

SÒNIA RODRÍGUEZ MAGRINYÀ

ESTUDI QUALITATIU I QUANTITATIU DE LA
FRACCIÓ LIPÍDICA DE MICROALGUES

TREBALL FI DE GRAU

GRAU EN QUÍMICA

TARRAGONA

Dirigit per la Sra. Patricia Puig Guiral

2015-2016



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**

Índex

1. OBJECTIUS	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓ	6
3.1. Importància microalgues.....	6
3.2. Antecedents	7
4. FONAMENTS	9
4.1. Lípids i àcids grassos.....	9
4.2. Anàlisi d'àcids grassos	10
4.3. Tècniques analítiques.....	12
4.3.1. Extracció en fase sòlida (SPE)	12
4.3.2. Cromatografia de capa fina (TLC)	13
4.3.3. Cromatografia de gasos (GC).....	15
5. PART EXPERIMENTAL	17
5.1. Identificació i quantificació d'àcids grassos en microalgues.....	17
5.1.1. Reactius	17
5.1.2. Metodologia	18
5.1.2.1. Saponificació, derivatització i extracció.....	18
5.1.2.2. Anàlisi GC-FID	18
5.1.2.3. Anàlisi GC-MS	19
5.2. Desenvolupament d'un mètode de fraccionament lipídic.....	20
5.2.1. Reactius	20
5.2.2. Metodologia	21
5.2.2.1. Extracció lipídica	21
5.2.2.2. Extracció en fase sòlida (SPE)	21
5.2.2.3. Cromatografia de capa fina (TLC)	23
5.2.2.4. Anàlisi de FAMES mitjançant GC-FID	23
6. RESULTATS I DISCUSSIÓ	24
6.1. Contingut total d'àcids grassos en diferents microalgues	24
6.1.1. Identificació dels àcids grassos en les microalgues.....	24
6.1.2. Quantificació dels àcids grassos en les microalgues	32
6.2. Desenvolupament d'un mètode de fraccionament lipídic.....	36
7. CONCLUSIONS.....	42
8. BIBLIOGRAFIA	43
9. ANNEXOS.....	46

1. OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest projecte és identificar i quantificar els àcids grassos en diferents microalgues d'interès per a l'empresa mitjançant cromatografia de gasos i desenvolupar un mètode d'extracció en fase sòlida (SPE) per fraccionar la grassa en diferents famílies de lípids (neutres, lliures i polars).

Així, els objectius específics serien els següents:

- Identificar els diferents àcids grassos que conté cadascuna de les mostres.
- Quantificar els diferents àcids grassos que conté cadascuna de les mostres i comparar diferents mostres analitzades.
- Desenvolupar un mètode de fraccionament lipídic i optimitzar-lo comprovant que la separació es produeix correctament mitjançant cromatografia de capa fina.
- Quantificar cadascuna de les fraccions lipídiques i veure en quina família de compostos es troba cadascun dels àcids grassos de la mostra.

2. ABSTRACT

To meet the growing interest of using microalgae biomass in the production of nutraceutical and pharmaceutical products, we need suitable analytical methods and a comprehensive data base to characterize lipid components. The aim of this project was to identify and quantify the different fatty acids in microalgae of interest to the company through gas chromatography and develop a method of solid phase extraction (SPE) to split fat in different families lipids (neutral, free and polar).

The identification and quantification of fatty acids in each type of microalgae by GC-FID and GC-MS was successful and the amount of fatty acids methyl esters (FAME) total of each of the samples could be calculated.

Microalgae lipids were fractionated into neutral lipids (NL), free fatty acids (FFA) and polar lipids (PL) using solid phase extraction (SPE) with aminopropyl bonded phase columns. The method was developed with standard lipid mixtures and applied to real samples. Each fraction of SPE was analyzed using GC-FID.

Significant differences and complexities of fatty acid composition among the microalgae tested were observed. The compositional information is valuable for strain selection, biomass fractionation and utilization.

3. INTRODUCCIÓ

Andrés Pinaluba, S.A. (APSA) és una empresa que fabrica i comercialitza additius així com premescles de medicaments per a l'alimentació, nutrició i salut animal. L'activitat i presència internacional d'Andrés Pinaluba, S.A. en més de 70 països, la converteixen en un dels proveïdors de productes per a la indústria d'alimentació animal més importants d'Europa amb activitat global.

Les pràctiques externes i el treball de fi de grau han estat realitzats a l'empresa Andrés Pinaluba, S.A., concretament al departament d'investigació d'aquesta, i les tasques s'han realitzat al laboratori analític d'aquest departament (APSA R&D).

El principal objectiu de l'empresa és satisfer qualsevol tipus de necessitat de les empreses que actuen en aquest tipus de mercat. Andrés Pinaluba, S.A. aposta per la innovació en productes i serveis. Es centra en el desenvolupament de nous productes a través de la investigació de nous additius per a la nutrició i benestar animal complint amb la demanda actual de productes més sans i naturals. Actualment treballen en l'estudi de les microalgues per a introduir-les com a suplementació en l'alimentació animal i per aquest motiu en aquest projecte s'estudiaran aquests compostos.

Per temes de confidencialitat de l'empresa, s'han omès dades referents als tipus de microalgues, que al text apareixeran amb una codi intern de l'empresa, així com les condicions de cultiu d'aquestes, que no s'especificaran.

