

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



**EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL EPA CONTENIDO EN EL ACEITE
EXTRAÍDO DE LA MICROALGA *NANNOCHLOROPSIS OCEANICA***

Tesis para optar el grado de Magistra en Química que presenta

ING. YENNY MARIBEL ALLCCA CASTILLO

ASESORA

DRA. JUANA ROSA MARÍA ROBLES CAYCHO

JURADO

DRA. MORALES BUENO, EMMA PATRICIA

DRA. MATOS REYES, MARIELA NORMA

San Miguel, 2016

DEDICATORIA



*A Dios
y a mis amados padres*

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, se realizó con el fin de estudiar la estabilidad oxidativa del EPA en el tiempo del aceite extraído de la especie *Nannochloropsis oceanica*.

Se comparó la eficiencia de extracción del aceite a partir de la biomasa seca por dos métodos, uno en frío y otro en caliente, para contrastar la importancia del empleo de un método en frío, que permitiría una mejor extracción de carotenoides y la preservación de otros antioxidantes. Se evaluó determinando el rendimiento del método de extracción y el contenido de ácidos grasos presentes, confirmando que el método en frío, es más adecuado para un análisis de estabilidad.

Se analizó cualitativamente su capacidad antioxidante total por voltametría estimando la señal característica de los carotenoides para la muestra. Se analizó el efecto del β -caroteno en la muestra, para lo cual se realizó adiciones sucesivas de estándar y se observó su influencia positiva en la capacidad antioxidante total.

A la matriz se le realizó un test de almacenamiento a 37°C, por lapsos de tiempo de 0, 3, 6, 9, 12, 15 días, en los cuales se le realizó los análisis respectivos de cuantificación de EPA por GC, evaluación del contenido de β -caroteno por HPLC, un análisis cualitativo de la capacidad antioxidante total por voltametría y determinación del índice de peróxido. Los estudios que se realizaron en los carotenoides por las técnicas de HPLC y voltametría, por presentar contenido muy bajo en la matriz, no mostraron señales significativas. Para el estudio de estabilidad oxidativa del EPA en el tiempo, se analizó como variable de estudio la concentración del EPA respecto al análisis del índice de peróxido, mediante un análisis de correlación observando que existía una alta correlación inversa entre las dos metodologías. Esto indicaría que el análisis de índice de peróxido sería un buen indicador de la estabilidad del EPA en la matriz.

AGRADECIMIENTOS

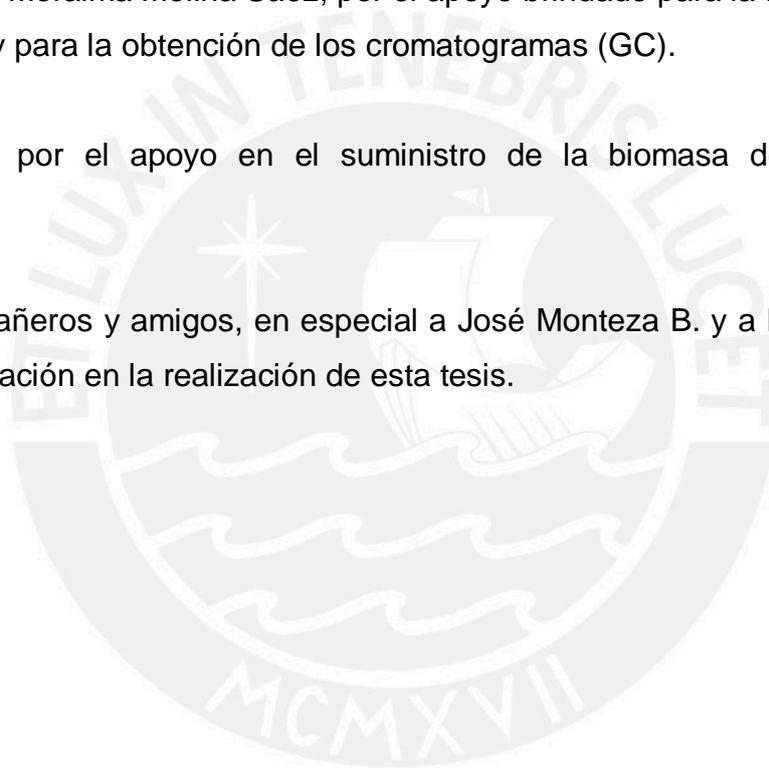
Estoy muy agradecida a la subvención otorgada por el FONDECYT – CONCYTEC en virtud del CONVENIO DE GESTIÓN N°012-2013-FONDECYT, con el que se ha financiado mis estudios de posgrado.

A los profesores y personal de la Escuela Posgrado y programa de Química de la PUCP, por su invaluable apoyo durante mi investigación.

A la Lic. Luz Moraima Molina Sáez, por el apoyo brindado para la realización de los análisis y para la obtención de los cromatogramas (GC).

A IMARPE, por el apoyo en el suministro de la biomasa de la especie estudiada.

A mis compañeros y amigos, en especial a José Monteza B. y a Pierr Ruiz O., por su motivación en la realización de esta tesis.



CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:	15
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo General	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4. MARCO DE REFERENCIA	16
4.1 LÍPIDOS.....	16
4.1.1 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS.....	17
4.1.1.1 MECANISMOS DE OXIDACIÓN DE LÍPIDOS	17
4.2 ÁCIDOS GRASOS	18
4.3 ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS IMPORTANTES	19
4.4 REACCIONES QUÍMICAS DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS	19
4.4.1 ETAPAS DE LA OXIDACIÓN ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS	19
4.4.2 FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES.....	20
4.4.2.1 ESTABILIDAD DEL RADICAL.....	21
4.4.3 ABSTRACCIÓN DE HIDRÓGENO.....	21
4.4.4 REACCIONES DE ADICIÓN ELIMINACIÓN.....	22
4.4.5 REACCIONES DE FRAGMENTACIÓN	22
4.4.6 REACCIÓN DE REORDENAMIENTO.....	23
4.4.7 REACCIÓN DE DESPROPORCIONAMIENTO.....	23
4.4.8 REACCIONES REDOX.....	24
4.4.9 DESCOMPOSICIÓN DE HIDRÓXIDOS	24
4.4.10 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN	25
4.5 CONTROL DE LA OXIDACIÓN DE LOS LÍPIDOS	26
4.5.1 QUELACIÓN CON IONES METÁLICOS	27
4.5.2 FOTOOXIDACIÓN.....	27
4.5.3 CONTROL DE LA PRESENCIA DE OXÍGENO	27
4.5.4 USO DE ANTIOXIDANTES	27
4.6 ANTIOXIDANTES.....	28
4.6.1 ANTIOXIDANTES EN LAS MICROALGAS.....	29
4.6.2 CAROTENOIDES	29
4.6.2.1 β -CAROTENO.....	30

4.6.3	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	31
4.6.3.1	MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	31
4.6.3.2	MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS.....	32
4.7	ESTUDIOS DE MICROALGAS MARINAS.....	33
4.7.1	CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA.....	33
4.7.1.1	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASAS.....	34
4.7.1.2	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEINAS.....	34
4.7.1.3	DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE CENIZAS.....	34
4.8	ESTABILIDAD.....	35
4.9	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	36
4.9.1	SISTEMA DE EXTRACCIÓN EN CALIENTE.....	37
4.9.2	SISTEMA DE EXTRACCIÓN EN FRIO.....	37
5.	METODOLOGÍA.....	38
5.1	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS.....	38
5.2	MUESTRA.....	41
5.2.2	GENERALIDADES.....	41
5.2.3	MATRIZ.....	42
5.3	PROCEDIMIENTOS.....	42
5.3.1	COMPOSICIÓN PORCENTUAL.....	42
5.3.1.1	DETERMINACIÓN DE GRASAS.....	42
5.3.1.2	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEINAS.....	43
5.3.1.3	DETERMINACIÓN DE CENIZAS.....	44
5.4	EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA MICROALGA.....	44
5.4.1	SISTEMA DE EXTRACCIÓN EN CALIENTE.....	45
5.4.2	SISTEMA DE EXTRACCIÓN EN FRIO.....	45
5.5	PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS.....	46
5.6	CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE EPA INICIAL.....	47
5.7	EVALUACIÓN DEL CONTENIDO INICIAL DE β -CAROTENO.....	48
5.8	MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR VOLTAMETRÍA.....	51
5.9	TEST DE ALMACENAMIENTO.....	52
5.10	CONTENIDO DE EPA EN EL TIEMPO.....	53
5.11	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS.....	53
5.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	54
6.	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	54
6.1	SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE.....	54

6.2	CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA SECA DE LA MICROALGA	59
6.3	PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS y CONTENIDO DE EPA INICIAL	60
6.4	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INICIAL DE β -CAROTENO	60
6.5	MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR VOLTAMETRÍA	61
6.6	TEST DE ALMACENAMIENTO	63
6.7	CONTENIDO DE EPA EN EL TIEMPO.....	64
6.8	DETERMINACIÓN DE VALOR DE PERÓXIDO.....	64
6.9	CONTENIDO DE β -CAROTENO	66
6.10	RESULTADOS ESTADÍSTICOS	66
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	68
7.1	SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE	68
7.2	CONTENIDO DE β -CAROTENO	69
7.3	MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR VOLTAMETRÍA	70
7.4	CONTENIDOS DE EPA EN EL TIEMPO E ÍNDICE DE PERÓXIDO	71
7.5	TEST DE ALMACENAMIENTO	71
7.6	RESULTADOS ESTADÍSTICOS	72
8.	CONCLUSIONES.....	72
9.	RECOMENDACIONES.....	73
10.	REFERENCIAS	75
11.	ANEXOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ácido linolénico.	19
Figura 2. Estructura del ácido eicosapentaenoico, EPA.	19
Figura 3. Reacciones en cadena en la peroxidación de lípidos.	20
Figura 4. Formación de radicales.	21
Figura 5. Abstracción de un hidrógeno a un centro alílico y su estabilización por resonancia.	22
Figura 6. Reacción de polimerización.	22
Figura 7. Fragmentación de radicales alcóxilos secundarios (RO•).	23
Figura 8. Reordenamiento de hidroperóxido	23
Figura 9. Ejemplos de reacciones de desproporcionamiento.	23
Figura 10. Participación de catalizadores de metales de transición en reacciones redox.	24
Figura 11. Reacción del ácido linolénico con oxígeno singlete.	25
Figura 12. Reacciones involucradas en la determinación de índice de peróxidos en un aceite, según el método iodométrico.	26
Figura 13. Reacciones de los antioxidantes primarios.	28
Figura 14. Estructura del β -caroteno.	30
Figura 15. Degradación del β -caroteno.	30
Figura 16. Ejemplo de una onda potencial en la voltametría de pulso diferencial (VPD).	32
Figura 17. Comparación del contenido porcentual de grasas y EPA, en ambos métodos de extracción.	56
Figura 18. Contenido de ácidos grasos en muestra obtenida por el método de extracción de soxhlet.	57
Figura 19. Contenido de ácidos grasos en muestra obtenida por el método de extracción de Bligh y Dyer modificado.	58
Figura 20. Cromatograma del estándar para β -caroteno totales a 0,3 ppm en diclorometano / hexano (1: 49).	61
Figura 21. Cromatograma para 75 mg de muestra de extracción sin degradación de la matriz identificando β -caroteno totales.	61
Figura 22. Voltamogramas obtenidos por VPD, con extractos de zanahorias a diferentes concentraciones.	62
Figura 23. Voltamogramas obtenidos por VPD, a diferentes adiciones sucesivas del estándar β -caroteno a la matriz en DCM / ETOH (1: 1, v / v).	63
Figura 24. Disminución del contenido de EPA en el tiempo a 37 °C.	64
Figura 25. Curva de calibración para la determinación del índice de peróxido, para la matriz.	65
Figura 26. Valores de concentración de peróxido a través del tiempo, para la matriz.	65
Figura 27. Prueba de correlación para los estudios en el tiempo del contenido de EPA y el índice de peróxido.	67
Figura 28. Certificado del Estándar de GLC 538.	79
Figura 29. Certificado del Estándar de PUFA 1	80

Figura 30. Certificado del Estándar de PUFA 3.	81
Figura 31. Cromatogramas para la determinación del β -caroteno en el tiempo por HPLC para la matriz perteneciente al día 0., leídos a 448, 445, 450 y 478 nm.....	82
Figura 32. Voltamograma obtenidos por VPD, obtenido en la determinación de capacidad antioxidante total en el tiempo para la matriz perteneciente al día 0.	83



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de metilésteres en el estándar GLC 538.....	38
Tabla 2. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases.....	46
Tabla 3. Condiciones de operación del equipo HPLC.	48
Tabla 4. Uso de la gradiente en HPLC.	49
Tabla 5. Parámetros de las mediciones voltamétricas.	52
Tabla 6. Porcentaje de grasas y EPA contenido en la muestra, según métodos en frío y caliente.....	55
Tabla 7. Tabla ANOVA para comparación del porcentaje de grasas.....	55
Tabla 8. Tabla ANOVA para comparación del porcentaje de EPA.	56
Tabla 9. Perfil de ácidos grasos en la muestra obtenida por soxhlet.	58
Tabla 10. Contenidos de EPA en mg / 100 mg aceite, según métodos de extracción. 59	
Tabla 11. Composición de la biomasa.	60
Tabla 12. Precisión de los resultados para la determinación del contenido de EPA y el índice de peróxido.....	67
Tabla 13. Contenido de EPA en el tiempo.....	82
Tabla 14. Índice de peróxido a través del tiempo.....	83

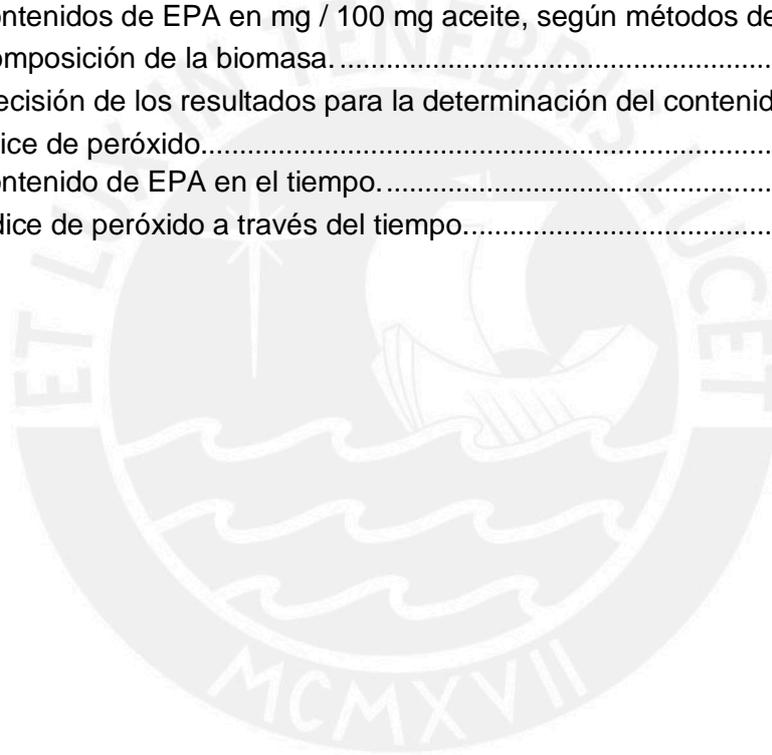


TABLA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AGPI-CL:	Ácido graso poliinsaturado de cadena larga.
EPA	: Ácido eicosapentaenoico.
DHA	: Ácido docosahexaenoico.
H / I	: Sistema de solventes de hexano e isopropanol.
CG	: Cromatógrafo de gases.
HPLC	: High performance liquid chromatography.
ECS	: Electrodo de calomelano saturado.
AUC	: Area Under Curve.
E	: Potencial.
V	: Voltio
VPD	: Voltametría de pulso diferencial.
PUFA	: Poly-unsaturated fatty acid.
PRD	: diferencia promedio relativo (de sus siglas en inglés).
BHT	: butil hidroxitolueno.
BHA	: butil hidroxianisol.
PG	: galato de propilo.
ROS	: Especies reactivas de oxígeno (de sus siglas en inglés).
LMWA	: Antioxidantes de bajo peso molecular (de sus siglas en inglés).
RSD	: Desviación estándar relativa (de sus siglas en inglés).

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se han llevado a cabo diversas investigaciones en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, específicamente los omega-3 (omega-3 AGPI-CL), los cuales poseen importantes aplicaciones nutracéuticas y farmacéuticas. Entre los más importantes se puede destacar al ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5*n*-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6*n*-3), donde en la mayoría de países la ingesta diaria recomendada de estos nutrientes no es alcanzada (Durme, Goiris, Winne, Cooman, & Muylaert, 2013; Ryckebosch et al., 2013; Yao, Gerde, Lee, Wang, & Harrata, 2015). Debido a las aplicaciones anteriormente citadas se justifica la búsqueda de nuevas fuentes para estos nutrientes, donde las principales podemos encontrarlas en su mayoría en especies hidrobiológicas y algunos vegetales. Estos últimos requieren para su cultivo una importante área agrícola y fuente de agua potable, por lo tanto es importante la exploración de otras fuentes que necesiten menos recursos. En este contexto, una alternativa a futuro que viene siendo estudiada, son las microalgas, las cuales para su producción emplean menos recursos (Chi & Takiguchi, 2015; Gouveia & Oliveira, 2009; He, Rodgers, Marshall, & Hsu, 2011).

Adicionalmente a diferencia de otras fuentes comerciales de aceites con omega-3, las especies de microalgas no presentan un alto porcentaje de contenido en grasas, pero presentan como ventajas el tener un importante crecimiento exponencial, se pueden monitorear los procesos de obtención de las mismas (Chi & Takiguchi, 2015) y los ácidos grasos extraídos en sus aceites son de buena calidad. Por lo anterior, se considera que presentan una buena productividad de ácidos grasos (Gouveia & Oliveira, 2009; Ryckebosch et al., 2013).

Las microalgas como fuente alternativa poseen desventajas, estas principalmente se deben a que los ácidos grasos de interés, EPA y DHA, están presentes en un medio (el aceite extraído) muy oxidante y oxidable. Estos procesos de oxidación se deben a la naturaleza autooxidativa del

medio y también se da por la hidrólisis que sufre como consecuencia de las enzimas hidrolíticas que hayan permanecido después de la extracción y aún estén activas (Ryckebosch et al., 2013; Servaes, 2015). Esta autooxidación ocasiona disminución del contenido de EPA y DHA, también formación de productos indeseables, los cuales ocasionan olores y sabores desagradables, además de la posible formación de compuestos nocivos para la salud. Todo esto desfavorece la calidad alimentaria, así como las aplicaciones nutracéuticas y farmacéuticas (Durme et al., 2013; Ryckebosch et al., 2013). De allí la importancia de la estabilidad que presenten los componentes contenidos en el medio, los cuales puedan retardar o inhibir los procesos de oxidación (Ryckebosch et al., 2013).

Ryckebosch en el 2013, reportó un trabajo en donde comparó aceites extraídos de ocho especies, cuatro que provenían de microalgas fotoautotróficas contra dos aceites extraídos de peces, una del Krill y otra de una microalga heterótrofa. Este estudio demostró que los aceites que provenían de especies de microalgas fotoautotróficas, presentaban una estabilidad de tipo oxidativa e hidrolítica superior frente a los otros aceites. Siendo la evaluación de la estabilidad un proceso aun complejo, por la diversidad de compuestos formados en la oxidación y por los factores antioxidantes presentes en la composición de la matriz. Por lo que se recomendó estudiar estos factores, como es el caso de los carotenoides que presenta un alto poder antioxidante (Ryckebosch et al., 2013).

Así mismo, en el caso de microalgas fotoautotróficas como el género *Nannochloropsis*, al ser productores primarios de ácidos grasos, presentan un mayor rendimiento energético en la producción de estos, respecto a las especies que consumen de ellas (Ryckebosch et al., 2013), por lo cual es un género atractivo como fuente de ácidos grasos de interés, EPA y DHA. Además en los estudios realizados por Huan He en el 2011 y Ryckebosch en el 2013, se mencionó que la microalga *Nannochloropsis sp.*, presenta un importante contenido en ácidos grasos poliinsaturados como el EPA (He et al., 2011; Ryckebosch et al., 2013). Debido a esto se seleccionó este género para realizar estudios en la presente investigación.

