácido oleico ME	307,22	247,27	0,20	271,76	0,12
Ácido cis-9,12-octadecadienoico ME	1178,02	201,90	0,83	289,23	0,75
Ácido 9,12,15-octadecanoico ME	1584,57	782,40	0,51	1726,79	-0,09

Tabla 16. Rendimiento de extracción de lípidos para muestras BLA y ChLA.

Compuestos lipídicos	Concentración muestra Y (µg en 25 ml)	ChE		TOA	
		Concentración lipídica (µg en 25 ml)	Rendimiento de extracción	Concentración lipídica (µg en 25 ml)	Rendimiento de extracción
Ácido dodecanoico ME	381,08	349,00	0,08	430,00	-0,13
Ácido tetradecanoico ME	417,97	0,00	1,00	437,20	-0,05
Ácido hexadecanoico ME	3820,48	2865,94	0,25	3227,70	0,16
Ácido cis-9-hexadecenoico ME	736,23	765,10	-0,04	791,94	-0,08
Ácido cis-10-heptadecenoico ME	275,34	0,00	1,00	0,00	1,00
Ácido esteárico ME	439,85	433,96	0,01	443,45	-0,01
Ácido oleico ME	307,22	0,00	1,00	384,84	-0,25
Ácido cis 9,12-octadecadienoico ME	1178,02	583,84	0,50	891,79	0,24
Ácido 9,12,15-octadecanoico ME	1584,57	1084,93	0,32	2518,07	-0,59

Tabla 17. Rendimiento de extracción de lípidos para muestras ChE y TOA.

Compuestos lipídicos	Concentración muestra Y (µg en 25 ml)	TCA		MDA	
		Concentración lipídica (µg en 25 ml)	Rendimiento de extracción	Concentración lipídica (µg en 25 ml)	Rendimiento de extracción
Ácido dodecanoico ME	381,08	400,03	-0,05	402,09	-0,06
Ácido tetradecanoico ME	417,97	0,00	1,00	332,47	0,20
Ácido hexadecanoico ME	3820,48	2753,79	0,28	3510,54	0,08
Ácido cis-9-hexadecenoico ME	736,23	850,69	-0,16	834,25	-0,13
Ácido cis-10-heptadecenoico ME	275,34	887,24	-2,22	718,26	-1,61
Ácido esteárico ME	439,85	0,00	1,00	0,00	1,00
Ácido oleico ME	307,22	496,57	-0,62	497,37	-0,62
Ácido cis-9,12-octadecadienoico ME	1178,02	1306,06	-0,11	764,99	0,35
Ácido 9,12,15-octadecanoico ME	1584,57	1592,91	-0,01	1830,28	-0,16

Tabla 18. Rendimiento de extracción de lípidos para muestras TCA y MDA.

Compuestos lipídicos	Concentración muestra Y (µg en 25 ml)	MOA	
		Concentración lipídica (µg en 25 ml)	Rendimiento de extracción
Ácido dodecanoico ME	381,08	446,86	-0,17
Ácido tetradecanoico ME	417,97	0,00	1,00
Ácido hexadecanoico ME	3820,48	3252,81	0,15
Ácido cis-9-hexadecenoico ME	736,23	752,68	-0,02
Ácido cis-10-heptadecenoico ME	275,34	754,02	-1,74
Ácido esteárico ME	439,85	435,98	0,01
Ácido oleico ME	307,22	361,57	-0,18
Ácido cis-9,12-octadecadienoico ME	1178,02	766,71	0,35
Ácido 9,12,15-octadecanoico ME	1584,57	1553,66	0,02

Tabla 19. Rendimiento de extracción de lípidos para muestra MOA.

Para calcular el rendimiento de extracción se utilizó la muestra Y como referencia y se aplicó la Ecuación 3 para su cálculo:

$$R = \frac{\mu g_{iY} - \mu g_{iDES}}{\mu g_{iY}}$$

Ecuación 3. Expresión para el cálculo de rendimiento de extracción.