L'equipament utilitzat és d'alt cost, el GC-FID i sobretot el GC-MS ja que el cost augmenta pel fet d'estar acoblat a espectrometria de masses. Respecte a reactius i patrons, també són d'alt valor, principalment el patró de FAMES, el Menhaden Oil i el trifluorur de bor que es detallen en l'apartat 5.1.1.

Pel que fa a residus, tot el que contingui trifluorur de bor i cloroform, reactius necessaris en la part experimental tal i com s'observa en l'apartat 5.1.1, s'ha d'eliminar com residus orgànics halogenats i el seu cost és superior al dels altres tipus de residus que hi ha al laboratori.

3.1. Importància microalgues

Les algues contribueixen al 40% de la fotosíntesis global i són extremadament diverses. Les microalgues constitueixen aproximadament 16.000 espècies reconegudes. Certs tipus de microalgues han estat reconegudes com a fonts de materials comercialment prometedores per a la producció de biocombustibles de tercera generació així com per a aplicacions nutraceutiques i farmacèutiques degut al seu ràpid creixement en certes condicions ambientals, al seu alt contingut en lípids i a la seva composició lipídica única ja que moltes de les microalgues tenen un elevat contingut d'àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) com ara els $\omega 3$ que són d'elevat interès nutricional tal i com es detalla a l'apartat 4.1.¹

Les microalgues constitueixen una màquina fotosintètica d'importància econòmica molt eficient que converteix l'energia solar en biomassa. Creixen en qualsevol medi aquàtic on hi hagi nutrients, fonts de carboni, llum i un rang de temperatura adequat. Són considerades un aliment molt interessant per la seva alta proporció de proteïnes i altres nutrients essencials pels humans. També destaquen per les seves innegables propietats terapèutiques per

estimular el creixement i la regeneració cel·lular, enfortir el sistema immunològic, protegir dels radicals lliures, millorar la digestió i la que és la seva millor virtut, desintoxicar l'organisme de metalls pesats, dioxines, elements quimioterapèutics i altres substàncies mitjançant diferents mètodes com per exemple la quelació.²

Les microalgues són espècies amb un elevat contingut de lípids en la seva composició, alguns dels quals són àcids grassos beneficiosos per a la salut, i d'aquí ve l'interès social de l'estudi d'aquest producte pels beneficis en el metabolisme i a la salut que comporten. Algunes microalgues que han guanyat cada vegada més atencions comercials són capaces de sintetitzar alts nivells d'àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga en resposta a factors ecològics. L'aparició d'àcids grassos o lípids que no es troben normalment en altres plantes superiors o productes d'origen animal fa a les microalgues distingibles d'aquestes espècies.¹

3.2. [Antecedents](#)

Les investigacions sobre el cultiu de microalgues presenten una elevada importància degut a la seva àmplia aplicació biotecnològica, comercial i agroalimentària.

Les microalgues han estat aprofitades al llarg de la història de la humanitat com a fonts de rics nutrients per les seves poblacions. No obstant això, no ha estat fins a la segona meitat del segle XX que s'han investigat formes d'ús industrial per potenciar el seu aprofitament massiu, principalment en les àrees de l'alimentació i medicina. A partir de l'escassetat d'aliments en el món, entre els anys 1935 i 1940 va sorgir l'interès de desenvolupar sistemes d'algues per a trobar noves fonts de proteïnes. La biotecnologia de microalgues s'inicia formalment quan als anys 50 científics alemanys van començar a conrear microalgues de forma massiva per obtenir lípids i proteïnes, reemplaçant les proteïnes animal i vegetal convencionals.³

S'han realitzat diversos estudis en les microalgues degut a que es considera que els àcids grassos provinents de la biomassa microalgal tenen el potencial de ser utilitzats com a matèria prima per a la producció de biocombustibles com ara el biodièsel.^{4,5} Aquesta és una aplicació de les microalgues molt important ja que el biodièsel ha anat guanyant popularitat mundial com a font d'energia renovable a causa dels seus avantatges econòmics, ambientals i socials.

Són molts els treballs publicats que fan referència a l'aplicació dels àcids grassos poliinsaturats extrets a partir de microalgues i hi ha una àmplia bibliografia sobre les espècies i condicions ambientals que afavoreixen la seva producció.^{6,7,8} En l'actualitat, part de les investigacions en biotecnologia de microalgues es condueixen a l'obtenció de ceps amb alt contingut en àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) i al desenvolupament de mètodes d'extracció i purificació d'aquests àcids orientats a escala industrial.^{9,10,11} Cal, per tant, disposar de mètodes d'anàlisi fiables, senzills i ràpids d'aquests àcids grassos.

El benefici ambiental de la producció de microalgues és força rellevant, ja que el cultiu de microalgues a nivell industrial permetria captar grans quantitats de CO₂ de l'atmosfera, i amb això, s'estarien adoptant els mecanismes de producció neta promulgats en el Protocol de Kyoto.³

Encara que moltes espècies de microalgues han estat analitzades per la seva composició d'àcids grassos, i alguns s'han determinat per a certes classes de lípids com ara lípids polars o esterols, pocs estudis han presentat la caracterització completa dels component lipídics (tant

lípidis simples com complexes). A causa de la gran variació entre els diferents tipus d'algues i de les condicions de cultiu d'aquestes, sovint es comparen els resultats de diferents laboratoris per a un perfilat complet de components lipídics d'una microalga. Així doncs, hi ha la necessitat de caracteritzar completament els diversos components lipídics dins d'una espècie de microalga.¹

La disponibilitat i la sensibilitat d'instrumentacions modernes com ara la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (CG-MS) proporcionen potents eines per obtenir un coneixement a fons de la composició dels lípidis de les microalgues.