Koen Goiris en el 2012 presentó un trabajo para la determinación del poder antioxidante total para microalgas donde se evaluó para este género a la especie *Nannochloropsis oculata*. En este estudio se comparó métodos voltamétricos respecto a métodos espectrofotométricos y se demostró que los métodos voltamétricos fueron más adecuados para la cuantificación del poder antioxidante total, al mostrar mejores resultados en dicha microalga (Goiris, De Vreese, De Cooman, & Muylaert, 2012).

Debido a que la estabilidad del medio extraído depende principalmente de los componentes que lo constituyen y estas a su vez, de la adecuada metodología de extracción, existen estudios donde se realiza una optimización del procedimiento de extracción de lípidos para microalga, como lo realiza en el 2012 Ryckebosch para la especie de *Nannochloropsis salina* y en el 2013 lo emplea en las especies *Nannochloropsis gaditana* y *Nannochloropsis sp.* Además con esta metodología reportó una importante estabilidad oxidativa e hidrolítica en los aceites extraídos de este género (Ryckebosch et al., 2013; Ryckebosch, Muylaert, & Foubert, 2012).

En el presente trabajo de investigación del género *Nannochloropsis* se seleccionó a la especie *Nannochloropsis oceanica*, porque esta especie presenta en su composición alto contenido de EPA y se han realizado estudios para incrementar la acumulación de este ácido graso bajo diferentes regímenes de cultivo (Meng et al., 2015; Pan et al., 2016), por lo que es una interesante fuente alternativa de obtención de EPA. Entonces se buscó analizar la metodología propuesta por Ryckebosch para la extracción del aceite a partir de esta especie, que refiere a brindar un medio más estable, respecto a un método clásico de extracción. Para estimar su estabilidad oxidativa del medio más estable en el tiempo, siendo este un proceso complejo, se buscó analizar compuestos obtenidos que brindan efectos de más estabilidad para contener al EPA, por lo tanto en esta investigación se buscó determinar la composición de ácidos grasos y los carotenoides presentes, que darían poder antioxidante al medio. La especie fue obtenida del banco de germoplasma del IMARPE (Instituto del Mar del Perú).

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:

Teniendo en cuenta la importancia de las diversas aplicaciones nutraceuticas y farmacéuticas del EPA, que la ingesta diaria recomendada de este nutriente no es alcanzada, la necesidad de fuentes más productivas con el empleo de menos recursos, se justifica la búsqueda de fuentes como las microalgas que cumplen estas características. Dentro de las microalgas, las fotoautotróficas presentan un mayor rendimiento energético en su producción de ácidos grasos, además un estudio indicó que presentan mayor estabilidad frente a las especies heterótrofas, por lo que se prefirió su estudio.

En ese contexto, la especie *Nannochloropsis oceanica* que presenta un alto contenido de EPA, se eligió para el presente trabajo de investigación. Sin embargo, en los extractos obtenidos a partir de las microalgas que contienen al EPA, uno de los problemas que afronta es la oxidación y de allí la importancia de analizar la obtención en un medio estable. Por lo cual se propuso contribuir con el estudio de estimar la estabilidad oxidativa del EPA en el tiempo para el aceite extraído de esta especie, analizando la composición de ácidos grasos y de antioxidantes presentes como el β -caroteno.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estudiar la estabilidad del EPA en el tiempo, en el aceite extraído de la microalga *Nannochloropsis oceanica*.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la extracción más eficiente para la obtención de EPA con una composición adecuada para favorecer el estudio de estabilidad, por la comparación entre dos métodos: una prueba clásica de

extracción en caliente por soxhlet frente a un método en frío (Ryckebosch et al., 2012).

- Cuantificar los contenidos iniciales de EPA, β -caroteno y la composición de ácidos grasos presentes en el aceite extraído de la microalga de la especie *Nannochloropsis oceanica*, empleando GC y HPLC.
- Medir la capacidad antioxidante inicial del aceite extraído de la microalga de la especie *Nannochloropsis oceanica*, por la técnica Voltamétrica.
- Analizar la estabilidad del EPA en el tiempo extraído del aceite de la microalga de la especie *Nannochloropsis oceanica* en base al índice de peróxido.
- Evaluar la presencia del carotenoide β -caroteno, inicial y su influencia a través del tiempo en el aceite extraído de la microalga de la especie *Nannochloropsis oceanica*.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1 LÍPIDOS

Existen lípidos simples o neutros y lípidos complejos, los primeros al ser hidrolizados nos darán productos más simples, donde encontraremos fácilmente los ácidos grasos o derivados; por su parte los lípidos complejos producen tres o más productos primarios. En las microalgas encontramos los lípidos simples principalmente como reserva energética, entre ellas las ceras, diacilglicéridos, triglicéridos y esteroides (Bertha & Voltolina, 2007).

Las ceras marinas presentan mayores insaturaciones que las provenientes de otras fuentes. Los lípidos complejos mayormente forman parte de membranas celulares y los constituyen glicerofosfolípidos, gliceroglicolípidos y esfingolípidos (Bertha & Voltolina, 2007).

4.1.1 OXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La oxidación de los lípidos de los alimentos genera subproductos que deterioran su calidad, al originar sabores y olores desagradables en el producto, disminuir su valor nutritivo y en el caso más nocivo, estos subproductos pueden llegar a ser tóxicos (Christie, 2003).

El periodo de inducción es lento, llamado así cuando la composición del medio retarda el proceso de oxidación. Una vez cuando el lípido se deteriora el proceso es rápido y da la formación de los olores. Estos olores y sabores son rancios y se pueden originar por vía hidrolítica (enzimas) y por vía oxidativa, dando lugar a la denominada rancidez oxidativa (Wasowicz et al., 2004).

Los problemas para el análisis de la oxidación lipídica se dan por ser un proceso complejo, con formación de productos inestables, que dan la formación rápida de otros compuestos. La mixtura de compuestos deriva en la variación de los mecanismos presentes, que complica la evaluación de algún estatus oxidativo (Wasowicz et al., 2004).

La oxidación se clasifica, por los productos formados en: oxidación primaria y secundaria. La oxidación primaria genera peróxidos; mientras la secundaria productos volátiles, los cuales generarían los olores típicos mencionados (Wasowicz et al., 2004).

Existen varios factores que influyen el grado de oxidación, como las condiciones de almacenamiento (temperatura, luz, oxígeno, metales y enzimas, contenido de ácidos grasos insaturados y la presencia de antioxidantes (inhibidores) o prooxidantes (catalizadores). (Wasowicz et al., 2004).

4.1.1.1 MECANISMOS DE OXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Los mecanismos de oxidación de lípidos en general se dan por tres vías: mecanismos iniciados por radical libre, la fotooxidación, cuando un

oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), es decir en un estado excitado por la luz, activa el proceso y las actividades lipoxigénicas, por las enzimas que puedan estar presentes (Wasowicz et al., 2004).

Las etapas de la oxidación son: iniciación, formación del radical; propagación, cuando el radical libre formado produce la formación de otros radicales y finalmente terminación, cuando hay un exceso de formación de los radicales y ellos reaccionan entre sí formando productos no radicalarios (Wasowicz et al., 2004).

4.2 ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos constituyen parte de los lípidos, estos se encuentran unidos por un enlace éster al glicerol o a otros alcoholes como el colesterol, o por enlaces amidas a ciertas bases de cadena larga, bases esfingoides y poco menos frecuente a otras aminas (Bertha & Voltolina, 2007).

Los ácidos grasos pierden polaridad conforme se incrementa la longitud de la cadena. Si la estructura es totalmente saturada será lineal y dará lugar a enlaces Van Der Waals que formarán entre sí empaquetamientos hasta llegar a formas cristalinas. Mientras que si presentan insaturaciones, estas originan ángulos a las cadenas largas que dificultarán la formación de empaquetamientos, lo que ocasiona que sean menos cristalizables que las saturadas (Bertha & Voltolina, 2007).

Los ácidos grasos insaturados de las microalgas, al ser biológicos, sólo presentan insaturaciones tipo *cis* (Z), debido a que en su síntesis se emplean unidades acetato de dos carbonos. Esto le confiere propiedades únicas, que aún se vienen estudiando a fondo por su alto valor nutricional (Frankel, 2005).

4.3 ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS IMPORTANTES

Los más importantes son de cadena larga poliinsaturados de tipo omega 3 (ω 3) y omega 6 (ω 6). Los ω 3 incluyen al DHA y EPA, que son de alto valor biológico y nutritivo. Los omega 3 derivan del ácido linolénico: ácido cis-9, cis-12, cis-15-octadcatrienoico (C18:3 n -3) (Figura 1). Se muestra al EPA, C20:5 n -3, en la Figura 2 (Ryckebosch et al., 2013).



Figura 1. Estructura del ácido linolénico.

Fuente: Frankel, 2005



Figura 2. Estructura del ácido eicosapentaenoico, EPA.

Fuente: Frankel, 2005.

4.4 REACCIONES QUÍMICAS DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

Los compuestos insaturados son particularmente susceptibles de ser atacados por los radicales libres, por ello los aceites que contienen ácidos grasos poliinsaturados, sufren procesos de peroxidación por mecanismos de radicales libres (Wasowicz et al., 2004).

4.4.1 ETAPAS DE LA OXIDACIÓN ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

Este proceso espontáneo, llamado también peroxidación de lípidos, es una reacción en cadena que presenta cuatro etapas principales: iniciación, propagación, ramificación de cadenas y terminación (Wasowicz et al., 2004), como se muestra en la Figura 3, donde se observa:

- La etapa 1: iniciación, se da por abstracción homolítica del hidrógeno de un grupo metileno que da lugar a la formación del radical R•.

- La etapa 2: propagación, cuando el radical reacciona con un oxígeno singlete (1O_2) y forma el radical peróxido, $ROO\cdot$.
- La etapa 3: ramificación, el radical peróxido reacciona con un ácido graso insaturado y forma hidroperóxidos ($ROOH$) y un nuevo $R\cdot$.
- Las etapas 4, 5 y 6: terminaciones, formación de productos no radicalarios.

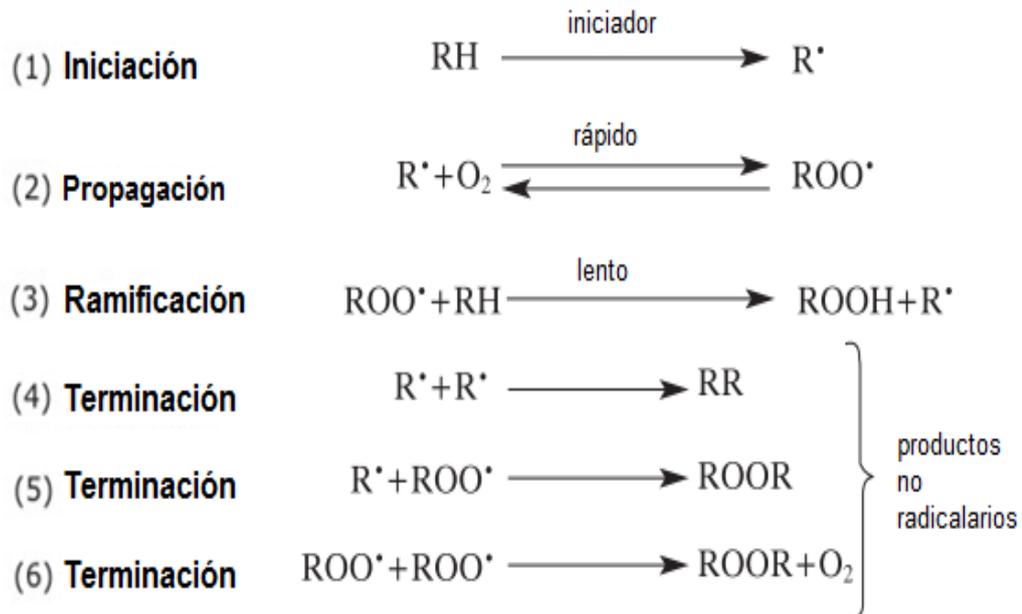


Figura 3. Reacciones en cadena en la peroxidación de lípidos.

Fuente: Wasowicz et al., 2004.

4.4.2 FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES

Las reacciones orgánicas pueden dividir a los enlaces covalentes vía homolítica en radicales (Figura 4-a) o vía heterolítica en iones (Figura 4-b). La vía homolítica que produce los radicales libres, es la que oxida en un proceso continuo y espontáneo mientras los radicales libres persistan en la composición del aceite. Este proceso se inicia por la presencia de ciertos componentes, como las trazas de metal y peróxidos. Estas reacciones siguen la siguiente regla sencilla, la interacción de dos radicales libres generan un compuesto no radical, pero la interacción de un radical y un no radical genera un nuevo radical libre. Un radical libre puede atacar los electrones π del doble enlace para transformarlo en otro radical (Frankel, 2005).

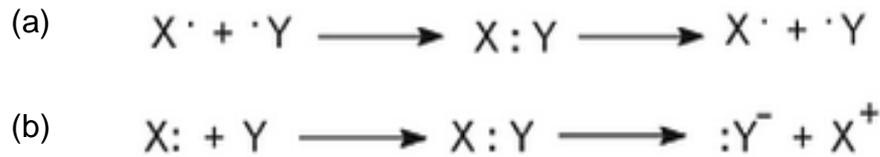


Figura 4. Formación de radicales.

(a) vía homolítica, (b) vía heterolítica. Fuente: Frankel, 2005.

4.4.2.1 ESTABILIDAD DEL RADICAL

Se analiza en base a la estabilidad termodinámica y depende de la facilidad de disociación del enlace R-H para formar los radicales. En ácidos grasos poliinsaturados depende de la conjugación del doble enlace y la deslocalización de electrones estabilizados por resonancia (Frankel, 2005).

La estabilidad cinética está controlada por factores estéricos, cuanto mayor es el impedimento, menor será la reactividad del radical y en consecuencia, será más estable. Por ejemplo, si el radical alílico presenta grupos voluminosos, el intermediario radicalario tendrá mayor estabilidad cinética, lo que le brinda importantes propiedades antioxidantes porque interrumpe las etapas de propagación de la cadena de peroxidación (Frankel, 2005).

4.4.3 ABSTRACCIÓN DE HIDRÓGENO

La abstracción de un hidrógeno se da en ácidos grasos insaturados que contienen un centro alílico, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ por parte de un radical libre como se observa en la Figura 5 (Frankel, 2005).

La formación de intermediarios alílicos ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$) es una característica importante de reacción de radicales libres, que determinan la naturaleza de los productos de la oxidación de los lípidos. Estos se estabilizan porque forman estructuras resonantes debido a la naturaleza del grupo alilo, que da lugar a una estructura híbrida resonante que

deslocaliza al radical en la estructura de los tres carbonos (Figura 5). Los radicales de ácidos grasos conjugados poliinsaturados también se estabilizan por resonancia (Frankel, 2005).

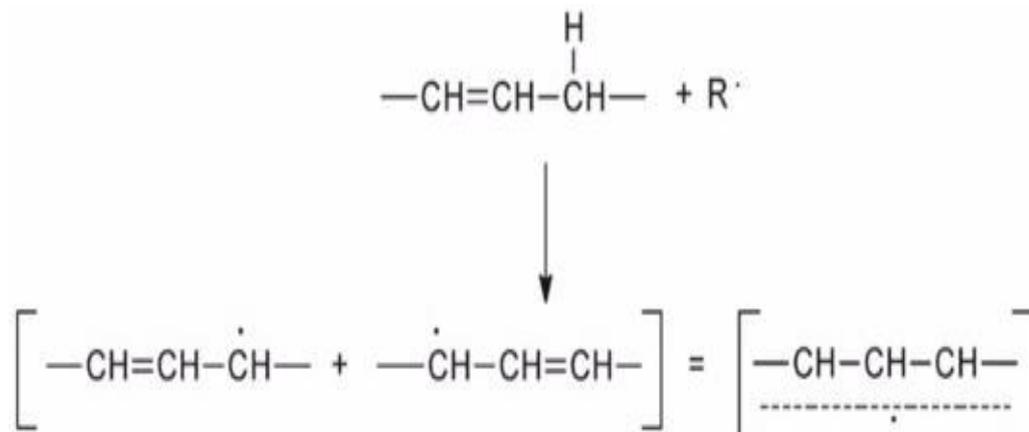


Figura 5. Abstracción de un hidrógeno a un centro alílico y su estabilización por resonancia.
Fuente: Frankel, 2005.

4.4.4 REACCIONES DE ADICIÓN ELIMINACIÓN

Los radicales peróxilos alílicos ROO• son susceptibles a reacciones de ciclación y polimerización, al unirse con un ácido graso insaturado produce un dímero de peróxido como se muestra en la Figura 6 (Frankel, 2005).

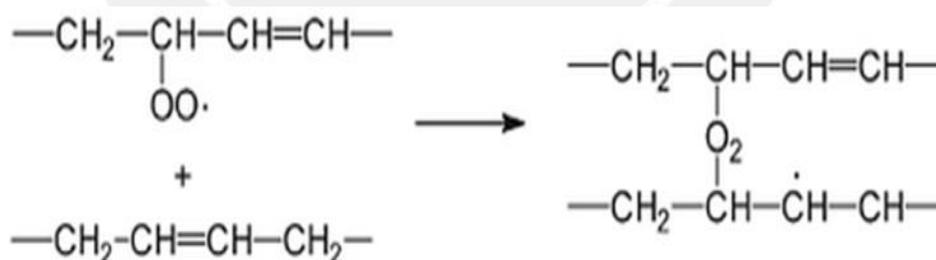


Figura 6. Reacción de polimerización.
Fuente: Frankel, 2005.

4.4.5 REACCIONES DE FRAGMENTACIÓN

Los radicales alcóxilos secundarios (RO•) son susceptibles de eliminación o ruptura en la posición β para formar aldehídos u otros compuestos volátiles, ver Figura 7. Esta reacción se da con ácidos grasos poliinsaturados, en presencia de un metal catalítico o en condiciones de temperatura elevada (Frankel, 2005).



Figura 7. Fragmentación de radicales alcóxilos secundarios (RO•).

Fuente: Frankel, 2005.

4.4.6 REACCIÓN DE REORDENAMIENTO

Un hidroperóxido sufre un reordenamiento al perder un radical hidrógeno y eliminar oxígeno a partir de un radical peróxido intermediario, Figura 8. Esto le brindará mixtura de posiciones e isomería de productos (Frankel, 2005).

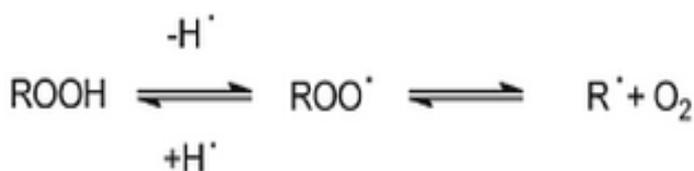


Figura 8. Reordenamiento de hidroperóxido

Fuente: Frankel, 2005.

4.4.7 REACCIÓN DE DESPROPORCIONAMIENTO

Un hidroperóxido se convertirá en cetona por transferencia de un radical de hidrógeno proveniente de un radical alcóxilo intermediario. También podría formar mixtura de cetona con compuestos hidróxidos, como se observa en la Figura 9 (Frankel, 2005).

