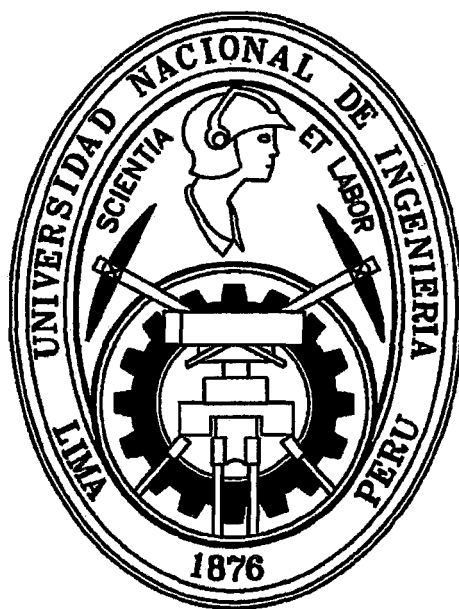


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN QUÍMICA

TITULADA:

**VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN
BIOMASA DE LA MICROALGA *Nannochloropsis sp.***

PRESENTADA POR:
Leenin Flores Ramos

ASESOR:
Mg. Ily M. Maza Mejía

LIMA – PERÚ
2013

Digitalizado por:

**Consortio Digital del
Conocimiento MebLatam,
Hemisferio y Dalse**

DEDICATORIA

Con especial cariño y admiración para mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Carla Aguilar Samanamud y a todo el equipo del Laboratorio de Biotecnología del Instituto del Mar del Perú por la confianza y el apoyo prestado para la realización de la Tesis.

Agradezco a la profesora Ily M. Maza Mejía por su asesoría y conocimientos que fueron necesarios para el desarrollo de la Tesis.

Agradezco a la Dra. Rosario Rojas Durán y a sus asistentes por la colaboración prestada en la caracterización de la muestra mediante cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas.

Agradezco a la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional de Ingeniería y a todos sus docentes por la formación adquirida en todos los años que curse allí.

Un especial agradecimiento para mis padres y hermanos por todo el apoyo y la dedicación hacia mi persona.

RESUMEN

En el presente trabajo se ha validado la metodología propuesta por Ichihara y Fukubayashi, aplicado al extracto de lípidos totales de biomasa liofilizada de la microalga *Nannochloropsis sp.*, con la finalidad de obtener información del perfil de ácidos grasos de esta. La información será usada para discutir el posible uso de esta microalga como fuente de lípidos para la producción de biodiesel dentro de los proyectos que tiene en el Instituto del Mar del Perú (IMARPE).

Los ácidos grasos propuestos para la validación fueron: el ácido mirístico, palmítico, palmitoléico, esteárico, oleico, araquidónico y eicosapentaenoico, que constituyen aproximadamente el 98% del total de ácidos grasos que posee esta microalga. Los ácidos grasos fueron identificados con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (GC-MS) en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las pruebas de validación se desarrollaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (GC-FID) dentro de las instalaciones del Laboratorio de Análisis Instrumental, Laboratorio de Biotecnología Acuática-IMARPE.

Entre los parámetros de validación estudiados se tiene: la linealidad, donde cada ácido graso reportó coeficientes de determinación cercanos a la unidad para cada curva de calibración; la precisión, el método reportó tener buena precisión con valores de desviación estándar relativa menores a 2% para cada ácido graso; el porcentaje de recuperación se encontró entre 93-101%; los límites de detección y cuantificación se encontraron en el orden de unos cuantos microgramos.

El método ha cumplido con los criterios de aceptación propuestos y se le ha considerado como una buena alternativa para la determinación de ácidos grasos y adecuado para nuestros propósitos.

1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	3
2.1. Validación de Métodos de Ensayo	3
2.1.1. Definición	3
2.1.2. Etapas de la Validación de un Método Analítico	3
2.1.3. Parámetros de la Validación	4
2.1.3.1. Veracidad	4
2.1.3.2. Precisión	5
2.1.3.3. Linealidad	5
2.1.3.4. Sensibilidad	7
2.1.3.5. Límite de Detección	7
2.1.3.6. Límite de Cuantificación	7
2.1.3.7. Selectividad	7
2.1.3.8. Robustez	7
2.2. Lípidos	9
2.2.1. Definición	9
2.2.2. Clasificación	9
2.2.2.1. Lípidos Simples o Neutros	9
2.2.2.2. Lípidos complejos	11
2.2.2.3. Proteolípidos	11
2.3. Ácidos Grasos	12
2.3.1. Definición	12
2.3.2. Clasificación	12
2.3.3. Representación	12
2.3.4. Propiedades Físicoquímicas	15
2.3.5. Biosíntesis de Ácidos Grasos	15
2.3.6. Determinación de Ácidos Grasos	18
2.4. <i>Nannochloropsis</i> sp.	23
2.4.1. Introducción	23
2.4.2. Descripción	24
2.4.3. Composición de lípidos	24
2.4.4. Obtención de Biomasa Microalgal	26

2.4.4.1. Cultivo de microalgas	26
2.4.4.2. Cosecha de microalgas	27
2.4.4.3. Secado de biomasa microalgal	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivos Generales	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Materiales	29
4.2. Procedimiento Experimental	30
4.2.1. Extracción de lípidos Totales	30
4.2.2. Derivatización de los Ácidos Grasos	30
4.2.3. Condiciones del Cromatógrafo de Gases	31
4.2.4. Metodología de la Validación	31
4.2.4.1. Prueba de normalidad	32
4.2.4.2. Selectividad	32
4.2.4.3. Linealidad	33
4.2.4.4. Sensibilidad	33
4.2.4.5. Límite de Detección y de Cuantificación	33
4.2.4.6. Porcentaje de Recuperación	33
4.2.4.7. Precisión	35
4.2.4.8. Robustez	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
5.1. Prueba de normalidad	36
5.2. Selectividad	39
5.3. Linealidad	43
5.4. Sensibilidad	47
5.5. Límite de Detección y de Cuantificación	48
5.6. Porcentaje de Recuperación	49
5.7. Precisión	50
5.8. Robustez	51
6. CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
GLOSARIO	55
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ANEXO A: Preparación de Metil Ésteres de Ácidos Grasos para Cromatografía Gaseosa, Método de Kenichi y Fukubayashi	59
ANEXO B: Espectro de masas de los ácidos grasos estudiados	66
ANEXO C: Prueba de valores atípicos	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Propiedad de homocedasticidad	6
Figura 2.2. Representación estructural de la molécula de ácido graso	12
Figura 2.3. Ejemplos de la representación de los ácidos grasos.	13
Figura 2.4. Mecanismo de producción de malonil-CoA	16
Figura 2.5. Mecanismo de elongación del grupo acetilo	16
Figura 2.6. Mecanismo general de la síntesis de palmitato	17
Figura 2.7. Reacción de transesterificación del acilglicérido	19
Figura 2.8. Mecanismo de transesterificación mediante catálisis ácida	20
Figura 2.9. Fotografías tomadas de un cultivo de la microalga <i>Nannochloropsis sp.</i> por el Banco de Germoplasma del IMARPE	24
Figura 2.10. Cultivo intermedio de la microalga <i>Nannochloropsis sp.</i> en la Sala de Microalgas del IMARPE	26
Figura 2.11. Cultivo masivo de la microalga <i>Nannochloropsis sp.</i> en la Sala de Procesos del IMARPE	26
Figura 2.12. Cosecha de la microalga <i>Nannochloropsis sp.</i> en la Sala de Procesos del IMARPE	27
Figura 2.13. Secado de biomasa de la microalga <i>Nannochloropsis sp.</i> en la Sala de Procesos del IMARPE	27
Figura 5.1. Gráficos de probabilidad de los datos de los ácidos grasos saturados.	37
Figura 5.2. Gráficos de probabilidad de los datos de los ácidos grasos monoinsaturados.	37
Figura 5.3. Gráficos de probabilidad de los datos de los ácidos grasos poliinsaturados.	38
Figura 5.4. Comparación de cromatogramas de la muestra con/sin estándar interno	39
Figura 5.5. Cromatograma típico obtenido de las pruebas de validación	40
Figura 5.6. Cromatograma obtenido por GC-MS de la muestra derivatizada	41
Figura 5.7. Curvas de calibración de los ácidos grasos saturados	43
Figura 5.8. Curvas de calibración de los ácidos grasos monoinsaturados	43

Figura 5.9. Curvas de calibración de los ácidos grasos poliinsaturados	44
Figura 5.10. Gráficos de residuales de las curvas de calibración de los ácidos grasos saturados.	46
Figura 5.11. Gráficos de residuales de las curvas de calibración de los ácidos grasos monoinsaturados.	46
Figura 5.12. Gráficos de residuales de las curvas de calibración de los ácidos grasos poliinsaturados	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Metodología de Youden Steiner para la determinación de robustez	8
Tabla 2.2. Ejemplos de las diferentes estructuras de los lípidos simples o neutros	10
Tabla 2.3. Ejemplos de la clasificación de los lípidos complejos	11
Tabla 2.4. Nomenclatura de los ácidos grasos	14
Tabla 2.5. Prueba de conversión de lípidos a FAMES por el método de Ichihara y Fukubayashi para la temperatura de reacción de 45°C	21
Tabla 2.6. Comparación de la metodología de Ichihara y Fukubayashi con métodos convencionales en una muestra de aceite de pescado	22
Tabla 2.7. Composición de ácidos grasos de la microalga <i>Nannochloropsis sp.</i>	25
Tabla 4.1. Patrón del porcentaje de área de 13 cromatogramas de ácidos grasos analizadas previo a las pruebas de validación y su valor esperado de ácidos grasos	31
Tabla 4.2. Criterio de acuerdo al valor de resolución	32
Tabla 4.3. Construcción de la curva de calibración de los estándares de ácido graso	33
Tabla 5.1. Valores de la relación de áreas de los ácidos grasos obtenidos de 32 réplicas de la muestra para la prueba de normalidad.	36
Tabla 5.2. Valores del estadístico de Anderson Darling. Prueba de normalidad.	38
Tabla 5.3. Valores típicos de tiempo de retención, ancho de pico y resolución de los picos obtenidos de la prueba de validación.	41
Tabla 5.4. Ácidos Grasos identificados mediante GC-MS para una muestra derivatizada del extracto lipídico de la cepa Np	42
Tabla 5.5. Valores obtenidos de las pruebas de linealidad	44
Tabla 5.6. Valores de la relación de áreas y varianzas obtenidos de la prueba de homocedasticidad	45
Tabla 5.7. Valores de la sensibilidad del método	47
Tabla 5.8. Valores del límite de detección y límite de cuantificación del método	48
Tabla 5.9. Valores de recuperación del método	49

Tabla 5.10. Valores de la precisión intermedia de la respuesta del equipo	50
Tabla 5.11. Valores de la precisión intermedia del método	50
Tabla 5.12. Valores obtenidos según la metodología de Youden-Steiner	51
Tabla 5.13. Valores de la diferencia de valores absolutos de las variables elegidas para la prueba de robustez y sus correspondientes valores críticos ($\sqrt{2}S$)	51

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En la actualidad, gran parte del trabajo de investigación que se realiza está asociado a resultados de mediciones que se efectúan en laboratorios de análisis químico, físico, biológico, etc. Las falsas interpretaciones y conclusiones erradas obtenidas de resultados no confiables, podrían generar que tales errores se multipliquen dentro de la comunidad científica y formen parte de un conocimiento universalmente aceptado.

Para prevenir estos hechos, es necesario que cada laboratorio de investigación diseñe métodos para validar sus procedimientos. Es decir, el laboratorio debe obtener evidencia de que sus procedimientos cumplen con requisitos que aseguren que sus resultados sean confiables¹. Estos requisitos se conocen como criterios de aceptación. Los criterios de aceptación recomendados para laboratorios de análisis químico pueden ser obtenidos de normas emitidas por la Asociación de las Comunidades Analíticas (AOAC)², el *Codex Alimentarius*³, así como de otras normas de instituciones de carácter afín. Estos criterios también dependerán del procedimiento específico de análisis que se esté usando y del grado de las necesidades del laboratorio³.

La confiabilidad del resultado también dependerá en gran medida de la implementación de un adecuado sistema de la gestión de la calidad, el cumplimiento de los principios de las buenas prácticas de laboratorio y la comprobada competencia técnica del personal involucrado¹.

El año 2010, Ichihara y Fukubayashi⁴ publicaron un método que permite determinar ácidos grasos en muestras biológicas, este método según manifiestan muestra una serie de ventajas frente a los métodos convencionales que se usan frecuentemente en los laboratorios, entre las que destacan: menor toxicidad, facilidad de preparación y menor costo.

El método ha sido aplicado en este trabajo con la finalidad de obtener un protocolo que nos permita decidir si bajo nuestras condiciones de laboratorio el método cumple con los criterios de aceptación propuestos y nos permita continuar con nuestras investigaciones relacionadas a la composición de ácidos grasos de la microalga *Nannochloropsis sp.* como parte de un proyecto gestionado por el Instituto del Mar del Perú.

La importancia de esta microalga radica en que es considerada como potencial fuente de lípidos para la producción de biodiesel^{5, 6, 7}; sin embargo, Jegan⁸ manifiesta que no es adecuada porque posee altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados; de otro lado Oloffson⁹ reporta contenidos moderadamente bajos de estos ácidos grasos dependiendo de las condiciones de cultivo. Estas propuestas muestran que el método analítico seleccionado para el análisis de ácidos grasos debe dar resultados confiables, para que pueda ser discutida sin cometer errores.

En el siguiente capítulo se intenta explicar brevemente el concepto de validación para luego estudiar el conjunto que engloba a los ácidos grasos, los lípidos, y mostrar los diferentes compuestos de las que forman parte en los seres vivos para concluir con su importancia y análisis en la microalga *Nannochloropsis sp.*

CAPÍTULO 2: GENERALIDADES

2.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO

2.1.1. DEFINICIÓN. Es un proceso mediante el cual se definen requisitos analíticos, que aseguran que el método de ensayo bajo ciertas consideraciones ha desarrollado capacidades consistentes con la aplicación requerida¹⁰. Esta definición implica que se debe desarrollar un mecanismo a través del cual se asegure que los resultados entregados por un laboratorio sean confiables y adecuados para los fines previstos.

2.1.2. ETAPAS DE LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO:

El proceso de validación involucra una serie de etapas que se deben de planificar y desarrollar sistemáticamente para lograr el objetivo de validar el método, una manera de lograr esto es mediante el siguiente camino¹⁰:

- Definir el objetivo y el alcance de la validación.
- Definir los parámetros característicos y los criterios de aceptación a determinar.
- Desarrollar un procedimiento operacional de validación.
- Definir los ensayos de validación.
- Verificar si las características de operación de los equipos con los que cuenta el laboratorio son compatibles con las que exige el método de estudio.
- Caracterizar los materiales, por ejemplo, patrones y reactivos.
- Ejecutar las pruebas preliminares de validación.
- Ajustar los parámetros de validación del método y los criterios de aceptación si es necesario.
- Ejecutar las pruebas completas de validación.
- Preparar un procedimiento operacional para la ejecución del método de rutina.
- Definir criterios de revalidación (por ejemplo: periodicidad; cambios de personal, condiciones ambientales, equipos, etc.)
- Definir tipo y frecuencia de verificación de control de calidad analítica del método de rutina.
- Y finalmente, documentar los resultados de las pruebas realizadas.

En general el proceso de validación se debe realizar cuando el laboratorio trata de implementar¹⁰:

- Métodos no normalizados: Métodos desarrollados por el laboratorio, métodos nuevos publicados en revistas científicas o métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
- Métodos normalizados con una modificación significativa.

En el caso de métodos normalizados sin modificación significativa lo que se sugiere es una verificación de los parámetros reportados por dichos métodos.

2.1.3. PARÁMETROS DE LA VALIDACIÓN¹¹

Existen una serie de parámetros que son necesarias evaluarlas para determinar la calidad del resultado analítico, entre las más importantes se encuentran: la veracidad, la precisión, la linealidad, la sensibilidad, el límite de detección, el límite de cuantificación, la selectividad y la robustez.

2.1.3.1. VERACIDAD: La veracidad es el grado de aproximación entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado de la propiedad que está siendo medida.

Una manera de expresar este parámetro es en términos del **sesgo** (bias), donde se mide la diferencia entre el valor promedio de varios resultados de mediciones y un valor de referencia.

Otra manera de expresarla es en términos del **porcentaje de recuperación** (%R) definida como el porcentaje del analito de interés obtenido en la muestra fortificada, calculado en función de la muestra sin fortificación y la cantidad adicionada de analito, el porcentaje de recuperación se calcula de la siguiente manera:

$$\%R = \frac{C_F - C_U}{C_A} \times 100\%$$

Dónde:

C_F: Concentración o cantidad de analito medida en la muestra fortificada.

C_U: Concentración o cantidad de analito medida en la muestra sin fortificar.

C_A: Concentración o cantidad de analito adicionada en la muestra fortificada.

2.1.3.2. PRECISIÓN: La precisión es la concordancia entre los resultados de las mediciones de pruebas independientes de réplicas del mismo objeto o de objetos similares obtenidos bajo condiciones estipuladas. La precisión se expresa usando la desviación estándar de los resultados o también usando la desviación estándar relativa porcentual (RSD%). Se pueden definir tres condiciones de medición de la precisión:

- Condiciones de repetibilidad: Se realizan las pruebas sobre porciones de la misma muestra por un mismo analista, utilizando el mismo método de ensayo, bajo las mismas condiciones y a lo largo de un corto período de tiempo dentro de un mismo laboratorio.
- Condiciones de precisión intermedia: Se realizan las pruebas sobre porciones de la misma muestra usando el mismo procedimiento, pero a lo largo de un extendido período de tiempo y posiblemente por dos analistas diferentes, dentro de un mismo laboratorio.
- Condiciones de reproducibilidad: Son obtenidos a partir de resultados de mediciones producidos por distintos laboratorios. Las condiciones de reproducibilidad de las mediciones se refieren a que las mediciones son realizadas en porciones de una misma muestra por diferentes analistas que trabajan en distintas locaciones.

2.1.3.3. LINEALIDAD: Es la capacidad de un método de análisis de dar respuesta o resultados instrumentales proporcionales a la cantidad del analito en un determinado intervalo.

Generalmente se obtiene una curva de calibración lineal de la forma:

$$y = mx + b$$

Dónde:

y: Respuesta del instrumento analítico

x: Concentración o cantidad del estándar.

m: Pendiente de la recta

b: Intercepto en el origen

Existen ciertos criterios para determinar la linealidad de una curva de calibración, entre los cuales se puede mencionar cinco¹²:

1. La curva de calibración debe tener un aspecto visual de línea recta.
2. El valor del coeficiente de determinación (R^2) debe ser mayor a 0.995
3. Para determinar la correlación de los datos se establece una prueba de hipótesis consistente en hallar el t_{exp} cuyo valor es:

$$t_{exp} = \frac{R\sqrt{N-2}}{\sqrt{1-R^2}}$$

Donde, N es el número de datos. Si dicho valor de t_{exp} es mayor que el $t_{crítico}$ correspondiente para la prueba t de dos colas con N-2 grados de libertad y $\alpha=0.05$, se establece que los datos tienen buena correlación.

4. Se debe realizar pruebas de homocedasticidad, es decir debe de investigar si la distribución de la señal alrededor de un punto tiene la misma varianza en cada punto de la recta como se observa en la Fig. 2.1:

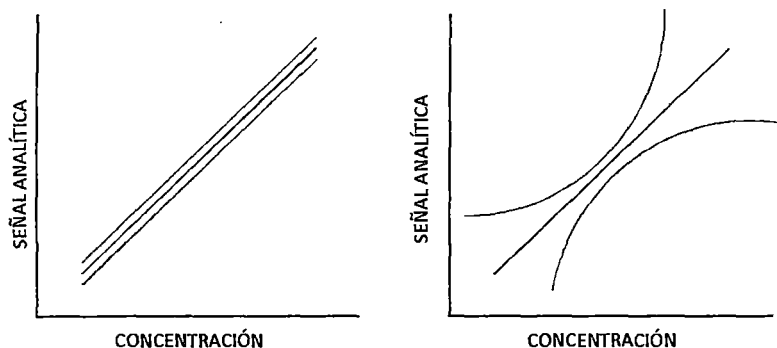


Figura 2.1. Propiedad de homocedasticidad. Izquierda, Distribución homocedástica. Derecha, distribución heterocedástica

Para ello se seleccionan dos puntos diferentes de la recta, se realiza una serie de medidas y se comparan sus varianzas con la prueba F.

5. Los residuales de la recta ($y_i - b - mx_i$) deben cumplir una serie de propiedades:
 - El número de residuales positivos debe ser aproximadamente igual al número de residuales negativos.
 - Los residuales deben estar distribuidos aleatoriamente.
 - Los residuales deben de tener aproximadamente el mismo valor absoluto.
 - Los residuales no deben mostrar tendencias.

2.1.3.4. SENSIBILIDAD: Es el cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo. La sensibilidad es calculada como la pendiente de la curva de calibración (m)

2.1.3.5. LIMITE DE DETECCIÓN (LOD): Es la mínima concentración de analito que puede ser identificado, medido y reportado con un intervalo de confianza de 99% tal que la concentración del analito es mayor que cero.

Según la IUPAC este valor puede ser aproximado a partir de los datos de regresión de la curva de calibración usando la siguiente fórmula¹³.

$$LOD = \frac{3s_b}{m}$$

Dónde,

s_b = Desviación estándar de la ordenada en el origen de la curva de calibración

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} - m^2(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N})}{(N - 2) * (N - (\sum x_i)^2 / \sum x_i^2)}}$$

m = Pendiente de la curva de calibración

2.1.3.6. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ): Es la concentración más baja de analito que puede ser determinado con un nivel aceptable de repetibilidad y de veracidad.

El valor de LOQ puede ser obtenido multiplicando el valor de LOD por 10/3¹³.

2.1.3.7. SELECTIVIDAD: Es el grado en el cual un método puede ser usado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de similar comportamiento.

2.1.3.8. ROBUSTEZ: Es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inalterado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método, y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. Una forma de medir la robustez es aplicando el procedimiento establecido por Youden y Steiner¹² que permite estudiar siete variables con solo realizar 8 pruebas. Las variables deben ser elegidas estratégicamente y designarlas con letras

mayúsculas (A, B, C, D, E, F y G) cuando se elige un valor alto y con letras minúsculas (a, b, c, d, e, f y g) para valores bajos, por ejemplo A=4mg de muestra y a=2mg de muestra, así se diseñan las pruebas de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla N° 2.1. Metodología de Youden y Steiner para la determinación de la robustez.

VALOR DE LAS VARIABLES	PRUEBAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Las ocho pruebas realizadas nos permiten obtener los resultados s, t, u, v, w, x, y, z. Con estos valores se obtienen las diferencias: (A-a), (B-b), (C-c), (D-d), (E-e), (F-f) y (G-g). Para ello se selecciona la fila donde se encuentra la variable, por ejemplo **D,d** y se promedian los resultados de las columnas en las que se encuentra presente dicha variable, en este caso se tendría:

$$D = \frac{s + t + y + z}{4} \quad y \quad d = \frac{u + v + w + x}{4}$$

El criterio de aceptación de la variable es:

$$|D - d| < \sqrt{2} S$$

Donde S es la precisión intermedia del método expresada como desviación estándar¹.

Ello se hace para cada una de las siete variables seleccionadas y se determina la sensibilidad de cada una a dichos cambios.

2.2. LÍPIDOS:

2.2.1. DEFINICIÓN:

Aunque no existe una definición clara del concepto de lípido, en un sentido general: “lípido” engloba sustancias tales como: aceites, grasas y ceras, los cuales pueden ser solo caracterizados por sus propiedades. En general, estas pueden ser descritas de la siguiente manera¹⁴:

- Proviene de animales y plantas vivos o fosilizados, pero también pueden ser obtenidas por síntesis química.
- Son insolubles o inmiscibles en agua pero son solubles en solventes orgánicos tales como el cloroformo, éter de petróleo, benceno, acetona, etc.
- Sus moléculas están mayormente constituidos de grupos de hidrocarburos de cadena larga y en menor medida de oxígeno pero también pueden contener: fósforo, nitrógeno y azufre.