4. FONAMENTS

4.1. Lípids i àcids grassos

Els lípids o greixos són molècules orgàniques l'estructura química de les quals està formada per hidrogen, carboni i oxigen. Els lípids tenen funcions de reserva energètica, estructural, catalítica i reguladora, de transport i de senyalització entre d'altres. A causa de la funció que aquests compleixen dins de l'organisme, és indispensable incorporar aliments que els continguin i, d'aquesta manera, mantenir el funcionament dels diferents òrgans.¹²

Pel que fa a les propietats físiques dels lípids cal destacar que tenen caràcter amfipàtic i el punt de fusió de cada lípid depèn del número de carbonis i del número de dobles enllaços que tingui. Com més carbonis tingui un lípid més elevat serà el punt de fusió del lípid i com més elevat sigui el número de dobles enllaços més baix serà el punt de fusió del lípid.

Pel que fa a les propietats químiques dels lípids cal destacar les següents:

- Esterificació: Reacció en la qual un àcid gras s'uneix a un alcohol, mitjançant un enllaç covalent. D'aquesta reacció es forma un èster, alliberant aigua.
- Saponificació: Reacció en la qual un àcid gras esterificat amb glicerol s'uneix a una base donant una sal d'àcid gras, alliberant una molècula d'aigua.
- Oxidació: Reacció en la qual un àcid gras insaturat passa de tenir un enllaç doble a un simple.

Existeixen diferents famílies de lípids i diverses maneres de classificar-los.¹³ En aquest treball es diferenciaren entre:

- Lípids neutres: Triglicèrids, diglicèrids, monoglicèrids, èsters d'esterols i esterols.
- Àcids grassos lliures
- Lípids polars: Fosfolípids

Els lípids també es poden classificar en saponificables o no saponificables. Els lípids saponificables són aquells que contenen àcids grassos o derivats.

Un àcid gras és un tipus de molècula orgànica formada per una llarga cadena hidrocarbonada en línia en l'extrem del qual hi ha un grup carboxil ($-\text{COOH}$). La gran majoria que es troben a la natura són de nombre parell d'àtoms de carboni. Cada àtom de carboni s'uneix al següent i al precedent per mitjà d'un enllaç covalent senzill. La fórmula bàsica d'una molècula d'àcid gras saturat és $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$.

Segons la presència de dobles enllaços en l'estructura, els àcids grassos es poden classificar en:¹⁴

- Àcids grassos saturats. No hi ha dobles enllaços entre els àtoms de carboni. Acostumen a ser sòlids a temperatura ambient i normalment les grasses d'origen animal contenen un percentatge d'àcids grassos saturats més alt. Es consideren perjudicials per a la salut si es prenen en grans quantitats.
- Àcids grassos insaturats. Existeix un o més enllaços dobles entre els àtoms de carboni. Solen ser líquids a temperatura ambient i es solen trobar als vegetals i al peix blau. En

principi, si no són modificats per a canviar-ne les propietats, són cardiosaludables i preferibles als saturats.

Els àcids grassos insaturats poden ser monoinsaturats si només tenen un doble enllaç o poliinsaturats si en tenen més d'un. Els àcids poliinsaturats (PUFAs) són essencials en el desenvolupament i en la fisiologia humana, a més de tenir un paper important en la reducció del risc de malalties cardiovasculars.¹⁵

A més, segons la isomeria de la insaturació d'aquests àcids grassos, es classifiquen en:

- Àcids grassos *cis*: És l'estructura natural de la majoria de greixos insaturats tal com els trobem a la natura. Són cardiosaludables i bons per la salut.
- Àcids grassos *trans*: Els enllaços *trans* es poden forçar artificialment, a partir dels àcids *cis*, per obtenir àcids *trans*. Tenen les propietats físiques (molècula linear recta, greix sòlid a temperatura ambient, etc.) i antinutritives (no cardiosaludable, obesitat, colesterol, etc.) dels saturats. Es troben als productes elaborats industrialment.

Àcids grassos ω 3, ω 6 i ω 9

Hi ha certs àcids grassos que són beneficiosos per a la salut. Aquests són els àcids ω 3, ω 6 i ω 9. Es caracteritzen per tenir el seu primer doble enllaç a la tercera, sisena i novena posició respectivament, començant pel darrer àtom de carboni respecte el carboxil. Aquest tret estructural distintiu els atorga unes propietats físiques especials i els converteix en precursors insubstituïbles de molècules que els éssers vius utilitzen per a regular determinades funcions circulatòries. Aquests àcids grassos són considerats cardiosaludables, ajuden a un bon manteniment de la funció cerebral i són capaços d'alleujar inflamacions de tipus reumàtic o menstrual.¹⁶

La principal font alimentària d'aquests àcids grassos és el peix blau; més concretament el seu greix i el seu oli. També en trobem a les nous i a les llavors de lli.