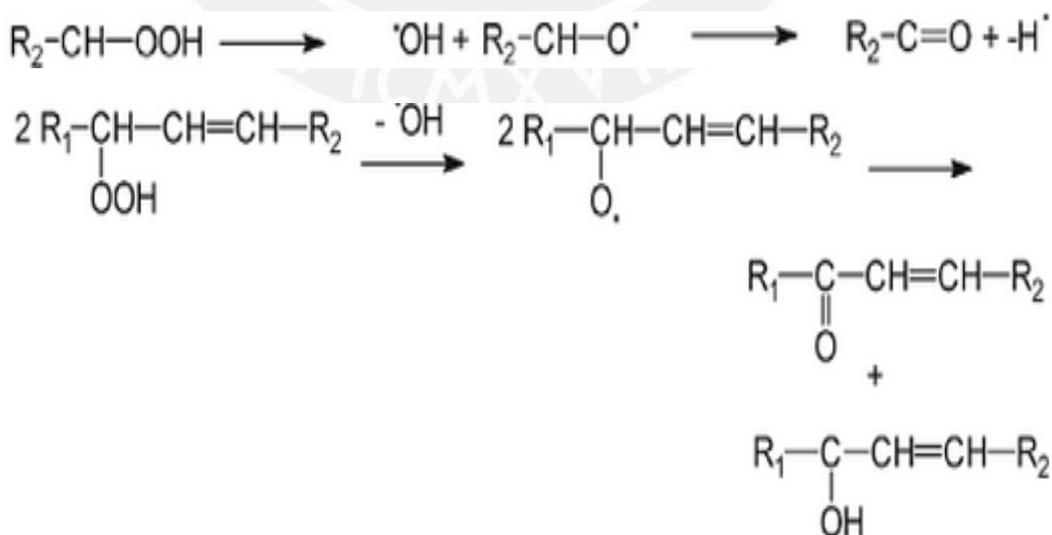


Figura 9. Ejemplos de reacciones de desproporcionamiento.

Fuente: Frankel, 2005.

4.4.8 REACCIONES REDOX

Los catalizadores de metales de transición pueden dar inicio a la reacción radicalaria del ácido graso o finalizarla debido a su capacidad de oxidarse o reducirse. En la Figura 10 se observa que la iniciación puede ser por reducción (a) o por oxidación (b) del metal y en (c) se muestra la terminación por reducción del metal (Frankel, 2005).

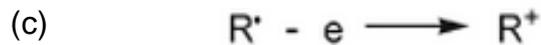
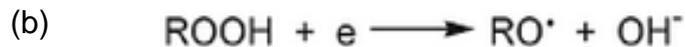
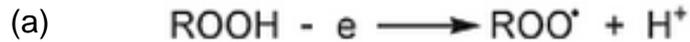


Figura 10. Participación de catalizadores de metales de transición en reacciones redox.

Iniciación (a) y (b), terminación (c).

Fuente: Frankel, 2005.

4.4.9 DESCOMPOSICIÓN DE HIDRÓXIDOS

La formación de radicales se produce de diversas formas, una de ellas es la descomposición de hidroperóxidos, los cuales producirán radicales oxhidrilo (OH^{\bullet}) y alcóxilo (RO^{\bullet}). Sucede cuando un oxígeno singlete ataca a un doble enlace del ácido graso insaturado, como se muestra en la Figura 11 (Miller, 2001).

La descomposición de hidróxidos puede dar productos como: aldehídos, cetonas, alcoholes, alquenos y/o ácidos hidroxilados, que en su mayoría, originan la presencia de olores desagradables en la muestra. (Frankel, 2005).

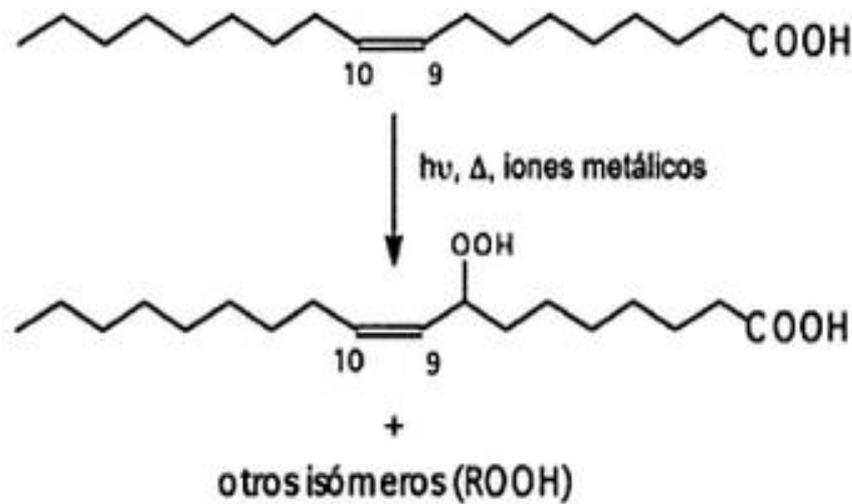


Figura 12. Reacciones involucradas en la determinación de índice de peróxidos en un aceite, según el método iodométrico. Fuente Miller 2001.

Existe un método más adecuado para los productos con alto contenido de carotenoides, este es el método modificado de la Federación Internacional de Lácteos (IDF) (Hornero, Pérez, & Mínguez, 2001), que se basa en la oxidación del Fe (II) a Fe (III), este último forma un complejo rojizo Fe(III)-tiocianato, que se determina por espectrofotometría UV-vis, el cual absorbe en 470 nm. Como los carotenoides presentes en la muestra absorben en el rango 400 a 600 nm, el método modificado realiza una pre-extracción de los pigmentos para evitar posibles interferencias (Hornero et al., 2001).

4.5 CONTROL DE LA OXIDACIÓN DE LOS LÍPIDOS

La oxidación de los lípidos perjudica la calidad de éstos en sus aplicaciones nutraceuticas y farmacéuticas, por lo que son necesarios métodos de control efectivos. Entre éstos tenemos el uso de inactivadores metálicos o agentes quelantes, uso de antioxidantes, control de la exposición al aire, a la luz e hidrogenación (Frankel, 2005; Wasowicz et al., 2004). También existe gran interés en el uso de

antioxidantes naturales, como los compuestos fenólicos y los flavonoides, que se encuentran en investigación en cuanto a sus mecanismos de acción (Durme et al., 2013; Ryckeboosch et al., 2013).

4.5.1 QUELACIÓN CON IONES METÁLICOS

Una forma de inhibir la peroxidación y formación de radicales libres es mediante el uso de inactivadores metálicos o agentes quelantes, estos conducen a la formación de complejos con los metales. Por ejemplo el hierro y cobre pueden estar presentes en los aceites ya sea en forma ionizada o compleja y son muy perjudiciales para la oxidación pero al ser nutrientes esenciales, no es conveniente eliminarlos y se procede a inactivarlos (Frankel, 2005).

4.5.2 FOTOOXIDACIÓN

La exposición a la luz debe ser controlada para evitar la fotooxidación, debido a que inicia la peroxidación, al transformar el oxígeno triplete en oxígeno singlete. Esto conduce a la formación de hidroperóxidos, que se descomponen para formar radicales libres (Wasowicz et al., 2004).

4.5.3 CONTROL DE LA PRESENCIA DE OXÍGENO

Otra forma muy empleada es minimizar la presencia de oxígeno, porque la peroxidación de lípidos requiere de oxígeno y radicales libres. Una de las formas de desplazar el oxígeno es el sellado al vacío, también por acción del gas nitrógeno (Frankel, 2005).

4.5.4 USO DE ANTIOXIDANTES

Para la aplicación se sella al vacío y se remueve los radicales libres del producto mediante la acción de estos antioxidantes. Ellos actúan como recogedores de radicales libres y pueden ser naturales o sintéticos. Antioxidantes naturales, comúnmente percibidos como seguros, como los ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles, ácido ascórbico y carotenoides (Wasowicz et al., 2004). Entre los sintéticos se presentan el

butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA), y galato de propilo (PG) y ter-butyl hidroquinona (TBHQ) (Frankel, 2005).

4.6 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes inhiben o retardan la oxidación y se clasifican por su mecanismo de acción en antioxidantes primarios y antioxidantes secundarios. En la Figura 13 Los antioxidantes primarios rompen la cadena de propagación de los radicales libres, como aceptores de ellos (a) o estabilizando al electrón deslocalizado (b). Los más importantes son: tocoferoles, BHT, BHA, y PG. Los antioxidantes secundarios, son capaces de actuar, como: reductores y quelantes de metales, eliminadores de oxígeno y agentes reductores, inactivadores de oxígeno singletes, como es el caso de los carotenoides (Wasowicz et al., 2004).

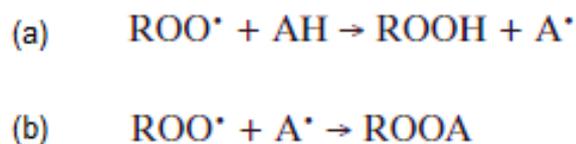


Figura 13. Reacciones de los antioxidantes primarios.

Fuente: Wasowicz et al., 2004

Un factor importante que afecta a la eficacia de un antioxidante es la tendencia del radical que produce a someterse a transferencia con el sustrato lipídico. La eficacia de los antioxidantes por lo tanto se puede disminuir por la reacción de oxidación directa, y por una reacción de transferencia de cadena de hidrógeno del radical antioxidante con el sustrato de lípidos para reiniciar las cadenas (Frankel, 2005).

En la extracción de lípidos los antioxidantes son arrastrados por su similar solubilidad con solventes orgánicos, como cloroformo, benceno, hexano, etc., por lo tanto se encuentran presentes en el aceite extraído y contribuyen a la estabilidad, además de tener un alto poder nutricional. Estos antioxidantes también pueden ser degradados a través de los procesos de peroxidación de lípidos (Hornero et al., 2001).

4.6.1 ANTIOXIDANTES EN LAS MICROALGAS

La mayoría de los antioxidantes naturales se derivan de fuentes vegetales. En el caso de las microalgas, es una fuente alternativa de antioxidantes debido a su naturaleza fotótrofas, debido a que son sometidas a un intenso estrés oxidativo generado por especies reactivas de oxígeno (ROS), durante la fotosíntesis. Por lo que poseen mecanismos de defensa para prevenir el daño celular por estos ROS, enzimas antioxidantes y los antioxidantes de bajo peso molecular (LMWA). Estos LMWA incluyen carotenoides, glutatión, vitaminas (ascorbato y tocoferoles), y compuestos fenólicos (Goiris et al., 2012).

En microalgas los carotenoides se han estudiado intensamente, y algunas especies ya se utilizan como una fuente comercial de carotenoides (astaxantina y β -caroteno). Otra clase importante de LMWA son los compuestos fenólicos que contribuyen significativamente a la actividad antioxidante en microalgas (Goiris et al., 2012; Ryckebosch et al., 2013).

En el fenol el hidrógeno de un grupo hidroxilo es extraído con cierta facilidad por los radicales libres los que se estabilizan convirtiéndose en especies no radicalarias. Mientras el otro componente ($\text{PhO}\cdot$), se estabiliza por resonancia del anillo aromático y pierde su reactividad (Frankel, 2005):



Sin embargo bajo ciertas condiciones los antioxidantes fenólicos son menos eficaces, ya que son menos estabilizado por resonancia y tienen una tendencia a actuar como la cadena de portadores mediante la generación de nuevos radicales oxidantes y convertirse en prooxidantes.

4.6.2 CAROTENOIDES

En el caso de los carotenoides, existen más de 600 carotenoides y se les encuentran en forma libre, como ésteres de ácidos grasos o como

glicósidos (Martinez, 2003). Los carotenoides son solubles en grasas y pueden fijar radicales libres y eliminar el singlete del oxígeno. También hay indicios de que el contenido y composición del carotenoide juega un papel importante en la estabilidad oxidativa de los aceites extraídos de ciertas especies de microalgas (Ryckebosch et al., 2013). En la Figura 14 se muestra uno de los carotenoides importantes, el β -caroteno.

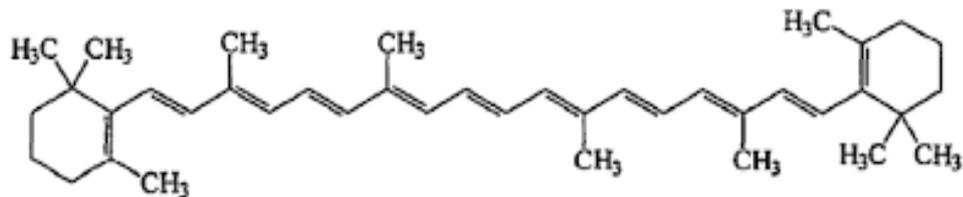


Figura 14. Estructura del β -caroteno.
Fuente: (Miller, 2001)

4.6.2.1 β -CAROTENO

En el caso del β -Caroteno, estos son muy eficaces en el bloqueo del oxígeno singlete (1O_2) y en la expulsión de otras especies reactivas de oxígeno (ROS). Sin embargo se podría dar alteraciones a su eficacia como un antioxidante bajo una serie de factores, como la interacción con otros antioxidantes y actuar como prooxidante. Así la molécula de carotenoide al oxidarse o fragmentarse, puede generar productos diferentes y posiblemente perjudiciales. También, por la interacción con ROS dando como resultado la formación de un radical peroxilo carotenoide que a su vez inicia más lipoperoxidación. (Lowe, Vlismas, & Young, 2003). En la Figura 15 se observa una fragmentación en un proceso de degradación del β -Caroteno en β -iononas.

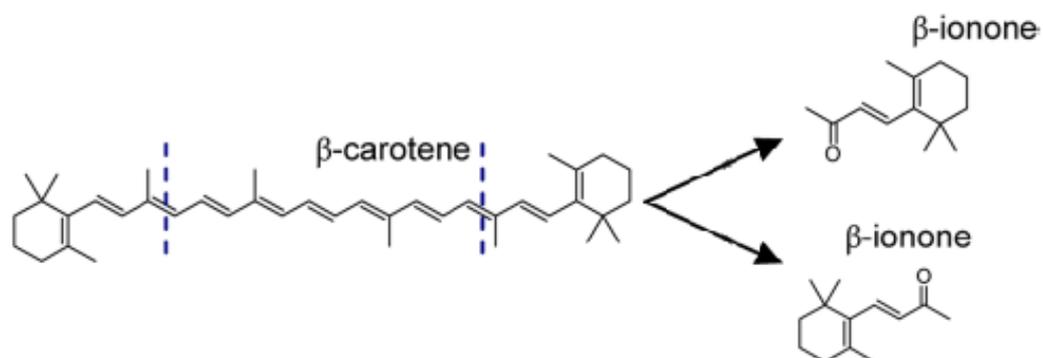


Figura 15. Degradación del β -caroteno.
Fuente: (Gallon et al., 2013)

4.6.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante se mide en base a las propiedades de los componentes presentes en la matriz. Estas pueden explicarse por la capacidad de atrapar radicales libres, quelar metales activos, interrumpir la peroxidación lipídica, incrementar la actividad enzimática antioxidante, así como también por sus mecanismos de aceptación y donación de electrones (Frankel, 2005).

Entonces por el método de extracción, que determina los componentes obtenidos en el medio, se ha comprobado que la especie *Nannochloropsis sp.*, muestra mayor estabilidad oxidativa cuando la extracción se realiza con mezcla hexano / isopropanol (3:2), que solo con hexano. Esto se debería al sinergismo presente entre los componentes antioxidantes extraídos, por la naturaleza de la combinación de mezcla de solventes más polar. Se pueden presentar polifenoles, otros carotenoides más polares, entre otros compuestos. (Ryckebosch et al., 2013).

4.6.3.1 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Existen varios métodos, la mayoría están basados en reacciones químicas en las que participan los antioxidantes, cuyos productos muestran diferente color según el estado de oxidación en el que se encuentren y que se mide por espectrofotometría. Entre los métodos más frecuentes se tiene, la determinación del potencial antioxidante total (TRAP de sus siglas en inglés), la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC de sus siglas en inglés) y el poder antioxidante reductor del hierro (FRAP de sus siglas en inglés). Debido a que las microalgas poseen un alto contenido de compuestos coloreados como las clorofilas y los carotenoides, los cuales pueden interferir en los métodos espectrofotométricos, existe como alternativa el uso de los métodos voltamétricos (Goiris et al., 2012).

4.6.3.2 MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS

Estos métodos ofrecen algunas ventajas: se trata de ensayos rápidos, las muestras no requieren de una preparación laboriosa, se pueden emplear tanto para extractos hidrofílicos como lipofílicos y en muestras intensamente coloreadas. Las señales detectadas en los voltamogramas son usadas como indicadores del potencial redox de la mayoría de antioxidantes presentes en la muestra, por lo cual se puede cuantificar la capacidad antioxidante total al determinar el área bajo la curva (AUC de sus siglas en inglés). Se ha determinado que para el género *Nannochloropsis*, estos métodos muestran buenos resultados. (Goiris et al., 2012).

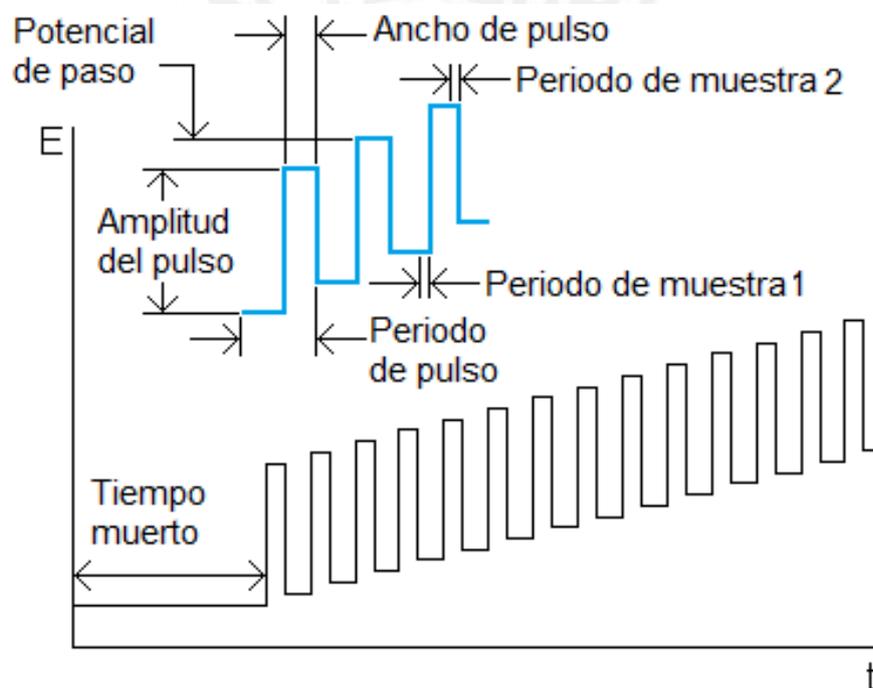


Figura 16. Ejemplo de una onda potencial en la voltametría de pulso diferencial (VPD).

Fuente: basinc, 2016

La voltametría de pulso diferencial (VPD) es un método voltamétrico que permite el análisis de sistemas redox, con la ventaja de ser un método más rápido y sensible. Estos métodos de pulso se basan en la aplicación de pequeños pulsos crecientes (definido por el potencial de paso) de amplitud constante, donde la lectura se realiza antes y después del pulso

de aplicado. El periodo entre los registros de las muestras está dado por el ancho de pulso (Bard & Faulkner, 2001; Kounaves, 1997). En la Figura 16 se muestra la forma de la onda del potencial aplicado en este método en el tiempo, donde la corriente se registra en los periodos de muestra 1 y 2.

4.7 ESTUDIOS DE MICROALGAS MARINAS

Las microalgas son microorganismos unicelulares hasta el momento han sido identificadas alrededor de 30.000 especies en ambientes de agua dulce, salada y en ambientes más extremos. Su diámetro varía típicamente entre 2 y 30 micras. Estas sintetizan proteínas, pigmentos y grasas, particularmente ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Las microalgas eucariotas, están protegidas por una membrana plasmática rica en lípidos y, en la mayoría de las especies, una pared celular con la composición compleja. Para optimizar la biosíntesis de los lípidos se controlan sus parámetros de cultivo como fuentes de luz, temperatura, salinidad, carbono y nitrógeno. Para la extracción de los lípidos las reservas de triglicéridos intracelulares ubicadas en las paredes celulares deben romperse. (Arnold et al., 2014).

Las microalgas se utilizan para diferentes aplicaciones, como la producción biodiesel, materia prima de la acuicultura, cosméticos y suplementos nutricionales. Además las microalgas son en la base de la cadena alimenticia acuática; (Arnold et al., 2014).