Esta definición cubre un amplio rango de sustancias químicas los cuales en su mayoría están formados por: triglicéridos, fosfolípidos, glucolípidos y ceras. Otras sustancias también son consideradas como lípidos porque ellos son obtenidos con solventes orgánicos usados para su extracción, entre las cuales destacan: las vitaminas liposolubles, coenzimas, pigmentos, terpenos, fenoles y esteroides.

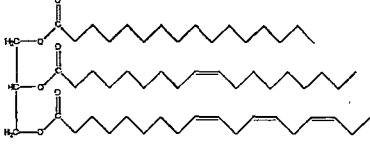
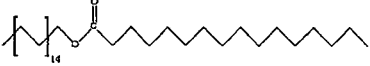
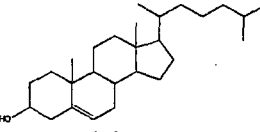
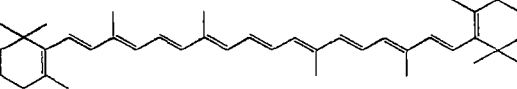
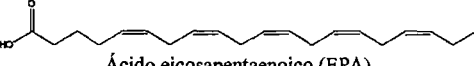
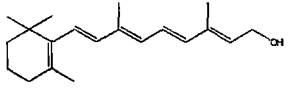
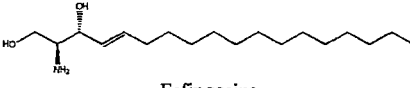
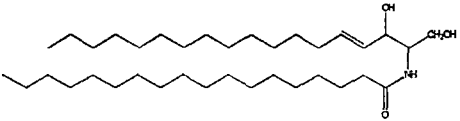
2.2.2. CLASIFICACIÓN:

Aunque existen varias formas de clasificación, para simplificar el estudio de este amplio grupo de moléculas se va a usar la siguiente clasificación¹⁴:

2.2.2.1. Lípidos simples o neutros: Ellos contienen uno o dos diferentes unidades de compuestos generalmente neutros o no polares, con excepción de los ácidos grasos que también son incluidos aquí. Por ejemplo, pueden estar formados de un esteroide y/o un ácido graso, un glicerol y ácido(s) grasos, un alcohol y/o un ácido graso, ácidos grasos y un aminoácido, etc. Algunas clasificaciones restringen este grupo a moléculas que contienen un alcohol y/o un ácido graso¹⁴.

Los lípidos que contienen glúcidos (glucolípidos) son excluidos de esta lista y son clasificados como “lípidos complejos”, aun si ellos contienen dos compuestos.

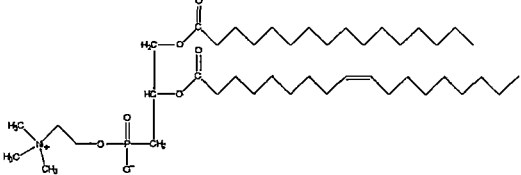
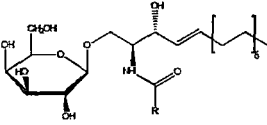
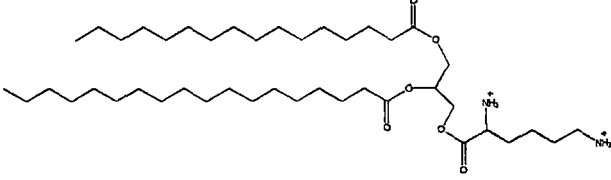
Tabla N° 2.2. Ejemplos de las diferentes estructuras que componen los lípidos simples o neutros.

Lípidos simples o neutros	Sub-unidades	Ejemplo
Glicéridos	Ácidos grasos y glicerol	 <p>Triglicérido</p>
Ceras	Alcohol primario lineal de alto peso molecular y un ácido graso	 <p>Cera de abeja</p>
Esteroles	Esterol libre, esteroil y ácido graso, esteroil e hidrocarburo de cadena larga...	 <p>Colesterol</p>
Carotenoides	*	 <p>β-caroteno</p>
Ácidos grasos	*	 <p>Ácido eicosapentaenoico (EPA)</p>
Vitaminas liposolubles	*	 <p>Vitamina A</p>
Amino alcoholes	*	 <p>Esfingosina</p>
Ceramidas	Amino alcohol y un ácido graso	 <p>Ceramida</p>

*. Son considerados una sola unidad

2.2.2.2. Lípidos complejos: Ellos contienen frecuentemente tres o más unidades químicas y tienen propiedades polares, por ejemplo: un glicerol, ácidos grasos y un glúcido, una larga cadena base, un ácido graso y un grupo fosfato, etc. Algunos contienen solo dos componentes pero incluyen un fragmento de un glúcido. Estos pueden ser divididos en tres grupos:

Tabla N° 2.3. Ejemplos de la clasificación de los lípidos complejos.

Lípidos complejos	Composición	Ejemplo
Fosfolípidos	Grupo fosfato y un fragmento lipídico (glicérido, ceramidas, etc)	 <p style="text-align: center;">Fosfoglicérido</p>
Glucolípidos	Glúcido y un fragmento lipídico (glicérido, ceramidas, esteroides, etc)	 <p style="text-align: center;">B-D-Galactosilceramida (R : cadena alquílica de un ácido graso)</p>
Aminolípidos	Aminoácidos y un glicérido	 <p style="text-align: center;">Lisil diacilglicerol</p>

2.2.2.3. Proteolípidos: Están formados por todas las proteínas que contienen un enlace covalente con ácidos grasos. Destacan las proteínas miristoiladas y las proteínas palmitoladas.

2.3. ÁCIDOS GRASOS

2.3.1. DEFINICIÓN: La IUPAC¹⁵ define a los ácidos grasos (FA de sus siglas en inglés) como ácidos alifáticos monocarboxílicos derivados de o contenidos en su forma esterificada en ceras, aceites o grasas animales o vegetales. Los ácidos grasos naturales tienen de 4 a 28 carbonos (usualmente en número par y en cadena no ramificada) y pueden ser saturados o insaturados. Por extensión, el término se utiliza a veces para abarcar todos los ácidos carboxílicos alifáticos acíclicos.

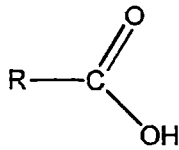


Figura 2.2. Representación estructural de la molécula de ácido graso. R cadena alifática.

2.3.2. CLASIFICACIÓN:

Los ácidos grasos de cadena lineal pueden ser clasificados de la siguiente manera¹⁴:

- a. **Ácidos grasos saturados.** Son ácidos grasos sin dobles enlaces entre carbonos; tienden a ser sólidos a temperatura ambiente.
- b. **Ácidos grasos insaturados.** Son ácidos grasos con dobles enlaces entre carbonos; suelen ser líquidos a temperatura ambiente.
- c. **Ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs de sus siglas en inglés).** Son ácidos grasos insaturados con un solo doble enlace entre carbonos.
- d. **Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs de sus siglas en inglés)** Son ácidos grasos insaturados con más de un doble enlace entre carbonos.

2.3.3. REPRESENTACIÓN:

Para representar a los ácidos grasos de cadena lineal se ha optado por usar la notación de los bioquímicos y fisiologistas en el cual el ácido graso es representado mediante las siguientes fórmulas¹⁶:

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{CN:0} \quad , \text{ si es un ácido graso saturado} \\ \text{CN:pn-x} \quad , \text{ si es un ácido graso insaturado} \end{array} \right.$$

Donde,

CN: Representa el número total de carbonos que posee el ácido graso (incluyendo el carbono carboxílico).

0: El valor cero indica que no hay presencia de enlaces insaturados.

p: Representa el número de dobles enlaces entre carbonos que posee el ácido graso.

x: Representa la posición del primer doble enlace contado desde el grupo metilo terminal (carbono “omega”)

Como ejemplos de esta representación se muestran al ácido palmítico y al ácido araquidónico:

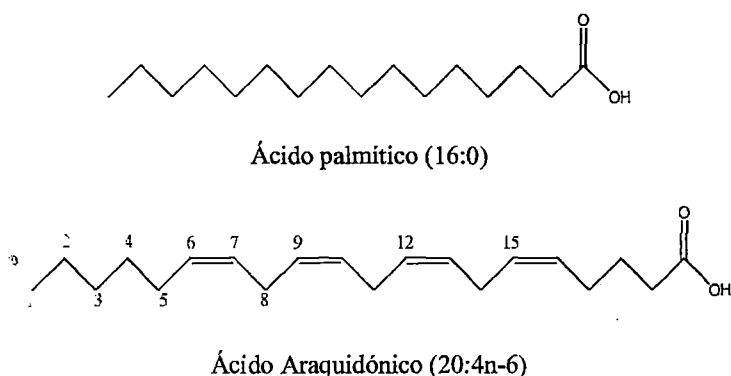


Figura 2.3. Ejemplos de la representación de los ácidos grasos.

A partir de dicha representación se puede deducir la estructura del ácido graso mediante la siguiente regla: Si existieran de dos a más dobles enlaces, la posición de estos son deducidos del primero adicionando el número 3 si se trata de enlaces dobles no conjugados (más frecuente), o el número 2 para enlaces dobles conjugados¹⁴.

En la Fig. 2.3 el ácido araquidónico, cuya representación es 20:4n-6, implica que el ácido graso tiene 4 dobles enlaces y el primer doble enlace está en la posición del carbono 6, comenzando desde el carbono ω , si aumentamos tres, el siguiente doble enlace estará en el carbono 9 y así sucesivamente se sigue hasta completar los cuatro dobles enlaces y por último se completa la cantidad de carbonos (20) para obtener la estructura.

Tabla N° 2.4. Nomenclatura de los ácidos grasos

Notación	Nombre sistemático IUPAC	Nombre común	Abreviatura
14:0	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	MA
14:1n-5	Ácido cis-9-tetradecaenoico	Ácido miristoleico	MOA
16:0	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	PA
16:1n-7	Ácido cis-9-hexadecanoico	Ácido palmitoleico	POA
18:0	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico	SA
18:1n-9	Ácido cis-9-octadecanoico	Ácido oleico	OA
18:1n-7	Ácido cis-11-octadecanoico	Ácido vaccénico	VA
18:2n-6	Ácido cis,cis-9,12 octadecadienoico	Ácido linoleico	LA
18:3n-6	Ácido cis,cis,cis-6,9,12 octadecatrienoico	Ácido gamma-linolénico	GLA
18:3n-3	Ácido cis,cis,cis-9,12,15 octadecatrienoico	Ácido alfa-linolénico	ALA
18:4n-3	Ácido cis,cis,cis,cis-6,9,12,15-octadecatetraenoico	Ácido estearidónico	-
20:0	Ácido eicosanoico	Ácido araquídico	-
20:1n-11	Ácido cis-9-eicosaenoico	Ácido gadoleico	-
20:1n-9	Ácido cis-11-eicosaenoico	Ácido gondoico	-
20:3n-6	Ácido cis,cis,cis-8,11,14-eicosatrienoico	Ácido dihomo-gamma-linolénico	DHGLA
20:4n-6	Ácido cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	Ácido araquidónico	AA
20:5n-3	Ácido cis,cis,cis,cis,cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Ácido timnodónico	EPA
22:0	Ácido docosanoico	Ácido behénico	-
22:1n-11	Ácido cis-11-docosaenoico	Ácido cetoleico	-
22:1n-9	Ácido cis-13-docosaenoico	Ácido erúcico	-
22:4n-6	Ácido cis,cis,cis,cis-7,10,13,16-docosatetraenoico	Ácido adrénico	DTA
22:5n-3	Ácido cis,cis,cis,cis,cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico	-	DPA-3
22:5n-6	Ácido cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoico	-	DPA-6
22:6n-3	Ácido cis,cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	Ácido cervónico	DHA
24:0	Ácido tetracosanoico	Ácido lignocérico	-

2.3.4. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS¹⁶

El **punto de fusión** de los ácidos grasos aumenta a medida que aumenta el tamaño de la cadena hidrocarbonada y este disminuye cuando aumenta el número de enlaces dobles. Esta propiedad también se encuentra presente en compuestos donde los ácidos grasos son los componentes principales (fosfolípidos, triglicéridos), así como también en altas estructuras organizadas (plasma, membranas, lipoproteínas). Bajo condiciones fisiológicas los dobles enlaces se encuentran preferentemente en configuración *cis*, el cual causa una deflexión de 30° de la cadena carbonada. Esto previene que la cadena llene el espacio de manera efectiva disminuyendo las interacciones de Van Der Waals y por tanto el punto de fusión.

La **solubilidad** en agua de los ácidos grasos disminuye a medida que aumenta el tamaño de la cadena. En soluciones diluidas los ácidos grasos están presentes como monómeros, en altas concentraciones forman micelas. La concentración a partir de la cual los ácidos grasos se asocian para formar micelas se llama concentración crítica micelar. En las micelas, el lado carboxílico se orienta hacia la fase acuosa, mientras que el lado hidrofóbico (alifático) es empacado alrededor de un centro. Este fenómeno se observa en los liposomas.

2.3.5. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS¹⁷

Los ácidos grasos son biomoléculas muy importantes para los seres vivos. Son los principales constituyentes de los triglicéridos y fosfolípidos cuyas importantes funciones son actuar como reserva energética y formar el armazón de las membranas celulares respectivamente.

El principal precursor de los ácidos grasos es el **malonil-CoA**, una molécula que aporta dos de sus tres átomos de carbono al esqueleto carbonado del ácido graso en crecimiento (elongación). El malonil-CoA es obtenido mediante la siguiente reacción (Fig. 2.4):

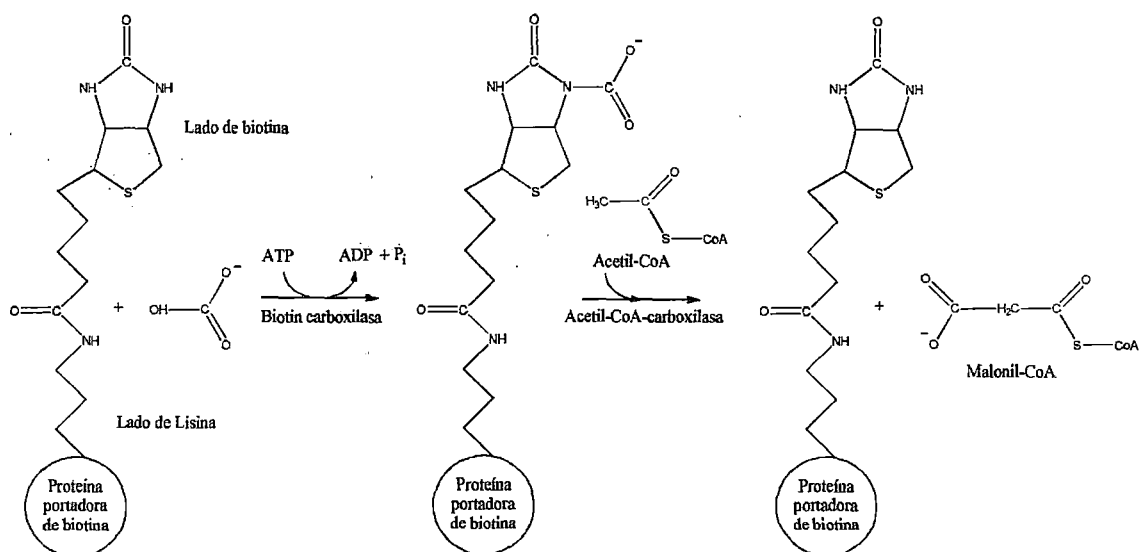


Figura 2.4. Mecanismo de producción de malonil-CoA.¹⁷

Como se puede observar el malonil-CoA se forma a partir de bicarbonato y de acetil-CoA, reacción que consume ATP y es catalizada por la acetil-CoA carboxilasa, enzima que requiere biotina como cofactor.

De modo general el proceso de elongación ocurre a través de cuatro etapas recurrentes y necesita de malonil-CoA y acetil-CoA para producir un grupo acilo saturado cuya cadena se incrementa en dos carbonos como se muestra a continuación:

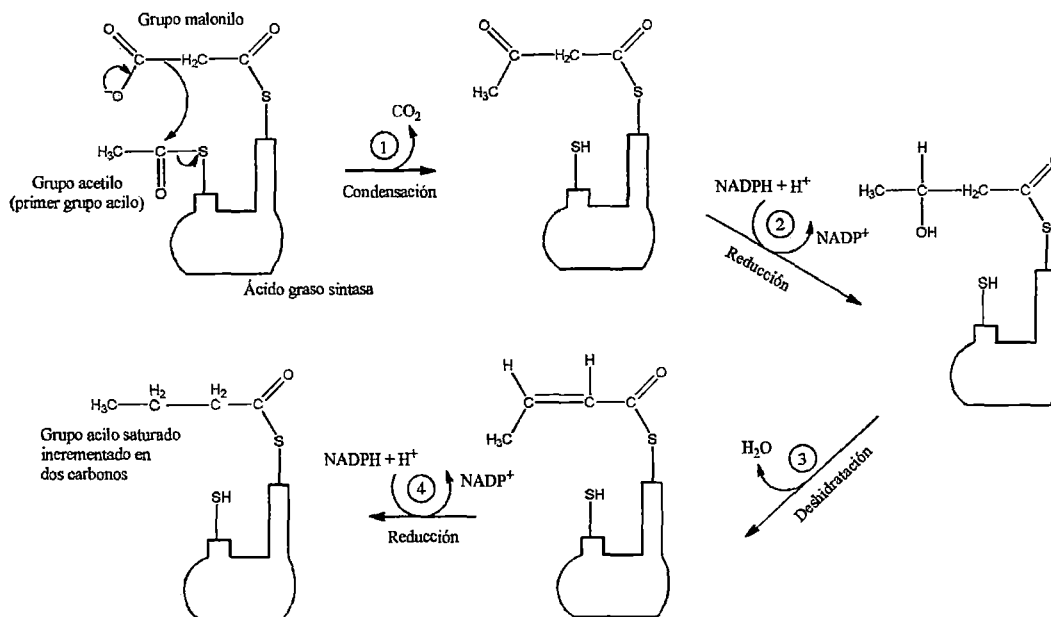
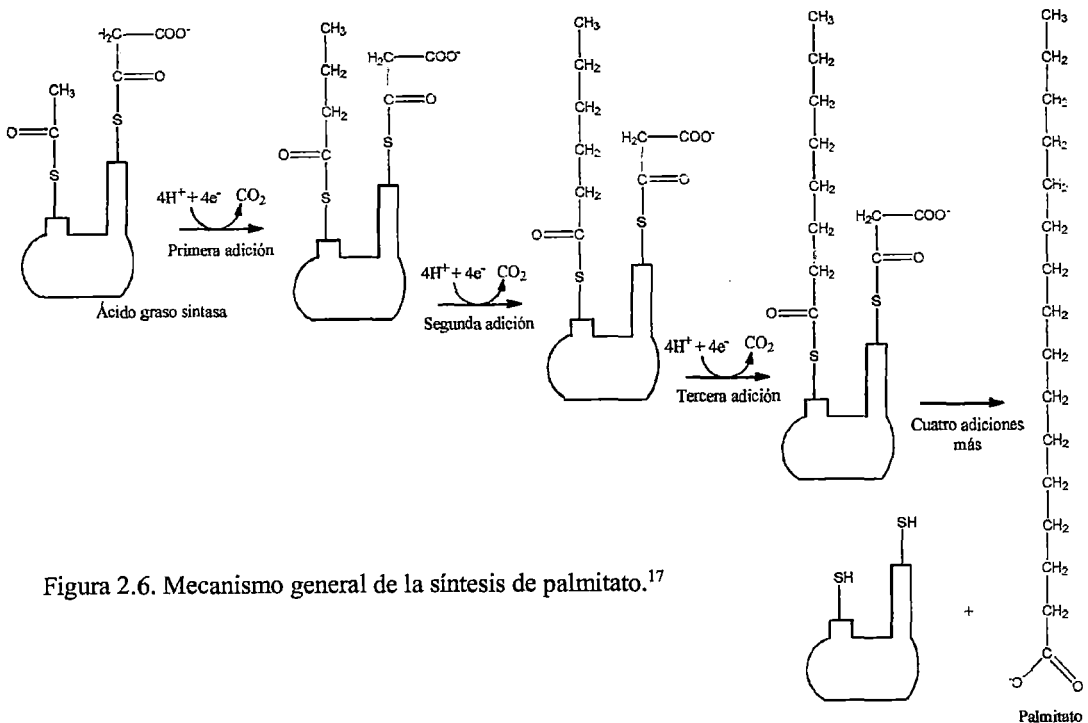


Figura 2.5. Mecanismo de elongación del grupo acetilo.¹⁷

En la Fig. 2.5 se muestra que previo al inicio del mecanismo, cada grupo malonilo y acetilo (o si es más grande: grupo acilo) es activado por un tioéster enlazado a un ácido graso sintasa (una multienzima compleja) para luego continuar con el mecanismo de elongación en cuatro etapas.

1. **Condensación:** Un grupo acilo se condensa con dos carbonos del malonil-CoA con eliminación de CO_2 del grupo malonilo, extendiendo la cadena acilo en dos carbonos.
2. **Reducción:** En este paso, el grupo β -ceto es reducido por el NADPH para formar un alcohol.
3. **Deshidratación:** En esta etapa la eliminación del H_2O crea un doble enlace.
4. **Reducción:** El doble enlace es reducido por el NADPH para formar el correspondiente grupo acilo saturado.

El proceso de elongación puede seguir repitiéndose y formar ácidos grasos como el ácido palmítico (Fig. 2.6), el cual puede servir como base para producir una amplia variedad de ácidos grasos saturados e insaturados los cuales se encuentran en los seres vivos.



Este proceso también permite explicar por qué en la naturaleza son más abundantes los ácidos grasos de notación par (16:0, 18:0,...) en contraste con los de notación impar (15:0, 17:0,...) que son bastante escasos.

2.3.6. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

El método más empleado para este fin es el método del estándar interno en conjunto con la cromatografía gaseosa.

Los estándares internos se seleccionan en función de una serie de requisitos entre las que destacan: estabilidad, cercanía al pico del analito, respuesta semejante al analito y no formar parte de la muestra¹³.

Entre los estándares internos más usados para el análisis de ácidos grasos se encuentran: El heptadecanoato de metilo (C17:0), El nonadecanoato de metilo (C19:0) y el tricosenoato de metilo (C23:0). En particular, para el estándar interno C23:0, errores sistemáticos del 5% deben ser aceptados¹⁴.

Para poder cuantificar los ácidos grasos, primero se debe verificar que existe una respuesta lineal por parte del detector construyendo una curva de calibración que compare la concentración o peso del estándar de ácido graso con la relación de áreas del estándar de ácido graso y el estándar interno. Luego se obtienen los factores de respuesta del equipo y se comparan con los encontrados para la muestra para obtener los resultados.

Los resultados también suelen expresarse alternativamente como la **normalización del área**, pero existe el problema de la propagación de errores por la fuerte interdependencia de los resultados. Así, si un ácido graso es incorrectamente estimado (u omitido cuando se desconoce) los resultados de los demás ácidos grasos son alterados¹⁴.

Previo al análisis por GC se debe de **derivatizar** los ácidos grasos y convertirlos en derivados no-reactivos de estos (metil ésteres u otros derivados), este proceso se debe hacer por las siguientes dos razones principales¹⁸:

- En la forma libre, es decir sin derivatizar, los ácidos grasos pueden ser difíciles de analizar porque estos compuestos altamente polares tienden a formar enlaces de hidrógeno, ocasionando problemas de adsorción. Reduciendo la polaridad se hacen más susceptible para su análisis.
- Para distinguir entre las ligeras diferencias exhibidas por los ácidos grasos insaturados, los grupos funcionales polares carboxilo deben ser neutralizados. Esto permite que la columna realice la separación de los ácidos grasos por propiedades tales como la elución, punto de ebullición, el grado de insaturación, la posición de la insaturación, e incluso por la configuración cis y trans de insaturación.