Àcids grassos essencials

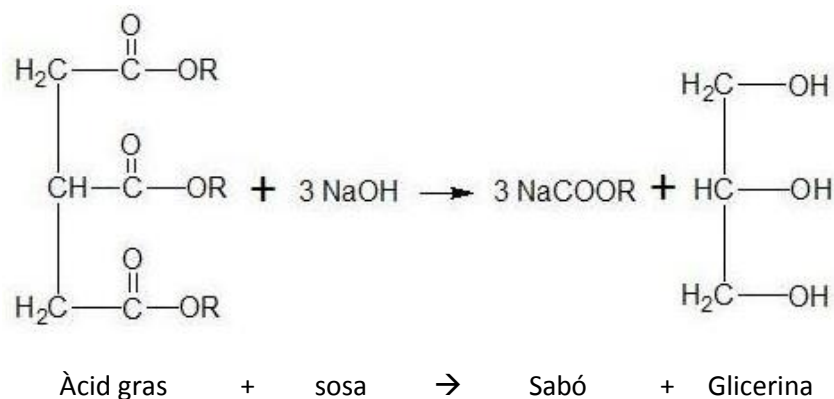
Els àcids grassos essencials (AGE) són aquells àcids grassos que el cos no pot sintetitzar i que per tant han de provenir de la dieta. Satisfer les necessitats d'alguns àcids grassos essencials pot ajudar a reduir el risc de desenvolupar malalties del cor, càncer i artritis. Els àcids grassos ω 3 són un tipus d'àcids grassos essencials.¹⁷

4.2. Anàlisi d'àcids grassos

Els àcids grassos se solen analitzar mitjançant cromatografia de gasos. Inicialment es realitza un extracció lipídica seguit d'una saponificació i derivatització per tal d'alliberar els àcids grassos i formar els èsters metílics, compostos més volàtils, que seran els que s'analitzaran per GC-FID.

Inicialment, es realitza una extracció lipídica de les mostres a analitzar per tal de d'obtenir només la fracció lipídica de tota la mostra ja que aquesta és la fracció d'interès en aquest tipus d'anàlisi.

En la saponificació s'obtenen els àcids grassos totals, tant els lliures com els combinats de tota la matriu de la mostra i així s'aconsegueix alliberar tots els àcids grassos mitjançant la saponificació dels glicèrids i fosfolípids. Així, es produeix una hidròlisi dels àcids grassos en medi bàsic de tots els greixos, que es descomponen, tal i com es pot veure a la reacció 1, en sals de sodi i glicerina.¹⁸



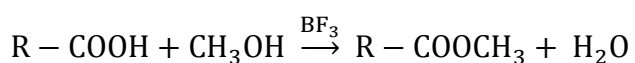
Reacció 1. Reacció de saponificació.

Pel que fa a la derivatització dels àcids grassos, aquests s'esterifiquen. Les raons principals per les quals els àcids grassos s'analitzen com a èsters metílics d'àcids grassos (FAME, sigles en anglès de Fatty Acid Methyl Esters) són, principalment, les següents:

- En la seva forma lliure, no derivatitzada, els àcids grassos poden ser difícils d'analitzar pel fet que aquests compostos altament polars tendeixen a formar enllaços d'hidrogen, donant lloc a problemes d'adsorció. Així, la reducció de la seva polaritat pot fer-los més susceptibles per al seu anàlisi.
- Per distingir entre molts àcids grassos insaturats amb diferències mínimes entre ells, els grups polars carboxil han de ser neutralitzats prèviament. Això llavors permet a la columna millorar les separacions segons el punt d'ebullició i també segons el grau d'insaturació, ja sigui per la posició de la insaturació o bé entre la configuració *cis* i *trans* d'aquesta.

L'esterificació d'àcids grassos a èsters metílics d'àcids grassos es porta a terme utilitzant un reactiu de derivatització alquílic. Els èsters metílics ofereixen una excel·lent estabilitat i proporcionen mostres ràpides i quantitatives per a l'anàlisi mitjançant GC.

Com es mostra a la reacció 2, la reacció d'esterificació implica la condensació del grup carboxil d'un àcid i el grup hidroxil d'un alcohol. L'esterificació es realitza millor en presència d'un catalitzador que protona un àtom d'oxigen del grup carboxil, fent l'àcid molt més reactiu. L'alcohol llavors es combina amb l'àcid protonat per formar un èster amb la pèrdua d'aigua. Finalment, el catalitzador s'elimina amb l'aigua. L'alcohol que s'utilitza determina la longitud de la cadena dels èsters resultants de manera que si s'utilitza metanol s'obtenen metil èsters.¹⁹



Reacció 2. Reacció d'esterificació

Si el que es vol és analitzar per separat diferents famílies d'àcids grassos aquestes s'hauran de separar prèviament. Una tècnica que s'utilitza actualment per a fer aquesta separació és l'extracció en fase sòlida i posteriorment ja es realitza la saponificació i derivatització de cada família de lípids per finalment analitzar-los per GC-FID.

4.3. [Tècniques analítiques](#)

4.3.1. [Extracció en fase sòlida \(SPE\)](#)

L'extracció en fase sòlida és una de les tècniques més usuals en el tractament i concentració de mostres abans de l'anàlisi per cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC), cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS), cromatografia de gasos (GC) o cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS).

El terme "extracció en fase sòlida" es deu a que el material de suport utilitzat és una superfície sòlida, generalment de sílice o de sílice modificada, és a dir, que conté un grup funcional orgànic específic unit covalentment a la superfície de la sílice. Els compostos que passen a través de la columna són adsorbits al suport a través d'intercanvi de ions, interaccions polars, enllaços d'hidrogen o interaccions no polars i, després, eluïts d'acord a les diferents afinitats entre el material absorbent i la fase mòbil utilitzada.²⁰

A la figura 1 es pot observar l'esquema general de les diferents etapes del procés d'extracció en fase sòlida. Aquestes són les següents:

Etapa de solvatació

L'activació de l'adsorbent i dels grups funcionals s'aconsegueix en passar un volum de solvent apropiat a través del cartutx per a que aquest es solvati convenientment. Per activar adsorbents hidrofòbics s'usa generalment metanol o acetonitril, mentre que per als hidrofílics s'usa hexà o clorur de metilè.