4.7.1 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

Dentro de los componentes de importancia en la composición de las microalgas se encuentran las proteínas, los lípidos y los carbohidratos, que en conjunto pueden representar hasta el 90 % del peso seco total. Mientras que los minerales, los ácidos nucleicos, los pigmentos y el resto de componentes alcanzarían el 10 % (Bertha & Voltolina, 2007).

4.7.1.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASAS

Se realizó la extracción del aceite por dos métodos, un método clásico en recuperación de grasas es la extracción en caliente por soxhlet. Otro método para trabajar microalgas en frío, es la adaptación realizada por Ryckebosch (2012) al método de Bligh y Dyer (1959) que se basa en el propuesto por Folch et al. (1956), que emplea una sistema de solventes de hexano / isopropanol (3:2). (Bertha & Voltolina, 2007; Ryckebosch et al., 2013). Una vez que se realizó la extracción la cuantificación de lípidos totales se realizó por gravimetría (Bertha & Voltolina, 2007).

4.7.1.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEINAS

Uno de los componentes de importancia en la composición de las microalgas son las proteínas, las que pueden representar hasta el 50 % del peso seco total. Existen diversos métodos para su determinación, pero sus resultados varían por el contenido de proteínas, las cuales poseen diferente composición en perfil de aminoácidos y peso molecular (Bertha & Voltolina, 2007).

Los métodos de Lowry et al. (1951) y de Bradford (1976), son por determinación espectrofotométrica. El primero en base a la intensidad de color obtenido con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico – tungstino: FMT), mientras que en el segundo las proteínas se tiñen con pigmento azul brillante de Coomassie y se lee a 465 y 595 nm. Este último resulta más sensible que el primero, aunque el método de Lowry et al. (1951), demostró ser más eficiente frente al cambio de tipo de proteína a estudiar y además muestra una curva de calibración más lineal (Bertha & Voltolina, 2007).

4.7.1.3 DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE CENIZAS

Para la determinación del peso inorgánico o peso de cenizas, en el caso de las microalgas marinas, debido a la gran cantidad de sales presentes, es necesario realizar un lavado previo. Es importante tener este proceso

estandarizado para que no afecte sus variaciones con la cuantificación de cenizas (Bertha & Voltolina, 2007).

4.8 ESTABILIDAD

Como parámetro de control de calidad, se puede definir como la resistencia a la oxidación de lípidos y por ende, a la formación de compuestos resultantes a esta oxidación, que generarán olores y sabores desagradables y compuestos nocivos para la salud, que disminuirán la calidad y valor nutricional del alimento. Además es un proceso complejo por la diversa formación de compuestos (Frankel, 2005).

Para evaluar estos procesos existen parámetros fisicoquímicos clásicos, como son: índice o valor del peróxido, acidez, anisidina, dienos conjugados, compuestos polares, contenido de agua, cuantificación de polímeros, composición de ácidos grasos y perfil de volátiles (Rockenbauer, 2012). Entre los métodos más sensibles según el orden decreciente están: análisis sensorial > análisis de volátiles por “headspace” > absorción de oxígeno > valor de peróxido > reacción al ácido tiobarbitúrico (TBARS) > blanqueo de caroteno por cooxidación con ácido linoleico > test de ranciamiento (Frankel, 1993). La diversidad de métodos refleja la complejidad de los procesos (Wasowicz et al., 2004).

Para determinar la estabilidad, se analizan los procesos internos que se dan por vía oxidativa y por vía hidrolítica, donde se determinan sus productos formados. Los procesos oxidativos constan de la oxidación primaria por formación de peróxidos y la oxidación secundaria por formación de compuestos volátiles. La peroxidación se determina principalmente por el índice de peróxido. Los compuestos volátiles se determinan por métodos cromatográficos en técnica de “headspace”

Mientras los procesos hidrolíticos se evalúan por la formación de ácidos grasos libres (Ryckebosch et al., 2013).

Además hay que tener en cuenta que en una extracción de aceite que contiene ácidos grasos poliinsaturados estos resultan ser más estables cuando la composición de estos es acompañada con glicolípidos y fosfolípidos; a diferencia de aquellos solamente acompañados por los triglicéridos. Esto es debido a la presencia de fosfolípidos, quienes ayudan a prevenir la oxidación de triglicéridos (Ryckebosch et al., 2012). Así mismo la presencia de carotenoides y tocoferoles, puede incrementar el poder antioxidante y por ende la estabilidad del aceite (Frankel, 2005).

4.9 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Una gran variedad de métodos suelen ser empleados para la extracción de aceite en microalgas, dentro de los cuales tenemos: extracción con solvente químico, extracción enzimática, extracción mediante fluidos supercríticos, extracción húmeda, entre las principales (Salazar Pérez, 2012).

En la extracción con solvente químico, solventes orgánicos suelen ser adicionados a la biomasa seca y se utilizan con frecuencia como complemento de métodos de disrupción mecánica, de autoclavado o sonicación. Su desventaja es ser poco amigables con el ambiente debido a la toxicidad de la mayoría de solventes utilizados. En el presente trabajo se emplearán dos técnicas: el método empleado modificado de Bligh y Dyer, frente a una prueba clásica, el sistema de extracción por Soxhlet que se realiza a temperaturas elevadas, denominado para diferenciarlo del anterior un método de extracción en caliente (Salazar Pérez, 2012).

4.9.1 SISTEMA DE EXTRACCIÓN EN CALIENTE

El sistema de extracción soxhlet ha sido ampliamente utilizado en la extracción de aceite de microalgas, como una prueba clásica. Este sistema, se compone de un balón en donde se coloca un solvente orgánico que se calienta hasta ebullición, un tubo de extracción soxhlet, donde se coloca la biomasa seca contenida en un cartucho y un condensador; que recirculara el solvente, después de evaporarse este se condensa y cae al tubo soxhlet, donde extrae el aceite y por medio de un sifón, vuelve al balón que contiene el resto de solvente y se repite el proceso (Salazar Pérez, 2012).

El solvente hexano ha sido ampliamente utilizado como solvente de extracción para microalgas en el sistema soxhlet, este solvente es relativamente económico, de fácil de recuperación y posee selectividad hacia lípidos neutros y es eficiente en la extracción de ácidos grasos (Salazar Pérez, 2012).

4.9.2 SISTEMA DE EXTRACCIÓN EN FRIO

Una metodología basada en solventes químicos realizado a bajas temperaturas es la propuesta por Bligh y Dyer en 1959, la cual extrae lípidos con una mezcla de solventes uno apolar y otro relativamente polar, esto logra la extracción de lípidos tanto polares como no polares. Entonces un solvente apolar, disuelve los lípidos neutros, mientras el solvente relativamente polar, disuelve los lípidos polares. Su ventaja frente al método de soxhlet es que se reduce significativamente el volumen de solvente utilizado. Este método emplea cloroformo / metanol (1:2), solventes que por ser muy tóxicos se buscó sustituir. En la optimización del método realizada por Ryckebosh en el 2012 para la extracción de microalgas, se logra un método de extracción de lípidos más rápido, con solventes menos tóxicos hexano / isopropanol (3:2) (Ryckebosch et al., 2012; Salazar Pérez, 2012).

5. METODOLOGÍA

5.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS

5.1.1 REACTIVOS

- Estándar de GLC 538, NU-CHECK PREP, INC. (ANEXO 1), que posee además de la composición distintos metilésteres, el porcentaje en peso de cada uno de ellos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de metilésteres en el estándar GLC 538.

GLC 538				
N°		Ácido graso	Peso (%)	Pureza (%)
1	C14:0	Mirístico	6,0	99,8
2	C14:1	Miristoleico	1,0	99,5
3	C16:0	Palmítico	16,0	99,8
4	C16:1	Palmitoleico	5,0	99,7
5	C18:0	Esteárico	8,0	99,8
6	C18:1 n -9c	Oleico	13,0	99,8
7	C18:1 n -7c	Vaccénico	4,0	99,7
8	C18:2 n -6c	Linoleico	2,0	99,6
9	C18:3 n -3c	Linolénico	2,0	99,5
10	C20:0	Araquídico	1,0	99,8
11	C20:1		1,0	99,7
12	C20:2		1,0	99,5
13	C20:3		1,0	99,4
14	C20:4 n -6	Araquidónico	3,0	99,4
15	C20:5 n -3	EPA	10,0	99,3
16	C22:0		1	99,8
17	C22:1 n -9	Erúcico	3,0	99,7
18	C22:6 n -3	DHA	12,0	99,6
19	C23:0		8,0	99,5
20	C24:0		1,0	99,5
21	C24:1		1,0	99,6

- Estándar de PUFA 1, Supelco, (CAT. N° 47033) (ANEXO 2), que contiene 15 metilésteres: C14:0; C16:0; C16:1; C18:0; C18:1 n -9; C18:1 n -7; C18:2 n -6; C18:4 n -3; C20:1 n -9; C20:5 n -3 (EPA); C22:1 n -11; C22:1 n -9; C22:5 n -3; C22:6 n -3 y C24:1 n -9.
- Estándar de PUFA 3, Supelco, (CAT. N° 47085-U) (ANEXO 3), que contiene 18 metilésteres: C14:0; C16:0; C16:1 n -7; C16:2 n -4; C16:3 n -4; C18:0; C18:1 n -9; C18:1 n -7; C18:2 n -6; C18:3 n -4; C18:3 n -3; C18:4 n -3; C20:1 n -9; C20:4 n -6; C20:4 n -3; C20:5 n -3 (EPA); C22:5 n -3 y C22:6 n -3.
- β -Caroteno, tipo II - Sigma-Aldrich. Pureza > 95 %.
- n -Hexano, Sigma-Aldrich, pureza \geq 99 %, libre de peróxido (GC).
- Ciclohexano, Sigma-Aldrich, pureza 99,5 % (GC).
- Tetrahidrofurano (THF), Sigma-Aldrich, pureza \geq 99,9 %, libre de peróxido (HPLC).
- Etanol, Sigma-Aldrich, pureza \geq 99,5 % (GC).
- Diclorometano, Sigma-Aldrich, pureza \geq 99,5 % (GC).
- Metanol, Sigma-Aldrich, pureza 99,8 % (GC).
- Butilhidroxitolueno (BHT), Sigma-Aldrich, pureza \geq 99 %.
- 2-propanol, Sigma-Aldrich, pureza \geq 98 % (GC).
- Acetato de amonio, Sigma-Aldrich, pureza \geq 99 % (HPLC).
- Acetonitrilo, Sigma-Aldrich, pureza \geq 99,9 % (GC).
- Hidróxido de sodio, NaOH, Merck.
- Sulfato de cobre, CuSO₄.5H₂O, J.T. Backer.
- Carbonato de sodio, Na₂CO₃, J.T. Backer.
- Tartrato de potasio, Merck.
- Sero albúmina de bovino (BSA), Merck.
- El reactivo de Folin – Ciocalteu, Merck.
- Trifluoruro de Boro - metanol, Merck, BF₃ (12 % en metanol), (GC).
- Cloruro de sodio, NaCl, JT Backer.
- Isooctano, Merck, (GC).
- Cloroformo, JT Backer.
- Ácido acético, JT Backer.
- Cloruro de hierro, FeCl₃, Merck.
- Dietil éter, JT Backer.

- Tiocianato de amonio, JT Backer.
- Cloruro de bario dihidratado, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, JT Backer.
- Sulfato de hierro heptahidratado, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pureza 98,90 %, JT Backer.
- Ácido clorhídrico, JT Backer.
- Gas helio, Linde-gas, pureza ≥ 99 %.
- Gas nitrógeno UHT, Linde-gas, pureza $\geq 99,9$ %.
- Agua Tipo I.

5.1.2 MATERIALES

- Columna: Purospher STAR RP-18 empacada (4,6 X 150 mm, 5 μm . Merck).
- Como electrodo de trabajo y contraelectrodo, dos electrodos de carbón vítreo.
- Electrodo de referencia, un electrodo de calomelano saturado (ECS).

5.1.3 EQUIPOS

- Cromatógrafo de gases AGILENT TECHNOLOGIES 7890, ubicado en el laboratorio de instrumentación de la Sección Química de la PUCP.
- HPLC Agilent 1290, DAD, bomba desgasificadora, automuestreador, detector UV-Vis, software Chem station. Ubicado en el laboratorio de instrumentación de la Sección Química de la PUCP.
- Espectrofotometro UV-vis Agilent 8453, ubicado en el laboratorio de instrumentación de la Sección Química de la PUCP.
- Centrifuga Hettich (Rotofix 32 A), ubicada en el laboratorio Q214 de la Sección Química de la PUCP.
- Mufla eléctrica (modelo MS 8), ubicado en el laboratorio Q214 de la Sección Química de la PUCP.
- Sonicador Laboratory Equipment Manufacturer, mrc, (modelo DCG-200H). Ubicado en el laboratorio Q214 de la Sección Química de la PUCP.
- Rotaevaporador SENCO (modelo R206B). Ubicado en el laboratorio Q111 de la PUCP.

- Balanza analítica de 5 dígitos Sartorius (modelo CP225D). Ubicada en laboratorio de minas de la PUCP.
- Potenciostato CH instruments (Modelo1242), Software CHI versión 14.09.
- Agitador magnético Thermo scientific Nuova (Modelo SP18420).
- Temperador VWR (modelo 1217-2), ubicado en el laboratorio Q214 de la Sección Química de la PUCP.

5.2 MUESTRA

5.2.1 TAXONOMÍA (Arnold et al., 2014)

Dominio: *Eukaryota*
Reino: *Chromalveolata*
Phylum: *Heterokontophyta*
Clase: *Eustigmatophyceae*
Familia: *Eustigmatophyte*
Género: *Nannochloropsis*
Especie: *Nannochloropsis oceanica*

5.2.2 GENERALIDADES

Las microalgas *Nannochloropsis* son organismos unicelulares que poseen una membrana plasmática con alto contenido de lípidos protegida por una compleja pared celular compleja. Se distribuyen ampliamente en el medio marino (Arnold et al., 2014) y su tamaño es de 2 - 4 x 3 - 5 micras de diámetro (Suda, Atsumi, & Miyashita, 2002). Este género es empleado como fuente de alimentos en acuicultura y se viene estudiando su uso como fuente de EPA en el desarrollo de productos nutracéuticos y como fuente de desarrollo de biodiesel (J. Li et al., 2014; Suda et al., 2002).

Para el estudio se empleó una cepa de *Nannochloropsis oceanica* del Banco de Germoplasma del IMARPE, embolsada en bolsas de

polietileno de alta densidad. La cepa posee un alto porcentaje de similitud con *N. oceanica* en la región ITS1 (99 %) e ITS2 (98 %) (Samanamud, 2015).

5.2.3 MATRIZ

Se partió de 15 g de biomasa seca de la microalga liofilizada, *Nannochloropsis oceanica*, refrigerada con 15 % de humedad y 0,425 mm de tamaño del poro (ASTM. E. 11) proporcionada por el IMARPE, que contiene según referencia:

- Lípidos: lípidos neutros, glicolípidos, fosfolípidos (Jing Li et al., 2014).
- Ácidos graso omega 3: EPA (C20:5n-3) (Samanamud, 2015).
- Carotenoides: β -caroteno, violaxantina y zeaxantina (Dong et al., 2013).

5.3 PROCEDIMIENTOS

5.3.1 COMPOSICIÓN PORCENTUAL

A la biomasa seca de la microalga liofilizada, se le determinó el porcentaje de grasas, de proteínas, de cenizas y el contenido de carbohidratos se asumió como la diferencia del 100 %. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

5.3.1.1 DETERMINACIÓN DE GRASAS

La cuantificación se realizó por gravimetría (Bertha & Voltolina, 2007). Se procedió a la extracción a partir de 2 g de la muestra, según se describe en la **Sección 5.4.1**, usando tubos previamente pesados, que se llevaron a desecador hasta peso constante (Arredondo-Vega B.O., 2007). El porcentaje de grasas se determinó por la Ecuación 1.

$$\% \text{ grasas} = \left(\frac{\text{PTG} - \text{PTI}}{\text{P}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

- PTF : Peso del tubo final en mg.
PTI : Peso del tubo inicial, vacío en mg.
P : Peso de la muestra en mg.

5.3.1.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEINAS

Por el método de Lowry et al. 1951, se añadió 5 mL de NaOH 1 N a 5 mg de la muestra para la extracción alcalina y se sometió a un termobañó a 100 °C por 60 min. Luego se enfrió a temperatura hasta ~10 °C y se centrifugó a 3000 rpm, después se extrajo el sobrenadante y se registró su volumen. De este extracto se tomaron 3 alícuotas diferentes de 250, 500 y 750 µL, se completaron hasta 1mL con NaOH 1 N y se agitaron.

Se preparó una mezcla al combinar una solución A [Na₂CO₃ al 2 % (p/v) en NaOH 1 N] y el sobrenadante de otra solución B [CuSO₄ al 5% / tartrato de K al 1 % (1:1)] en la proporción 50:1. A cada uno de los extractos alcalinos se le añadió 5 mL de la mezcla (A / B 50: 1), se agitó y se dejó reposar por 15 min. Se les agregó 500 µL de una solución de Folin: H₂O destilada (1:1), se agitó y se dejó reposar por 40 min.

Finalmente se leyó en el espectrofotómetro a 750 nm con el uso de un blanco que contuvo todos los reactivos y 1 mL de NaOH 1 N. La curva de calibración se preparó con una concentración de 300 µg/mL de sero albúmina de bovino (BSA), en 0, 50, 100, 150 µg/mL. Y se cuantificó según la Ecuación 2.

$$\% \text{ proteínas} = \left[\frac{(m \cdot A_{750nm}) \times V_E}{V_m \cdot P_S} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

- P_S : Peso de microalga liofilizada.
 V_E : Volumen de extracto alcalino.
 V_m : Volumen de la muestra.
 A_{750} : Absorbancia a 750.
 m : Concentración de BSA ($\mu\text{g/mL}$), según curva.

5.3.1.3 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Basado en la AOAC 942.05, se pesó en un crisol de porcelana, de 2 g de la muestra se precalcinó y luego se llevó a mufla eléctrica precalentada a 550 °C por 8 horas hasta formar cenizas blancas. El crisol se enfrió en desecador hasta constancia en peso. El porcentaje de cenizas se determinó según la Ecuación 3.

$$\% \text{ Ceniza} \left(\frac{w}{w} \right) = \left(\frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

- M_2 : Masa en gramos de la cápsula con cenizas.
 M_1 : Masa en gramos de la cápsula con la muestra.
 M_0 : Masa en gramos de la cápsula vacía.

5.4 EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE LA MICROALGA

Se realizó la extracción del aceite de la muestra (la biomasa seca de la microalga liofilizada) mediante la comparación de dos metodologías para obtener la matriz adecuada para la realización del estudio de la estabilidad en el tiempo. Las pruebas se realizaron cinco ensayos por cada método, la extracción en caliente fue por duplicado y la extracción en frío por triplicado.

5.4.1 SISTEMA DE EXTRACCIÓN EN CALIENTE

Para la extracción se empleó el equipo de extracción soxhlet según Salazar Pérez, 2012. Se pesó 2 g de muestra, se colocó en un cartucho dentro de un tubo de extracción soxhlet, y se empleó como solvente hexano. Se dejó recircular el sistema hasta observar que el solvente tomo un tono casi transparente. Se volatilizó el hexano con gas nitrógeno y se llevó en desecador antes del pesado. Se almacenó las extracciones a 4°C.

5.4.2 SISTEMA DE EXTRACCIÓN EN FRIO

Se realizó una adaptación del método modificado para las microalgas de Bligh y Dyer (1959) por Ryckeboosch et al., 2012 descrita a continuación.

Se pesó 100 mg de muestra de microalgas seca liofilizada, con 6 mL de mezcla de solventes, H / I, (3:2), se llevó a ultrasonido por 15 minutos (3 ciclos) en un baño de agua con hielo a 10 °C, que trabaja con una amplitud del 70 %. Luego se incubó los tubos por 24 h a 4 °C y protegidos de la luz, de esa manera se favoreció la extracción completa. Se sonicó otros 15 minutos (3 ciclos) en frío antes de la centrifugación (4000 rpm por 20 min a ~ 10 °C) y se trasvasó el extracto con una pipeta Pasteur, a un nuevo tubo. A la biomasa residual se agregó 3 mL de H/I (3:2) y se centrifugó nuevamente (4000 rpm por 20 min a ~ 10 °C, recuperando el extracto) se repitió el proceso dos veces. Al producto extraído se le agregó 3 mL de agua tipo I y se agitó por 30 s. Se llevó a centrifugar a 4000 rpm por 10 min a ~ 10 °C, para separar la fase orgánica que contiene los lípidos, repitiendo hasta que la fase acuosa fue transparente. Finalmente se volatilizo la fase orgánica con nitrógeno gaseoso.