El proceso de derivatización más común consiste en transformar los ácidos grasos a **metil ésteres de ácidos grasos (FAMEs)** mediante una reacción de transesterificación usando metanol y condiciones ácidas o básicas como se muestra en la siguiente reacción química¹⁹:

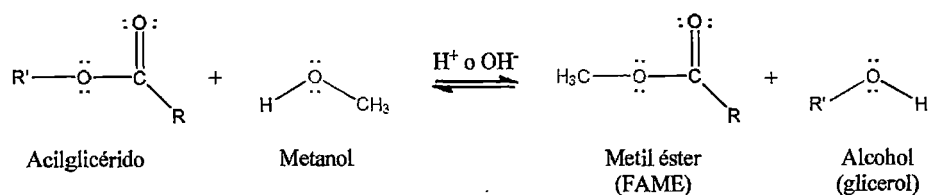


Figura 2.7. Reacción de transesterificación del acilglicérido. R' resto de glicerol.
R cadena alifática.

El mecanismo de transesterificación del acilglicérido mediante catálisis ácida se muestra en la siguiente figura:

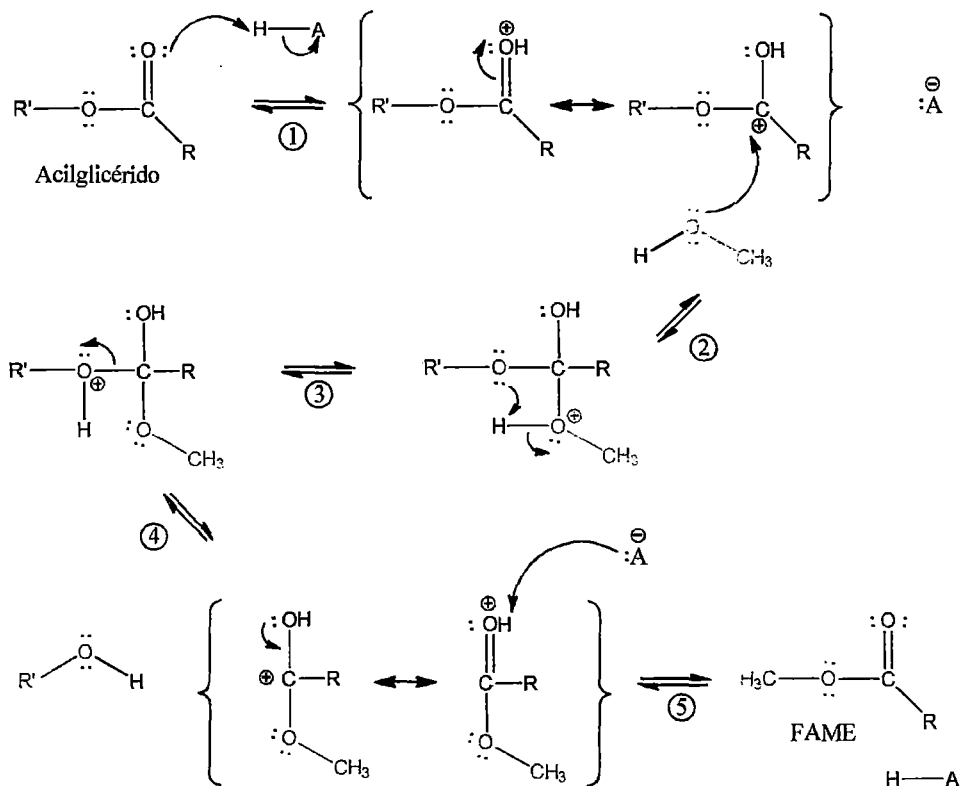


Figura 2.8. Mecanismo de transesterificación mediante catálisis ácida.¹⁹

El mecanismo de transesterificación de un acilglicérido (Fig.2.8) involucra cinco etapas:

1. Protonación del oxígeno del glicérido para generar una estructura resonante con un carbono más electrófilo.
2. El alcohol ataca el grupo carbonilo protonado para formar un intermediario tetraédrico.
3. Generación de un buen grupo saliente por la pérdida de un protón de un oxígeno y la ganancia del otro.
4. Eliminación del alcohol para generar un éster protonado.
5. Regeneración del catalizador ácido y formación de la FAME.

Entre los catalizadores básicos se puede decir que la derivatización catalizada por base es mucho más rápida bajo condiciones de temperaturas moderadas que las que son catalizadas por ácidos, la derivatización catalizada por el KOH o el NaOH son completadas en 2 min para glicerolípidos y 1h 37 min para esterolípidos a 37°C, sin embargo las bases no pueden catalizar la esterificación de ácidos grasos libres⁴.

Entre los catalizadores ácidos, el Trifluoruro de Boro (BF_3) es un catalizador ácido comúnmente usado para la derivatización, pero su uso es muy peligroso. El ácido sulfúrico (H_2SO_4) es también un efectivo catalizador ácido para la síntesis de FAMEs, pero al ser un líquido viscoso bastante corrosivo, debe ser manejado con precaución. Otra limitación de ambos catalizadores ácidos, BF_3 y H_2SO_4 , es que al ser usados en altas concentraciones y a altas temperaturas pueden generar derivados de ácidos grasos⁴.

El HCl es el catalizador ácido más ampliamente usado porque es un reactivo relativamente manejable y produce rendimientos casi cuantitativos. Una presentación de dicho catalizador es la *solución metanólica de HCl anhidra*, este reactivo puede ser preparado de cloruro de acetilo y metanol, pero hay que tener cuidado porque el cloruro ácido es volátil (punto de ebullición, 52°C) y es extremadamente irritante para los ojos. El reactivo no es muy estable porque el HCl reacciona nucleofílicamente con el metanol para producir clorometano y agua ocasionando que la concentración de HCl disminuya durante su almacenamiento⁴.

Debido a estos problemas, Ichihara y Fukubayashi han propuesto un método conveniente para la preparación de FAMEs de acilípidos, incluyendo esterolesteres, triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres. El reactivo está compuesto de ácido clorhídrico comercial (HCl concentrado), metanol y tolueno.

Los resultados de sus pruebas se muestran en las tablas N° 2.5 y N° 2.6

Tabla N° 2.5 Prueba de conversión de lípidos a FAMEs por el método de Ichihara y Fukubayashi para la temperatura de reacción de 45°C ⁴.

Lípidos	Tiempo de reacción	Porcentaje de conversión
Esteroles	16h	98.2 ± 0.7
Triglicéridos	8h	98.8 ± 0.7
Fosfolípidos	8h	96.7 ± 0.2
Ácidos grasos libres	20min	98.4 ± 0.1

Tabla N° 2.6. Comparación de la metodología de Ichihara y Fukubayashi con métodos convencionales en una muestra de aceite de pescado⁴.

Ácido Graso	BF₃	HCl metanólico anhidro	Reacción (45°C, 16h)
14:0	7.9 ± 0.0	7.8 ± 0.2	7.6 ± 0.1
16:0	12.5 ± 0.0	12.2 ± 0.2	11.8 ± 0.1
16:1	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.1	6.3 ± 0.1
18:0	2.0 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0
18:1	6.0 ± 0.0	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1
18:2n-6	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0
18:3n-3	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0
18:4n-3	4.5 ± 0.0	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1
20:1	15.1 ± 0.1	14.6 ± 0.0	14.7 ± 0.1
20:4n-6	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0
20:4n-3	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0
20:5n-3	9.2 ± 0.1	10.1 ± 0.0	10.0 ± 0.0
22:1	20.3 ± 0.3	19.5 ± 0.4	20.4 ± 0.5
21:5n-3	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
22:5n-3	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
22:6n-3	9.4 ± 0.1	10.4 ± 0.2	10.4 ± 0.2

2.4. *Nannochloropsis sp.*

2.4.1. INTRODUCCIÓN:

La *Nannochloropsis sp.* (Np) es una microalga, microorganismo unicelular fotosintético, de origen marino. Pertenece al reino Chromista, la clase Eustigmatophyceae y a la familia Monodopsidaceae²⁰. Esta microalga es ampliamente usada como fuente de alimento para otras especies de importancia acuícola tales como artemias, rotíferos y organismos filtradores en general, por lo que es producida por laboratorios de investigación acuícola y empresas particulares en distintos lugares del mundo²¹.

Debido a la problemática que existe actualmente con los combustibles fósiles, esta microalga ha sido ampliamente estudiada en los últimos años debido a su potencial como fuente de lípidos para la producción de biodiesel. Propiedades tales como: una alta acumulación de lípidos (31-68% de su peso seco), crecimiento rápido y ser cosechadas durante todo el año le han otorgado tal título²².

Si bien la microalga incrementa su población de manera relativamente rápida cuando se le cultiva en biorreactores, la microalga debe sufrir un proceso conocido como “stress” para que esta incremente el nivel de lípidos en su organismo, esto se logra generando una deficiencia en el nivel de nutrientes del medio y ocasionándole un shock lumino-térmico (alta iluminación y alta temperatura), bajo estas condiciones la microalga enfrentará estos cambios acumulando reservas de energía en forma de lípidos²³.

Entre los procesos que encarecen la obtención del aceite microalgal se encuentra la extracción de los lípidos, usualmente se usan solventes orgánicos (metanol/cloroformo, éter de petróleo, hexano, isopropanol, etc), y también se usan extracciones asistidas por microondas y ultrasonido. Para desarrollar estos métodos la biomasa microalgal debe contener como máximo 10% de humedad, con lo cual el proceso de secado también contribuye al incremento del costo⁵.

2.4.2. DESCRIPCIÓN²⁴:

La clase Eustigmatophyceae involucra organismos caracterizados por poseer pigmentos tales como la clorofila a pero no poseen clorofila b ni clorofila c, además contienen β -caroteno, violaxantina y vauquerixantina, estos pigmentos le otorgan una coloración amarillo verdosa a estas microalgas. Tienen forma aproximadamente esférica de 2-4 μ m de diámetro o también pueden ser cilíndricas de 3-4x2.5 μ m (Fig.2.9). Las células no poseen movimiento propio y se desplazan libremente en el medio marino.

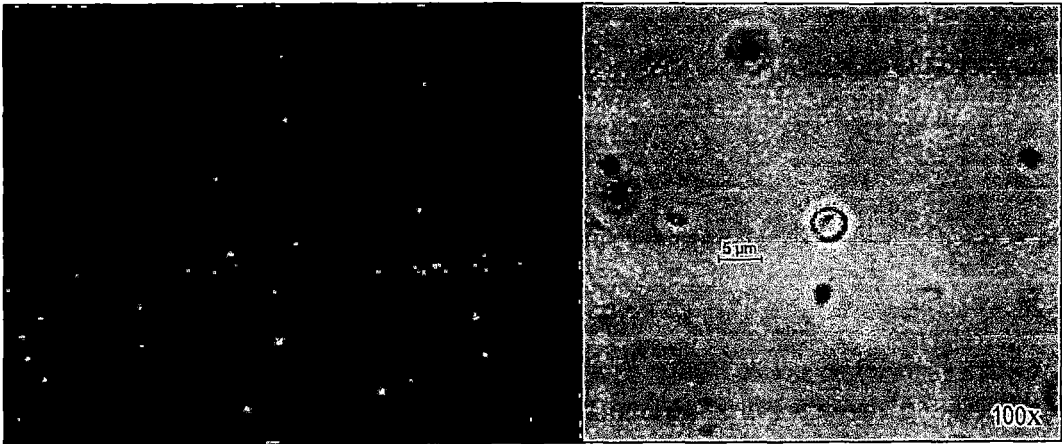


Figura N° 2.9. Fotografías tomadas de un cultivo de *Nannochloropsis sp.* por el Banco de Germoplasma del IMARPE.

2.4.3. COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS:

Estudios realizados por Chen²² de la composición lipídica muestran que la mayor parte de la fracción lipídica de la microalga *Nannochloropsis sp.* está constituida por acilglicéridos llegando a ocupar más del 80% del total de los lípidos, los esterolípidos ocupan un 5% del total y el resto de la fracción lo ocupan los fosfolípidos y glucolípidos.

Estudios realizados por Olofsson⁹ en fotobiorreactores durante todo un año reportan resultados sobre la composición de ácidos grasos de esta microalga, resumidos en la tabla N° 2.7

Tabla N° 2.7. Composición de ácidos grasos de la microalga *Nannochloropsis sp.*⁹

Ácido graso	%
14:0	0.4 - 7
15:0	0.7 - 0.8
16:0	26.9 - 35.8
16:1n-7	25.1 - 33.3
16:2n-4	0.6 - 2.1
16:3n-4	0 - 6.7
18:0	1.3 - 2.3
18:1n-9	3.1 - 8.9
18:1n-7	0.4 - 1.4
18:2n-6	2.4 - 8.4
18:3n-4	0 - 0.6
18:3n-3	1.1 - 10.5
20:4n-6	0.4 - 6.3
20:5n-3	0.8 - 15.8
22:3n-3	0 - 0.8

Los ácidos grasos predominantes en esta especie son el ácido palmítico (16:0), el ácido palmitoléico (16:1n-7) y el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3), los primeros dos ácidos son bastante comunes y son ampliamente distribuidos en los organismos vivos. El EPA, como ácido graso esencial, permite el uso de esta cepa como fuente de alimento para otras especies marinas²¹.

2.4.4. Obtención de biomasa microalgal:

La biomasa es obtenida generalmente en un proceso que involucra 3 etapas: cultivo, cosecha y secado²⁵.

2.4.4.1. Cultivo de microalgas. Una vez obtenida la cepa de la microalga, adquirida de un laboratorio o purificada de un medio natural, el primer paso consiste en incrementar la población de esta, para ello se usan medios de cultivo (mezcla de micronutrientes) en volúmenes suficientes para que la microalga inicie su reproducción y crecimiento. En el caso del IMARPE este proceso se realiza en dos etapas como se muestran en las siguientes figuras:



Figura 2.10. Cultivo intermedio de la microalga *Nannochloropsis sp* en la Sala de Microalgas del IMARPE.: se produce una serie de volúmenes en los que la microalga incrementa su población gradualmente hasta producir aproximadamente 300L de volumen. De Izquierda a Derecha los volúmenes de cultivo son 1L, 20L y 300L²⁵.

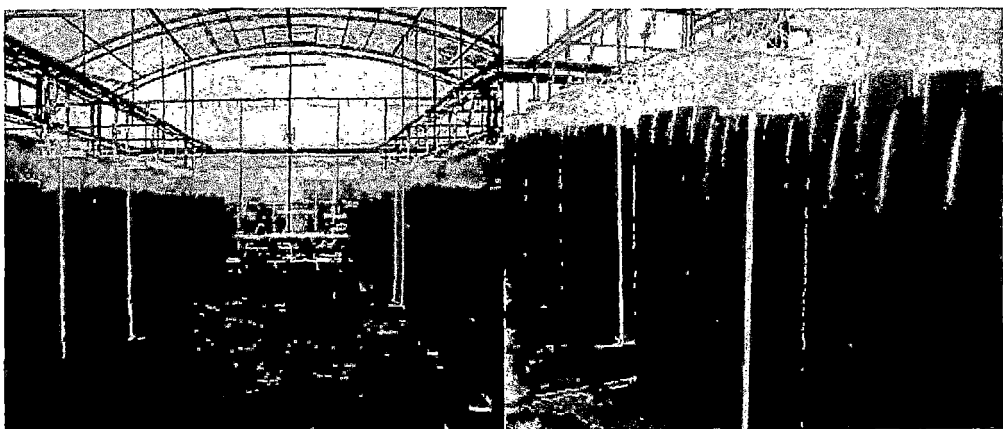


Figura 2.11. Cultivo masivo de la microalga *Nannochloropsis sp*. en la Sala de procesos del IMARPE: Los volúmenes obtenidos del cultivo intermedio se usan como inóculos para producir grandes volúmenes de microalga llegando a superar los 6000 litros de volumen de cultivo en biorreactores²⁵.

2.4.4.2. Cosecha de microalgas. Este proceso consiste en separar la microalga del medio de cultivo. En el caso del IMARPE se emplea una centrifuga separadora como se muestra en la siguiente figura:

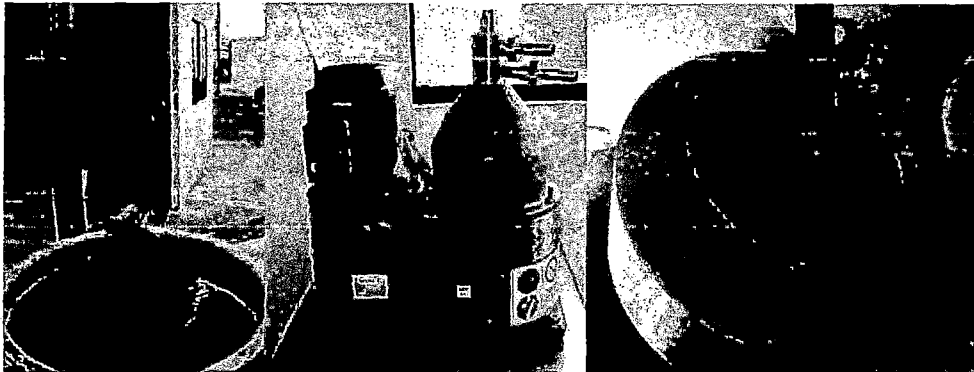


Figura 2.12. Cosecha de la microalga *Nannochloropsis sp.* en la Sala de procesos del IMARPE. A la derecha se muestra un tanque donde son colectados los biorreactores, en el centro se muestra la centrifuga separadora y a la izquierda la biomasa húmeda colectada por la centrifuga²⁵.

2.4.4.3. Secado de biomasa microalgal. El proceso de secado se puede realizar de varias maneras, pero para asegurar que los componentes de la biomasa casi no se alteren se prefiere liofilizar la biomasa húmeda.

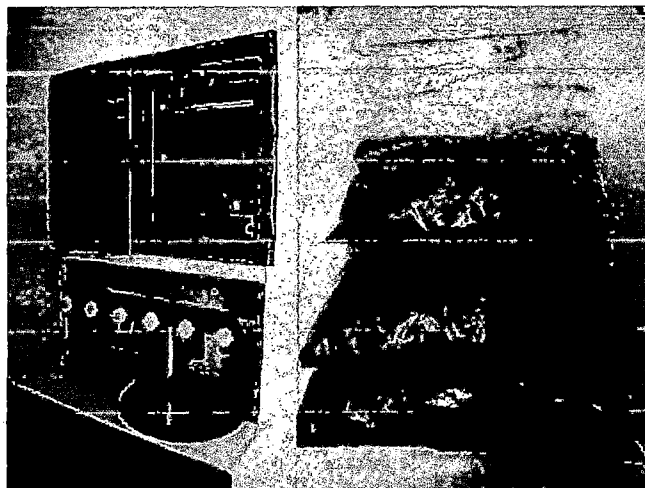


Figura 2.13. Secado de biomasa de la microalga *Nannochloropsis sp.* en la Sala de procesos del IMARPE. A la izquierda, se muestra el liofilizador usado para liofilizar las muestras de biomasa microalgal. A la derecha, se muestra la biomasa liofilizada²⁵.

CAPITULO 3: OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

- Validar la metodología para la cuantificación de ácidos grasos en biomasa liofilizada de la microalga *Nannochloropsis sp.*

3.2. Objetivos específicos:

- Implementar la metodología propuesta por Ichihara y Fukubayashi para la cuantificación de los ácidos grasos contenidos en el extracto de lípidos totales de biomasa liofilizada de la microalga *Nannochloropsis sp.*
- Determinar los parámetros característicos de la validación: selectividad, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, porcentaje de recuperación, precisión y robustez
- Evaluar los parámetros característicos obtenidos del proceso de validación.

CAPÍTULO 4: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales:

Muestra: La muestra liofilizada de la microalga *Nannochloropsis sp.* fue provista por la Sala de Procesos – Laboratorio de Biotecnología Acuática, IMARPE.

Estándares: Los estándares de ácidos grasos usados fueron: el ácido mirístico (14:0), el ácido palmítico (16:0), el ácido palmitoléico (16:1n-7), el ácido esteárico (18:0), el ácido oleico (18:1n-9), el ácido araquidónico (20:4n-6) y el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3).

El estándar interno usado fue el tricosanoato de metilo (C23:0), Todos los estándares usados tuvieron purezas superiores al 99%.

Reactivos:

- Cloroformo P.A., Metanol HPLC, Tolueno HPLC y Hexano HPLC
- Ácido clorhídrico 37% P.A. y agua ultrapura.
- Nitrógeno gas extra puro.

Equipos:

- Cromatógrafo de gases Varian CP-3800 con detector de ionización de flama (FID) provisto del autosampler Varian CP-8400 ubicado en el laboratorio de Análisis instrumental, IMARPE.
- Baño María MRC BH-200
- Vortex ZXClassic VELP Scientifica
- Campana Extractora de Gases.

Materiales de laboratorio:

- Micropipetas de 10-100 μ L y de 100-1000 μ L
- Tubos de ensayo de 10mL con tapa rosca de teflón.
- Viales con tapa rosca de teflón de 2mL
- Fiolas de 25, 50 y 100mL
- Pipetas Pasteur.

4.2. Procedimiento experimental:

4.2.1. Extracción de lípidos totales (Bligh & Dyer modificado para microalgas²⁶):

Se pesó 6 g de biomasa liofilizada de la microalga Np y se le añadió 210 mL de la mezcla de solventes cloroformo/metanol 1:2, este preparado se le colocó en un baño de ultrasonido con hielo por espacio de 15 min y luego se le guardó en una congeladora durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se repitió el baño de ultrasonido con hielo por espacio de 15min, luego se filtró el preparado en un filtro de celulosa regenerada de 0.45 µm. Se añadió agua ultrapura al extracto lipídico en relación de 2mL H₂O/4.5mL de filtrado y se separó la fase orgánica. Se evaporó el cloroformo de la fase orgánica con nitrógeno gas y se almacenó los lípidos secos en un desecador al vacío cubierto con una manta oscura durante toda la noche. Al día siguiente se pesó 0.2500g de los lípidos secos en una fiola de 25mL y se le enrasó con cloroformo, obteniendo la muestra en una concentración de 10 mg/mL en cloroformo.

4.2.2. Derivatización de los ácidos grasos: (Ichihara y Fukubayashi)

A un tubo de ensayo de 10mL con tapa de teflón, se le añadió 1mg (100µL) de la muestra preparada en cloroformo (10 mg/mL cloroformo) y 100µg (100µL) del estándar interno C23:0 (1mg/mL cloroformo). Se evaporó el solvente con nitrógeno gas hasta sequedad y se le añadió 0.2mL de tolueno, se agitó el tubo a 500 rpm con el vortex durante 10s, seguidamente se le añadió 1.5mL de metanol y se le agitó a 500 rpm con el vortex durante 10s. Luego, se le añadió 0.3mL del catalizador constituido por una mezcla de 9.7mL de ácido clorhídrico 37% y 41.5mL metanol. Se usó nitrógeno gas para desplazar el aire dentro del tubo por espacio de 1 min y se agitó a 800rpm con el vortex durante 1min. Se colocó el tubo en baño maría a 45 °C por 16 horas. Al día siguiente se retiró el tubo y se le dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se le añadió 1.5mL de hexano, se desplazó el aire con nitrógeno gas por 1 min y se agitó a 800rpm con el vortex durante 60s. Luego se le añadió 1mL de agua ultrapura, se desplazó el aire con nitrógeno gas por 1 min y se agitó a 800rpm con el vortex durante 60s. Se centrifugó el tubo a 1500rpm durante 5min y se separó la fase orgánica a un vial

de 2mL con tapa de teflón con la ayuda de una pipeta Pasteur. Esta prueba se realizó por duplicado.

4.2.3. Condiciones del cromatógrafo de gases:

Muestreador automático:	Volumen de inyección: 1 μ L
Inyector:	Modo de inyección: splitless Tiempo de inyección: 0.5 min Temperatura del inyector: 250 °C
Horno de la columna:	Columna: Columna capilar WCOT fused silica 30mx0.25mmx0.25 μ m. Gas de arrastre: Helio. Flujo de gas: 1mL/min Programa de temperatura: 120 °C por 1 min, 30 °C/min hasta 160 °C, 160 °C por 1 min, 4 °C/min hasta 240 °C, 240 °C por 7min. Tiempo total del programa de temperatura: 30.33 min
Detector:	Temperatura programada del detector: 260 °C

4.2.4. Metodología de la validación:

Pruebas previas a la validación realizadas con 13 muestras diferentes de extracto lipídico de biomasa liofilizada de la microalga Np mostraron el siguiente patrón:

Tabla 4.1. Patrón del porcentaje de área de 13 cromatogramas de ácidos grasos de la microalga Np analizadas previo a las pruebas de validación y su valor esperado de ácidos grasos.