Donde μg_{iY} son los microgramos del lípido *i* presentes en la muestra Y, μg_{iDES} son los microgramos del lípido *i* presentes en la muestra tratada con el disolvente eutéctico y R es el rendimiento de extracción expresado en tanto por uno.

A la vista de los resultados obtenidos y presentados en las Tablas 16 a 19, para los diferentes disolventes eutécticos estudiados, cabe destacar la presencia de valores negativos para algunos de los ácidos estudiados. De acuerdo con la metodología empleada para determinar el rendimiento de extracción, los valores negativos nos indican que el disolvente no es capaz de extraer ese ácido, pero si lo es para degradar la pared celular de la microalga e incrementar la cantidad de ácido liberado como han demostrado otros estudios realizados (35,36).

También se pudo observar que los disolventes insolubles en agua (TOA, TCA, MDA y MOA) degradan las paredes celulares con mayor intensidad que los solubles en agua facilitando la liberación de los ácidos grasos presentes en la microalga.

Con respecto a la selectividad de los disolventes eutécticos por los ácidos grasos analizados, se nos presenta un problema complejo de analizar ya que en ninguno de los disolventes utilizados se aprecia una tendencia clara por la extracción preferencial de un ácido en concreto con respecto a los otros. Sin embargo, sí se aprecia un enriquecimiento de un conjunto de ácidos frente al resto de los presentes en la microalga. Para facilitar la discusión, se ha elaborado la Tabla 20 en la que se ha utilizado la letra S cuando el disolvente es capaz de extraer el 70% o más del ácido graso ($R \geq 0,7$), la letra T se ha utilizado para indicar rendimientos intermedios ($0,25 \leq R \leq 0,7$) y la letra N para rendimientos bajos ($R \leq 0,25$).

Compuestos lipídicos	BLA	ChLA	ChE	TOA	TCA	MDA	MOA
Ácido dodecanoico	S	N	N	N	N	N	N
Ácido tetradecanoico	S	N	S	N	S	N	S
Ácido hexadecanoico	T	T	N	N	T	N	N
Ácido cis-9-hexadecenoico	T	N	N	N	N	N	N
Ácido cis-10-heptadecenoico	S	S	S	S	N	N	N
Ácido esteárico	N	N	N	N	S	S	N
Ácido oleico	N	N	S	N	N	N	N
Ácido cis-9,12-octadecadienoico	S	S	T	T	N	T	T
Ácido 9,12,15-octadecanoico	T	N	T	N	N	N	N

Tabla 20. Estudio de la selectividad de los disolventes eutécticos evaluados.

En la Tabla 20 se puede observar cómo los disolventes eutécticos TOA, MDA y MOA son selectivos para la extracción de los ácidos cis-10-heptadecanoico, esteárico y tetradecanoico respectivamente. En los tres disolventes se observó

la co-extracción del ácido cis-9,12-octadecanóico. El disolvente TCA es selectivo para la extracción de ácido tetradecanóico y esteárico, aunque también se produce la co-extracción de ácido hexadecanóico en menor proporción.

Con respecto a los disolventes solubles en agua, el disolvente BLA es selectivo para la concentración de ácido oleico y esteárico ya que no los extrae, dejándolos acumulados en la microalga. Los disolventes eutécticos basados en el cloruro de colina ChLA y ChE resultaron selectivos para la extracción de ácido tetradecanóico, cis-10-heptadecenoico, oleico y cis-9,12-octadecanoico.

Mediante la combinación de procesos de extracción-reextracción que involucren a uno o varios de los disolventes eutécticos utilizados se podría llegar al aislamiento individual de algunos de los ácidos estudiados, sin embargo, este análisis queda fuera del alcance de este proyecto quedando pendiente para estudios posteriores.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas tras la realización del presente trabajo son las siguientes:

- Tras los distintos métodos utilizados en el estudio de extracción de lípidos para una muestra de microalgas liofilizadas del género *Nannochloropsis gaditana*, el método de extracción y transesterificación simultánea usando disoluciones metanol-HCl es útil para extraer y transesterificar los lípidos al mismo tiempo en un solo paso. Sin embargo, se ha comprobado que este método por sí solo no es suficiente para extraer todos los lípidos de la muestra como han puesto de manifiesto los rendimientos negativos obtenidos al tratar la microalga con los diferentes disolventes eutécticos estudiados.
- Nuestro método cromatográfico permite analizar los componentes deseados. No obstante, el solapamiento total entre los picos pertenecientes al EPA y al ácido eicosanoico puede presentar un problema en futuras determinaciones. Por lo que se propone la aplicación de Helio en vez de Nitrógeno como fase móvil del cromatógrafo.
- Finalmente, se propone la búsqueda de un método alternativo para conseguir una extracción total de los lípidos contenidos en la microalga que pueda ser utilizado como referencia. Una solución podría ser el uso de una variante del método de extracción de lípidos totales, en el cual, podamos eliminar bien el disolvente eutéctico. Esto se podría conseguir utilizando matraces Erlenmeyer, los cuales, nos permiten trabajar mejor con las muestras.
- Se comprobó que los disolventes insolubles en agua (TOA, TCA, MDA y MOA) degradan las paredes celulares con mayor intensidad que los solubles en agua, facilitando la liberación de los ácidos grasos presentes en la microalga.
- Se comprobó que los disolventes eutécticos estudiados presentaban diferentes selectividades con respecto a los ácidos grasos extraídos, abriendo las posibilidades a futuros estudios, en los cuales, combinando estos disolventes en procesos de extracción-reextracción, se intenten aislar individualmente ácidos grasos de interés industrial.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bhatnagar I, Kim SK. Immense essence of excellence: Marine microbial bioactive compounds. *Mar Drugs*. 2010;8(10):2673–701.
2. Perez DJ, Scientific N. Algas , helechos y plantas vasculares acuáticas en estudios de contaminación ambiental y ecotoxicología . 2017.
3. Luis – Fitopasión [Internet]. [cited 2020 Jul 9]. Available from: <https://fitopasion.com/2017/11/luis.html>
4. Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;65(6):635–48.
5. Rhodophyta - EcuRed [Internet]. [cited 2020 Apr 3]. Available from: <https://www.ecured.cu/Rhodophyta>
6. Tipos de algas - Los 7 tipos de algas diferentes [Internet]. [cited 2020 Apr 4]. Available from: <https://algas.pro/tipos-de-algas/>
7. Qué son las microalgas - Green Sea Bio System One [Internet]. [cited 2020 Apr 4]. Available from: <https://www.greenseabiosystem.com/nosotros/que-son-las-microalgas/>
8. Priyadarshani I, Rath B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. 2012;3(4):89–100.
9. Todo lo que necesitas saber sobre microalgas - plancton [Internet]. [cited 2020 Apr 4]. Available from: <https://www.planctonmarino.com/2016/10/27/microalgas/>
10. Microalgas - definicion y características [Internet]. [cited 2020 Apr 4]. Available from: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html>
11. Brasil B dos SAF, de Siqueira FG, Salum TFC, Zanette CM, Spier MR. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. *Algal Res* [Internet]. 2017;25(February):76–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.035>
12. Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX. Microalgae as sources of high added-value compounds-a brief review of recent work. *Biotechnol Prog*. 2011;27(3):597–613.
13. Valenzuela B A, Sanhueza C J, Valenzuela B R. Las microalgas: una fuente renovable para la obtención de ácidos grasos omega-3 de cadena larga para la nutrición humana y animal TT - Microalgae: A renewable source for obtaining omega-3 long-chain fatty acids for human and animal nutrition. *Rev Chil Nutr* [Internet]. 2015;42(3):306–10. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182015000300013&lang=es%0Ahttp://www.scielo.cl/pdf/rchnut/v42n3/art13.pdf
14. Michalak I, Chojnacka K. Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng Life Sci*. 2015;15(2):160–76.
15. Microalgas P, González-arechavala Y. Ana-Maria-Santos & Yolanda-Gonzales-Arechavala & Carlos-Martin-Sastre. 2014;
16. Valverde F, Romero-Campero FJ, León R, Guerrero MG, Serrano A. New challenges in microalgae biotechnology. *Eur J Protistol* [Internet]. 2016;55:95–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2016.03.002>
17. Tang Y, Rosenberg JN, Betenbaugh MJ, Wang F. Optimization of one-step in situ transesterification method for accurate quantification of epa in *nannochloropsis gaditana*. *Appl Sci*. 2016;6(11).
18. Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F, Acien-Fernandez FG, Molina-Grima E.