La cuantificación de lípidos totales fue por gravimetría. Se pesó y determinó el contenido de aceite de las muestras obtenidas. Se repitió todo el procedimiento 93 veces, para tener suficiente matriz para realizar el test de almacenamiento y se almacenó las extracciones a 4°C.

5.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Preparación de muestras

Se empleó el aceite que fue extraído por el método en frío de la biomasa seca de la microalga liofilizada. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Procedimiento

Según AOAC Official Method 991.39, se realizó la saponificación de 25 mg de la muestra con 1,5 mL de metóxido de sodio-metanol (0,5 M de NaOH en metanol) por 5 min a 100 °C, se enfrió, luego se realizó una metilación catalizada con 2 mL de BF₃, (12 % en metanol), con 30 s de agitación y se llevó a 100 °C por 30 min. Se extrajeron los metilésteres con 2 mL de isooctano a 40 °C y con 5 mL de una solución saturada de NaCl. Todo el procedimiento se realizó bajo atmósfera de nitrógeno. Los extractos se sometieron a CG, con una columna de fase HP-5, las condiciones de operación de equipo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases.

Características	Condición
Gas portador	Helio (99,99 %)
Columna	HP-5
Temperatura del inyector (°C)	250
Temperatura del detector, FID, (°C)	270
Temperatura del horno programado (°C)	170 – 225
Rampa de temperatura (°C / min)	1
Flujo (mL / min)	1
Longitud de onda (nm)	440 y 667
Temperaturas límite de la columna (°C)	40 – 230/240

Los metilésteres se identificaron según sus tiempos de retención característicos, por comparación con los estándares PUFA 1 y PUFA 3. Además se determinó sus porcentajes de áreas por comparación con el estándar GLC 538, según la Ecuación 4.

$$\text{Área \% AG} = \left[\frac{A_x}{(A_T - A_{IS})} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

- A_x : Área perteneciente al pico de del cromatograma de la muestra.
- A_T : Área total perteneciente al cromatograma de la muestra.
- A_{IS} : Área perteneciente al pico de EPA del cromatograma del estándar.

5.6 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE EPA INICIAL

A partir del paso anterior se realizó la determinación cuantitativa del EPA, según AOAC Official Method 991.39 en unidades mg de EPA/ 100 mg de muestra. Se realizó los cálculos según la Ecuación 5.

$$\text{EPA} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ mg}} \right) = \left(\frac{A_x \times W_{IS} \times CF_x}{A_{IS} \times W_s \times 1,04} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

- A_x : Área perteneciente al pico de EPA del cromatograma de la muestra.
- A_{IS} : Área perteneciente al pico de EPA del cromatograma del estándar.
- CF_x : Factor de corrección teórico del detector (0,99 para el EPA).
- W_{IS} : Peso del compuesto del EPA del estándar en mg.
- W_s : Peso de la muestra empleada en mg.
- 1,04 : Factor de conversión de metiléster a mg de ácido graso / g de aceite.

5.7 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO INICIAL DE β -CAROTENO

Preparación de muestras

Se empleó el aceite que fue extraído por el método en frío de la biomasa seca de la microalga liofilizada. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Procedimiento

Se basó por adaptación de los métodos de la AOCS 2009, Determinación de β -caroteno en Margarinas, y de la AOAC 2005.07 (51.3.01). En una fiola de 10 mL se disolvió 50 mg de la muestra con 8 mL de la solución de diclorometano / etanol (1:1). Se añadió 10 mg de BHT y se agitó. Se dejó en la oscuridad por aproximadamente 2 h, luego se enrasó con diclorometano y se agitó fuertemente. Se filtró con Millex-HV; 0,45 μ m, PVDF y se analizó por HPLC. Las condiciones de operación de equipo se muestran en la Tabla 3. Se trabajó por duplicado y el resultado se expresó en mg/ 100g de matriz.

Tabla 3. Condiciones de operación del equipo HPLC.

Características	Condición
Temperatura de columna ($^{\circ}$ C)	30
Presión aproximada (bar)	65
Flujo (mL / min)	0,8
Volumen de inyección (μ L)	10
Tiempo de corrida (min)	60
Detección de onda (nm)	450

Para la identificación de los isómeros del β -caroteno, que se forman por la isomerización térmica, se empleó la solución de control 1, preparada al disolver 3 mg del estándar de β -caroteno y 1 g de BHT en 50 mL THF. Luego se añadió 200 mL de etanol y se llevó a reflujo durante dos horas

en un baño de agua a 80 °C. Se enfrió, se diluyó hasta un volumen de 500 mL con etanol, se transfirió a una botella dispensadora y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente. La concentración de β -caroteno en esta solución fue de 6 $\mu\text{g/mL}$ en etanol / THF (9:1) la que también permitió calibrar el equipo para las mediciones.

Para la determinación de β -carotenos totales contenidos en la matriz, se usó la solución de control 2, preparada al disolver 0,3 mg del estándar en 20 mL de diclorometano, se sonicó por 30 s y luego se llevó a un volumen de 100 mL con *n*-Hexano. Finalmente se diluyó de 1 a 10, la concentración de β -caroteno en esta solución fue de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ en hexano / DCM (98:2).

Como fase móvil se emplearon la solución 1 que contenía $2,27 \times 10^{-4}$ M de BHT en metanol / acetonitrilo / 2-propanol / 0,2 % acetato de amonio en agua (100:91:4:5 v/v) y metanol para el gradiente. Las condiciones del uso de la gradiente en el equipo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Uso de la gradiente en HPLC.

Tiempo	Solvente	Flujo
0 - 15 min	100 % solución 1	0,8 mL/ min
15 - 30 min	70 % solución 1 30 % solución 2	1,0 mL/ min
30 - 50 min	100 % solución 1	0,8 mL/ min

Solución 1 : metanol / acetonitrilo / 2-propanol / 0,2 % acetato de amonio en agua (100:91:4:5 v/v) y 10 mg BHT.

Solución 2 : metanol.

Se determinó la pureza espectrofotométrica (SP) del estándar mediante la lectura de la solución de control 2 en el UV-vis contra ciclohexano a 457 nm y la constante de la absorbancia aparente, E_{app} [1%, 1 cm] se calculó por la Ecuación 6.

$$\text{app [1\%, 1 cm]} = A \times \frac{2}{w} \times \frac{10000}{B} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

- A : Absorbancia máxima.
 2 : Factor de dilución en L.
 w : Masa de referencia del estándar en mg.
 B : Largo de la celda en cm.

Se calculó la SP de los β -caroteno totales del estándar y de la matriz, según la Ecuación 7.

$$SP = \frac{E_{\text{app [1\%, 1 cm]}}}{2505} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

- 2505 : Valor de E [1%, 1 cm] reportado para todos los *trans*- β -caroteno puro en ciclohexano (AOAC 2005.07 (51.3.01)).

La pureza cromatografica (CP) de la solución control 2 se determinó por HPLC según la Ecuación 8.

$$CP = \frac{\text{área del todos los } \textit{trans}\text{-}\beta\text{-caroteno (control 2)}}{\text{suma de áreas de todos los picos relevantes (control 1)}} \quad \text{Ecuación 8}$$

El porcentaje de pureza del estándar de referencia (P), se determina según la Ecuación 9.

$$\%P = SP \times CP \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

La concentración (C) de β -carotenos en determinada cantidad del estándar (w), está dado por la Ecuación 10.

$$C (\mu\text{g/mL}) = \frac{w \times \%P}{200} \quad \text{Ecuación 10}$$

5.8 MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR VOLTAMETRÍA

Preparación de muestras

Se preparó un extracto con 10 g de zanahorias en 25 mL de etanol caliente al 95 % del que se obtuvieron 35,2 mg de carotenoides, los cuales se disolvieron en 25 mL de una mezcla diclorometano (DCM) / etanol (ETOH), (1:1, v / v), denominada solución madre (1 408 ppm), que se mantuvo a 4 °C.

Se empleó el aceite que fue extraído por el método en frío de la biomasa seca de la microalga liofilizada. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Procedimiento

Por el método basado en Goiris et al., 2012, para determinación de la respuesta del equipo ante la presencia de carotenoides, se realizó un extracción de carotenoides de zanahoria. La solución madre se diluyó hasta 56 ppm y se hizo la lectura por voltametría de pulso diferencial (VPD). Se añadió 1 mL de la solución madre y se volvió a hacer la medición y por último se agregó otro mililitro de solución madre con su respectiva lectura.

Se preparó una solución de 1,17 ppm del estándar de β -caroteno en DCM / ETOH (1:1, v / v). Luego se disolvieron 12,5 mg de la muestra (aceite extraído de la microalga liofilizada) en 50 mL de una mezcla de DCM / ETOH (1:1, v / v) y se procedió a la lectura por VPD. Se añadió 1 mL de la solución del estándar y se procedió a hacer la medición y por último se agregó 1 mL más de la solución del estándar seguido de su respectiva lectura.

Todas las mediciones voltamétricas se realizaron por duplicado, a temperatura ambiente, con agitación de la solución y en atmósfera de N_2 . Los parámetros empleados durante las mediciones voltamétricas se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros de las mediciones voltamétricas.

Características	Condición
potencial inicial (V)	0
potencial final (V)	1,9
potencial de paso (mV)	4
amplitud (mV)	50
ancho de pulso (s)	0,25
ancho de muestra (s)	0,083

5.9 TEST DE ALMACENAMIENTO

Preparación de muestras

Se empleó el aceite que fue extraído por el método en frío de la biomasa seca de la microalga liofilizada y fueron homogenizadas constituyendo así la matriz de la investigación.

Procedimiento

La metodología se basó en el test de almacenamiento empleado por Frankel, 2005 y Ryckebosch et al., 2013. En un vial ámbar de 20 mL se depositaron 25 mg de la matriz, distribuidos homogéneamente sobre el fondo del vial y se selló herméticamente sin retirar el oxígeno u otro tratamiento. Se repitió el procedimiento con un total de 78 viales. Se sumergieron en agua en un temperador a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ y se mantuvieron por distintos lapsos de tiempo (0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 días), al cabo de los cuales se retiraron un determinado número de viales que fueron sometidos a las distintas lecturas (HPLC, CG, índice de peróxido, etc.) y se llevó a almacén a 4 °C , previo a su análisis.

5.10 CONTENIDO DE EPA EN EL TIEMPO

Se analizó con 25 mg de la matriz según AOAC Official Method 991.39, descrito en la **Sección 5.5 y 5.6** La determinación cuantitativa del EPA en unidades mg de EPA/ g de muestra fue calculada por la Ecuación 5. En cada lapso de tiempo se leyeron dos lecturas en un mismo día, y una tercera lectura en un día diferente.

5.11 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS

Según el método de la IDF modificado (Hornero et al., 2001), para la extracción de los pigmentos de la matriz, se emplearon tres viales de 10 mL en los que se colocaron 15 mg de la matriz. Estos se disolvieron con 1 mL de una solución de cloroformo-ácido acético (2:3), se añadió 100 μ L de solución fresca Fe (II), se llevó al vortex por 15 s y luego se dejaron reposar por 10 min, protegidos de la luz. Posteriormente se les agregó 2 mL de agua tipo I, 4 mL de dietiléter (7 ppm BHT); las mezclas se agitaron y se extrajeron las fases orgánicas, las cuales se blanquearon con nitrógeno.

Para la determinación del Fe (III) se empleó 1 mL de cada una de las fases acuosas, las que se mezclaron con 100 μ L de solución saturada de tiocianato de amonio y se dejaron en reposo por 10 min. Luego se leyeron por UV a 470 nm, con agua como blanco y con corrección del espectro de línea base a 670 nm. Para la lectura se preparó un blanco que contenía todos los reactivos empleados excepto la matriz. Se usó una celda de cuarzo de 1 mL de capacidad y de 1 cm de longitud. Se elaboró la curva de calibración con soluciones a 0, 1, 3, 7 y 10 μ g / mL de Fe (III). El índice es expresado en mequivalentes de peróxidos / kg de aceite según la Ecuación 12.

$$PV \left(\frac{\text{meq peróxido}}{\text{kg muestra}} \right) = \frac{(A_{sm} - A_{bl})}{55,84 \times 2 \times m \times w_{sm}} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde:

meq_{peróxido}: Miliequivalentes de peróxido.

A_{sm} : Absorbancia de la muestra a 470 nm.

A_{bl} : Absorbancia del blanco a 470 nm.

m : Pendiente de la curva de calibración del Fe (III).

w_{sm} : Masa de la muestra en gramos.

La solución Fe (II) se preparó, con una mezcla de 2 soluciones, una de 0,4 g de BaCl₂·2H₂O en 50 mL de agua tipo I y la otra con 0,5 g de FeSO₄·7H₂O en 50 mL de agua tipo I, a la que se agregó 2 mL de ácido clorhídrico y se protegió de la luz.

5.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el aseguramiento de la calidad de los resultados del método normalizado AOAC 991.39 y el método de la IDF modificado, se controló los parámetros de desempeño de precisión y exactitud para lo cual se tuvo en cuenta que los límites de aceptación para ambos parámetros fueron del 5 %. Para el análisis de correlación se graficó la relación de los dos metodologías propuestas y se obtuvo el coeficiente de correlación. Para los análisis se empleó el programa Minitab (Versión 16.1.0).

6. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

6.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE

Se realizó una comparación con una prueba clásica de extracción en caliente por soxhlet, frente al método en frío modificado de Bligh y Dyer (1959), para la determinación del porcentaje de grasa contenido en la

muestra de la microalga a estudiar. La cuantificación de lípidos totales se realizó por gravimetría, y se realizó 5 veces por método los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de grasas y EPA contenido en la muestra, según métodos en frío y caliente.

Método	Bligh y Dyer modificado		Soxhlet	
	% EPA	% grasa	% EPA	% grasa
Ensayo 1	0,7699	10,4667	0,8948	12,5655
Ensayo 2	0,7564	10,4000	0,8600	13,2911
Ensayo 3	0,7814	10,6333	0,8800	12,3704
Ensayo 4	0,7609	10,3667	0,8962	12,3826
Ensayo 5	0,7758	10,3667	0,9166	12,1753
Promedio	0,7689	10,4467	0,8895	12,5570
RSD	1,2019	1,5856	2,1118	3,2704

Realizando la comparación de medias mediante ANOVA (Tabla 7), se obtuvo que el P valor es menor a 0,05 existe así al 95 %de confianza una diferencia significativa entre los métodos para la extracción de grasas. El análisis mediante ANOVA para el porcentaje de EPA (Tabla 8) contenido en la muestra se obtuvo que el P valor es menor a 0,05 por lo que existe así al 95 %de confianza una diferencia significativa entre las concentraciones obtenidas.

Tabla 7. Tabla ANOVA para comparación del porcentaje de grasas.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razon-F	Valor-P
Entre grupos	14,845	1	14,845	<i>123,08</i>	<i>0,0000</i>
Intra grupos	1,56791	13	0,120608		
Total (Corr.)	16,4129	14			

Tabla 8. Tabla ANOVA para comparación del porcentaje de EPA.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,079415	1	0,079415	262,13	<i>0,0000</i>
Intra grupos	0,006968	23	0,000303		
Total (Corr.)	0,086384	24			

En la Figura 17 se observa que el método vía soxhlet brinda un rendimiento de extracción en grasas mayor que por el método en frío. Respecto al rendimiento de extracción de EPA, ambos métodos presentan valores similares.

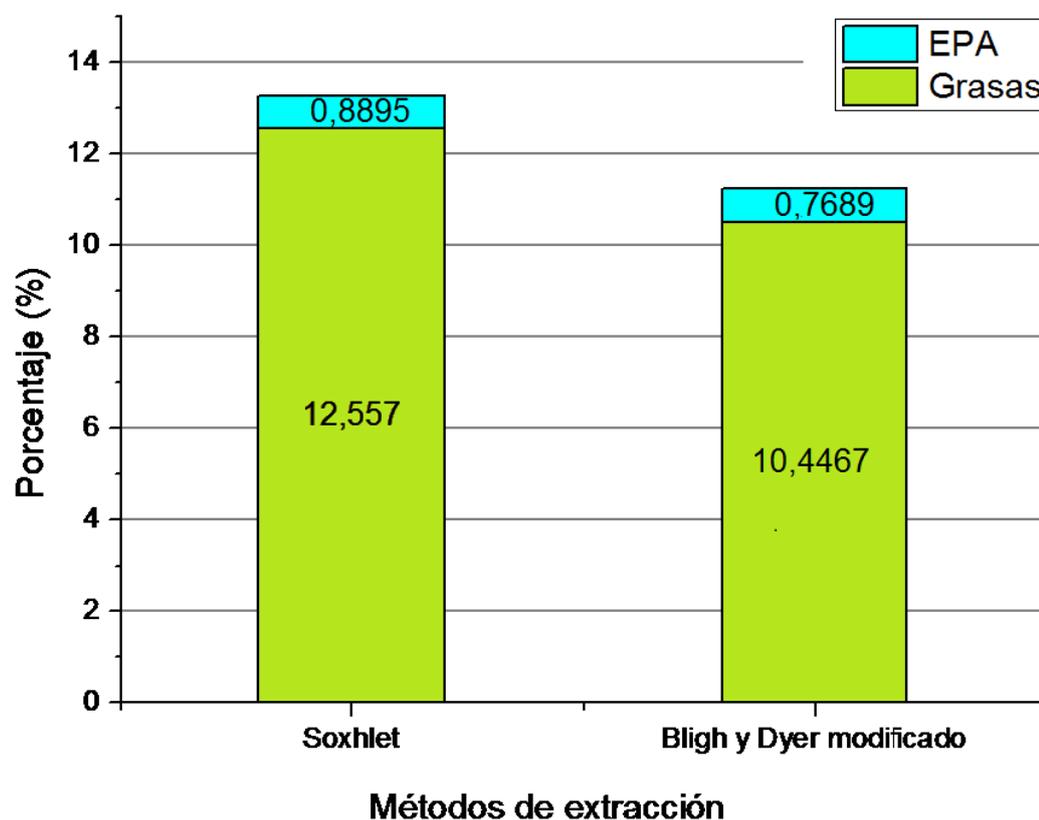


Figura 17. Comparación del contenido porcentual de grasas y EPA, en ambos métodos de extracción.

Se determinó mediante CG, la composición de los ácidos grasos contenidos en los extractos por ambos métodos, los que se muestran en

la Figura 18, para el método de soxhlet y en la Figura 19 para el método de Bligh y Dyer modificado.

Se observa que los perfiles son similares por corresponder a la misma especie, pero el proceso de extracción empleado favorece la presencia de algunos aminoácidos en mayor cantidad que en otros. Como es el caso del ácido graso mirístico (C14:0), que por la extracción en soxhlet (Figura 18), presenta una señal intensa a 11,051 min, mientras que por la extracción en frío (Figura 19) la señal es bastante pequeña. Este ácido graso es responsable del olor marino característico de las algas y también se presenta cuando la muestra empieza su proceso de degradación. Esto indicaría que la composición extraída por soxhlet ya tendría un grado mayor de degradación que la de por el método en frío. Así mismo el caso del ácido graso pentadecanoico, es parecido al ser un compuesto saturado y solo presentarse en la extracción por soxhlet (Figura 18).