Ácido graso	% Área	µg FA aproximado /mg extracto lipídico	Aprox. Esperado y redondeado (µg FA/mg extracto lipídico)
14:0	5,7 ± 0,6	57	50
16:0	40,1 ± 1,1	401	400
16:1n-7	32,4 ± 1,1	324	300
18:0	1,0 ± 0,2	10	10
18:1n-9	12,4 ± 0,9	124	100
20:4n-6	1,2 ± 0,2	10	10
20:5n-3	5,3 ± 0,4	53	50

A cada valor de la última columna se les asignó el valor de 100% y se les usó como referente para construir el diseño experimental.

4.2.4.1. Prueba de normalidad:

Para evaluar la distribución normal de los resultados, se preparó 32 réplicas de la muestra, se les inyectó en el cromatógrafo y se determinó la normalidad de las respuestas de cada ácido graso mediante la prueba de Anderson Darling, para un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

4.2.4.2. Selectividad:

Interferentes en el pico del estándar interno: Para determinar la presencia de interferentes en el pico del estándar interno, se comparó los cromatogramas de la muestra derivatizada con y sin estándar interno.

Resolución de los picos: Se analizó el cromatograma de la muestra y se obtuvo el valor de resolución de cada par de picos consecutivos mediante la siguiente fórmula¹³:

$$\text{Resolución} = 2(t_2 - t_1)/(w_2 + w_1)$$

Donde:

t_i : Tiempo de retención del pico i (min)

w_i : Ancho del pico i (min).

Se estableció el siguiente criterio para el valor de resolución:

Tabla 4.2. Criterio de acuerdo al valor de resolución

Resolución	Criterio
<1	Mala separación
~1	Separación aceptable
>1.5	Buena separación

Pureza de los picos: Se analizó la muestra derivatizada con un GC-MS en las instalaciones del laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

4.2.4.3. Linealidad:

Se construyeron las curvas de calibración usando 5 niveles correspondientes al 20, 60, 100, 140 y 180% del valor esperado para cada estándar de ácido graso y se les derivatizó con 100 μ g del estándar interno, usando los valores de la tabla N° 4.3.

Para verificar la homocedasticidad de la curva de calibración, se inyectó 4 veces cada estándar correspondiente a los niveles 2 y 4 de la curva de calibración y se compararon las varianzas de estos niveles.

4.2.4.4. Sensibilidad:

Estos valores se obtuvieron de la pendiente de la curva de calibración.

4.2.4.5. Límite de detección y de cuantificación (LOD y LOQ):

Estos valores se obtuvieron de los valores obtenidos de la pendiente (m) y la desviación estándar en el origen (s_b) de la curva de calibración de cada ácido graso.

4.2.4.6. Porcentaje de recuperación:

Esta prueba se realizó usando 3 niveles diferentes de fortificación para cada ácido graso, correspondientes a la fortificación de la muestra con 25, 50 y 75% del valor esperado para cada ácido graso. Se determinó el porcentaje de recuperación en cada nivel y se promediaron los valores. Se propuso como criterio de aceptación el intervalo de 95 – 105%.

Tabla 4.3. Construcción de la curva de calibración de los estándares de ácido graso. En la parte superior se muestra las concentraciones preparadas de cada estándar de ácido graso disueltas en **cloroformo**. Dentro de cada columna de ácido graso se encuentran los volúmenes en μL que se usaron para la derivatización y posterior construcción de la curva de calibración.

CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE ÁCIDO GRASO														
Nivel	14:0 (1mg/mL)		16:0 (1mg/mL)		16:1n-7 (1mg/mL)		18:0 (0.2mg/mL)		18:1n-9 (0.5mg/mL)		20:4n-6 (0.2mg/mL)		20:5n-3 (1mg/mL)	
	14:0 (μg)	V _{usar} (μL)	16:0 (μg)	V _{usar} (μL)	16:1n-7 (μg)	V _{usar} (μL)	18:0 (μg)	V _{usar} (μL)	18:1n-9 (μg)	V _{usar} (μL)	20:4n-6 (μg)	V _{usar} (μL)	20:5n-3 (μg)	V _{usar} (μL)
	1	10	10	80	80	60	60	2	10	20	40	2	10	10
2	30	30	240	240	180	180	6	30	60	120	6	30	30	30
3	50	50	400	400	300	300	10	50	100	200	10	50	50	50
4	70	70	560	560	420	420	14	70	140	280	14	70	70	70
5	90	90	720	720	540	540	18	90	180	360	18	90	90	90

4.2.4.7. Precisión:

Precisión intermedia de la respuesta del equipo. Se realizó la prueba de precisión intermedia de la respuesta del equipo analizando la misma muestra y usando un solo analista por 9 días diferentes.

Se determinó el RSD% de la relación de áreas de los ácidos grasos con respecto del estándar interno de cada día por los 9 días.

Precisión intermedia del Método: Esta prueba se realizó usando dos analistas diferentes analizando la misma muestra por 5 días diferentes.

Se determinó el RSD% de los valores promedio de cada analista de cada día por los 5 días.

Para poder cuantificar el contenido de ácidos grasos en la muestra se construyó una mezcla de estándares correspondiente al 100% del valor esperado de cada ácido graso. Se derivatizó tal mezcla con 100 µg de estándar interno y se preparó por duplicado.

En ambos casos se propuso el criterio de aceptación: $RSD\% < 2\%$

4.2.4.8. Robustez:

Se aplicó la metodología de Youden-Steiner y se seleccionaron las siguientes variables para evaluar su robustez:

- Masa de la muestra: A=1mg, a=0.5mg
- Volumen de tolueno: B=0.3mL, b=0.2mL
- Volumen de metanol: C=1.5mL, c=1.2mL
- Volumen de catalizador: D=0.3mL, d=0.2mL
- Tiempo de reacción: E=20h, e=16h
- Volumen de hexano: F=1.5mL, f=1.2mL
- Volumen de agua: G=1.2mL, g=1.0mL

Para cuantificar el contenido de ácidos grasos se usó el mismo estándar preparado en la prueba de precisión intermedia del método.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Prueba de Normalidad:

Los valores obtenidos se muestran en la tabla 5.1:

Tabla 5.1: Valores de la relación de áreas de los ácidos grasos obtenidos de 32 réplicas de la muestra para la prueba de normalidad.

Réplica	14:0	16:0	16:1n-7	18:0	18:1n-9	20:4n-6	20:5n-3
1	0,4184	3,3674	2,4972	0,0914	1,0229	0,1107	0,4843
2	0,4193	3,3739	2,4509	0,0927	1,0320	0,1130	0,4938
3	0,3991	3,2561	2,4168	0,0899	1,0054	0,1110	0,4854
4	0,4153	3,3482	2,4792	0,0911	1,0233	0,1119	0,4888
5	0,4148	3,3356	2,4773	0,0919	1,0184	0,1118	0,4876
6	0,4144	3,3430	2,4775	0,0936	1,0236	0,1123	0,4955
7	0,4200	3,3736	2,5087	0,0923	1,0301	0,1128	0,4918
8	0,4061	3,2728	2,4247	0,0900	1,0064	0,1106	0,4837
9	0,4084	3,2851	2,4440	0,0905	1,0106	0,1113	0,4873
10	0,4004	3,2239	2,3947	0,0891	0,9912	0,1099	0,4811
11	0,4114	3,3148	2,4579	0,0912	1,0150	0,1119	0,4877
12	0,4177	3,3348	2,4761	0,0905	1,0159	0,1110	0,4848
13	0,3980	3,1895	2,3638	0,0882	0,9829	0,1090	0,4760
14	0,4116	3,2840	2,4438	0,0901	1,0030	0,1097	0,4806
15	0,4107	3,2838	2,4349	0,0900	1,0035	0,1101	0,4820
16	0,4152	3,3262	2,4681	0,0915	1,0158	0,1113	0,4859
17	0,4175	3,3395	2,4814	0,0910	1,0161	0,1113	0,4851
18	0,4246	3,3664	2,5057	0,0917	1,0216	0,1122	0,4897
19	0,4150	3,3399	2,4721	0,0918	1,0187	0,1115	0,4856
20	0,3898	3,1445	2,3369	0,0879	0,9758	0,1092	0,4771
21	0,3992	3,2036	2,3818	0,0898	0,9890	0,1104	0,4843
22	0,3929	3,1733	2,3557	0,0885	0,9813	0,1096	0,4780
23	0,4045	3,2644	2,4245	0,0903	1,0019	0,1107	0,4831
24	0,3977	3,2092	2,3819	0,0895	0,9893	0,1103	0,4796
25	0,4016	3,2460	2,4129	0,0909	1,0080	0,1123	0,4902
26	0,4074	3,2830	2,4377	0,0900	1,0068	0,1112	0,4838
27	0,4365	3,4990	2,6003	0,0959	1,0639	0,1157	0,5033
28	0,4061	3,2440	2,4150	0,0891	0,9949	0,1101	0,4799
29	0,4000	3,2136	2,3902	0,0885	0,9880	0,1089	0,4750
30	0,4198	3,3499	2,4922	0,0920	1,0207	0,1122	0,4882
31	0,3990	3,1922	2,3733	0,0882	0,9789	0,1079	0,4708
32	0,3897	3,1140	2,3186	0,0869	0,9639	0,1079	0,4716

A continuación se muestran las gráficas de probabilidad de cada ácido graso obtenidos con los datos de la tabla 5.1.

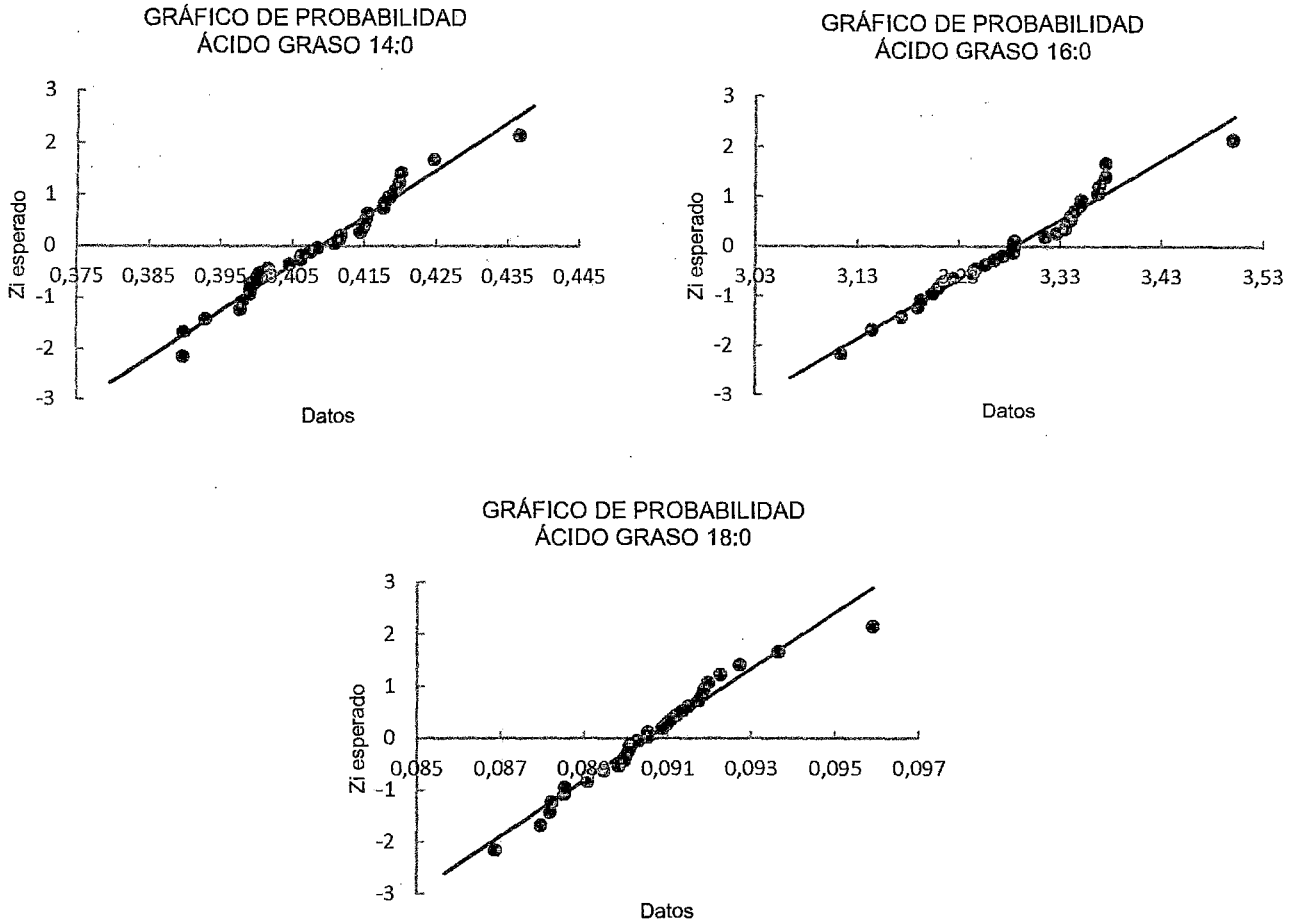


Figura 5.1. Gráficos de probabilidad de los datos de los ácidos grasos saturados.

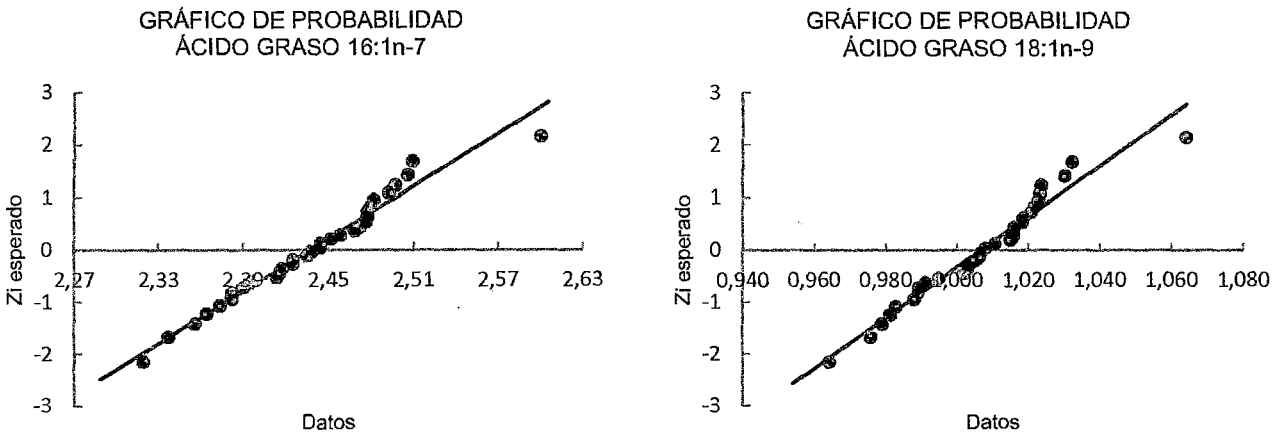


Figura 5.2. Gráficos de probabilidad de los datos de los ácidos grasos monoinsaturados.

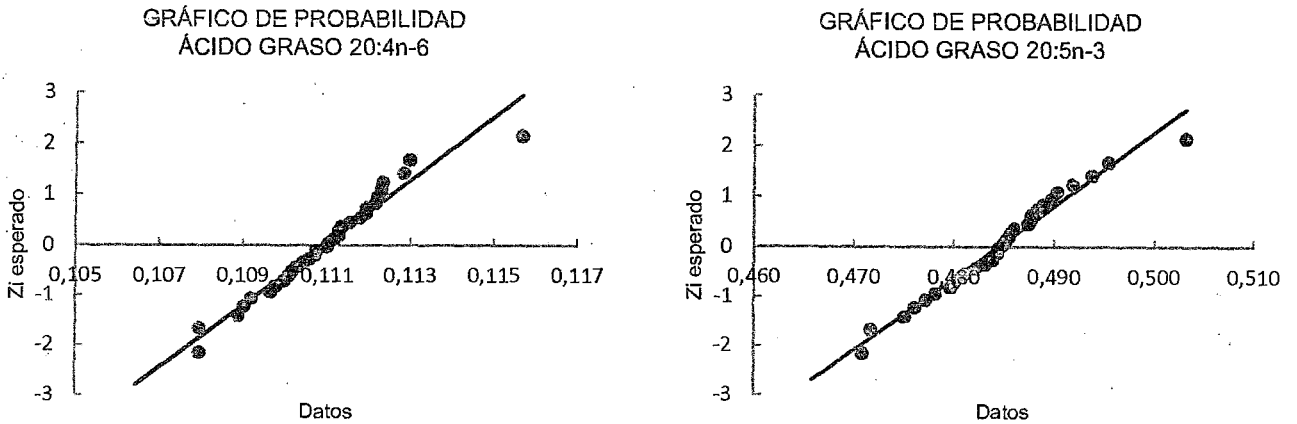


Figura 5.3. Gráficos de probabilidad de los datos de los ácidos grasos poliinsaturados.

Debido a que la mayoría de los datos se encuentran sobre la recta, las gráficas 5.1, 5.2 y 5.3 muestran que existe un buen ajuste entre los datos y la distribución normal, este hecho nos permite concluir que los datos presentan distribución normal. También se puede concluir esto analizando los valores del estadístico de Anderson Darling (AD), el AD* y comparándolos con el valor crítico (Tabla 5.2)

Tabla 5.2: Valores del estadístico de Anderson Darling. Prueba de normalidad.

ÁCIDO GRASO	14:0	16:0	16:1n-7	18:0	18:1n-9	20:4n-6	20:5n-3
AD	0.369	0.373	0.265	0.261	0.393	0.259	0.244
AD*	0.378	0.383	0.272	0.268	0.403	0.266	0.251
Valor Crítico ($\alpha=0.05$)	0.752	0.752	0.752	0.752	0.752	0.752	0.752

Donde,

$$AD = -n + \sum_{i=1}^n \frac{(1-2i)}{n} (\ln(F(Z_i)) + \ln(1 - F(Z_{n+1-i})))$$

$F(Z_i)$: Distribución normal acumulativa de los datos normalizados Z_i

n : Número de datos

$$AD^* = AD * \left(1 + \frac{0,75}{n} + \frac{2,25}{n^2}\right)$$

Se acepta la hipótesis nula, si $AD^* < \text{valor crítico}$. Es decir, se concluye que la distribución de los datos es normal si $AD^* < \text{valor crítico}$. En todos los casos se observa ese comportamiento y por lo tanto: los datos para cada ácido graso tienen distribución normal.

5.2. Selectividad:

- **Interferentes en el pico del estándar interno:** En la siguiente figura se muestra la comparación de los cromatogramas de la muestra de Np con el estándar interno (Np_23) y sin el estándar interno (Np_1) (Fig. 5.4)

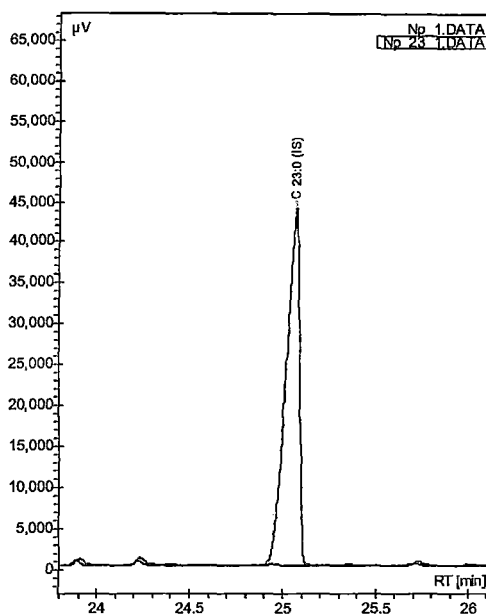


Figura 5.4. Comparación de cromatogramas de la muestra sin estándar interno (Np_1) y la muestra con el estándar interno (Np_23_1)

La figura anterior muestra que el estándar interno C23:0 no contiene ningún pico de ácido graso de la muestra, por el cual se le consideró a este estándar como adecuado para realizar las pruebas de validación.

- **Resolución de los picos:** En la fig. 5.5 se observa que la mayoría de los picos se encuentran bien resueltos con excepción del ácido graso 18:1n-9. Este se encuentra junto a un pico de menor tamaño ubicado a su lado derecho, posiblemente sea su isómero 18:1n-7. El valor de resolución encontrado para estos picos es 1.06 (Tabla 5.3). Según la Tabla N°4.2 se le ha considerado un valor aceptable de separación para realizar las pruebas de validación.

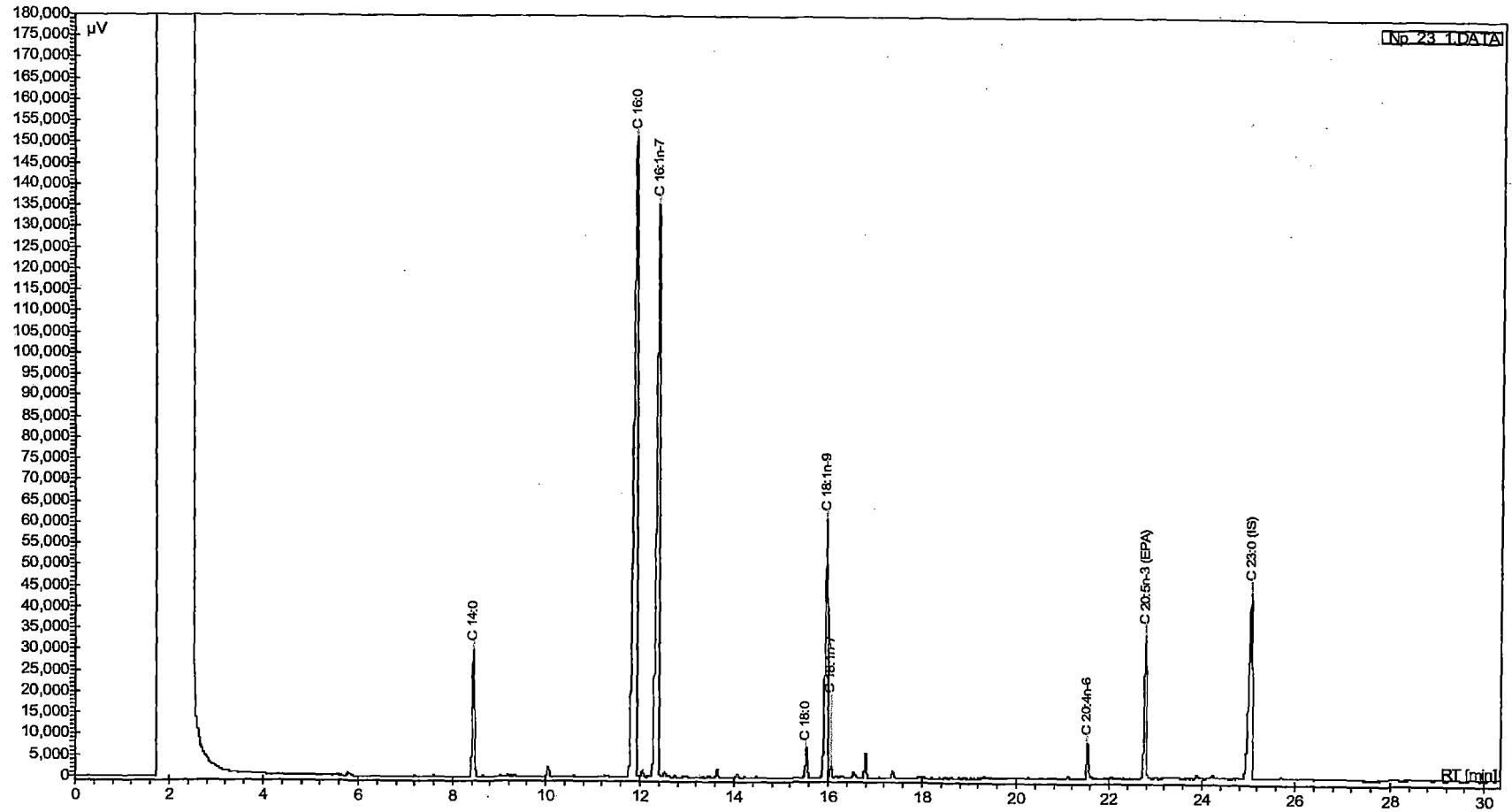


Figura 5.5. Cromatograma típico obtenido de las pruebas de validación.