Etapa de condicionament

Es passa pel cartutx un volum apropiat de la matriu de la mostra per condicionar el cartutx amb el mateix solvent en el qual aquesta es troba.

Etapa de càrrega de la mostra

La mostra en dissolució es carrega al cartutx de forma que els analits queden retinguts. Per obtenir la màxima eficàcia s'ha de controlar el cabal de la mostra de manera que aquest no sigui ni massa ràpid, per evitar que es perdin analits, ni massa lent, per evitar que es quedin retinguts compostos que no són del nostre interès. A vegades convé analitzar la fracció no retinguda per comprovar que tots els compostos d'interès han estat retinguts.

Etapa de rentat

El rentat permet l'eliminació de qualsevol interferent que no sigui d'interès fent passar un solvent adequat pel cartutx.

Etape d'assecat

Sovint s'eliminen les traces de solvent fent circular aire a través de la columna. Aquesta etapa millora el rendiment d'extracció.

Etape d'elució

Es passa un solvent adequat per la columna per eliminar la interacció analit-adsorbent i així aconseguir eluir els compostos d'interès. El solvent adequat ha de tenir la màxima interacció amb l'analit i una interacció mínima amb les altres impureses, deixant-les en l'adsorbent. El volum d'elució ha de ser el menor possible per mantenir alt el factor de concentració.

Etape de Concentració

Els compostos d'interès es concentren evaporant una part del solvent si és necessari.

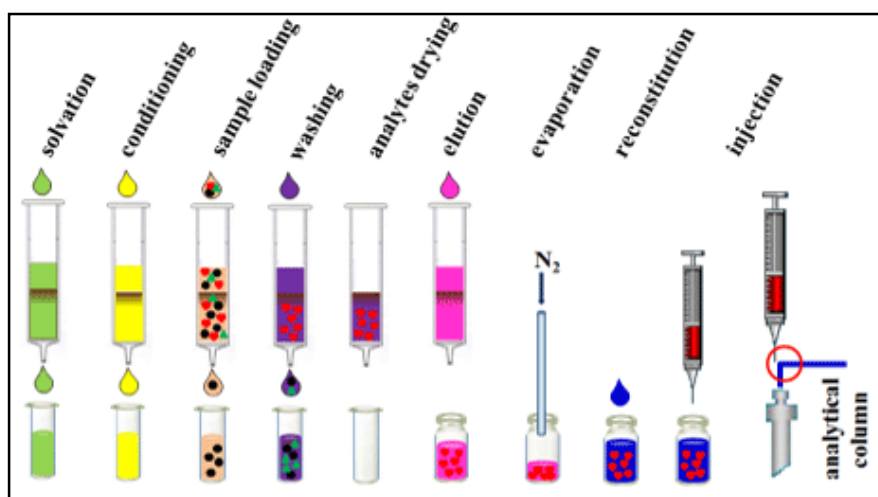


Figura 1. Esquema general de les diferents etapes d'extracció en fase sòlida.

4.3.2. Cromatografia de capa fina (TLC)

La cromatografia de capa fina, abreviada a l'anglès com a TLC (Thin Layer Chromatography), és una tècnica cromatogràfica utilitzada principalment per separar els components purs que formen part d'una mescla.

Aquesta separació es basa en la diferent interacció que experimenten els components de la mescla amb la fase estacionària; una capa fina de material adsorbent (normalment sílice, sílice modificada, gel, alumina o cel·lulosa) immobilitzada sobre un suport inert, i la fase mòbil; un dissolvent o barreja de dissolvents que es desplaça per la làmina per capil·laritat. Aquesta diferència d'adsorció, que es deu a la diferència de polaritat dels components, es tradueix en un major o menor desplaçament de cada component per la capa fina, permetent la seva separació i identificació. El procés d'adsorció es deu a interaccions intermoleculars de tipus dipol-dipol o enllaços d'hidrogen entre el solut i l'adsorbent. L'adsorbent ha de ser inert amb les substàncies a analitzar i no actuar com a catalitzador en reaccions de descomposició.²¹

En aquest treball, la TLC s'utilitza com a mètode qualitatiu per comprovar que la separació en l'SPE de les diferents famílies de lípids es dona correctament. Les plaques que s'utilitzen són de sílice.

Per dur a terme l'anàlisi es diposita un volum petit de mostra (20µl) a 1 cm d'altura de la placa cromatogràfica i a 1 cm de distància entre les diferents taques. Un cop seca la mostra, s'introdueix la placa en un recipient adient que conté la fase mòbil i paper de filtre al voltant de les parets d'aquest per saturar l'ambient. A mesura que el solvent puja per la placa per capil·laritat, va arrossegant als diferents lípids. Els lípids polars s'uniran fortament a la sílice, mentre que els lípids neutres no seran retinguts i seran els que més avançaran al llarg de la placa.