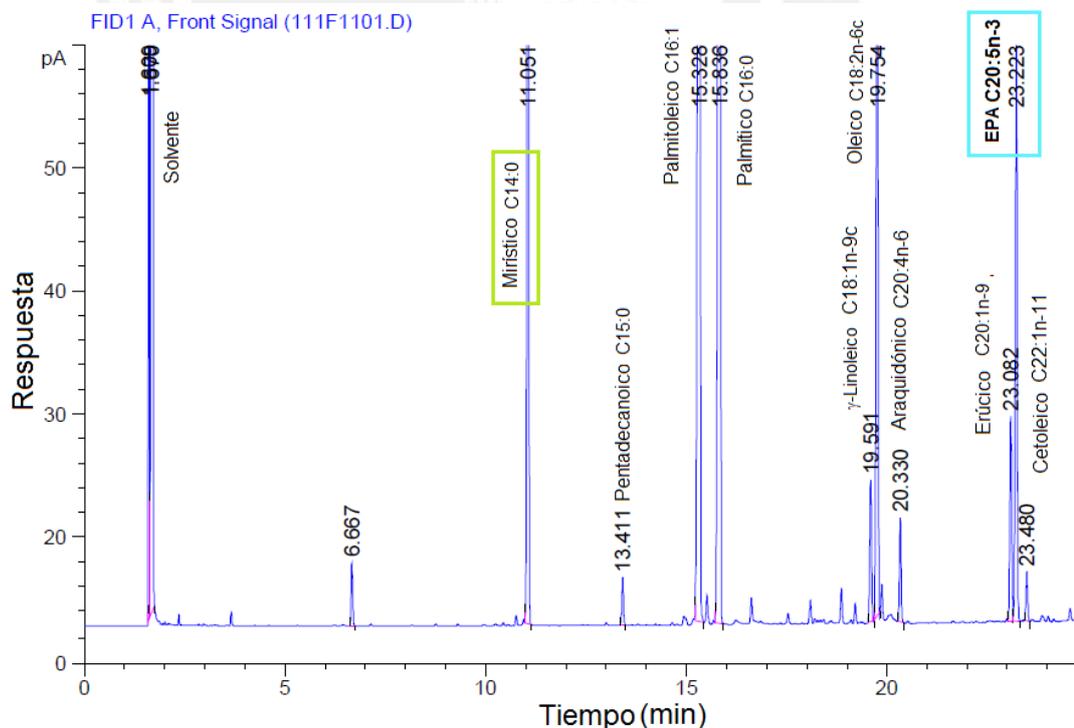


Figura 18. Contenido de ácidos grasos en muestra obtenida por el método de extracción de soxhlet.

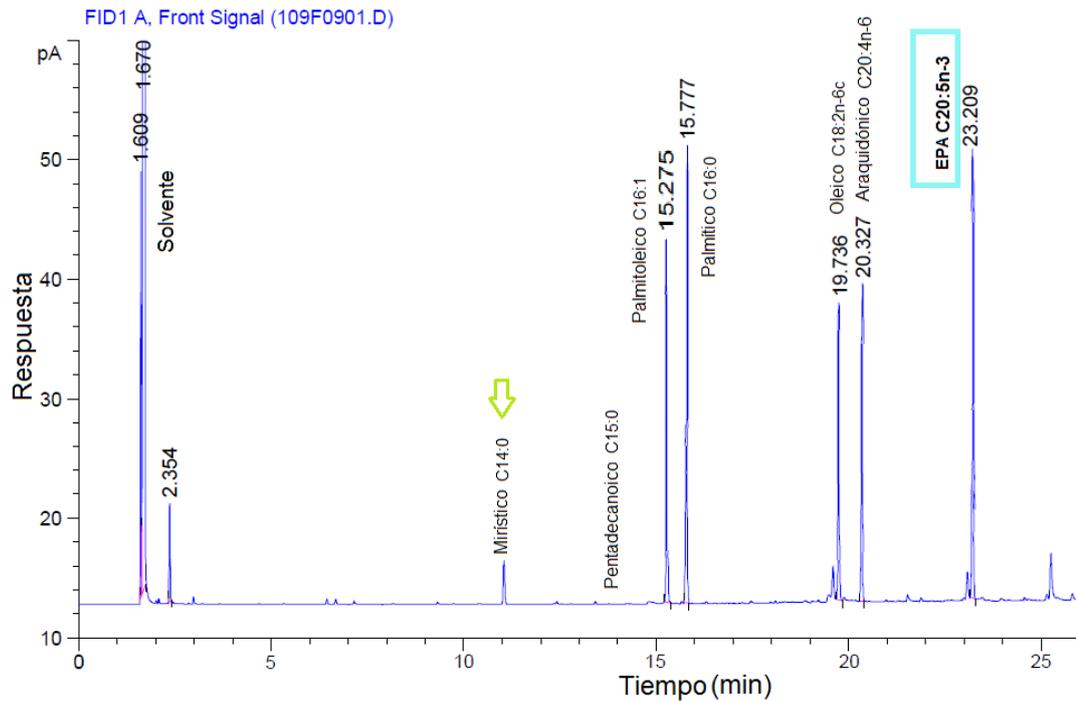


Figura 19. Contenido de ácidos grasos en muestra obtenida por el método de extracción de Bligh y Dyer modificado.

Tabla 9. Perfil de ácidos grasos en la muestra obtenida por soxhlet.

N°	Ácidos grasos		Soxhlet		Bligh y Dyer	
			t _{Retención}	Área (%)	t _{Retención}	Área (%)
1	--	--			2,35400	7,99330
2	--	--	6,66700	0,51383	--	--
3	Mirístico	C14:0	11,05100	8,38369	--	--
4	Pentadecanoico	C15:0	13,41100	0,44206	--	--
5	Palmitoleico	C16:1	15,32800	34,05777	15,27500	18,22864
6	Palmítico	C16:0	15,83600	36,70335	15,77700	31,18405
7	γ-Linoleico	C18:1n-9c	19,59100	1,43072	--	--
8	Oleico	C18:2n-6c	19,75400	8,46798	19,73600	10,46283
9	Araquidónico	C20:4n-6	20,33000	1,02725	20,32700	13,25186
10	Erúcido	C20:1n-9	23,08200	2,14885	--	--
11	EPA	C20:5n-3	23,22300	6,34262	23,20900	18,87932
12	Cetoleico	C22:1n-11	23,48000	0,48188	--	--

El perfil de ácidos grasos por ambos métodos de extracción se observa en la Tabla 9, donde en el perfil de ácidos grasos por método de Soxhlet, se observa la presencia de 11 ácidos grasos; mientras por el método en frío 5 ácidos grasos. Los ácidos grasos que presentan mayor porcentaje en la composición, en ambos métodos, son los: ácido palmítico y palmitoleico.

Tabla 10. Contenidos de EPA en mg / 100 mg aceite, según métodos de extracción.

Método	Contenido de EPA (mg/100 mg aceite)
Soxhlet	7,1154
Bligh y Dyer modificado	7,3719

En la Tabla 10 se presentó los resultados de contenido de EPA en unidades de mg / 100 mg aceite extraído de la microalga liofilizada, para ambos métodos de extracción. Entonces en ambos métodos se observó diferencias significativas entre ellos para la extracción de grasas y EPAs, donde presentó un rendimiento fue mayor en el extracto por el método en caliente. Sin embargo el método en frío presentó menor contenido de ácidos grasos que estén vinculados a un proceso de degradación además en el contenido de EPA sobre el aceite extraído, fue mayor para este método (Tabla 10). Por las razones antes explicadas se justifica la elección del método de extracción en frío, método adaptado de Bligh y Dyer modificado por Ryckebosch, para realizar las pruebas del almacenamiento en el presente estudio mostrando una estabilidad mayor que el método clásico.

6.2 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA SECA DE LA MICROALGA

Debido a que el método por Soxhlet resultó más eficiente en la extracción de grasas (Figura 17) se le eligió para este análisis en la composición de la muestra, tomándose sus valores obtenidos.

La composición de la biomasa seca (microalga liofilizada) obtenidas se muestran en la Tabla 11. Para la especie mostró tener un alto porcentaje en carbohidratos y proteínas en cantidades similares alrededor del 40 %. El contenido de grasas para la muestra fue de $10,4467 \pm 1,0726$ %, lo que era lo esperado para la especie, en base otros estudios reportados para el género muestra un porcentaje similar.

Tabla 11. Composición de la biomasa.

Característica	Resultado (%)	RSD
Grasas	12,5570	3,2704
Proteínas	40,8217	0,7184
Cenizas	7,0087	1,3946
Carbohidratos	39,6126	0,8692
El valor del RSD son las desviaciones estándares de 3 réplicas, excepto en el % en grasas que se realizó 5 ensayos.		

6.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS y CONTENIDO DE EPA INICIAL

Por las ventajas que presentó el extracto obtenido por el método en frío, se recogieron sus datos del perfil de ácidos grasos y contenido de EPA inicial que se observan en la Tabla 9 y 10. Además se empleó este aceite para realizar los análisis.

6.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INICIAL DE β -CAROTENO

Se realizó las determinaciones cuantitativas del estándar de β -caroteno, con la solución control 2 (0,3 ppm) para β -caroteno totales y se obtuvo un cromatograma con una señal característica a 41,222 min, como se observa en la Figura 20.

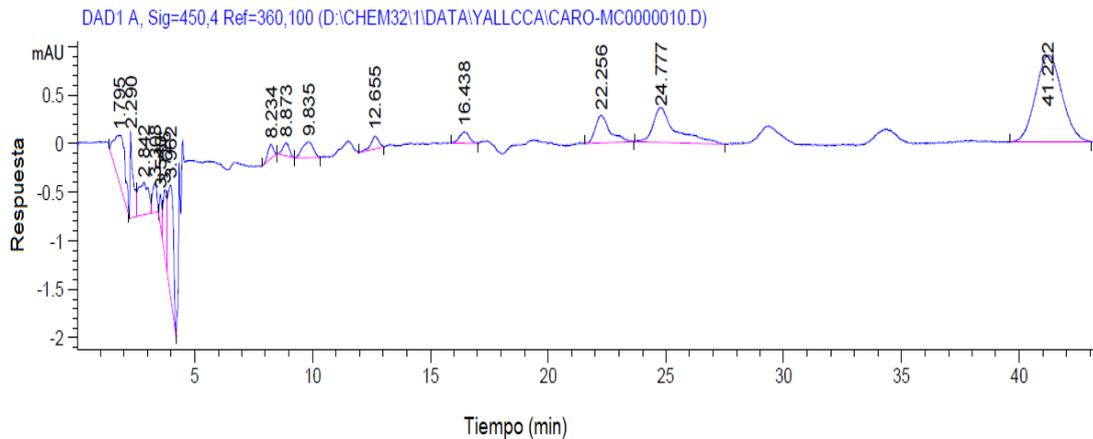


Figura 20. Cromatograma del estándar para β -caroteno totales a 0,3 ppm en diclorometano / hexano (1: 49).

Cuando se realizó las determinaciones cuantitativas se empleó 75 mg de la muestra fresca, diluida en 10 mL de DCM / EtOH (3:2), se obtuvo un cromatograma con la misma señal característica a 41, 766 para el β -caroteno, como se observa en la Figura 21. Donde el contenido de β -caroteno para la muestra inicial resultó ser de 0,922 ppm, 1,229 mg de β -caroteno / 100 g de muestra.

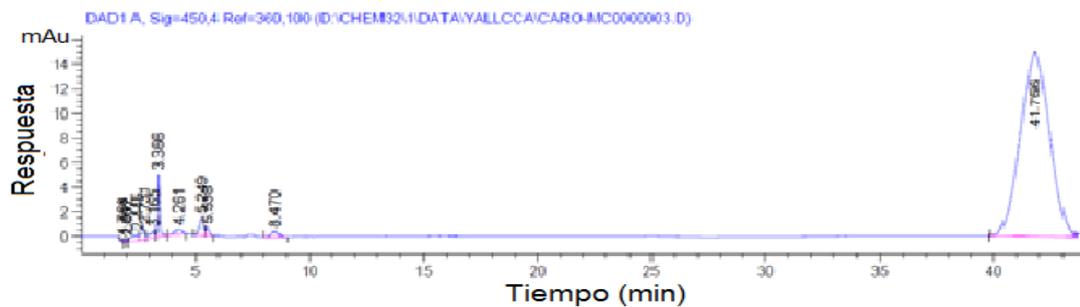


Figura 21. Cromatograma para 75 mg de muestra de extracción sin degradación de la matriz identificando β -caroteno totales.

6.5 MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR VOLTAMETRÍA

Para el análisis de la señal característica de los carotenoides en la solución, realizada por VPD, se empleó un extracto de los carotenoides de una muestra de zanahoria con dilución en diclorometano / etanol (1:1, v / v). El peso de carotenoides obtenido fue 35,2 mg a partir de 10 g de

muestra, su concentración en la solución madre fue de 1 408 ppm, a partir de la cual se preparó una solución diluida de 56 ppm que fue la solución de trabajo. El voltamograma obtenido se observa en la Figura 22, donde a concentraciones mayores del extracto se observaron cambios de posición en las curvas significativas, mostrando una variación en la señal obtenida que se puede relacionar con la capacidad antioxidante.

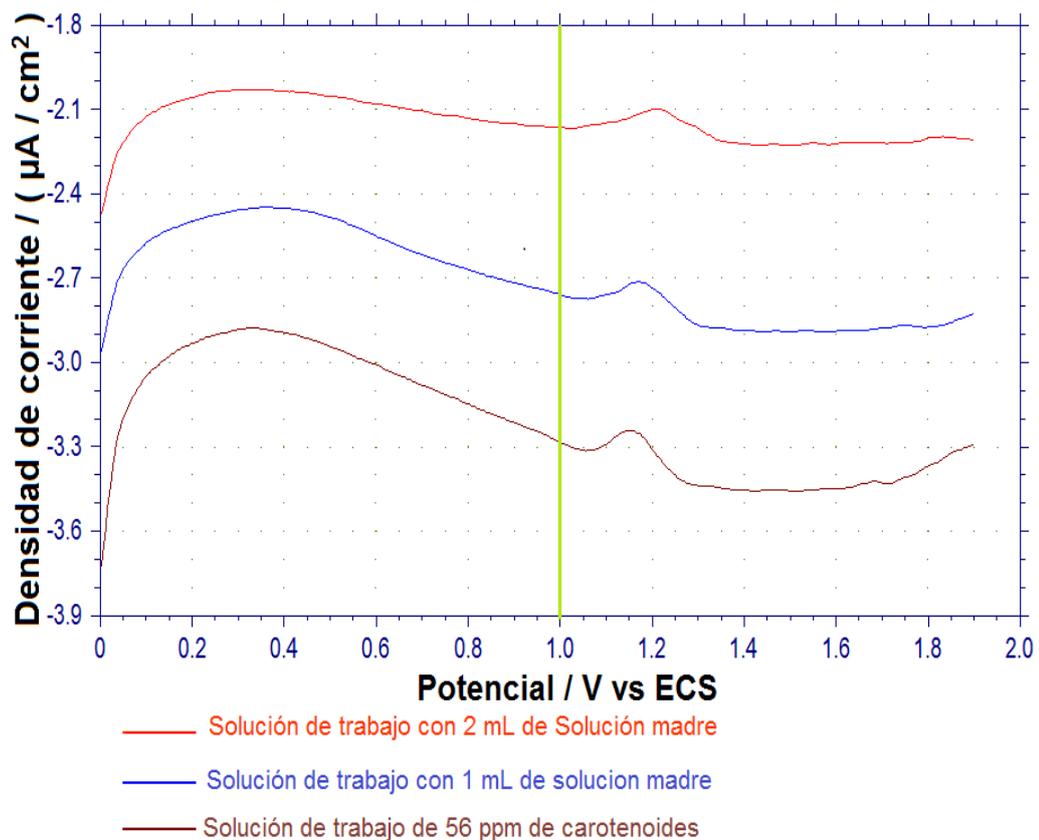


Figura 22. Voltamogramas obtenidos por VPD, con extractos de zanahorias a diferentes concentraciones.

Al realizar los análisis por voltametría de pulso diferencial (VPD) con la matriz disuelta en diclorometano y con adiciones sucesivas del estándar β -caroteno de concentración de 1,171 ppm se obtuvo el voltamograma, que se observa en la Figura 21. En esta gráfica se muestra la VPD realizada a la matriz (línea roja), la VPD a la misma muestra de aceite con adición de 1 mL de estándar de β -caroteno (línea azul) y la VPD a la misma muestra de aceite con adición de 2 mL de estándar de β -caroteno

(línea guinda), donde se observa que al añadir el estándar éste muestra una señal alrededor de 1,0 V, mientras que en el aceite que no tiene estándar añadido, no hay una señal apreciable. Esto permite su identificación de la señal característica, indicando además que a este potencial recién ocurre la oxidación del β -caroteno.

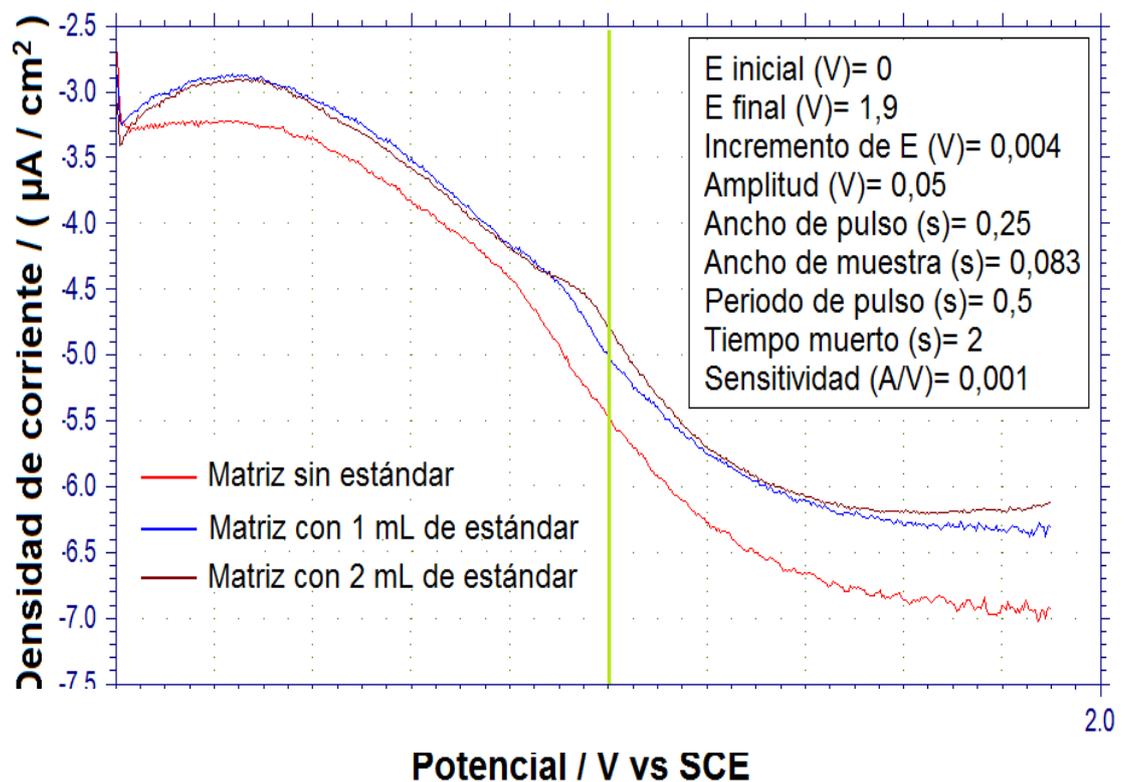


Figura 23. Voltamogramas obtenidos por VPD, a diferentes adiciones sucesivas del estándar β -caroteno a la matriz en DCM / ETOH (1:1, v / v).

6.6 TEST DE ALMACENAMIENTO

Después de realizar las determinaciones iniciales sobre el aceite extraído de la muestra obtenida por el método en frío, se procedió a realizar extracciones sucesivas por este método, homogenizando luego todas estas muestras obteniendo la matriz de estudio en la que se basaron los análisis de estabilidad en el tiempo (1, 3, 6, 9, 12, 18 días).

6.7 CONTENIDO DE EPA EN EL TIEMPO

Los resultados de los análisis del contenido de EPA por CG se observan en la Figura 24. Para el día cero presentó una concentración alrededor de 12 mg /100 mg de matriz, a partir del cual se observó un decrecimiento de la concentración casi totalmente lineal hasta llegar a concentraciones no estimables hasta el día 9. Presentando un decaimiento constante para la concentración de EPA por acción de la temperatura aplicada, la presencia de oxígeno teniendo contacto con la matriz durante el almacenamiento.