Tabla 5.3. Valores típicos de tiempo de retención, ancho de pico y resolución de los picos obtenidos de la prueba de validación.

Ácido Graso	Tiempo de Retención (min)	Ancho del Pico (min)	Resolución
14:0	8.05	0.09	59.57
16:0	11.90	0.14	3.48
16:1n-7	12.37	0.13	30.10
18:0	15.53	0.08	4.78
18:1n-9	15.96	0.10	1.06
18:1n-7*	16.05	0.07	73.20
20:4n-6	21.54	0.08	15.50
20:5n-3	22.78	0.08	-

*: Se asume esa identidad en función del estándar de aceite de pescado usado para identificar los picos.

- **Pureza de los picos:** El análisis por GC-MS confirmó e identificó la presencia de las FAMEs en la muestra derivatizada, cuyo cromatograma se muestra la siguiente figura:

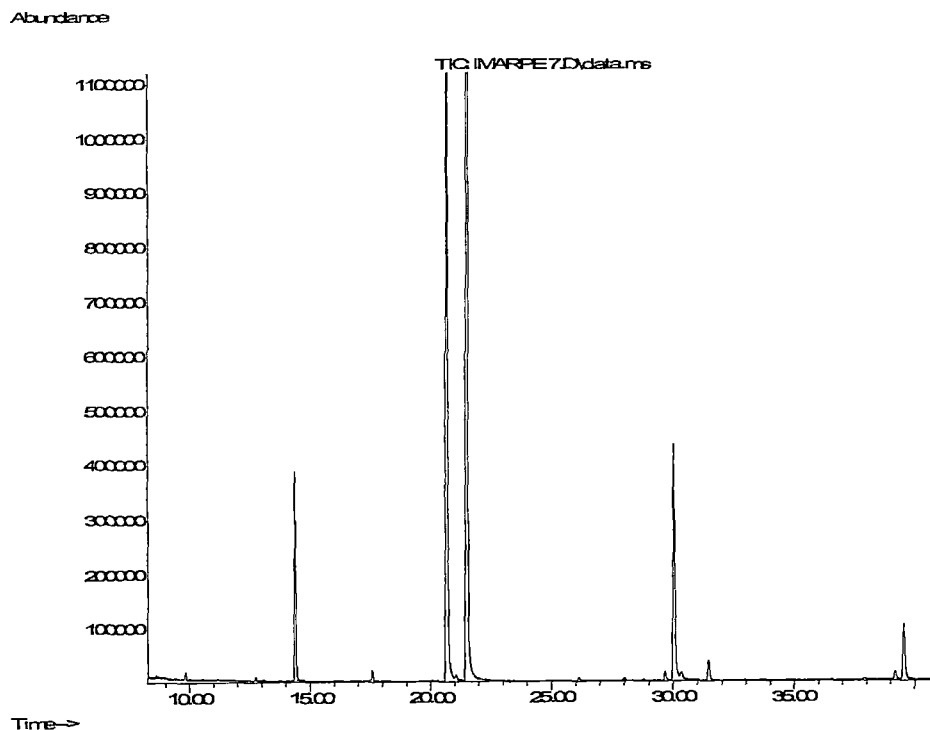


Fig.5.6. Cromatograma obtenido por GC-MS de la muestra derivatizada*.

*. El espectro de masas de cada pico se muestra en el anexo B

Tabla 5.4. Ácidos Grasos identificados mediante GC-MS para una muestra derivatizada del extracto lipídico de la cepa Np

Número	Nombre del compuesto (NIST08.L)	Tiempo de retención (min)	% Área
1	Ácido láurico (12:0)	9.82	0.17
2	Ácido mirístico (14:0)	14.37	5.51
3	Ácido pentadecanoico (15:0)	17.57	0.33
4	Ácido palmitoleico (16:1)	20.66	31.56
5	Ácido palmítico (16:0)	21.50	48.23
6	Ácido linolelaídico (18:2)	29.67	0.31
7	Ácido oleico (18:1)	30.05	10.09
8	Ácido esteárico (18:0)	31.46	0.82
9	Ácido araquidónico (20:4)	39.19	0.32
10	Ácido eicosapentanoico (20:5)	39.56	2.66

Se confirmó la pureza de cada pico y se determinó que cada pico no forma parte de una superposición de picos de otras especies químicas.

Se identificó la presencia de todos los ácidos grasos seleccionados para las pruebas de validación mediante la técnica de GC-MS y además este método también reportó la presencia de tres especies más: el ácido láurico, el ácido pentadecanoico y el ácido linolelaídico., la suma de los tres componentes llega a ser aproximadamente el 1% del total, que para nuestros estudios en biodiesel no son significantes. No se llegó a confirmar la presencia del isómero del ácido graso supuesto (18:1n-7), solo la presencia del ácido graso 18:1n-9, aparentemente no superó el límite de detección del método para ser caracterizado apropiadamente. Los espectros de masas (Anexo B) también confirman que el método aplicado para la derivatización convierte a los ácidos grasos en sus correspondientes metil ésteres.

5.3. Linealidad:

A continuación se muestran las curvas de calibración de cada estándar y los resultados de las pruebas de linealidad:

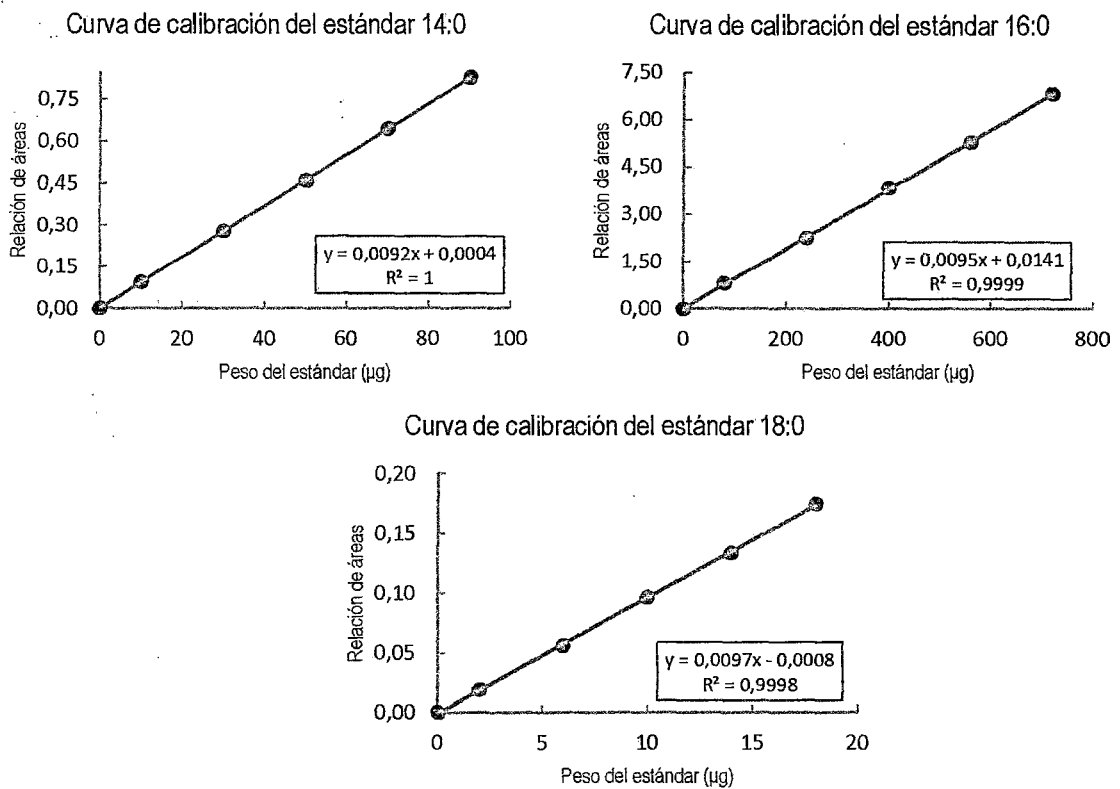


Figura 5.7. Curvas de calibración de los estándares de ácidos grasos saturados.

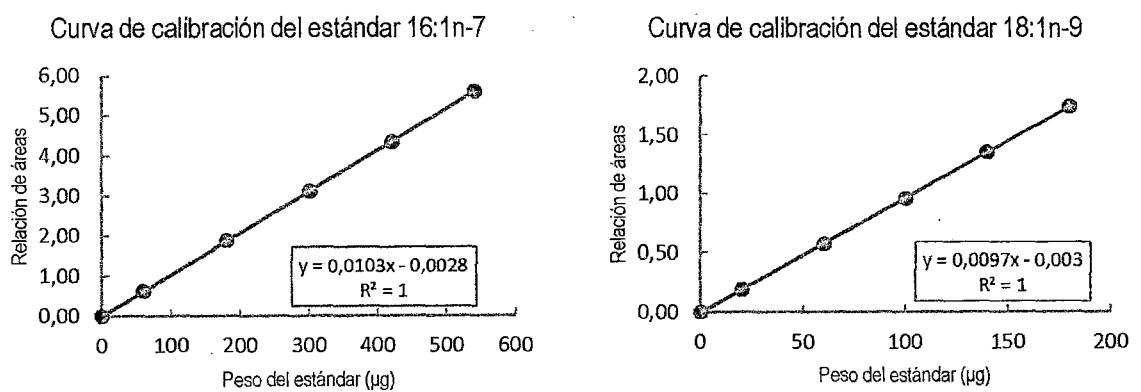


Figura 5.8. Curvas de calibración de los estándares de ácidos grasos monoinsaturados.

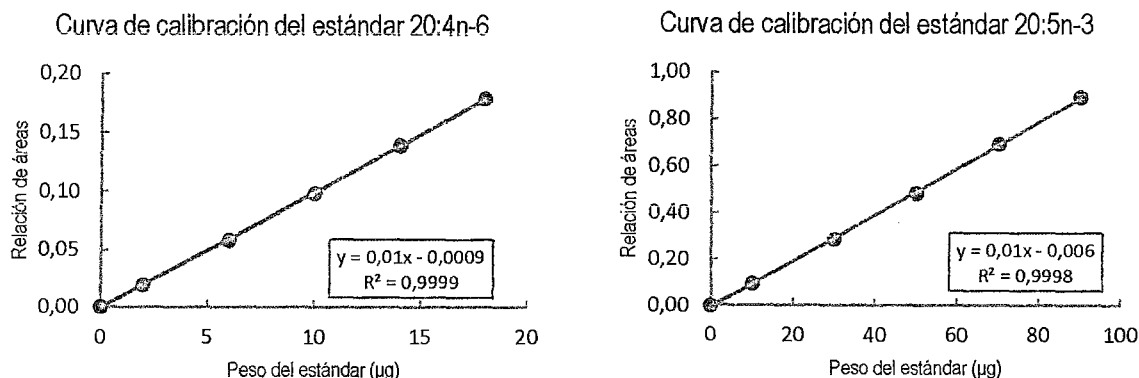


Figura 5.9. Curvas de calibración de los estándares de ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla 5.5. Valores obtenidos de las pruebas de linealidad: La curva de calibración, el coeficiente de determinación (R^2), el valor de prueba de correlación y la desviación estándar de la ordenada en el origen (s_b).

Ácido Graso	Curva de calibración	R^2	t_{exp}	s_b
14:0	$y = 0.00921x + 0,00037$	1,0000	853,32	0,00057
16:0	$y = 0.00948x + 0.01412$	0,9999	174,93	0,02274
16:1n-7	$y = 0.01035x - 0.00284$	1,0000	682,56	0,00477
18:0	$y = 0.00968x - 0,00075$	0,9998	134,07	0,00076
18:1n-9	$y = 0.00966x - 0.00300$	1,0000	375,00	0,00270
20:4n-6	$y = 0.00996x - 0.00089$	0,9999	204,04	0,00051
20:5n-3	$y = 0.00996x - 0.00605$	0,9998	127,62	0,00409

Con respecto al valor del R^2 , en todos los casos se observa que supera al valor límite 0.995 propuesto de control de linealidad, asegurando una prueba de la linealidad de los datos. Además, el valor de prueba t_{exp} (fórmula pág. 6) que determina la correlación de los datos, en cada caso, supera al $t_{critico} = 2,78$ ($\alpha=0.05$, 4 grados de libertad) proporcionando información de la buena correlación que existe entre los datos.

Tabla 5.6: Valores de la relación de áreas y varianzas obtenidos de la prueba de homocedasticidad.

Réplicas	14:0	16:0	16:1n-7	18:0	18:1n-9	20:4n-6	20:5n-3
Nivel 2							
1	0,2773	2,2530	1,8566	0,0559	0,5716	0,0580	0,2866
2	0,2772	2,2762	1,8733	0,0568	0,5759	0,0582	0,2879
3	0,2713	2,2597	1,8640	0,0566	0,5761	0,0591	0,2903
4	0,2745	2,2452	1,8397	0,0568	0,5848	0,0586	0,2874
s_2^2	$8,1 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$
Nivel 4							
1	0,6447	5,3024	4,3401	0,1338	1,3502	0,1390	0,6945
2	0,6424	5,2855	4,3259	0,1356	1,3482	0,1378	0,6921
3	0,6418	5,3015	4,3086	0,1359	1,3680	0,1380	0,6897
4	0,6442	5,3439	4,3849	0,1340	1,3666	0,1403	0,6981
s_4^2	$2,0 \times 10^{-6}$	$6,2 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-5}$
F_{exp}	4,14	3,28	5,27	5,88	3,62	5,19	5,29
$F_{critico}$	9,28	9,28	9,28	9,28	9,28	9,28	9,28

Para determinar el valor de prueba F_{exp} se determina el cociente de las varianzas (s^2) del mayor entre el menor como se muestra en la siguiente fórmula:

$$F_{exp} = \frac{s_4^2}{s_2^2}$$

La tabla 5.6 muestra que valor de prueba de homocedasticidad F_{exp} es menor al $F_{critico} = 9,28$ ($\alpha=0.05$, 3,3 grados de libertad) para cada caso, proporcionándonos información de que las varianzas entre los niveles 2 y 4 de la curva de calibración son iguales y por lo tanto existe homocedasticidad entre estos puntos. La importancia de esta determinación es que se tiene un indicio de la homocedasticidad entre los puntos que son vecindario del valor esperado (nivel 3, 100%)

Las gráficas de los residuales de cada estándar (Fig. 5.10, 5.11 y 5.12) no mostraron ninguna anomalía, es decir, cumplieron con todas las condiciones enumeradas en la página 6, lo cual indicaría una prueba más de la linealidad de los datos

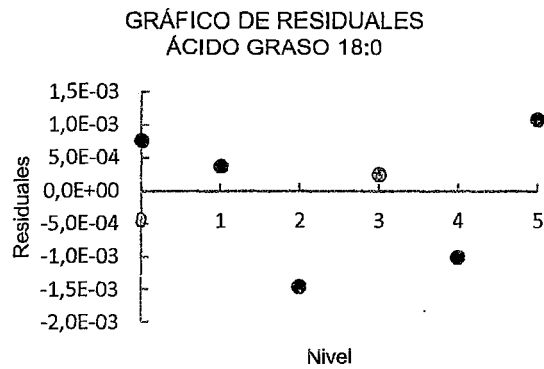
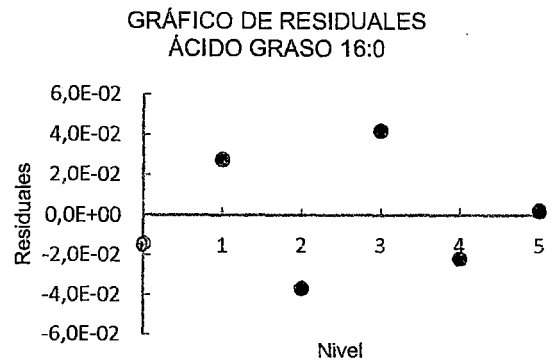
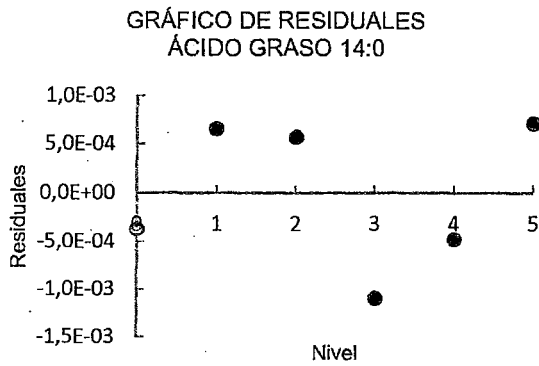


Figura 5.10. Gráficos de residuales de las curvas de calibración de los ácidos grasos saturados.

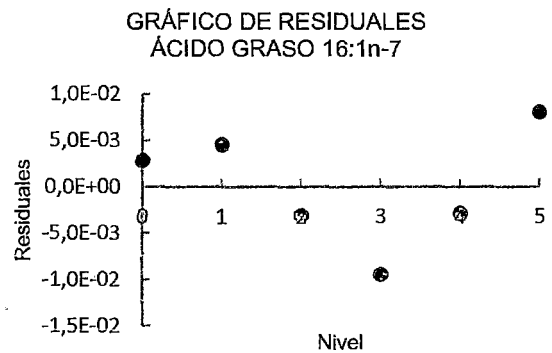
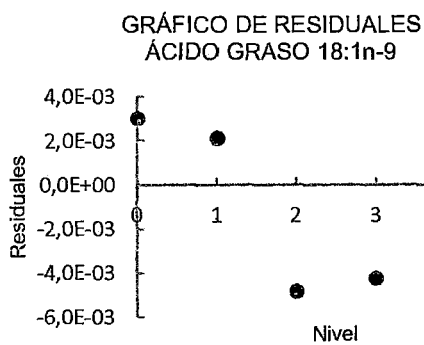


Figura 5.11. Gráficos de residuales de las curvas de calibración de los ácidos grasos monoinsaturados

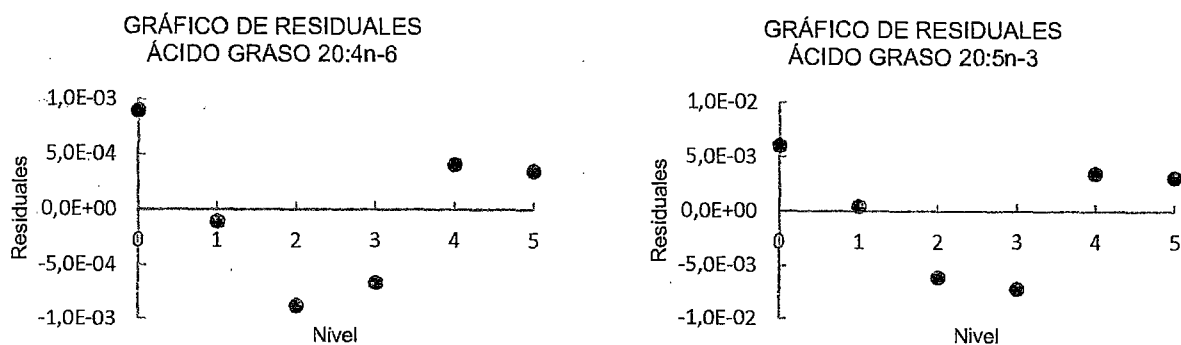


Figura 5.12. Gráficos de residuales de las curvas de calibración de los ácidos grasos poliinsaturados

Con todas esas pruebas se puede asegurar que existe linealidad entre los puntos correspondientes al 20 y 180% del valor esperado de cada ácido graso propuesto para su estudio.

5.4. Sensibilidad:

Tabla 5.7. Valores de la sensibilidad del método.

Ácido Graso	Sensibilidad (μg^{-1})
14:0	0,0092
16:0	0,0095
16:1n-7	0,0103
18:0	0,0097
18:1n-9	0,0097
20:4n-6	0,0100
20:5n-3	0,0100

Se observa cierta tendencia entre los resultados. La sensibilidad aumenta proporcionalmente con respecto del peso molecular del ácido graso, esto ocurre probablemente debido a que si la cadena de ácido graso es más larga, la eficiencia de la combustión en el detector es mayor²⁷. Según Ulberth²⁷ debido a que el valor del ácido graso 16:1n-7 no se encuentra dentro de esta tendencia, este podría estar sujeto a un error sistemático pero al ser semejante a los demás valores se presume que no afectará en gran medida a los resultados.

5.5. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Tabla 5.8. Valores del límite de detección y límite de cuantificación del método.

Ácido Graso	LOD (μg)	LOQ (μg)
14:0	0,18	0,61
16:0	7,19	23,98
16:1n-7	1,38	4,61
18:0	0,23	0,78
18:1n-9	0,84	2,80
20:4n-6	0,15	0,51
20:5n-3	1,23	4,11

Los valores de la tabla N° 5.8 fueron obtenidos aplicando la ecuación de la página 7. Se observa que estos están comprendidos en el orden de unos cuantos microgramos, lo que da indicio de la buena performance del equipo de cromatografía usado. Estos valores tan pequeños son importantes porque se podría rediseñar el método para trabajar con cantidades de muestra aún menores dado que en el mundo marino no siempre se tiene una cantidad abundante de muestra para ser analizada. Por ejemplo según la tabla 5.8 el valor de muestra mínimo a usar sería 37.4 μg (valor equivalente a la suma de todos los LOQs) que es aproximadamente el 4% del peso de muestra que ha sido seleccionado para las pruebas.

5.6. Porcentaje de Recuperación:

Tabla 5.9. Valores del porcentaje de recuperación del método

µg de ácido graso	14:0	16:0	16:1n-7	18:0	18:1n-9	20:4n-6	20:5n-3
Nivel 1 (25%)							
C_{F1}	57,8	473,2	327,9	12,8	133,1	13,7	63,8
C_{U1}	46,6	378,0	254,5	10,3	106,8	11,2	51,5
C_{A1}	12,5	100,0	75,0	2,5	25,0	2,5	12,5
%R₁	90,1	95,2	97,7	102,0	104,9	102,3	98,0
Nivel 2 (50%)							
C_{F2}	70,1	569,3	392,8	15,1	156,4	16,1	76,2
C_{U2}	46,6	378,0	254,5	10,3	106,8	11,2	51,5
C_{A2}	25,0	200,0	150,0	5,0	50,0	5,0	25,0
%R₂	94,0	95,7	92,2	96,1	99,2	98,1	98,9
Nivel 3 (75%)							
C_{F3}	82,2	661,8	468,7	17,4	179,6	18,6	88,6
C_{U3}	46,6	378,0	254,5	10,3	106,8	11,2	51,5
C_{A3}	37,5	300,0	225,0	7,5	75,0	7,5	37,5
%R₃	96,8	94,6	95,2	94,8	97,0	99,4	99,0
%R	93,7±3,6	95,2±0,6	95,0±2,9	97,6±3,9	100,3±4,1	99,9±2,1	98,7±0,5

Se determinó el %R de acorde a la ecuación de la pág. 4 y se observó cierta tendencia del porcentaje de recuperación del método. La recuperación mejora a medida que la señal se aproxima al estándar interno, dando rendimientos comprendidos entre 97 y 101% para los ácidos grasos 18:0, 18:1n-9, 20:4n-6 y 20:5n-3. Se observan rendimientos aceptables para los ácidos grasos 16:0 y 16:1n-7. El único valor que no está comprendido dentro del criterio de aceptación propuesto es el ácido graso 14:0. Con esta información se puede deducir la necesidad de introducir un estándar interno más cercano a los ácidos grasos: 14:0, 16:0 y 16:1n-7 para mejorar la recuperación.

5.7. Precisión:

- Precisión intermedia de la respuesta del equipo:

Tabla 5.10. Valores de la respuesta del equipo en función de los días de pruebas y su correspondiente valor de precisión intermedia para cada ácido graso (RSD%)

Ácido Graso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	RSD%
14:0	0,450	0,449	0,447	0,445	0,462	0,453	0,453	0,447	0,442	1,2
16:0	3,761	3,769	3,732	3,722	3,855*	3,778	3,777	3,737	3,706	0,7
16:1n-7	2,723	2,731	2,707	2,695	2,796*	2,734	2,735	2,705	2,684	0,7
18:0	0,104	0,105	0,104	0,103	0,107	0,105	0,107	0,104	0,103	1,3
18:1n-9	1,088	1,094	1,081	1,077	1,113	1,093	1,097	1,085	1,081	1,0
20:4n-6	0,119	0,119	0,118	0,118	0,120	0,118	0,120	0,118	0,116	1,0
20:5n-3	0,519	0,516	0,512	0,512	0,525	0,518	0,532*	0,516	0,516	0,8

*: Valores atípicos eliminados mediante la prueba de Mandel (Anexo C).