El factor de retenció (R_f) és un paràmetre característic de cada compost, que es defineix com el quocient entre la distància recorreguda pel compost i la distància recorreguda pel front de dissolvent, i depèn de la fase estacionària i de la fase mòbil. El valor d'aquest paràmetre oscil·la entre 0 i 1. Els compostos apolars interaccionen poc amb la fase estacionària, de manera que el recorregut per la làmina és gran, i per aquest motiu presenten factors de retenció elevats. Contràriament, els compostos polars interaccionen fortament amb la fase estacionària, desplaçant-se menys per la làmina, i per tant, tenen factors de retenció menors.²² Aquest paràmetre ens ajuda a diferenciar un compost d'un altre.

En la figura 2 es pot observar l'esquema general d'una cromatografia de capa fina i en la figura 3 l'esquema general del punt inicial i final de la dues fases de la cromatografia de capa fina.

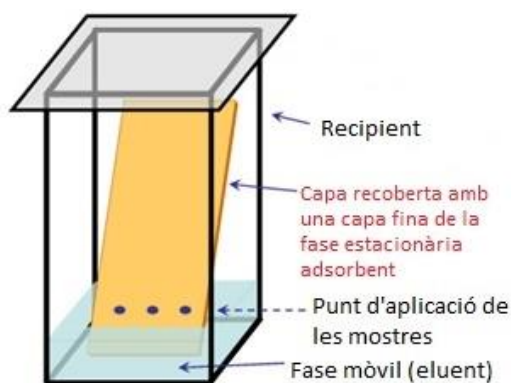


Figura 2. Esquema general d'una cromatografia de capa fina.

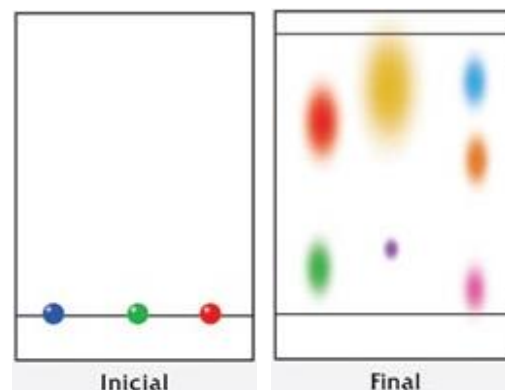


Figura 3. Esquema general del punt inicial i final de la dues fases de la cromatografia de capa fina.

Els lípids, un cop separats, poden ser detectats en les plaques de TLC mitjançant diferents mètodes de tinció. Les molècules que actuen com a reveladors reaccionen amb diferents components dels lípids, com els dobles enllaços dels àcids grassos, el fòsfor o els grups amino del cap polar. Un exemple de solució reveladora és la 2,7-diclorofluoresceïna al 0,1% (p/v) en metanol que a l'aplicar-la en forma d'esprai es poden observar les taques dels diferents compostos sota llum UV.²³

Les diferents espècies lipídiques són identificades en base a la migració relativa de cadascuna a les plaques, comparant-les amb patrons que s'han punxat prèviament.

4.3.3. Cromatografia de gasos (GC)

La cromatografia de gasos és una tècnica de separació de mescles de productes volàtils o semivolàtils. La mostra s'introdueix en el port d'injecció del cromatògraf on es volatilitza i els vapors o gasos formats són arrossegats per un gas inert a una columna cromatogràfica. El diferent grau d'interacció dels components de la mescla amb la fase estacionària de la columna permet la seva separació. Finalment, els components separats poden ser detectats, caracteritzats i quantificats emprant diversos detectors. En la figura 4 s'observa un esquema gràfic de les parts d'un cromatògraf de gasos.

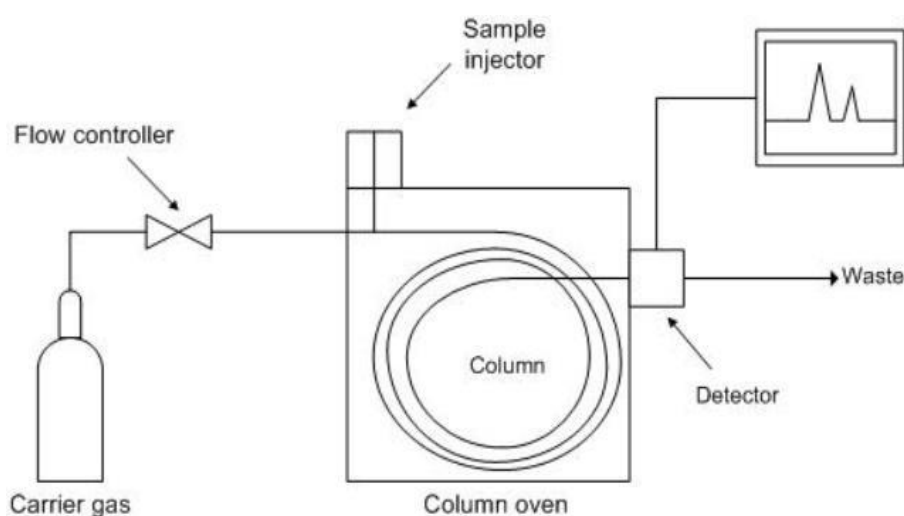


Figura 4. Esquema gràfic de les parts d'un cromatògraf de gasos

Les diferents possibilitats d'introducció de mostres, el gran nombre de fases estacionàries de les columnes cromatogràfiques i la diversitat de detectors, fan que aquesta tècnica tingui una gran quantitat d'aplicacions en multitud de camps.^{24,25}

Els diferents tipus de detectors comporten diferents selectivitats en la resposta. Destaca l'ús del cromatògraf de gasos amb detector de Ionització en Flama (GC-FID) i del cromatògraf de gasos acoblat a un espectròmetre de masses (GC-MS) per ser els més universals.