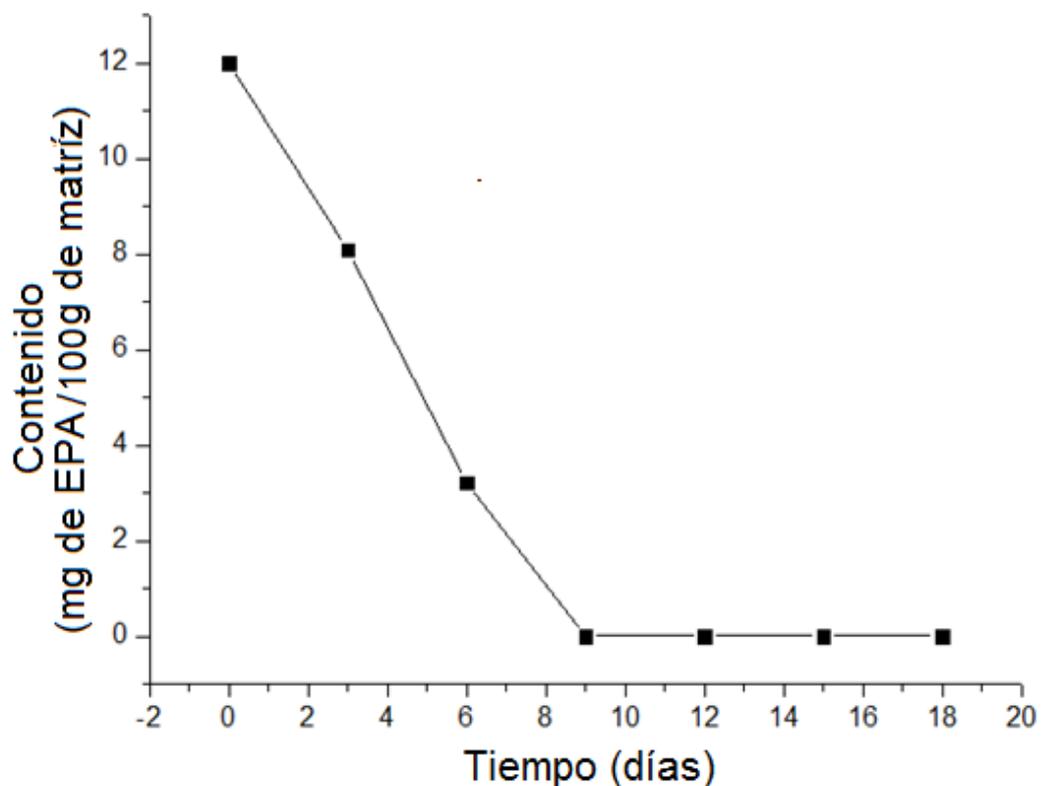


Figura 24. Disminución del contenido de EPA en el tiempo a 37 °C.

6.8 DETERMINACIÓN DE VALOR DE PERÓXIDO.

La curva de calibración para la determinación del índice de peróxido (con 0, 1, 3, 7, 10 μg / mL de Fe III), se obtuvo con una pendiente (m) de 0,032 y un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,994$, como se observa en la Figura 25.

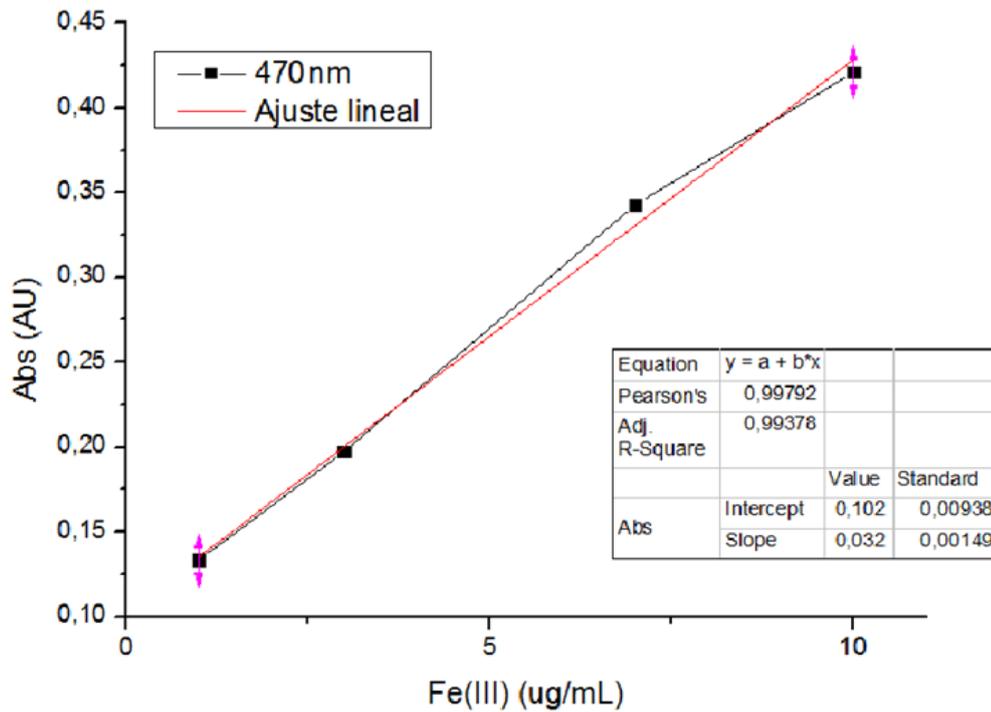


Figura 25. Curva de calibración para la determinación del índice de peróxido, para la matriz.

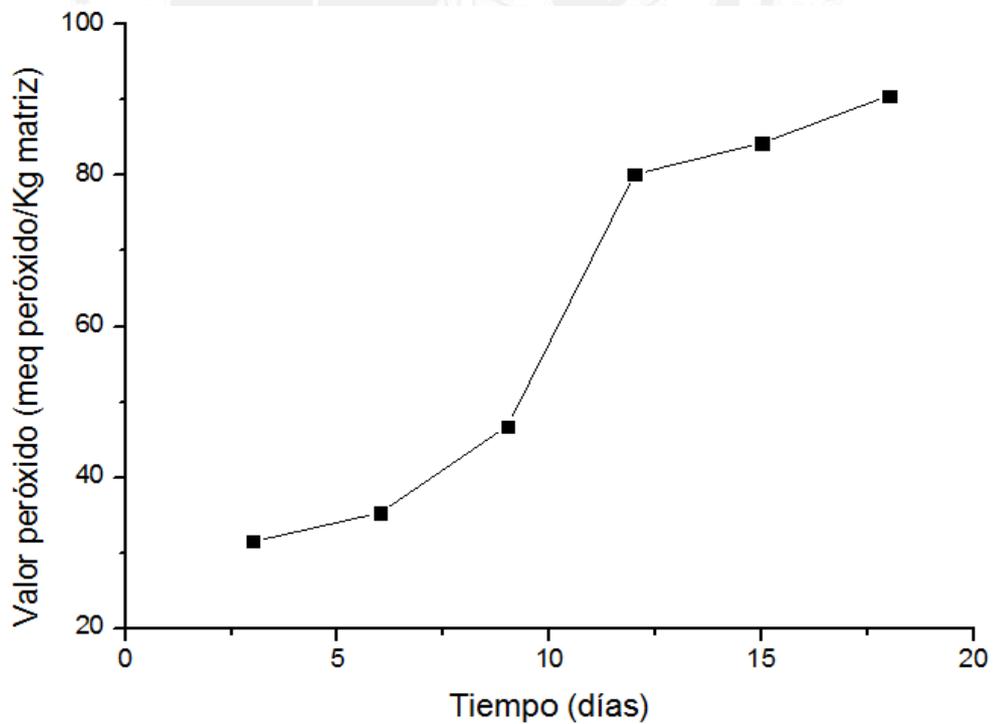


Figura 26. Valores de concentración de peróxido a través del tiempo, para la matriz.

Se realizó la determinación de índice de peróxido, para las muestras obtenidas por el test de almacenamiento. En la Figura 26 se muestra la variación del índice de peróxido en función del tiempo. En ella se observa un mayor aumento de formación de peróxidos alrededor del día 9 hasta aproximadamente el día 12. Esta mayor formación de peróxidos indica una alta velocidad de oxidación. Así mismo podría indicar que en este lapso de tiempo el periodo de inducción fue alcanzado deteriorándose los lípidos y empezando una oxidación a mayor velocidad que correspondería al proceso de propagación de radicales, hasta agotar los recursos oxidables.

6.9 CONTENIDO DE β -CAROTENO

Las señales obtenidas para las muestras obtenidas por el test de almacenamiento, no pudieron ser cuantificables (ANEXO 4). Esto podría corresponder a la baja concentración del analito en la muestra.

6.10 RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Según los resultados mostrados en la Tabla 12, la diferencia promedio relativo (PRD de sus siglas en inglés) estuvo por debajo del 5 % para los dos métodos realizados excepto en la repetición en diferentes días del método EPA en el tiempo de 6 días, donde existe una variabilidad alta. Esto puede ser debido a que en este lapso de tiempo para la degradación acelerada el decrecimiento del contenido de EPA es muy rápido por lo cual en este punto de su degradación la muestra sería muy inestable por que las reacciones se estarían produciendo a una velocidad alta. Los datos de las mediciones analizadas se encuentran en el ANEXO 5 Y 6.

Tabla 12. Precisión de los resultados para la determinación del contenido de EPA y el índice de peróxido.

Método	Unidades	Tiempo (días)	%PRD (diferente día)	%PRD (mismo día)
Contenido de EPA	%	0	0.010	0.004
	%	3	2.444	0.931
	%	6	12.102	0.684
	%	9	-	-
	%	12	-	-
	%	15	-	-
Índice de peróxido	%	0	2.756	0.442
	%	3	0.209	0.160
	%	6	0.730	2.016
	%	9	0.314	0.277
	%	12	0.130	0.254
	%	15	0.136	0.083

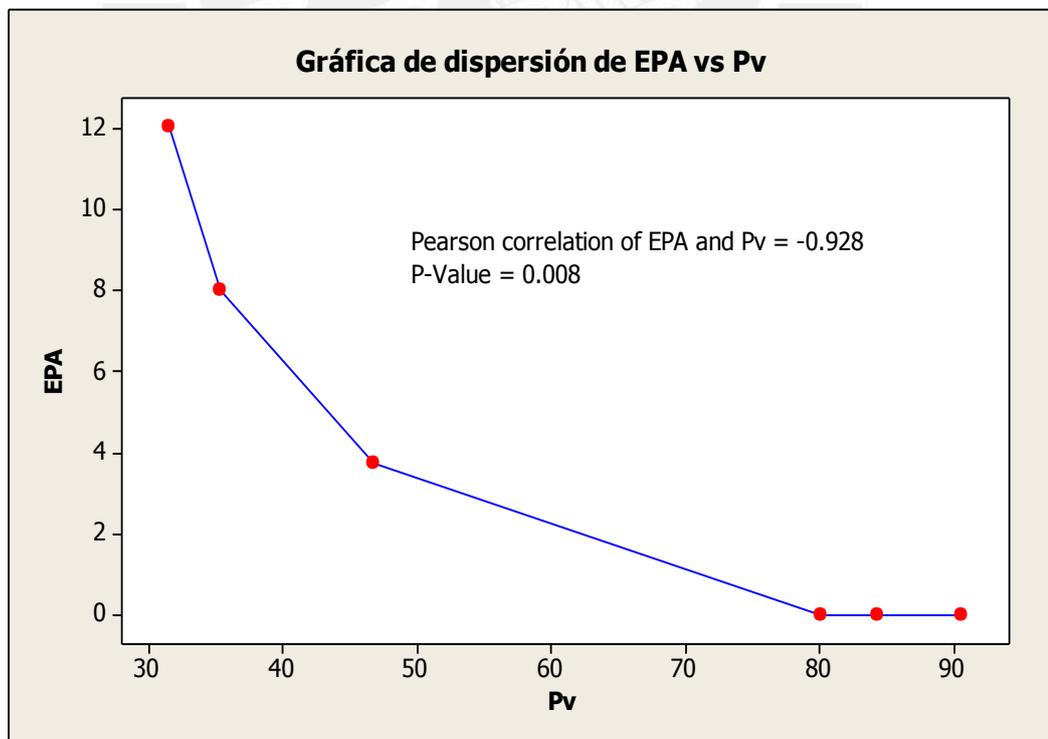


Figura 27. Prueba de correlación para los estudios en el tiempo del contenido de EPA y el índice de peróxido.

Para el análisis de correlación se realizó la relación de las dos metodologías propuestas para los estudios en el tiempo del contenido de EPA y el Índice de peróxido, se realizó la gráfica como se observa en la Figura 25, donde se muestra el coeficiente de correlación.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE

En los análisis de comparación de los métodos de extracción en caliente por soxhlet frente al método en frío modificado de Bligh y Dyer, se buscó comprobar y analizar, que la metodología empleada para la extracción es de suma importancia en la obtención de una matriz con una composición que pueda favorecer la oxidación de nutrientes como el EPA, o puedan desfavorecer este proceso dándole a la composición extraída una característica de estabilidad. Este análisis basó su decisión en la determinación del rendimiento de la extracción de grasas en la biomasa seca respecto a su rendimiento de EPA en el aceite extraído por cada método, y además por un análisis de composición de ácidos grasos que constituían al aceite extraído.

En la Tabla 6 se muestra los valores de porcentaje de grasas y EPA obtenidos por estos dos métodos, a los cuales se le realizó un análisis de ANOVA comparando los porcentajes obtenidos en ambos métodos. Se obtuvo que los resultados mostraban P valores significativos ($p < 0,05$), que rechazó la hipótesis nula, lo cual significó a un 95 % de confianza que las técnicas presentan diferentes rendimientos (Tabla 7 y 8).

Para la técnica que presentó mayor rendimiento de extracción de grasas se escogió a la técnica de soxhlet (Figura 17), para la determinación de grasas en el análisis de composición de la biomasa seca (microalga liofilizada).

Con el objeto de buscar un método que genere una extracción con una mejor estabilidad, el análisis se basó en el aceite que presentó mayor contenido de EPA y una composición de ácidos grasos que favorezcan a las características de estabilidad. En el primer aspecto el método en frío presentó una ligera superioridad frente al método en caliente (Tabla 10). En el segundo aspecto se encontró la presencia del ácido mirístico en una mayor proporción en el método de Soxhlet. Este ácido graso se presenta como un signo de degradación, lo cual se referencia en estudios para microalgas realizado por Durme et al., 2013. Esto desfavorecería la opción del método por Soxhlet. Añadido a esto el método realizado a temperaturas bajas favorece la extracción de carotenoides, como sería el caso del β -caroteno que se pretendió estudiar en el tiempo. Además en la Tabla 6 se observa para el método de Soxhlet que sus valores de RSD obtenidos fueron mayores que los obtenidos por el método en frío esto desfavorece a la técnica por presentar una mayor incertidumbre en los resultados. Por los aspectos mencionados se escogió al método en frío como adecuado para un estudio de estabilidad.

7.2 CONTENIDO DE β -CAROTENO

Para el estudio del contenido inicial de β -caroteno, en la muestra extraída de la especie se obtuvo 1,229 mg de β -caroteno / 100 g de muestra (Figura 21). Esto resultó ser bajo comparado con otros análisis realizados al género *Nannochloropsis sp* (Ryckebosch et al., 2013).

Para los análisis en el tiempo de la medición de β -caroteno por HPLC, estos no mostraron señales significativas (ANEXO 4), puede deberse a que ya en la muestra fresca se observó concentraciones bajas. Además que para ese análisis se dispuso de 75 mg de muestra, por lo que se empleó los 3 viales de 25 mg destinados para HPLC en cada punto y aun así no se obtuvo señal, no quedando matriz suficiente para seguir realizando mayor número de ensayos.

7.3 MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR VOLTAMETRÍA

Respecto a este antioxidante secundario se buscó analizar el efecto en el medio para determinar si su poder antioxidante ayudaría a la capacidad de antioxidantes totales de la matriz. Dado que la gran variedad de compuestos que presenta este medio trabaja por sinergismo entonces era importante medir su efecto en el medio y respecto a la concentración de EPA, analito de interés.

Durante la realización de la medición de la capacidad antioxidante inicial por voltametría, se buscó determinar cualitativamente la influencia del β -caroteno en la capacidad antioxidante del medio (aceite extraído). Se observó la señal correspondiente al β -caroteno alrededor de 1,0 V (Figura 22), variando este valor posiblemente por la diferencia de los componentes presentes en las muestras analizadas. Se observó que al realizar las adiciones sucesivas del estándar de β -caroteno, las mediciones respondieron favorablemente mostrando un mayor aumento de AUC (Figura 23), lo cual correspondería a una mejor capacidad antioxidante del medio. Es decir para la matriz, el enriquecimiento con cantidades de β -caroteno podría resultar favorable para su mejor estabilidad en el tiempo.

Para la medición del efecto del β -caroteno en la capacidad antioxidante en el tiempo, según las mediciones voltamétricas, no se determinó señales apreciables en las muestras de aceite realizadas (ANEXO 7), en vista que los análisis de HPLC no detectaron una señal apreciable en las pruebas de almacenamiento (ANEXO 4), se tiene indicios que la concentración del β -caroteno es muy baja o no significativa en la matriz analizada en el tiempo. Esto tiene relación con la formación de peróxidos, lo cual fue más rápido que para la matriz estudiada, tal como se mostró en la Figura 27.

7.4 CONTENIDOS DE EPA EN EL TIEMPO E ÍNDICE DE PERÓXIDO

El contenido del EPA en las condiciones planteadas por el presente trabajo de investigación mostró un decaimiento en su contenido de EPA en la matriz (Figura 24), hasta el día 6. Las razones para este decaimiento constante para la matriz analizada podrían deberse a que el periodo de inducción de la oxidación que se estima lento se haya dado previo o durante a la homogenización de la muestra.

Comparando estos valores frente a los resultados del índice de peróxido se observó que en ese mismo punto (día 6) la peroxidación se realizó a mayor velocidad lo que correspondería al proceso de propagación de los radicales hasta consumir los recursos (Figura 26). En el día 12 se observó una disminución de la velocidad de esta peroxidación. Esto acompañado con los estudios de correlación de ambos factores permite relacionar ambos procesos. Ya que el índice de peróxido mide la oxidación primaria y que el EPA es afectada por este proceso, al ser un ácido graso insaturado sufre la autooxidación en primera instancia al presentar enlaces débiles, dando la formación de hidroperóxidos que son medidos por el análisis del índice de peróxido. Los demás compuestos formados por la autooxidación que vendrían a ser la oxidación secundaria, no fueron estudiados en la presente investigación y correspondería a los productos volátiles.

7.5 TEST DE ALMACENAMIENTO

Durante la realización del Test de almacenamiento se recogieron las muestras extraídas de la especie, las cuales se mezclaron, estas muestras fueron preparadas a condiciones más estrictas que para la muestra inicial cuyo contenido correspondiente fue de 7,3719 de EPA (Tabla 10) en mg /g matriz. Por esta razón la matriz reportó un valor superior para el día 0, de 12,009 de EPA en mg /g matriz (ANEXO 5).

7.6 RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Según el análisis de correlación de las dos metodologías mostrado en la Figura 25, el P valor es menor a 0,05. Por lo tanto a un nivel de confianza del 95 % nos dice que el coeficiente de correlación es diferente de cero en la población. Además el coeficiente de correlación de Pearson es cercano a uno y negativo. Por lo que existe una alta correlación inversa entre las dos metodologías a pesar de no ser lineal, esto es debido al proceso por etapas que ocurre en la oxidación de lípidos.

Respecto a que las demás variables no fueron estudiadas para el análisis de estabilidad no se pudo observar las relaciones de sinergismo que presentaría la matriz y los efectos de cada uno de ellos respecto a la determinación de la la estabilidad del EPA en la matriz.