- Microalgae research worldwide. *Algal Res* [Internet]. 2018;35(May):50–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.005>
19. Singh S, Kate BN, Banecjee UC. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Crit Rev Biotechnol*. 2005;25(3):73–95.
 20. FOTOBIOREACTORES CON MICROALGAS – Blog del curso Diseño de Reactores UC [Internet]. [cited 2020 Jul 9]. Available from: <https://reactoresuc.wordpress.com/2017/09/06/fotobiorreactores-con-microalgas/>
 21. Joana Gil-Chávez G, Villa JA, Fernando Ayala-Zavala J, Basilio Heredia J, Sepulveda D, Yahia EM, et al. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2013;12(1):5–23.
 22. Ventura SPM, Nobre BP, Ertekin F, Hayes M, Garcíá-Vaquero M, Vieira F, et al. Extraction of value-added compounds from microalgae. *Microalgae-Based Biofuels Bioprod From Feed Cultiv to End-Products*. 2017;(December):461–83.
 23. Bonilla-Mendez JR, Hoyos-Concha JL. Methods of extraction, refining and concentration of fish oil as a source of omega-3 fatty acids. *Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu*. 2018;19(3):645–68.
 24. Laurens LML, Quinn M, Van Wychen S, Templeton DW, Wolfrum EJ. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403(1):167–78.
 25. Yi T, Li SM, Fan JY, Fan LL, Zhang ZF, Luo P, et al. Comparative analysis of EPA and DHA in fish oil nutritional capsules by GC-MS. *Lipids Health Dis*. 2014;13(1):1–6.
 26. Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev*. 2012;41(21):7108–46.
 27. Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC. Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustain Chem Eng*. 2014;2(5):1063–71.
 28. Mbous YP, Hayyan M, Hayyan A, Wong WF, Hashim MA, Looi CY. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2017;35(2):105–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>
 29. Degam G. Deep Eutectic Solvents Synthesis , Characterization and Applications in Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. Theses Diss [Internet]. 2017;195. Available from: 1156
 30. García G, Aparicio S, Ullah R, Atilhan M. Deep eutectic solvents: Physicochemical properties and gas separation applications. *Energy and Fuels*. 2015;29(4):2616–44.
 31. Cromatografía de gases | un momento para recordar... [Internet]. [cited 2020 Apr 9]. Available from: <https://seabi.wordpress.com/2012/02/04/gas-chromatography/>
 32. Cromatografía de gases [Internet]. [cited 2020 Apr 14]. Available from: <https://es.slideshare.net/jmramos1978/cromatografa-de-gases-8754568>
 33. Qingren G, Shifang K. Study of AUC thermal decomposition kinetics in nitrogen by a non-isothermal method. *Thermochim Acta*. 1987;116(C):71–7.
 34. Cromatografía de gases: cómo funciona, tipos, partes, usos - Lifeder [Internet]. [cited 2020 Apr 14]. Available from: <https://www.lifeder.com/cromatografia-de-gases/>
 35. Lu W, Alam A, Pan Y, Wu J, Wang Z, Yuan Z. Bioresource Technology A new approach of microalgal biomass pretreatment using deep eutectic solvents for enhanced lipid recovery for biodiesel production. *Bioresour Technol* [Internet]. 2016;218:123–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.120>
 36. Jeevan Kumar SP, Vijay Kumar G, Dash A, Scholz P, Banerjee R. Sustainable green

solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal Res*
[Internet]. 2017;21:138–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.014>