El detector de ionització de flama (FID) és un detector d'elevat ús en la cromatografia de gasos. Es condueix la mostra per una flama d'aire o d'hidrogen per oxidar les molècules orgàniques i així es produeixen partícules amb càrrega elèctrica (ions) el senyal elèctric de les quals és mesurat. És un detector sensible a la massa, de manera que la seva resposta és proporcional a la massa de carboni que passa a través d'ell. Presenta una elevada sensibilitat, un ampli interval de resposta, poc soroll de fons, és universal, fàcil de fabricar i utilitzar i és un detector destructiu ja que pirrolitza la mostra.²⁶

La detecció per espectrometria de masses (MS) aporta una gran quantitat d'informació que possibilita la identificació dels components d'una mescla. L'espectrometria de masses és una tècnica analítica que mesura la relació massa/càrrega d'ions en fase gasosa. La primera etapa

d'un anàlisi per espectrometria de masses consisteix en la ionització i fragmentació de l'analít típicament mitjançant ionització per impacte electrònic. Durant aquest procés, la mostra és bombardejada per electrons que ionitzen la molècula fent que es perdi un electró a causa de la repulsió electrostàtica. Els ions generats són dirigits a l'espectròmetre de masses on, en funció del tipus d'analitzador de massa, s'utilitza un camp elèctric o magnètic i els ions es separen en funció de la seva relació m/z (massa/càrrega). Finalment, els ions són enviats a l'electromultiplicador, que registra la carga induïda o el corrent produït.²⁷

La ionització per impacte electrònic permet identificar els compostos per comparació de l'espectre amb llibreries comercials.

La detecció per MS és una detecció sensible, destructiva, dóna informació qualitativa i quantitativa i és universal i alhora específica perquè permet treballar en mode *Full-Scan* o *SIM*. El mode *Full-Scan* consisteix en un escombrat complet de fragments en un rang de massa/càrrega conegut mentre que el mode *SIM* recull dades per a les masses d'interès concretes. El mode *SIM* permet la detecció d'analits específics amb una major sensibilitat i el mode *Full-Scan* és útil en la identificació de compostos desconeguts en una mostra i proporcionar confirmació dels resultats del GC utilitzant altres tipus de detectors.²⁸

5. PART EXPERIMENTAL

5.1. Identificació i quantificació d'àcids grassos en microalgues

Es pretén analitzar el contingut d'àcids grassos en diferents mostres de microalgues d'interès per a l'empresa. Les mostres que s'analitzen pertanyen a diferents famílies de microalgues. En l'empresa treballen amb 3 famílies de microalgues principalment. Les mostres analitzades de cadascuna de les famílies són les següents:

APSA102: APSA102-024, APSA102-025 i APSA102-027.

APSA103: APSA103-008, APSA103-016 i APSA103-017.

APSA108: APSA108-003, APSA108-004 i APSA108-005.

La metodologia descrita en aquest apartat es basa en un mètode posat a punt al laboratori.

5.1.1. Reactius

- Hidròxid sòdic (NaOH)
- Metanol
- Cloroform
- Trifluorur de bor en metanol (BF₃), 1,3M
- Clorur de sodi (NaCl)
- Sulfat de sodi anhidre (Na₂SO₄)
- Heptà
- Aigua Milli-Q
- Patrons
 - Patró comercial de 14 FAMES (sigles en anglès de Fatty Acids Methyl Esters)(C8-C24)
 - Tricosanat de metil, patró intern (C23:0)
 - Menhaden oil

En la taula 1 es detalla la puresa, perillositat i les precaucions per a els reactius anteriors que puguin tenir algun perill.

Taula 1. Puresa, perillositat i precaucions dels reactius

COMPOST	PURESA	PERILLOSITAT	PRECAUCIONS
NaOH (s)	≥ 98%	Corrosiu	Ulleres, campana, bata, guants
Metanol (l)	≥ 99,9%	Tòxic, inflamable	Ulleres, campana, bata, guants
Cloroform	99,0-99,4%	Irritant, tòxic, cancerigen	Ulleres, campana, bata, guants
BF₃ en MeOH (l)	10%	Inflamable, corrosiu, tòxic	Ulleres, campana, bata, guants
NaCl (s)	≥ 99,8%	-	Guants
Na₂SO₄ (s)	98,5%-101%	-	Ulleres, campana, bata, guants
Heptà (l)	≥ 99,0%	Irritant, inflamable	Ulleres, campana, bata, guants

5.1.2. Metodologia

5.1.2.1. Saponificació, derivatització i extracció

Es pesen 100 mg de mostra en un tub falcon de 50 ml, s'afegeix 6ml d'una solució de NaOH 0.5 M més 7 ml de triflorur de bor, s'agita amb el vòrtex durant 15 segons, s'afegeixen 3-4 perles de vidre, es tapen els tubs i es porta a un bany a 80 °C durant 10 minuts. En aquesta etapa es produirà la saponificació i la derivatització dels àcids grassos.