8. CONCLUSIONES

- El análisis de comparación de los métodos de extracción en caliente por soxhlet frente al método en frío modificado de Bligh y Dyer, permitió comprobar que el método de extracción es de suma importancia en la obtención de la composición de una matriz adecuada para un análisis de estabilidad. Esto fue respaldado por el análisis de composición de ácidos grasos, que mostró evidencia de menor efecto de degradación para el método en frío. Además por ser realizado a temperaturas bajas favorecería la extracción de carotenoides, como sería el caso del β -caroteno.
- Para la medición del efecto del β -caroteno en la capacidad antioxidante según las mediciones voltamétricas, se observó una respuesta favorable del medio respecto a la adición de este componente.
- Respecto al análisis del índice de peróxido, se observó que existe una alta correlación inversa entre las dos metodologías, esto indicaría al

análisis del índice de peróxido como un buen indicador de la estabilidad del EPA en la matriz.

- Para evaluar la estabilidad del EPA se analizó el índice de peróxido correspondiente como parámetro de la oxidación primaria. Los demás compuestos formados por la oxidación secundaria, productos volátiles, no fueron estudiados en la presente investigación.
- El contenido del EPA en las condiciones planteadas por el presente trabajo de investigación mostró un decaimiento en su contenido de EPA hasta el día 6, comparando estos valores frente a los resultados del índice de peróxido se observó que en ese mismo punto la peroxidación se realizó a mayor velocidad lo que correspondería al proceso de propagación radicalaria. En el día 12 se observó una disminución de velocidad de esta peroxidación. Esto acompañado con los estudios de correlación de ambos factores permite relacionar ambos procesos.

9. RECOMENDACIONES

A pesar de que en la literatura se menciona que los análisis de carotenoides producidos por el género *Nannochloropsis sp.*, son de una importancia significativa (Ryckebosch et al., 2013), en el presente trabajo experimental para la especie *Nannochloropsis oceánica* la cepa que posee un alto porcentaje de similitud con *N. oceánica* en la región ITS1 (99 %) e ITS2 (98 %), no se logró cuantificar concentraciones significativas, por lo que se recomendaría continuar realizando estudios en base al β -caroteno, por su importancia nutricional y sus efectos en la estabilidad de la matriz.

Además cabe mencionar que su poder de inhibir el oxígeno singlete no fue medido y siendo este uno de sus atributos como antioxidante sería interesante poder analizarlo para la especie.

Otros posibles aspectos a mejorar podrían ser el desarrollo de una metodología más apropiada para la extracción, o reproducir las condiciones

necesarias de los métodos expuestos en la extracción del aceite, como un mejor control de una temperatura más bajo y mejor control de luz que el realizado en el estudio, lo cual favorecería a mejorar la matriz. Esto debido a la gran reactividad de la matriz frente al aire y luz, aunque sea en cantidades mínimas.

Se recomienda seguir estudiando la influencia de antioxidantes naturales en la matriz que contiene al EPA, debido a que se consideran a los antioxidantes sintéticos aplicados en usos alimentarios y nutraceuticas como potenciales promovedores de efectos carcinogénicos (Ryckebosch et al., 2013).

Para el análisis de oxidación de lípidos y degradación de los ácidos grasos se puede seguir explorando en los diversos métodos para determinar la estabilidad de la muestra. Así como también continuar explorando los demás antioxidantes que tendrían efectos en la estabilidad de la matriz, debido a que presenta una creciente expectativa e interés por su contenido de EPA.

10. REFERENCIAS

- Arnold, A., Genard, B., Zito, F., Tremblay, R., Warschawski, D., & Marcotte, I. (2014). Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ^{13}C solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1848(1), 369–377.
<http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.017>
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). Polarography and Pulse Voltammetry. In D. Harris (Ed.), *Electrochemical Methods fundamentals and applications* (Second, pp. 261 – 303). Texas.
- basinc. (2016). Pulse Voltammetric Techniques. Extraído el 01 de febrero del 2016, desde:
https://www.basinc.com/mans/EC_epsilon/Techniques/Pulse/pulse.html#differential
- Bertha, A., & Voltolina, D. (2007). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. *Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S., ISBN 968-5(5), 35 – 51.*
- Chi, Y., & Takiguchi, Y. (2015). Comparison of the Growth Performance of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 and *Nannochloropsis gaditana* CCMP526 under Various Culture Conditions. *Journal of Plant Sciences (Science Publishing Group)*, 3(1), 9.
<http://doi.org/10.11648/j.jps.20150301.12>
- Christie, W. (2003). *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*. (U. The Oily Press: Bridgewater, Ed.) (3rd ed.).
- Dong, H.-P., Williams, E., Wang, D., Xie, Z.-X., Hsia, R., Jenck, A., ... Place, A. (2013). Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to Long-Term Nitrogen Starvation and Recovery. *Plant Physiology*, 162(2), 1110–26.
<http://doi.org/10.1104/pp.113.214320>
- Durme, J. Van, Goiris, K., Winne, A. De, Cooman, L. De, & Muylaert, K. (2013). Evaluation of the volatile composition and sensory properties of five species of microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10881– 10890. <http://doi.org/10.1021/jf403112k>
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid Oxidation*. (2014 Elsevier, Ed.) (segunda ed).

- University of California, USA.
- Gallon, C. Z., Fuller, S. C., Fanning, K. J., Smyth, H. E., Pun, S., Martin, I. F., & O'Hare, T. J. (2013). Increase in β -ionone, a carotenoid-derived volatile in zeaxanthin-biofortified sweet corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(30), 7181–7187. <http://doi.org/10.1021/jf402326e>
- Goiris, K., De Vreese, P., De Cooman, L., & Muylaert, K. (2012). Rapid screening and guided extraction of antioxidants from microalgae using voltammetric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(30), 7359–7366. <http://doi.org/10.1021/jf302345j>
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *36*(2), 269–274. <http://doi.org/10.1007/s10295-008-0495-6>
- He, H., Rodgers, R. P., Marshall, A. G., & Hsu, C. S. (2011). Algae polar lipids characterized by online liquid chromatography coupled with hybrid linear quadrupole ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy and Fuels*, *25*(10), 4770–4775. <http://doi.org/10.1021/ef201061j>
- Hornero, D., Pérez, A., & Mínguez, M. I. (2001). A rapid spectrophotometric method for the determination of peroxide value in food lipids with high carotenoid content. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *78*(11), 1151–1155. <http://doi.org/10.1007/s11746-001-0404-y>
- Kounaves, S. P. (1997). Voltammetric Techniques. In F. Settle (Ed.), *Handbook of instrumental Techniques for analytical chemistry* (pp. 711 – 725). Michigan: Prentice Hall PTR.
- Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., ... Xu, J. (2014). Choreography of Transcriptomes and Lipidomes of *Nannochloropsis* Reveals the Mechanisms of Oil Synthesis in Microalgae. *The Plant Cell*, *26*(4), 1645–1665. <http://doi.org/10.1105/tpc.113.121418>
- Li, J., Han, D., Wang, D., Ning, K., Jia, J., Wei, L., ... Xu, J. (2014). Choreography of Transcriptomes and Lipidomes of *Nannochloropsis* Reveals the Mechanisms of Oil Synthesis in Microalgae. *The Plant Cell*, *26*(4), 1645–1665. <http://doi.org/10.1105/tpc.113.121418>
- Lowe, G., Vlismas, K., & Young, A. (2003). Carotenoids as prooxidants? *Molecular Aspects of Medicine*, *24*(6), 363–369.

- [http://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00032-3](http://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00032-3)
- Martinez, A. (2003). *Carotenoides. Facultad de Química Farmacéutica. Colombia.*
- Meng, Y., Jiang, J., Wang, H., Cao, X., Xue, S., Yang, Q., & Wang, W. (2015). The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes. *Bioresource Technology*, 179, 483–489. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.012>
- Miller, D. (2001). *Química de Alimentos Manual de laboratorio.* (G. Noriega, Ed.) (LIMUSA, 20).
- Pan, Y., Yang, H., Meng, Y., Liu, J., Shen, P., Wu, P., ... Xue, S. (2016). The utilization of natural soda resource of Ordos in the cultivation of *Nannochloropsis oceanica*. *Bioresource Technology*, 200, 548–556. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.068>
- Rockenbauer, A. (2012). Degradation of Edible Oil during Food Processing by Ultrasound: Electron Paramagnetic Resonance, Physicochemical, and Sensory Appreciation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7761– 7768. <http://doi.org/10.1021/jf301286f>
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Termote, R., Lemahieu, C., Muylaert, K., Van Durme, J., ... Foubert, I. (2013). Stability of omega-3 LC-PUFA-rich photoautotrophic microalgal oils compared to commercially available omega-3 LC-PUFA oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 10145–10155. <http://doi.org/10.1021/jf402296s>
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., & Foubert, I. (2012). Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 189–198. <http://doi.org/10.1007/s11746-011-1903-z>
- Salazar Pérez, L. E. (2012). *Evaluación de métodos de extracción de aceite de microalgas para la producción de biodiesel.* Universidad de Piura. Piura.
- Samanamud, C. P. A. (2015). Evaluación de compuestos bioactivos: ácidos grasos y proteínas, a partir de biomasa microalgal seca. In *V CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA ALGAL* (pp. 1–36). Chile. Retrieved from <http://claba2015.com/wp-content/uploads/2015/11/Carla-Aguilar.pdf>
- Servaes, K. (2015). Polar Lipid Profile of *Nannochloropsis oculata* determined

- using a variety of lipid extraction procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3931–3941.
- Suda, S., Atsumi, M., & Miyashita, H. (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia*, 41(3), 273–279. <http://doi.org/10.2216/i0031-8884-41-3-273.1>
- Wasowicz, E., Gramza, A., Hêœ, M., Jeleñ, H. H., Korczak, J., Maecka, M., ... Rudzińska, M. (2004). Oxidation of lipids in food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 13(48 61), 87–100.
- Yao, L., Gerde, J. a, Lee, S.-L., Wang, T., & Harrata, K. a. (2015). Microalgae lipid characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1773–87. <http://doi.org/10.1021/jf5050603>



ANEXO 3. Certificado del Estándar de PUFA 3.

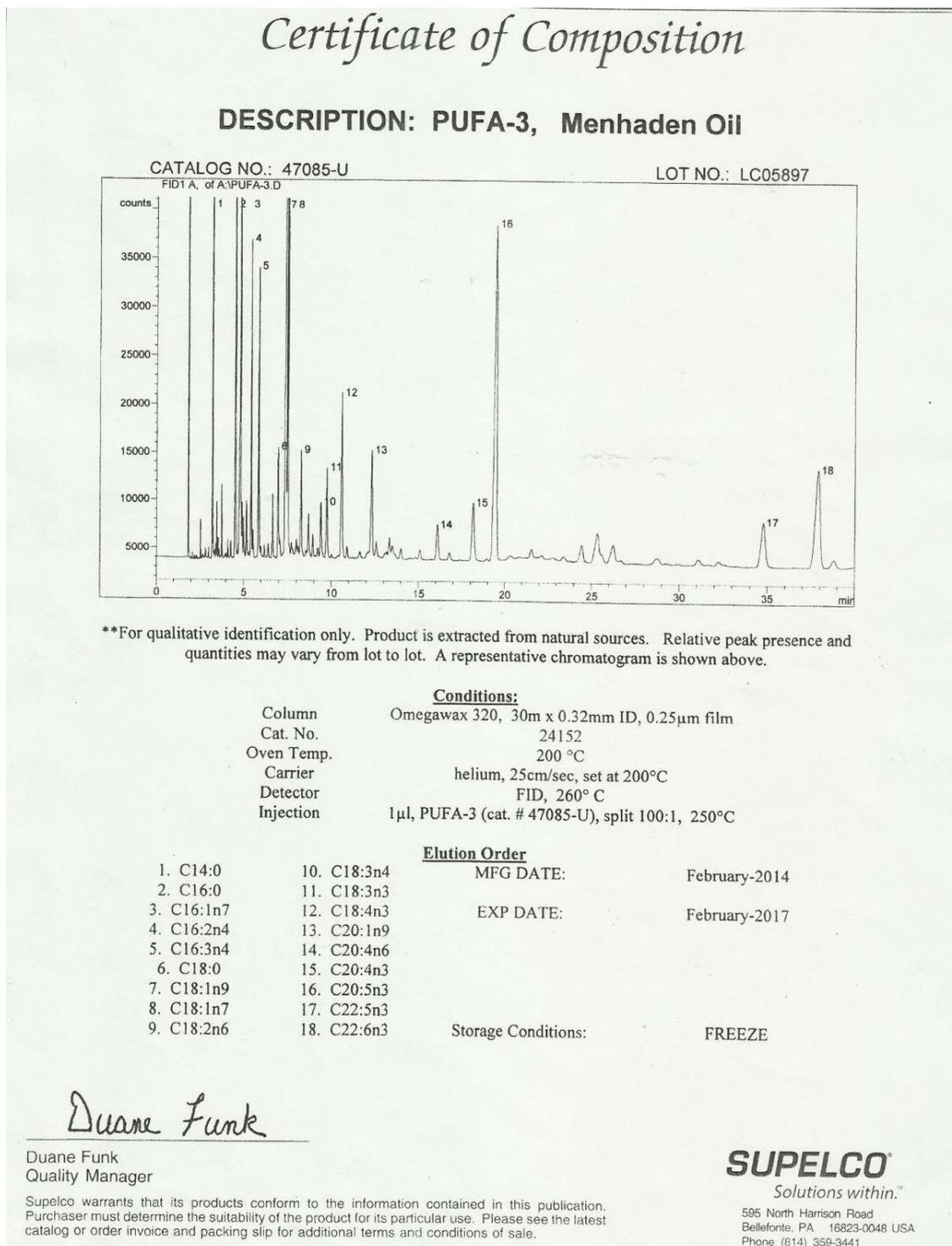


Figura 30. Certificado del Estándar de PUFA 3.

ANEXO 4.

Cromatograma para la determinación del β -caroteno por HPLC, en el día 0 que no presento señales cuantificables.

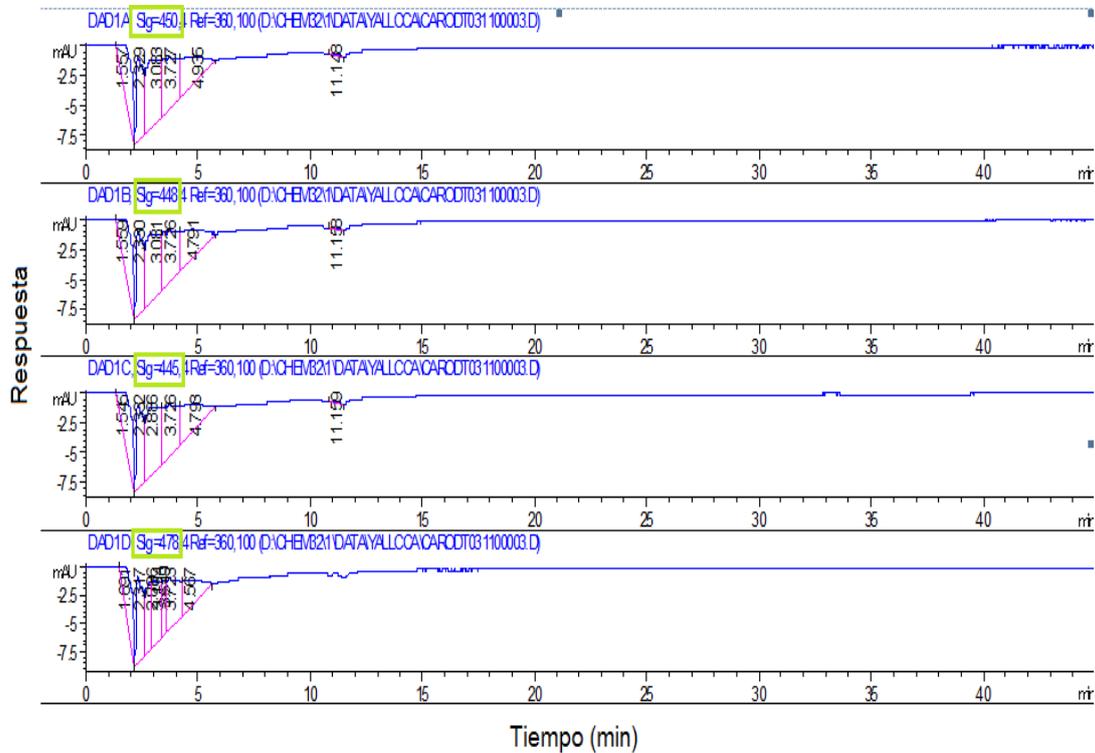


Figura 31. Cromatogramas para la determinación del β -caroteno en el tiempo por HPLC para la matriz perteneciente al día 0., leídos a 448, 445, 450 y 478 nm.

ANEXO 5.

Tabla 13. Contenido de EPA en el tiempo.

Contenido de EPA (mg / 100 mg matriz)				
Tiempo (días)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
0	12,00881	12,01005	12,00831	12,0090567
3	7,89385	8,08914	7,96765	7,98354667
6	3,5643	4,02345	3,58876	3,72550333
9	0	0	0	0
12	0	0	0	0
15	0	0	0	0

ANEXO 6.

Tabla 14. Índice de peróxido a través del tiempo.

Índice de peróxido				
Tiempo (días)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
0	31,81174	30,94689	31,67324	31,47729
3	35,22006	35,293649	35,35031	35,2880063
6	57,33201	56,98764	56,049733	56,7897943
9	80,07015	80,3216	80,09976	80,1638367
12	84,32491	84,43497	84,22046	84,32678
15	90,64001	90,51691	90,59223	90,58305

ANEXO 7. Voltamograma por PDV, para la determinación capacidad antioxidante total en el día 0, que no presento señales cuantificables

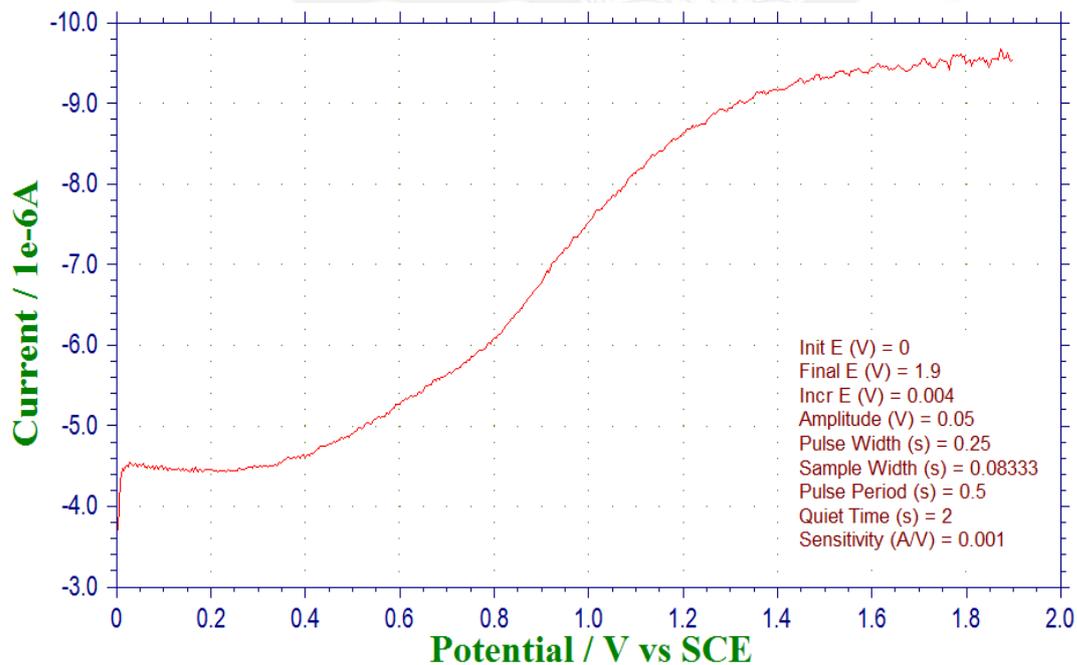


Figura 32. Voltamograma obtenidos por VPD, obtenido en la determinación de capacidad antioxidante total en el tiempo para la matriz perteneciente al día 0.