Se observa en todos los casos que ningún valor de RSD% superó el criterio de aceptación propuesto, ello significa que el equipo presenta una buena precisión de su respuesta.

- Precisión intermedia del método:

Tabla 5.11. Valores de precisión intermedia del método. Se muestran los valores obtenidos por los analistas L y C en mg de ácido graso/g de muestra en los cinco días que duró la prueba.

Ácido Graso	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C2	C3	C4	C5	RSD%
14:0	46,0	46,3	46,3	45,8	45,7	46,0	44,3*	46,8	45,8	45,8	0,7
16:0	360,3	360,7	360,6	358,8	357,4	360,9	346,0*	363,7	358,0	358,1	0,6
16:1n-7	251,6	251,5	251,4	249,8	249,1	251,7	241,4*	254,0	249,5	249,8	0,6
18:0	9,2	9,2	9,1	9,1	9,1*	9,2	8,8*	9,2	9,1	9,1	0,6
18:1n-9	109,6	109,4	109,3	109,2	108,5	109,8	104,9*	110,2	108,8	108,7	0,5
20:4n-6	11,1	11,1	11,0	11,1	11,0	11,1	10,7*	11,1	11,1	11,0	0,5
20:5n-3	53,0	53,3	52,6	52,9	52,0	53,0	51,2*	53,1	52,7	52,3	0,8

*: Valores atípicos eliminados mediante la prueba de Mandel (Anexo C).

Se observa que los valores obtenidos por cada analista en cada día son semejantes a los propuestos en la tabla 4.1. En cada caso se obtuvo un valor de precisión

menor a 1% suficiente para cumplir con el criterio de aceptación propuesto, lo que permite deducir que el método aplicado tiene una buena precisión.

5.8. Robustez:

Los valores de las ocho pruebas realizadas según la metodología de Youden-Steiner se muestran a continuación:

Tabla 5.12. Valores obtenidos según la metodología de Youden-Steiner

Ácido graso	Prueba (mg/g)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
14:0	44,4	44,1	44,1	44,6	43,7	44,0	44,0	44,5
16:0	343,7	342,1	343,1	343,9	339,0	340,2	339,5	342,6
16:1n-7	239,2	238,1	238,5	239,8	235,6	235,9	235,4	237,4
18:0	8,9	8,9	8,9	8,8	8,7	8,8	8,8	8,7
18:1n-9	104,2	103,9	104,3	103,9	102,7	103,0	102,7	103,2
20:4n-6	11,1	11,1	11,1	11,0	10,9	10,9	10,9	10,8
20:5n-3	51,9	52,0	52,0	51,9	51,3	51,4	53,1	51,4

Con estos valores se construyó la tabla 5.13:

Tabla 5.13. Valores de la diferencia de valores absolutos de las variables elegidas para la prueba de robustez y sus correspondientes valores críticos ($\sqrt{2}S$)

Variable	Ácido Graso						
	14:0	16:0	16:1n-7	18:0	18:1n-9	20:4n-6	20:5n-3
Masa de la muestra: A-a	0,26	2,86	2,84	0,11	1,17	0,22	0,13
Volumen de tolueno: B-b	0,24	1,02	0,56	0,03	0,04	0,04	0,42
Volumen de metanol: C-c	0,25	0,88	0,67	0,01	0,02	0,01	0,43
Volumen de catalizador: D-d	0,19	0,43	0,08	0,03	0,01	0,01	0,47
Tiempo de reacción: E-e	0,16	1,31	0,56	0,03	0,37	0,03	0,41
Volumen de hexano: F-f	0,27	1,10	1,04	0,06	0,01	0,05	0,48
Volumen de agua: G-g	0,15	0,12	0,18	0,05	0,08	0,01	0,41
$\sqrt{2}S$	0,48	2,80	2,18	0,07	0,80	0,08	0,56

Los parámetros que se muestran en la tabla 5.13 han sido escogidos de manera que se observe como afectan las demás variables a un cambio relativamente alto en la masa de muestra usada (de 1mg a 0.5mg), este cambio se hizo en función de la prueba LOD y LOQ donde se mencionó que aún se puede seguir usando menor cantidad de muestra para el análisis. La tabla muestra que los ácidos grasos 16:0, 16:1n-7, 18:0, 18:1n-9 y 20:4n-6 son los que muestran una mayor sensibilidad de sus resultados al usar menor cantidad de muestra mientras que los dos ácidos grasos restantes superan el criterio de aceptación. El resto de variables propias de la formación de las FAME (tolueno, metanol, catalizador y tiempo de reacción) y propias de la extracción de las FAME (hexano y agua) no muestran una elevada sensibilidad de sus resultados al usar cambios relativamente menores y superan el criterio de aceptación propuesto.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

- El proceso de implementación del método fue sencillo de realizar, el único inconveniente como en cualquier método de cromatografía ha sido optimizar la resolución y el tiempo de retención de los picos de los cromatogramas.
- Los parámetros característicos obtenidos fueron: selectividad, no se reportó presencia de interferentes; linealidad, los valores de R^2 fueron superiores a 0.9998; sensibilidad, estos valores se encontraron en el intervalo de 0.0090 y 0.0105 μg^{-1} ; porcentaje de recuperación, se encontraron en el intervalo de 93-101%; precisión intermedia, estos valores fueron menores al 2% (RSD%); límites de detección, se encontraron en el intervalo de 0.1 a 8 μg ; límites de cuantificación, se encontraron en el intervalo de 0.5 a 24 μg ; robustez, esta prueba demostró que el método es sensible a un cambio en la cantidad de muestra.
- El método analítico cumplió con la mayoría de los criterios de aceptación propuestos y se le ha considerado adecuado para ser usado en las pruebas de nuestras investigaciones.

RECOMENDACIONES

Existen ciertas consideraciones técnicas que son importantes mencionar para el buen desarrollo y posterior mejora del método analítico, entre ellas destacan:

- Controlar la temperatura del laboratorio a una temperatura baja debido a que los solventes orgánicos que se requieren para el análisis son volátiles y su volumen depende de la temperatura. La temperatura del laboratorio se mantuvo a $21 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Trabajar con la menor cantidad de luz posible porque los ácidos grasos tienden a deteriorarse con el exceso de luz.
- Almacenar los extractos y estándares a 4°C y en oscuridad si no se va a utilizar en el momento.
- Probar estándares internos con señales más cercanas a los ácidos grasos 14:0, 16:0 y 16:1n-7 para mejorar el porcentaje de recuperación del método.
- Lavar la jeringa del cromatógrafo con solventes compatibles al hexano para evitar la formación de burbujas dentro de ella.
- Evitar introducir agua al vial porque podría deteriorar la columna del equipo de cromatografía al ser inyectada accidentalmente.
- Verificar que no haya contaminación en el equipo de cromatografía inyectando el blanco consistente en hexano puro antes de cada prueba.
- Realizar el cambio de la septa del inyector del equipo de cromatografía cada 50 inyecciones.

De otro lado, se recomienda extender la aplicación del método a diferentes tipos de microalgas y elaborar estudios sobre el potencial de estos como fuente de lípidos para la producción de biodiesel. Además, se recomendaría evaluar los ácidos grasos esenciales de las microalgas y estudiar su posible extracción para consumo humano.

BANCO DE GERMOPLASMA: Es un lugar destinado a la conservación de la diversidad genética de uno o varios cultivos y sus especies silvestres relacionadas.

BIODIESEL: Es un biocombustible líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales como aceites vegetales o grasas animales, con o sin uso previo, mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación, y que se aplica en la preparación de sustitutos totales o parciales del petrodiesel o gasóleo obtenido del petróleo

BIOMASA: Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

BIORREACTOR: Es un sistema empleado para hacer crecer células en operaciones de cultivo celular. Este sistema busca mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) al organismo que se cultiva.

COSECHA DE MICROALGAS: Es la separación de la microalga del medio de cultivo.

DERIVATIZACIÓN DE ANALITOS: Es el proceso que consiste en modificar químicamente un compuesto para producir un derivado con nuevas propiedades que faciliten o permitan su análisis.

LIOFILIZACIÓN: Es un método de desecación en el que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío.

MEDIO DE CULTIVO: Consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PRICHARD, E. y BARWICK, V. 2007. Quality Assurance in Analytical Chemistry. Reino Unido, John Wiley & Sons.
2. AOAC. 2012. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. [En línea] <http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf> [Consulta 06 diciembre 2012]
3. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2010. Procedural Manual. Roma, decimonovena edición.
4. ICHIHARA, K. y FUKUBAYASHI, Y. 2010. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Liquid Chromatography. The journal of lipid Research [En línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2817593/>> [Consulta: 06 de diciembre de 2012]
5. RAEHTZ, K. 2009. Challenges and Advances in Making Microalgae Biomass a Cost Efficient Source of Biodiesel. MMG 445 Basic Biotechnology Vol. 5:37-43.
6. GONZÁLEZ, D., KAFAROV, V. y GUZMÁN, A. 2009. Desarrollo de Métodos de Extracción de Aceite en la Cadena de Producción de Biodiesel a Partir de Microalgas. Prospect. Vol. 7:53-60
7. LOERA-QUESADA, M. y OLGUÍN, J. 2010. Las Microalgas Como Fuente de Biodiesel: Retos Y Oportunidades. México, Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal 1(1): 91-116
8. JEGAN, S. y FARID, M. 2011. Feasibility Study for production of Biofuel and Chemical from Marine Microalgae *Nannochloropsis* sp. Based on Basic Mass and Energy Analysis. Nueva Zelanda. [En línea] <<http://www.hindawi.com/isrn/re/2012/156824/>> [Consulta: 06 de diciembre de 2012]
9. OLOFSSON, M., LAMELA, T., NILSSON, E., PASCAL, J., DEL PINO, V., URONEN, P. y LEGRAND, C. 2012. Seasonal Variation of Lipids and Fatty Acids of the Microalgae *Nannochloropsis Oculata* Grown in Outdoor Large-Scale Photobioreactors. Energies, 5:1577-1592.
10. INDECOPI. 2003. Guía para Efectuar la Validación de Métodos de Ensayo. [En línea] <<http://www.indecopi.gob.pe/repositorioaps/0/0/jer/acre01/guiaValidacion.pdf>> [Consulta: 06 de diciembre de 2012]

11. EURACHEM. 1998. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Reino Unido, LGC.
12. DÍAZ, I. y CÁRDENAS, P. 2011. Validación de Métodos de Ensayo. En: Segundo Curso de Validación de Métodos de Ensayo: 14 de noviembre – 12 de diciembre de 2011. Lima, Instituto de Corrosión y Protección, Universidad Católica del Perú.
13. SKOOG, A., WEST, M., HOLLER, J y CROUCH, R. 2005. Fundamentos de Química Analítica. Octava edición, México, Thomson.
14. CYBERLIPID CENTER. 2012. Resource Site for Lipid Studies. [En línea] <<http://www.cyberlipid.org/cyberlip/home0001.htm>> [Consulta 06 diciembre 2012]
15. IUPAC. 2012. Goldbook [En línea] <<http://goldbook.iupac.org/F02330.html>> [Consulta 06 diciembre 2012]
16. TVRZICKÁ, E., ZÁK, A., VECKA, M. y STANKOVÁ, B. 2012. Fatty Acids in Human Metabolism. [En línea] <<http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C03/E6-54-03-05.pdf>> [Consulta 06 diciembre 2012]
17. LEHNINGER, NELSON, D., COX, M. 2005. Principles of Biochemistry. Cuarta edición, UK, W. H. Freeman.
18. SIGMA-ALDRICH. 2012. Derivatization of Fatty Acids to FAMES. [En línea] <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=105120181>> [Consulta 06 diciembre 2012]
19. SOLOMONS, T. y FRYHLE, C. 2011. Organic Chemistry. Décima edición, Estados Unidos de América, John Wiley and Sons.
20. ALGAEBASE. 2012. Nannochloropsis. [En línea] <http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=44568> [Consulta 06 diciembre 2012]
21. BECKER, E. 1995. Microalgae, Biotechnology and Microbiology. Primera Reimpresión, Reino Unido, Universidad de Cambridge.
22. CHEN, M., LIU, T., CHEN, L., ZHANG, W., WANG, J., GAO, L., CHEN, Y. y PENG, X. 2012. Subcritical Co-Solvents Extraction of Lipid from Wet Microalgae Pastes of *Nannochloropsis sp.* Eur J Lipid Sci Technol; 114(2): 205–212.
23. SARMA, K., SCHUHMANN, H. y SCHENK, P. 2012. High lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. Australia, Energies **2012**, 5, 1532-1553.

24. VAN DEN HOEK, C., MANN, D. y JAHNS, H. 1995. *Algae, an Introduction to Phycology*. UK, University of Cambridge.
25. AGUILAR, C., YNGA, G., OSCANO, A., CHANG, I., Y L. FLORES. 2011. *Compendio Metodológico Para la Extracción de Lípidos Totales a Partir de Biomasa Microalgal*. Área de Biotecnología acuática, Dirección de Investigaciones en Acuicultura, Gestión Costera y Aguas continentales. Instituto del Mar del Perú (IMARPE).
26. ARREDONDO, B. y VOLTOVINA, D. 2007. *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de Biomasa Microalgal*. México, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste.
27. ULBERTH, F. GABERNING, R. y SCHRAMMEL, F. 1998. Flame-Ionization Detector Response to Methyl, Ethyl, Propyl, and Butyl Esters of Fatty Acids. Austria, *JAOCS* vol. 76(2).
28. MILLER, N. y MILLER, C. 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Sexta edición, Inglaterra, Pearson.
29. OLVERA, R., RÍOS, E. y VICENTE, V. 2003. *Manual de Técnicas para el Cultivo y Extracción de Bioproductos a Partir de Microalgas*. México, Instituto Politécnico Nacional.
30. KROMIDAS, S. 2006. *HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization*. Alemania, John Wiley & Sons.
31. MSP. 2005. *Gas Chromatography Troubleshooting and Reference Guide*. [En línea] <http://www.msp.ch/cs/Reference_Guide.pdf> [Consulta: 04 Octubre 2012]
32. BEUVING, G. 2012. *Validation of Analytical Methods*. [Diapositiva, en línea]. <<http://www.ikev.org/haber/beuvingall.pdf>> [Consulta: 04 Octubre 2012]
33. BLANCO-GOMIS, D., MANGAS, J., MARGOLLES, I. y ARIAS. P. 2001. Gas Chromatographic Analysis of Total Fatty Acids in Cider. España, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1260-1263.

ANEXO A
PREPARACIÓN DE METIL ESTERES DE ÁCIDOS GRASOS PARA
CROMATOGRAFÍA GASEOSA, MÉTODO DE KENICHI Y FUKUBAYASHI.

Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography[§]

Ken'ichi Ichihara^{1,2} and Yumeto Fukubayashi¹

Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural Science, Kyoto Prefectural University, Shimogamo, Kyoto 606-8522, Japan

Abstract A convenient method using commercial aqueous concentrated HCl (conc. HCl; 35%, w/w) as an acid catalyst was developed for preparation of fatty acid methyl esters (FAMES) from sterol esters, triacylglycerols, phospholipids, and FFAs for gas-liquid chromatography (GC). An 8% (w/v) solution of HCl in methanol/water (85:15, v/v) was prepared by diluting 9.7 ml of conc. HCl with 41.5 ml of methanol. Toluene (0.2 ml), methanol (1.5 ml), and the 8% HCl solution (0.3 ml) were added sequentially to the lipid sample. The final HCl concentration was 1.2% (w/v). This solution (2 ml) was incubated at 45°C overnight or heated at 100°C for 1–1.5 h. The amount of FFA formed in the presence of water derived from conc. HCl was estimated to be <1.4%. The yields of FAMES were >96% for the above lipid classes and were the same as or better than those obtained by saponification/methylation or by acid-catalyzed methanolysis/methylation using commercial anhydrous HCl/methanol. **■** The method developed here could be successfully applied to fatty acid analysis of various lipid samples, including fish oils, vegetable oils, and blood lipids by GC.—Ichihara, K., and Y. Fukubayashi. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 2010. 51: 635–640.

Supplementary key words fatty acid composition • methanolysis • methylation • triacylglycerols • sterol esters • phospholipids • fish oils • vegetable oils • blood lipids

Fatty acids are the major component of lipids, and the physical, chemical, and physiological properties of a lipid class depend primarily on its fatty acid composition. The fatty acid composition is determined as the methyl esters of fatty acids by gas-liquid chromatography (GC) (1–3). Saponification followed by methylation is a classical method for preparation of fatty acid methyl esters (FAMES) from glycerolipids and sterol esters (SEs). Conventionally, FAMES are prepared by base- or acid-catalyzed esterification. Base-catalyzed methanolysis proceeds much more rapidly under mild temperature conditions than acid-catalyzed reactions (3, 4), and KOH- or NaOH-catalyzed

methanolysis completes within 2 min at room temperature for glycerolipids (5, 6) and within 1 h at 37°C for SE (7). However, bases cannot catalyze the esterification of FFAs. BF₃ is a commonly used acid catalyst for methylation and methanolysis (8), but it is harmful, and boron and fluorine are also both restricted by local drainage laws. In addition, the methanolic BF₃ reagent has a limited shelf life (9). H₂SO₄ is also an effective acid catalyst for FAME synthesis, but it is a very corrosive viscous liquid and must be handled with care. When the acid catalysts, BF₃ and H₂SO₄ are used at high concentrations or at high temperatures, artifacts derived from fatty acids can be produced (1–3, 10, 11).

HCl is most widely used as an acid catalyst because it is a relatively mild reagent and gives almost quantitative yields (1–3). Anhydrous methanolic HCl can be prepared from acetyl chloride and methanol (2–4, 9), but the acid chloride is volatile (bp 52°C) and is an extreme irritant to the eyes. It also reacts violently with methanol. Many researchers purchase commercial expensive anhydrous methanolic HCl reagents. However, anhydrous methanolic HCl is unstable, and HCl reacts nucleophilically with methanol to produce chloromethane and water (12); consequently, the concentrations of HCl in commercial anhydrous HCl/methanol reagents decrease during storage. Commercial products of methanolic HCl contain considerable amounts of water that are probably formed during storage or are a contaminant introduced in the process of production.

In this study, we have developed a convenient reagent for preparation of FAMES from acyl lipids, including SEs, triacylglycerols (TGs), phospholipids (PhLs), and FFAs. The reagent is composed of commercial concentrated HCl (conc. HCl), methanol, and toluene and is superior to other reagents in terms of convenience, safety, and cost.

Abbreviations: FAME, fatty acid methyl ester; GC, gas-liquid chromatography; PC, phosphatidylcholine; PhL, phospholipid; Sap/BF₃, saponification followed by BF₃-catalyzed methylation; SE, sterol ester; TG, triacylglycerol.

¹K. Ichihara and Y. Fukubayashi contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed.

e-mail: ichihara@kpu.ac.jp

§ The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains supplementary data in the form of one table and nine figures.

Manuscript received 12 August 2009 and in revised form 16 September 2009.

Published, JLR Papers in Press, September 15, 2009

DOI 10.1194/jlr.D001065

Copyright © 2010 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

Here, we propose two procedures for derivatization of fatty acyl residues with the reagent: one is for mild reaction, and the other is for rapid reaction. All types of fatty acids with *O*-ester linkages and FFAs were converted almost quantitatively into the corresponding methyl esters in one-step reactions.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Fatty acids, TG, and cholesterol esters were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), Matreya (Pleasant Gap, PA), Nu-Chek-Prep (Elysian, MN), and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Phosphatidylcholine (PC; dioleoyl) was synthesized according to Ref. 13. Glass-distilled solvents were purchased from Sigma-Aldrich and Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Anhydrous methanolic HCl reagents, HCl (35%, w/w), acetyl chloride, methyl acetate, and 50% BF₃ in methanol were of reagent grade.

TLC and GC

Reaction products of methanolysis/methylation were analyzed by TLC on silica gel. Lipids separated were visualized by spraying 50% (w/w) sulfuric acid and then heating at 135°C. FAMES were analyzed with a Shimadzu 2014 gas chromatograph equipped with a column of SUPELCOWAX 10 (0.53 mm × 30 m) at a column temperature of 215°C or 225°C.

Preparation of FAMES

Lipid substrates and FAME products. FAMES were prepared from 1 mg of cholesteryl oleate, 1 mg of glyceryl trioleate, 1 mg of dioleoyl PC, 1 mg of oleic acid, 0.05 mg of *cis*-9,10-methyleneoctadecanoic acid (a cyclopropane fatty acid), 0.05 mg of conjugated linoleic acids that were mainly composed of *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 isomers, 1 mg of olive oil, 1 mg of soybean oil, 1 mg of linseed oil, 0.5 mg of fish oil (Pacific saury), 0.3 mg of blood lipids that had been extracted by the method of Bligh and Dyer (14) in the presence of 0.05% (w/v) 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol as an antioxidant, and 0.025 ml of whole blood. The formation of FAMES was mainly investigated with cholesteryl oleate because SEs are the most resistant to transesterification of lipid classes having ester linkages (7). The internal standard was methyl heptadecanoate or methyl tricosanoate. FAMES formed from biological materials were purified on cartridge columns packed with 200 mg of silica gel (No.102021; Merck, Darmstadt, Germany) prior to GC. The silica gel cartridge was conditioned with 3 ml of hexane, charged with FAMES dissolved in 1 ml of hexane, and washed with 3 ml of hexane. FAMES were eluted with 3 ml of 1.5% (v/v) methyl acetate in hexane.

Conventional method 1: saponification followed by BF₃-catalyzed methylation (Sap/BF₃). A lipid sample in a screw-capped glass tube (16.5 × 105 mm) was hydrolyzed with 1 ml of 1 M KOH in 70% ethanol at 90°C for 1 h. The reaction mixture was acidified with 0.2 ml of 6 M HCl, and then 1 ml of water was added. FFAs were released and extracted with 1 ml of hexane. After evaporation of the hexane in vacuo, the FFAs were methylated with 1 ml of 10% BF₃ in methanol at 37°C for 20 min. Water was added to the solution, and then FAMES were extracted with 1 ml of hexane.

Conventional method 2: anhydrous methanolic HCl method. HCl concentrations of commercial anhydrous solutions of HCl/methanol were 5% (w/v) according to the manufacturers' specifications, but the precise concentrations determined by titration were 2.3–3.2%. Karl-Fischer titration indicated that some of these

commercial reagents contained 1–4% water. Anhydrous methanolic 5% (w/v) HCl was also prepared by mixing acetyl chloride with methanol (3, 9). To a lipid sample in a screw-capped glass test tube was added 2.0 ml of anhydrous methanolic HCl, and the mixture was heated at 100°C for 1 h in a boiling water bath. After cooling, 1 ml of water was added, and then FAMES were extracted with 1 ml of hexane.

Mild methanolysis/methylation and rapid methanolysis/methylation using conc. HCl. Commercial conc. HCl (35%, w/w; 9.7 ml) was diluted with 41.5 ml of methanol to make 50 ml of 8.0% (w/v) HCl. This HCl reagent contained 85% (v/v) methanol and 15% (v/v) water that was derived from conc. HCl and was stored in a refrigerator.

A lipid sample was placed in a screw-capped glass test tube (16.5 × 105 mm) and dissolved in 0.20 ml of toluene. To the lipid solution, 1.50 ml of methanol and 0.30 ml of the 8.0% HCl solution were added in this order. The final HCl concentration was 1.2% (w/v) or 0.39 M, which corresponded to 0.06 ml of conc. HCl in a total volume of 2 ml. Addition of mixed 1.2% HCl/methanol/toluene solution to SE or TG samples should be avoided because of the low solubilities of these lipids in water-containing methanol. The tube was vortexed and then incubated at 45°C overnight (14 h or longer) for mild methanolysis/methylation or heated at 100°C for 1 h for rapid reaction. The reaction time at 100°C was extended up to 1.5 h for samples containing SE. After cooling to room temperature, 1 ml of hexane and 1 ml of water were added for extraction of FAMES. The tube was vortexed, and then the hexane layer was analyzed by GC directly or after purification through a silica gel column.

Preparation of FAMES from blood on a micro scale. FAMES were also prepared from one drop of whole blood spotted on filter paper with 1.2% HCl/methanol/toluene under the mild conditions. The procedure was a modification of a KOH/methanol method (6), which had been developed for fatty acid analysis of blood glycerolipids. Blood (0.025 ml) was spotted onto a small piece of filter paper (1.5 × 1.5 cm; Whatman 3MM) that had been washed with acetone containing 0.05% 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol. Each piece, once it had dried, was put in a screw-capped test tube, to which 0.2 ml of toluene, 1.5 ml of methanol, and 0.3 ml of the 8% HCl reagent were added sequentially and then incubated at 45°C overnight. To the reaction mixture were added 1 ml of hexane and 0.2 ml of water, and the tube was vortexed. FAMES in the hexane layer were purified through a silica gel cartridge column.

RESULTS AND DISCUSSION

Mild methanolysis/methylation at 45°C

Reaction conditions were investigated for mild methanolysis and methylation. **Figure 1A** shows that the methanolysis of cholesteryl oleate at 45°C for 16 h proceeded almost quantitatively in the presence of 1.2–1.6% HCl, which corresponded to 0.06–0.08 ml of conc. HCl in a total volume of 2 ml. The HCl concentration of 2.0% increased the amount of cholesteryl oleate that did not undergo methanolysis, presumably by lowering the solubility of the substrate. The formation of FFA was stimulated as the concentration of HCl increased. This would be due to an increase in water content. In the presence of 1.2% HCl, cholesteryl oleate required reaction times longer than 14 h for completion of methanolysis at 45°C (**Fig. 1B**).

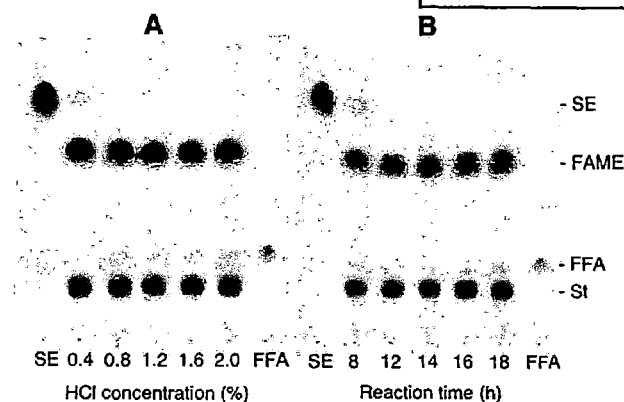


Fig. 1. A: Effects of the concentration of HCl on methanolysis of cholesteryl oleate. The reaction mixtures were incubated at 45°C for 16 h. B: Dependence of methanolysis of cholesteryl oleate on reaction time. Reaction mixtures containing 1.2% (w/v) HCl were incubated at 45°C. Reaction products were analyzed by double development of TLC. The silica gel plate was developed to 2.5 cm from the origin with hexane/*tert*-butyl methyl ether/acetic acid (50:50:0.5, v/v/v), dried in vacuo, and redeveloped to 8 cm from the origin with hexane/*tert*-butyl methyl ether/acetic acid (97:3:0.5, v/v/v). St, sterol.

Under conditions of 45°C/14 h, methanolysis of TG proceeded at the lower HCl concentration of 0.6% (see supplementary Fig. 1A). The lower concentration of HCl means a lower water content of the reaction medium and resulted in a decrease in FFA formed by hydrolysis. TG and PhL were converted into FAME within 8 h at 45°C in 1.2% HCl (see supplementary Figs. 1B and 1IA)

In contrast to methanolysis of esters, methylation of FFA occurs very rapidly. The formation of FAME from FFA was completed within 20 min in 1.2% HCl and continued at much lower concentrations of HCl (see supplementary Figs. 1IB and 1II). The best reaction conditions for methylation of FFA were a reaction temperature of 45°C, reaction time of 60 min, and HCl concentration of 0.2%. The alternative conditions 45°C/20 min/0.5% HCl also gave good efficiency of methylation. The reactions of glycerolipids and FFA were thus more rapid than that of SE, and the order of reactivities of acyl lipids with HCl/methanol was FFA >> PhL = TG > SE.

The reaction conditions 0.6% HCl/45°C/14 h or 1.2% HCl/45°C/8 h gave good yields of FAME for lipid samples composed of only glycerolipids and FFA, while the reaction conditions 1.2% HCl/45°C/16 h are recommended for lipid samples containing SE.

Cyclopropane fatty acids are heat- and acid-labile components of bacteria and cottonseed oil; hence, their derivatization to methyl esters had been carried out by base-catalyzed methanolysis or Sap/BF₃ (15). A cyclopropane fatty acid, *cis*-9,10-methyleneoctadecanoic acid, was recovered almost quantitatively as the methyl ester with trace amounts of artifacts under mild temperature conditions of 45°C (1.2% HCl/14 h), under which glycerolipids can be converted into FAME (see supplementary Fig. 1IV). Conjugated linoleic acids are unstable under acidic conditions, and synthesis of their methyl esters resulted in the

formation of 5% artifacts even under the mild conditions of 1.2% HCl/45°C/14 h. However, no artifacts were detected in FAME prepared by the combination of alkali-catalyzed methanolysis at room temperature or at 37°C (5, 7) and acid-catalyzed methylation for 20 min (0.5% HCl/45°C) as suggested in a previous work (16).

Rapid methanolysis/methylation at 100°C

Methyl oleate was formed from cholesteryl oleate when SE was heated at 100°C for 90 min with 1.2% HCl in methanol and toluene, but two major artifacts were produced under elevated temperature conditions (see supplementary Fig. 1V). These artifacts were probably due to 3,5-cholestadiene and cholesteryl methyl ether (17, 18), and the latter artifact could not be separated from FAME by pretreatment with a silica gel column for GC. Taking into account the lifespan of GC columns, an overnight reaction at 45°C is recommended for blood lipids that contain cholesterol and its esters.

Methanolysis of TG at 100°C produced no artifacts except FFA (see supplementary Fig. 1VI). The reaction time required for methanolysis of TG was 30 min with 1.2% HCl or 90 min with 0.6% HCl, in which the amount of FFA released was smaller than that for 1.2% HCl. The reaction times required for methanolysis of PC and methylation of FFA were shorter than 15 min in the presence of 1.2% HCl, and methylation of oleic acid with 0.2% HCl was completed within 5 min at 100°C.

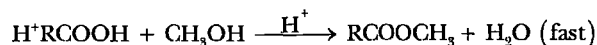
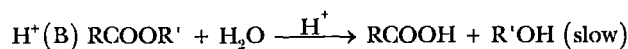
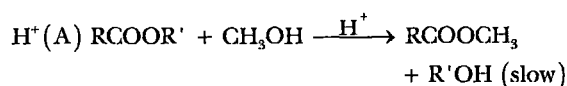
Reaction conditions of 1.2% HCl/100°C/90 min are thus required for lipid samples containing SE, while 30 min is a sufficient reaction time to give good yields of FAME for lipid samples not containing SE.

Water contents and solubilities of lipids as factors affecting FAME formation

Because the reagent contains water derived from aqueous conc. HCl as a component and the acid-catalyzed methanolysis is a reversible reaction, the formation of FFA is inevitable, as seen in Fig. 1. To assess the rate of hydrolysis of FAME formed, methyl oleate was incubated in methanol containing 1.0% HCl and water at 100°C for 1 h. Hydrolysis of FAME was a function of water content, and the percentage of remaining methyl oleate decreased with increasing water content (see supplementary Fig. 1VII). The 2 ml reaction mixture of 1.2% HCl contains 0.044 ml of water, i.e., 2.2% water derived from conc. HCl, and it was estimated that not more than 1.4% of FAME produced can be hydrolyzed during methanolysis/methylation. These findings indicate that the presence of water inevitably promotes the hydrolysis of FAME formed but does not significantly affect the yield of FAME. Ulberth and Henninger (19) reported that the formation of FAME was not hindered by addition of up to 2% water in a reaction mixture, and a similar observation that 5% water was acceptable for methanolysis was also reported by Lepage and Roy (20). Some of commercial methanolic 4.6–5% HCl reagents contained more than 1% water, and their HCl concentrations were 2.3–3.2% at the time of purchase. It must be kept in mind that HCl reacts with methanol to form chloromethane

and water. Half the HCl in methanol is lost within 1.5 months at room temperature, and a considerable amount of HCl is lost during methanolysis at 100°C (12).

The presence of water also gives rise to hydrolysis of ester bonds in SE, TG, and PhL, and it is presumed that FAMEs are synthesized through either transesterification pathway, i.e., methanolysis (reaction A) or hydrolysis/methylation (reaction B), in methanolic HCl solutions that are not absolutely anhydrous. FFA liberated by hydrolysis should be immediately methylated, as acid-catalyzed methylation of FFA occurs rapidly. Progress of reaction from PC to FAME in 1.2% HCl/methanol was accompanied by a change in the amount of FFA liberated, which suggests that the hydrolysis/methylation pathway operates to some extent. Trace amounts of water may therefore stimulate the formation of FAME and may not necessarily be a negative factor with respect to the rate of FAME production.



Methanol is a poor solvent for SE and TG, and the solubilities of these nonpolar lipids in methanol further

TABLE 1. Optimized conditions for preparation of FAMEs from individual lipid classes with conc. HCl/methanol/toluene

Lipid Class	HCl Conc.	Time	Yield of FAME ^d
<i>Mild methanolysis/methylation at 45°C</i>			
	%		%
SE	1.2	16 h	98.2 ± 0.7
TG	1.2	8 h	98.8 ± 0.7
	0.6	14 h	97.8 ± 0.2
PhL	1.2	8 h	96.7 ± 0.2 ^b
FFA	0.5	20 min	98.4 ± 0.1 ^c
	0.2	60 min	99.1 ± 0.2
<i>Rapid methanolysis/methylation at 100°C</i>			
	%		%
SE	1.2	90 min	96.8 ± 0.3 ^{d,e}
TG	1.2	30 min	97.3 ± 0.3 ^c
PhL	1.2	30 min	96.5 ± 0.5
FFA	0.2	5 min	98.4 ± 0.3

Molecular species of lipid classes analyzed were cholesteryl oleate as SE, glyceryl trioleate as TG, dioleoyl PC as PhL, and oleic acid as FFA.

^a After reaction of each lipid class, a hexane solution of methyl heptadecanoate as an internal standard and water were added to the reaction mixture. The yield of FAME in the hexane layer was determined by GC. Each value of yield is the average of three determinations.

^b Methanolysis of PhL with 0.6% HCl for 14 h at 45°C also gave a similar yield.

^c A similar yield, 97.9%, was obtained with 1.2% HCl.

^d Artifacts were produced from cholesterol. A shorter reaction time, 60 min, gave a yield of 96.5%.

^e For comparison, anhydrous methanolic 5% HCl was prepared prior to use by mixing 2 ml of acetyl chloride and 20 ml of chilled methanol. SE and TG were each dissolved in toluene and heated at 100°C for 90 and 60 min, respectively, with the anhydrous reagent. The HCl concentration of the reaction mixture was 4.5%. The yields of FAME were 99.0 ± 0.8% for SE and 99.6 ± 0.1% for TG.

decreased with increases in the concentration of water (see supplementary Fig. VIII). Glyceryl trioleate dissolved at a concentration of 3.3 mg in 2 ml of methanol at 25°C, but in the presence of 2.2% water, the solubility was 1.3 mg/2 ml. Addition of 10% toluene to water-containing methanol doubled the solubility of TG in the solution. The solubility of glyceryl trioleate in 2 ml of methanol solution containing 0.044 ml of water and 0.2 ml of toluene is equivalent to that of methanol containing 0.008 ml of water. Methanol containing both 2.0% water and 10% toluene is almost equivalent to anhydrous methanol with respect to the solubility of glyceryl trioleate. In the absence of toluene, methanolysis of SE and TG was slow, and considerable amounts of these lipids remained unchanged. The adverse effect of water derived from conc. HCl on the solubilities of hydrophobic lipids was thus appreciably diminished by addition of 10% toluene. The reaction of PhL or FFA did not require the addition of toluene.

Yields of FAME and limits of lipid amounts to be treated

Reaction conditions were thoroughly investigated for methanolysis/methylation of four lipid classes, i.e., SE, TG, PhL, and FFA. Table 1 shows the most appropriate conditions for mild reaction at 45°C and rapid reaction at 100°C, and yields of FAME. FAMEs were synthesized in yields >96% for these four lipid classes by the mild and rapid reactions. Table 1 indicates that lipid samples containing SE, such as blood lipids, should be treated at 45°C for 16 h or at 100°C for 90 min in 1.2% HCl/methanol/toluene and that lipid samples not containing SE, such as vegetable oils, can be derivatized at 1.2% or lower concentrations of HCl and with shorter reaction times.

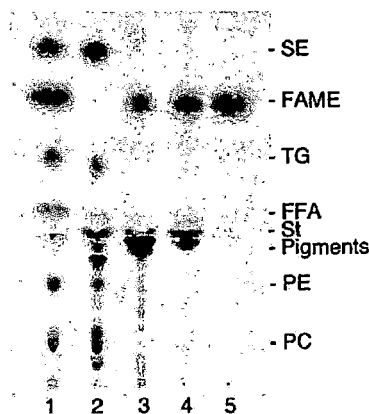


Fig. 2. Formation of FAMEs from one drop of whole blood on filter paper and purification of FAMEs formed. Lane 1, a standard mixture of SE, FAME, TG, FFA, phosphatidylethanolamine, and PC; lane 2, blood lipids; lane 3, chloroform extract after reaction; lane 4, hexane extract after reaction; lane 5, eluate of 1.5% methyl acetate/hexane from a cartridge column of silica gel that adsorbed the hexane extract. The TLC plate was first developed with chloroform/methanol/water/acetic acid (65:35:4:1, v/v/v/v) to 3.5 cm from the origin, dried in vacuo, and then redeveloped with hexane/*tert*-butyl methyl ether/acetic acid (90:10:0.5, v/v/v) to the top of the plate. St, sterol.

TABLE 2. Comparison of fish oil fatty acid compositions determined by a conventional Sap/BF₃ method, by a conventional anhydrous methanolic HCl method, and by the conc. HCl/methanol/toluene method

Fatty Acid ^a	Conventional Method		Present Method (1.2% HCl)	
	Sap/BF ₃	Anhyd. HCl	45°C/16 h	100°C/1 h
	%		%	
14:0	7.9 ± 0.0	7.8 ± 0.2	7.6 ± 0.1	7.5 ± 0.1
16:0	12.5 ± 0.0	12.2 ± 0.2	11.8 ± 0.1	12.0 ± 0.0
16:1	6.6 ± 0.0	6.6 ± 0.1	6.3 ± 0.1	6.5 ± 0.0
18:0	2.0 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0
18:1	6.0 ± 0.0	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.1	5.8 ± 0.0
18:2 n-6	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.5 ± 0.0
18:3 n-3	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.3 ± 0.0
18:4 n-3	4.5 ± 0.0	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.0
20:1	15.1 ± 0.1	14.6 ± 0.0	14.7 ± 0.1	14.7 ± 0.1
20:4 n-6	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
20:4 n-3	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0
20:5 n-3	9.2 ± 0.1	10.1 ± 0.0	10.0 ± 0.0	10.0 ± 0.1
22:1	20.3 ± 0.3	19.5 ± 0.4	20.4 ± 0.5	19.8 ± 0.1
21:5 n-3	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1
22:5 n-3	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.0
22:6 n-3	9.4 ± 0.1	10.4 ± 0.2	10.4 ± 0.2	10.5 ± 0.2

Each value is the average of three determinations.

^a Fatty acids are designated by number of carbon atoms:number of double bonds.

In comparison to base-catalyzed methanolysis (5–7), acid-catalyzed methanolysis has two major intrinsic disadvantages, i.e., low capacity for amounts of lipids to be treated and slow reaction rate. For single lipid classes, 1 mg of SE or 2 mg of TG could be thoroughly transesterified in 2 ml of the 1.2% HCl reagent used in the present method, and these amounts, 1 and 2 mg, were the limits for complete methanolysis of SE and TG, respectively. In methylation of FFA, at least 20 mg could be converted into FAME.

Application for blood lipids, vegetable oils, and fish oils

The accuracy and validity of the present methanolysis/methylation method using conc. HCl were confirmed with a variety of lipid samples. The mild 45°C/16 h conditions were used for blood lipids that contain considerable amounts of SE, and FAMES were prepared from one drop of blood spotted onto a small piece of filter paper. SE, TG, FFA, PC, and phosphatidylethanolamine were all efficiently converted to FAMES, which were purified to a single spot on TLC through a silica gel cartridge column for GC (Fig. 2). For vegetable oils rich in TG, FAMES were prepared by the rapid methanolysis at 100°C. Fish oils have many polyunsaturated fatty acid species in TG, and they are subject to autoxidation. FAMES were prepared by both the mild and rapid procedures. No obvious differences in fatty acid composition were found between the present method using conc. HCl and conventional methods, and also between 45°C/16 h and 100°C/90 min of the present method for the lipid samples tested. Table 2 shows fish oil fatty acid compositions obtained by different methods (for blood fatty acid compositions, see supplementary Table I; for GC of FAMES prepared from fish oil under the mild conditions, see supplementary Fig. IX).

Concluding remarks

The mixed solution of conc. HCl, methanol, and toluene is a convenient reagent for methanolysis and methylation

of acyl lipids. The reagent can be readily prepared in laboratories from common chemicals. Yields of FAME prepared and fatty acid compositions obtained using this reagent are almost identical to those determined with other conventional reagents of acid or base catalysts. Anhydrous HCl/methanol reagents for methanolysis and methylation of acyl lipids can thus be replaced by conc. HCl/methanol/toluene, which can also replace alkaline reagents such as sodium methoxide/methanol or KOH/methanol for lipid samples of milligram order.

The authors thank Dr. Kouhei Yamamoto (Osaka Prefecture University) for his practical advice on GC analysis.

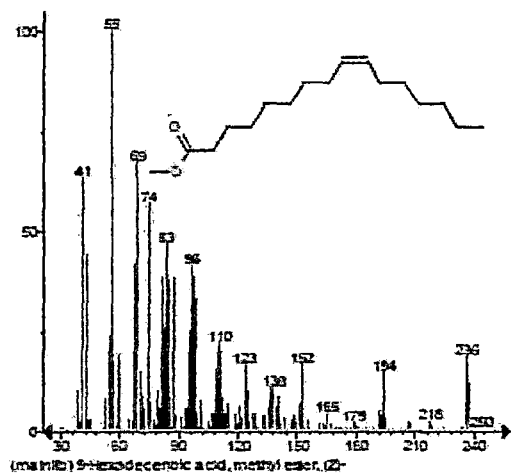
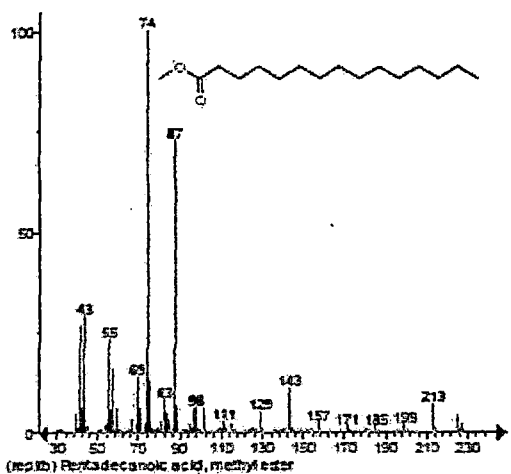
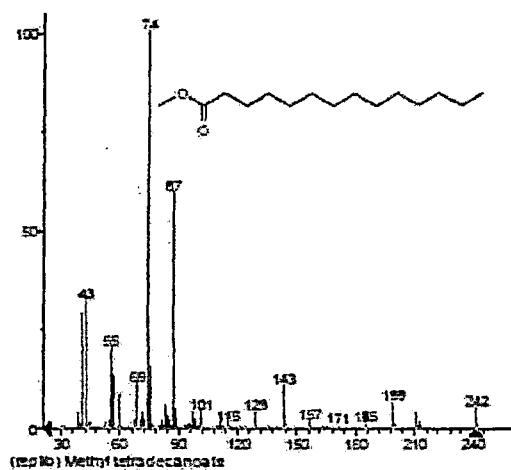
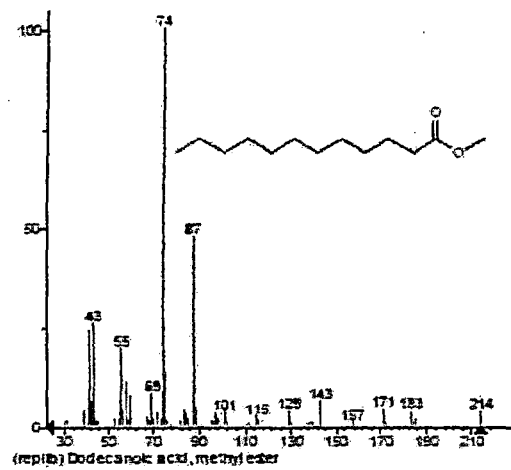
REFERENCES

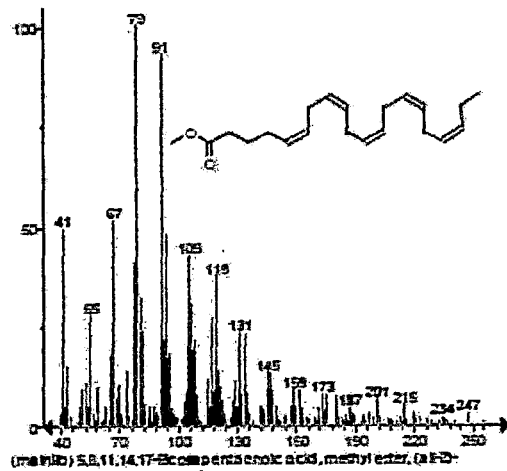
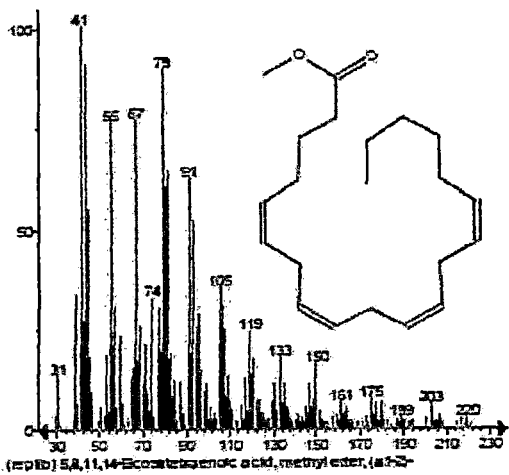
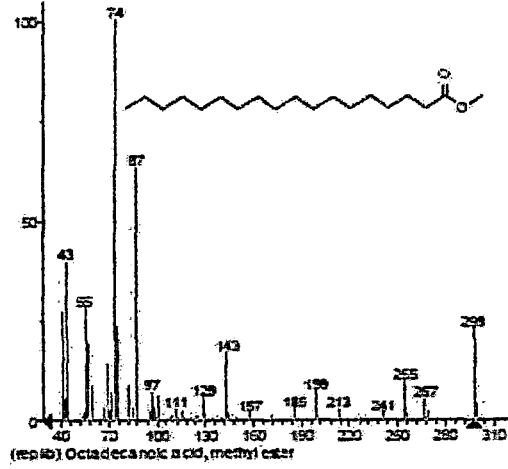
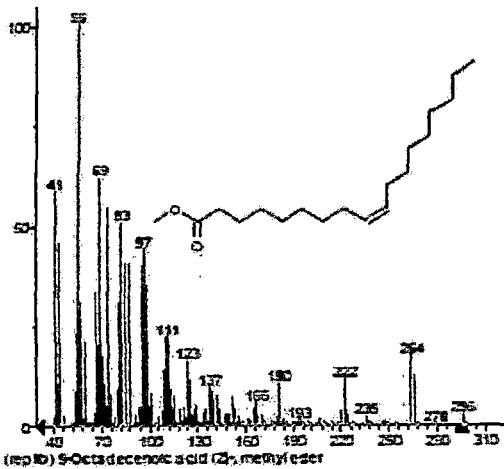
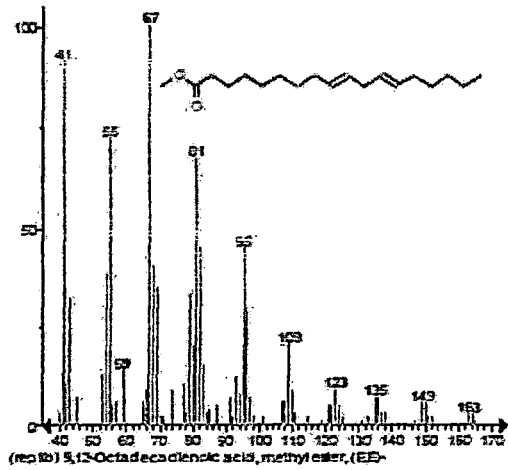
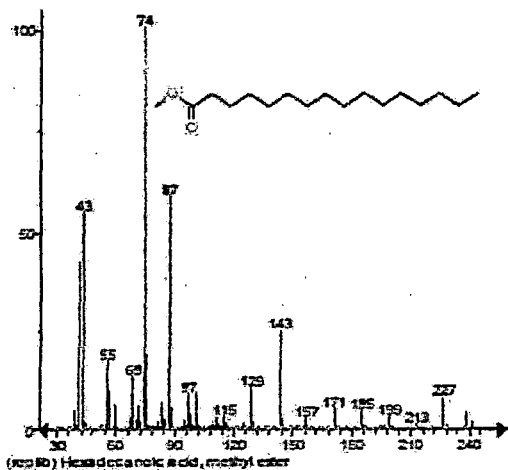
- Sheppard, A. J., and J. L. Iverson. 1975. Esterification of fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. Sci.* **13**: 448–452.
- Liu, K-S. 1994. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**: 1179–1187.
- Christie, W. W. 2003. *Lipid Analysis*. 3rd edition. The Oily Press, Bridgwater, UK.
- Carrapiso, A. I., and C. Garcia. 2000. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification. *Lipids*. **35**: 1167–1177.
- Ichihara, K., A. Shibahara, K. Yamamoto, and T. Nakayama. 1996. An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids* **31**: 535–539. [Erratum. 1996. *Lipids* **31**: 889].
- Ichihara, K., K. Waku, C. Yamaguchi, K. Saito, A. Shibahara, S. Miyatani, and K. Yamamoto. 2002. A convenient method for determination of the C_{20–22} PUFA composition of glycerolipids in blood and breast milk. *Lipids*. **37**: 523–526.
- Ichihara, K., C. Yamaguchi, H. Nishijima, and K. Saito. 2003. Preparation of FAME from sterol esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**: 833–834.
- Ackman, R. G. 1998. Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of the fatty acids of fish oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**: 541–545.
- Christie, W. W. 1992. Preparation of fatty acid methyl esters. *Inform.* **3**: 1031–1034.

10. Hansen, R. P., and J. F. Smith. 1966. The occurrence of methyl methoxystearate isomers in the methyl esters prepared from sheep perinephric fat. *Lipids*. **1**: 316–321.
11. Klopfenstein, W. E. 1971. On methylation of unsaturated acids using boron trihalide-methanol reagents. *J. Lipid Res.* **12**: 773–776.
12. Kishimoto, Y., and N. S. Radin. 1965. A reaction tube for methanolysis; instability of hydrogen chloride in methanol. *J. Lipid Res.* **6**: 435–436.
13. Ichihara, K., H. Iwasaki, K. Ueda, R. Takizawa, H. Naito, and M. Tomosugi. 2005. Synthesis of phosphatidylcholine: an improved method without using the cadmium chloride complex of *sn*-glycero-3-phosphocholine. *Chem. Phys. Lipids*. **137**: 94–99.
14. Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911–917.
15. Grogan, D. W., and J. E. Cronan, Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 429–441.
16. Kramer, J. K. G., V. Fellner, M. E. R. Dugan, F. D. Sauer, M. M. Mossoba, and M. P. Yurawecz. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. *Lipids*. **32**: 1219–1228.
17. Shapiro, I. L., and D. Kritchevsky. 1965. Degradation of cholesterol during transesterification of cholesterol stearate. *J. Chromatogr.* **18**: 599–601.
18. Kramer, J. K. G., and H. W. Hulan. 1976. Artifacts produced during acid-catalyzed methanolysis of sterol esters. *J. Lipid Res.* **17**: 674–676.
19. Ulberth, F., and M. Henninger. 1992. One-step extraction/methylation method for determining the fatty acid composition of processed foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**: 174–177.
20. Lepage, G., and C. C. Roy. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* **27**: 114–120.

ANEXO B
ESPECTRO DE MASAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTUDIADOS

La muestra derivatizada ha sido estudiada por GC-MS y ha reportado los siguientes 10 espectros de masas correspondientes a cada pico del cromatograma de la prueba de selectividad (Fig. 5.6)





ANEXO C
PRUEBA DE VALORES ATÍPICOS

**PRUEBA DE VALORES ATÍPICOS DE LOS VALORES DE PRECISIÓN
INTERMEDIA DE LA RESPUESTA DEL EQUIPO**

- ÁCIDO GRASO 14:0

Valores obtenidos de la relación de áreas de los **nueve** días de prueba:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Réplica 1	0,4497	0,4486	0,4489	0,4452	0,4683	0,4531	0,4598	0,4382	0,4448
Réplica 2	0,4512	0,4486	0,4453	0,4456	0,4550	0,4525	0,4466	0,4564	0,4400

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_1	h_2	h_3	h_4	h_5	h_6	h_7	h_8	h_9
h_{exp}	0,10	0,22	0,50	0,80	2,11	0,51	0,59	0,46	1,34
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7	k_8	k_9
k_{exp}	0,17	0,00	0,40	0,05	1,49	0,07	1,47	2,03	0,53
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

En todos los casos no se supera el valor crítico y por lo tanto no se tiene valores atípicos en este caso.

- ÁCIDO GRASO 16:0

Valores obtenidos de la relación de áreas de los **nueve** días de prueba:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Réplica 1	3,7763	3,7674	3,7623	3,7312	3,9090	3,7780	3,8216	3,6790	3,7254
Réplica 2	3,7447	3,7704	3,7018	3,7126	3,8015	3,7788	3,7328	3,7948	3,6858

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_1	h_2	h_3	h_4	h_5	h_6	h_7	h_8	h_9
h_{exp}	0,02	0,21	0,63	0,86	2,17	0,43	0,40	0,52	1,23
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7	k_8	k_9
k_{exp}	0,48	0,05	0,91	0,28	1,62	0,01	1,34	1,75	0,60
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

El valor de h_5 no supera la prueba y se le considera como valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin este valor.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando el día **cinco**:

Día	1	2	3	4	6	7	8	9
Réplica 1	3,7763	3,7674	3,7623	3,7312	3,7780	3,8216	3,6790	3,7254
Réplica 2	3,7447	3,7704	3,7018	3,7126	3,7788	3,7328	3,7948	3,6858

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_1	h_2	h_3	h_4	h_6	h_7	h_8	h_9
h_{exp}	0,47	0,78	0,57	0,94	1,12	1,08	0,39	1,54
$h_{critico}$	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06

	k_1	k_2	k_3	k_4	k_6	k_7	k_8	k_9
k_{exp}	0,54	0,05	1,03	0,32	0,01	1,50	1,96	0,67
$k_{critico}$	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25

Se observa que esta vez si se supera la prueba.

- **ÁCIDO GRASO 16:1n-7**

Valores obtenidos de la relación de áreas de los **nueve** días de prueba:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Réplica 1	2,7326	2,7303	2,7249	2,7012	2,8370	2,7354	2,7682	2,6617	2,6978
Réplica 2	2,7130	2,7309	2,6890	2,6890	2,7545	2,7321	2,7010	2,7490	2,6697

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_1	h_2	h_3	h_4	h_5	h_6	h_7	h_8	h_9
h_{exp}	0,01	0,23	0,50	0,86	2,23	0,32	0,35	0,55	1,21
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7	k_8	k_9
k_{exp}	0,40	0,01	0,73	0,25	1,69	0,07	1,37	1,78	0,57
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

El valor de h_5 no supera la prueba y se le considera como valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin este valor.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando el día **cinco**:

Día	1	2	3	4	6	7	8	9
Réplica 1	2,7326	2,7303	2,7249	2,7012	2,7354	2,7682	2,6617	2,6978
Réplica 2	2,7130	2,7309	2,6890	2,6890	2,7321	2,7010	2,7490	2,6697

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_1	h_2	h_3	h_4	h_6	h_7	h_8	h_9
h_{exp}	0,45	0,86	0,37	0,99	1,03	1,07	0,46	1,59
$h_{critico}$	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06

	k_1	k_2	k_3	k_4	k_6	k_7	k_8	k_9
k_{exp}	0,46	0,01	0,84	0,29	0,08	1,56	2,03	0,65
$k_{critico}$	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25

Se observa que esta vez si se supera la prueba.

- **ÁCIDO GRASO 18:0**

Valores obtenidos de la relación de áreas de los **nueve** días de prueba:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Réplica 1	0,1049	0,1049	0,1042	0,1039	0,1085	0,1048	0,1050	0,1025	0,1033
Réplica 2	0,1036	0,1053	0,1033	0,1028	0,1053	0,1051	0,1081	0,1050	0,1029

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_1	h_2	h_3	h_4	h_5	h_6	h_7	h_8	h_9
h_{exp}	0,26	0,33	0,66	0,92	1,66	0,23	1,42	0,68	1,12
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7	k_8	k_9
k_{exp}	0,72	0,26	0,52	0,61	1,75	0,17	1,66	1,37	0,22
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

En todos los casos no se supera el valor crítico y por lo tanto no se tiene valores atípicos en este caso.

- **ÁCIDO GRASO 18:1n-9**

Valores obtenidos de la relación de áreas de los **nueve** días de prueba:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Réplica 1	1,0942	1,0945	1,0887	1,0809	1,1273	1,0925	1,1018	1,0734	1,0865
Réplica 2	1,0827	1,0933	1,0734	1,0734	1,0993	1,0943	1,0913	1,0968	1,0750

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_1	h_2	h_3	h_4	h_5	h_6	h_7	h_8	h_9
h_{exp}	0,26	0,33	0,66	0,92	1,66	0,23	1,42	0,68	1,12
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7	k_8	k_9
k_{exp}	0,72	0,26	0,52	0,61	1,75	0,17	1,66	1,37	0,22
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

En todos los casos no se supera el valor crítico y por lo tanto no se tiene valores atípicos en este caso.

- **ÁCIDO GRASO 20:4n-6**

Valores obtenidos de la relación de áreas de los **nueve** días de prueba:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Réplica 1	0,1207	0,1180	0,1190	0,1180	0,1228	0,1173	0,1188	0,1176	0,1168
Réplica 2	0,1168	0,1201	0,1162	0,1176	0,1175	0,1195	0,1205	0,1191	0,1152

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_1	h_2	h_3	h_4	h_5	h_6	h_7	h_8	h_9
h_{exp}	0,26	0,50	0,69	0,53	1,44	0,00	1,02	0,05	1,95
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	k ₅	k ₆	k ₇	k ₈	k ₉
k _{exp}	1,41	0,76	1,01	0,15	1,91	0,81	0,64	0,57	0,58
k _{crítico}	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

En todos los casos no se supera el valor crítico y por lo tanto no se tiene valores atípicos en este caso.

- ÁCIDO GRASO 20:5n-3

Valores obtenidos de la relación de áreas de los **nueve** días de prueba:

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Réplica 1	0,5209	0,5160	0,5144	0,5153	0,5317	0,5172	0,5192	0,5125	0,5176
Réplica 2	0,5162	0,5158	0,5106	0,5090	0,5188	0,5194	0,5449	0,5194	0,5150

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h ₁	h ₂	h ₃	h ₄	h ₅	h ₆	h ₇	h ₈	h ₉
h _{exp}	0,00	0,42	0,95	1,00	1,05	0,04	2,12	0,41	0,35
h _{crítico}	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	k ₅	k ₆	k ₇	k ₈	k ₉
k _{exp}	0,46	0,02	0,37	0,60	1,25	0,22	2,48	0,67	0,25
k _{crítico}	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

El valor de k₇ no supera la prueba y se le considera como valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin este valor.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando el día **siete**:

Día	1	2	3	4	5	6	8	9
Réplica 1	0,5209	0,5160	0,5144	0,5153	0,5317	0,5172	0,5125	0,5176
Réplica 2	0,5162	0,5158	0,5106	0,5090	0,5188	0,5194	0,5194	0,5150

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h ₁	h ₂	h ₃	h ₄	h ₅	h ₆	h ₈	h ₉
h _{exp}	0,42	0,24	1,06	1,14	2,04	0,35	0,23	0,13
h _{crítico}	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06

	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	k ₅	k ₆	k ₈	k ₉
k _{exp}	0,77	0,03	0,63	1,01	2,10	0,36	1,12	0,43
k _{critico}	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25

Se observa que esta vez si se supera la prueba.

**PRUEBA DE VALORES ATÍPICOS DE LOS VALORES DE PRECISIÓN
INTERMEDIA DEL MÉTODO**

- **ÁCIDO GRASO 14:0**

Valores obtenidos de la cantidad de ácido graso 14:0 en mg/g de muestra: **10** datos en total.

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C2	C3	C4	C5
Réplica 1	46,08	46,34	46,18	46,01	45,45	46,03	44,37	46,93	45,61	46,13
Réplica 2	45,98	46,28	46,39	45,69	45,92	46,03	44,30	46,58	45,94	45,46

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h _{L1}	h _{L2}	h _{L3}	h _{L4}	h _{L5}	h _{C1}	h _{C2}	h _{C3}	h _{C4}	h _{C5}
h _{exp}	0,23	0,67	0,64	0,06	0,31	0,23	2,45	1,37	0,17	0,14
h _{critico}	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

	h _{L1}	h _{L2}	h _{L3}	h _{L4}	h _{L5}	h _{C1}	h _{C2}	h _{C3}	h _{C4}	h _{C5}
k _{exp}	0,31	0,19	0,64	0,98	1,44	0,01	0,23	1,06	1,03	2,05
k _{critico}	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32

El valor de h_{C2} no supera la prueba y se le considera como valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin este valor.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando el h_{C2}: **9** datos en total

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C3	C4	C5
Réplica 1	46,08	46,34	46,18	46,01	45,45	46,03	46,93	45,61	46,13
Réplica 2	45,98	46,28	46,39	45,69	45,92	46,03	46,58	45,94	45,46

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,08	0,74	0,68	0,62	1,08	0,08	2,04	0,83	0,77
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_{L1}	k_{L2}	k_{L3}	k_{L4}	k_{L5}	k_{C1}	k_{C3}	k_{C4}	k_{C5}
k_{exp}	0,30	0,18	0,61	0,93	1,37	0,01	1,01	0,98	1,95
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

Se observa que esta vez si se supera la prueba.

- **ÁCIDO GRASO 16:0**

Valores obtenidos de la cantidad de ácido graso 16:0 en mg/g de muestra: **10** datos en total.

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C2	C3	C4	C5
Réplica 1	361,0	361,7	359,4	360,0	354,9	360,9	346,5	364,7	356,9	359,9
Réplica 2	359,6	359,6	361,9	357,7	359,9	360,8	345,4	362,7	359,1	356,2

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,40	0,46	0,46	0,08	0,23	0,51	2,62	1,11	0,10	0,08
$h_{critico}$	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
k_{exp}	0,53	0,83	0,97	0,89	1,93	0,05	0,42	0,75	0,84	1,46
$k_{critico}$	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32

El valor de h_{C2} no supera la prueba y se le considera como valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin este valor.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando el h_{C2} : **9** datos en total

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C3	C4	C5
Réplica 1	361,0	361,7	359,4	360,0	354,9	360,9	364,7	356,9	359,9
Réplica 2	359,6	359,6	361,9	357,7	359,9	360,8	362,7	359,1	356,2

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,26	0,42	0,41	0,50	1,24	0,52	1,96	0,93	0,90
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_{L1}	k_{L2}	k_{L3}	k_{L4}	k_{L5}	k_{C1}	k_{C3}	k_{C4}	k_{C5}
k_{exp}	0,51	0,79	0,93	0,85	1,85	0,05	0,72	0,80	1,39
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

Se observa que esta vez si se supera la prueba.

- **ÁCIDO GRASO 16:1n-7**

Valores obtenidos de la cantidad de ácido graso 16:1n-7 en mg/g de muestra: **10** datos en total.

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C2	C3	C4	C5
Réplica 1	252,0	252,2	250,8	250,7	247,9	251,6	241,3	255,0	248,2	251,0
Réplica 2	251,1	250,8	252,1	248,9	250,3	251,8	241,4	253,1	250,8	248,5

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,47	0,45	0,43	0,05	0,25	0,51	2,57	1,20	0,14	0,06
$h_{critico}$	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
k_{exp}	0,49	0,83	0,75	1,03	1,39	0,13	0,04	1,11	1,49	1,43
$k_{critico}$	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32

El valor de h_{C2} no supera la prueba y se le considera como valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin este valor.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando el h_{C2} : **9** datos en total

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C3	C4	C5
Réplica 1	252,0	252,2	250,8	250,7	247,9	251,6	255,0	248,2	251,0
Réplica 2	251,1	250,8	252,1	248,9	250,3	251,8	253,1	250,8	248,5

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,40	0,37	0,33	0,74	1,17	0,50	2,00	0,93	0,76
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_{L1}	k_{L2}	k_{L3}	k_{L4}	k_{L5}	k_{C1}	k_{C3}	k_{C4}	k_{C5}
k_{exp}	0,46	0,78	0,71	0,98	1,32	0,12	1,05	1,42	1,36
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

Se observa que esta vez si se supera la prueba.

- **ÁCIDO GRASO 18:0**

Valores obtenidos de la cantidad de ácido graso 18:0 en mg/g de muestra: **10** datos en total.

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C2	C3	C4	C5
Réplica 1	9,19	9,24	9,08	9,11	9,02	9,24	8,81	9,20	9,12	9,14
Réplica 2	9,20	9,17	9,15	9,11	9,16	9,23	8,80	9,20	9,13	9,08

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,64	0,70	0,03	0,08	0,25	0,95	2,58	0,68	0,04	0,08
$h_{critico}$	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
k_{exp}	0,18	1,21	1,10	0,04	2,44	0,13	0,25	0,06	0,29	1,08
$k_{critico}$	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32

Los valores de h_{C2} y h_{L5} no superan la prueba y se les considera como valores atípicos, se vuelve a repetir la prueba sin estos valores.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando h_{C2} y h_{L5} : **8** datos en total

	L1	L2	L3	L4	C1	C3	C4	C5
Réplica 1	9,19	9,24	9,08	9,11	9,24	9,20	9,12	9,14
Réplica 2	9,20	9,17	9,15	9,11	9,23	9,20	9,13	9,08

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{C1}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,67	0,81	0,90	1,00	1,40	0,76	0,72	1,01
$h_{critico}$	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06	2,06

	k_{L1}	k_{L2}	k_{L3}	k_{L4}	k_{C1}	k_{C3}	k_{C4}	k_{C5}
k_{exp}	0,26	1,71	1,56	0,06	0,18	0,09	0,42	1,53
$k_{critico}$	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25

Se observa que esta vez si se supera la prueba.

- **ÁCIDO GRASO 18:1n-9**

Valores obtenidos de la cantidad de ácido graso 18:1n-9 en mg/g de muestra: 10 datos en total.

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C2	C3	C4	C5
Réplica 1	109,7	109,7	109,0	109,5	107,7	109,7	104,9	110,4	108,4	109,2
Réplica 2	109,5	109,0	109,6	108,8	109,3	110,0	105,0	110,1	109,3	108,1

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,53	0,35	0,31	0,23	0,25	0,67	2,65	0,94	0,02	0,11
$h_{critico}$	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
k_{exp}	0,18	0,90	0,77	0,87	2,08	0,32	0,05	0,41	1,13	1,38
$k_{critico}$	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32

El valor de h_{C2} no supera la prueba y se le considera como valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin este valor.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando el h_{C2} : 9 datos en total

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C3	C4	C5
Réplica 1	109,7	109,7	109,0	109,5	107,7	109,7	110,4	108,4	109,2
Réplica 2	109,5	109,0	109,6	108,8	109,3	110,0	110,1	109,3	108,1

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,61	0,13	0,05	0,17	1,43	0,98	1,68	0,82	1,04
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_{L1}	k_{L2}	k_{L3}	k_{L4}	k_{L5}	k_{C1}	k_{C3}	k_{C4}	k_{C5}
k_{exp}	0,17	0,85	0,73	0,83	1,98	0,30	0,39	1,07	1,31
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

Se observa que esta vez si se supera la prueba.

- **ÁCIDO GRASO 20:4n-6**

Valores obtenidos de la cantidad de ácido graso 20:4n-6 en mg/g de muestra: 10 datos en total.

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C2	C3	C4	C5
Réplica 1	11,12	11,17	11,01	11,09	10,88	11,15	10,70	11,11	11,06	11,08
Réplica 2	11,08	11,07	11,06	11,09	11,04	11,14	10,69	11,11	11,16	11,00

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,46	0,56	0,04	0,37	0,60	0,80	2,60	0,54	0,54	0,02
$h_{critico}$	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
k_{exp}	0,55	1,35	0,65	0,02	2,14	0,18	0,17	0,04	1,29	1,06
$k_{critico}$	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32

El valor de h_{C2} no supera la prueba y se le considera como valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin este valor.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando el h_{C2} : 9 datos en total

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C3	C4	C5
Réplica 1	11,12	11,17	11,01	11,09	10,88	11,15	11,11	11,06	11,08
Réplica 2	11,08	11,07	11,06	11,09	11,04	11,14	11,11	11,16	11,00

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,39	0,63	0,77	0,18	2,06	1,18	0,58	0,57	0,71
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_{L1}	k_{L2}	k_{L3}	k_{L4}	k_{L5}	k_{C1}	k_{C3}	k_{C4}	k_{C5}
k_{exp}	0,52	1,28	0,62	0,02	2,04	0,18	0,03	1,23	1,01
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

Se observa que esta vez si se supera la prueba.

- **ÁCIDO GRASO 20:5n-3**

Valores obtenidos de la cantidad de ácido graso 20:5n-3 en mg/g de muestra: 10 datos en total.

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C2	C3	C4	C5
Réplica 1	52,95	53,34	52,50	52,93	51,71	53,05	51,20	53,10	52,40	52,60
Réplica 2	52,96	53,18	52,78	52,85	52,29	53,03	51,23	53,01	53,01	52,03

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,57	1,06	0,06	0,45	0,99	0,70	2,26	0,72	0,16	0,48
$h_{critico}$	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18	2,18

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C2}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
k_{exp}	0,02	0,46	0,82	0,23	1,69	0,06	0,09	0,25	1,81	1,69
$k_{critico}$	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32	2,32

El valor de h_{C2} no supera la prueba y se le considera como valor atípico, se vuelve a repetir la prueba sin este valor.

Valores obtenidos de la relación de áreas exceptuando el h_{C2} : 9 datos en total

	L1	L2	L3	L4	L5	C1	C3	C4	C5
Réplica 1	52,95	53,34	52,50	52,93	51,71	53,05	53,10	52,40	52,60
Réplica 2	52,96	53,18	52,78	52,85	52,29	53,03	53,01	53,01	52,03

Valores h y k de la prueba de consistencia de Mandel

	h_{L1}	h_{L2}	h_{L3}	h_{L4}	h_{L5}	h_{C1}	h_{C3}	h_{C4}	h_{C5}
h_{exp}	0,49	1,25	0,30	0,32	1,92	0,70	0,73	0,14	1,13
$h_{critico}$	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13	2,13

	k_{L1}	k_{L2}	k_{L3}	k_{L4}	k_{L5}	k_{C1}	k_{C3}	k_{C4}	k_{C5}
k_{exp}	0,02	0,44	0,77	0,22	1,61	0,05	0,23	1,72	1,61
$k_{critico}$	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29	2,29

Se observa que esta vez sí se supera la prueba.