Després de la incubació al bany, esperar fins aconseguir temperatura ambient, aproximadament 30 minuts, i afegir 5 ml d'heptà mesurats exactament. Afegir també 10 ml de solució saturada de NaCl, invertir 3 cops, deixar reposar i veure si les fases es separen. Com que es forma una emulsió, portem els diferents tubs a la centrífuga durant 5 minuts a 5000 rpm per tal de trencar-la. Es recull la part orgànica superior amb l'ajuda d'una pipeta i es traspasa l'extracte a un vial transparent de 10 ml.

A continuació s'afegeix una espàtula de Na₂SO₄ anhidre per tal d'eliminar l'aigua que pugui haver quedat a l'extracte. Un cop afegit el Na₂SO₄ s'ha d'observar una sola fase i el sòlid ha de quedar lliure. Per tal d'eliminar aquest sòlid es filtra la solució amb filtre PVDF de xeringa de 0,45 µm i es recull l'extracte filtrat en tubs de 1,5 ml.

5.1.2.2. Anàlisi GC-FID

L'equip que s'utilitza en aquest anàlisi és un cromatògraf de gasos Agilent Technologies 7890 A GC System amb injector split/splitless i detector de ionització en flama (FID).

Abans de l'anàlisi cromatogràfic s'ha d'afegir el patró intern (IS) amb una concentració determinada i preparar determinades dilucions dels extractes per assegurar-nos que la concentració de tots els compostos podrà ser determinada mitjançant la recta de calibratge preparada. Les dilucions que es realitzen són les següents:

- Dilució 1: 850 µL heptà + 50 µL IS + 100 µL mostra
- Dilució 2: 930 µL heptà + 50 µL IS + 20 µL mostra
- Concentrada: 50 µL IS + 950 µL mostra

Tota la mostra que sobra es guarda a -20°C.

Finalment s'analitza per GC-FID. Si no es realitza l'anàlisi cromatogràfic el mateix dia s'ha de guardar la mostra al congelador a -20°C fins l'anàlisi. Cada mostra es realitza per duplicat.

Per a la quantificació s'usa una recta patró preparada prèviament amb diversos patrons. Els patrons utilitzats es guarden a -20°C i s'utilitzen com control cada dia que es faci un anàlisi.

Les solucions que s'analitzen per GC són, en aquest ordre, la dilució 2 seguida de la dilució 1 i, finalment, la concentrada per evitar possibles contaminacions. S'analitzaran totes les mostres de les quals es vulgui saber la concentració.

Es carrega el mètode i es comprova que les condicions de treball corresponguin a les indicades a continuació:

Paràmetres de la injecció:

- Temperatura de l'injector : 250 °C
- Volum d'injecció: 3 µL
- Mode d'injecció: SPLIT
Split ratio: 10:1

Paràmetres de la separació cromatogràfica:

- Gas portador: Hidrogen
Flux: 1mL·min⁻¹
- Columna: Omegawax250™ de dimensions 30 m*250 µm*0,25 µm (T^a màxima: 280 °C)
- Forn: Programa de temperatura:

Ratio (°C/min)	T(°C)	Hold (min)	Run time (min)
-	100	1	1
20	180	5	10
2	200	0	15
20	240	13	35

Post run: 240 °C

Velocitat de dades: 50,0 Hz

Paràmetres de la detecció del FID:

Temperatura: 300 °C

Flux d'hidrogen: 45 mL·min⁻¹

Flux d'aire: 350 mL·min⁻¹

5.1.2.3. Anàlisi GC-MS

L'equip que s'utilitza en aquest anàlisi és un cromatògraf de gasos Agilent Technologies 7890 A amb injector split/splitless i acoblat a un detector d'espectrometria de masses 5975.

S'analitzen les solucions concentrades de cadascun preparades prèviament segons l'apartat 5.1.2.1. Es carrega el mètode ja ficat a punt i es comprova que les condicions de treball corresponguin a les indicades a continuació:

Paràmetres de la injecció:

- Temperatura de l'injector : 250°C
- Volum d'injecció: 1 µL
- Mode d'injecció: SPLIT
Split ratio: 10:1

Paràmetres de la separació cromatogràfica:

- Gas portador: Heli
Flux: 1,2mL·min⁻¹
- Columna: Supelco SP-2560 de dimensions 100m*250µm*0,2µm (T^a màxima: 250°C)

- Forn: Programa de temperatura:

Ratio (°C/min)	T(°C)	Hold (min)	Run time (min)
-	140	5	5
4	240	15	45

Paràmetres de la detecció del MS:

Mode d'adquisició: Scan 35-500 m/z

Temps d'espera per al solvent: 9 min

Mode EMV: Gain Factor (1.00)

Temperatura font: 230 °C

Temperatura quadrupol: 150 °C

5.2. Desenvolupament d'un mètode de fraccionament lipídic

5.2.1. Reactius

- Hexà
- Cloroform
- Eluent 1: CHCl₃/isopropanol (2:1)
- Eluent 2: Èter etílic amb àcid acètic al 2%
- Eluent 3: Metanol
- Eluent 4: Hexà/èter etílic/àcid acètic (70:30:1)
- Eluent 5: Èter de petroli/acetat d'etil/àcid acètic (80:20:1)
- Eluent 6: CHCl₃/metanol/aigua/àcid acètic (90:50:5:2)
- Eluent 7: Hexà/èter etílic/àcid acètic (50:50:1)
- Solvent d'extracció: CHCl₃/metanol (2:1)
- Solució reveladora: 2,7-diclorofluoresceïna al 0,1% (p/v) en metanol
- Reactius necessaris per a la saponificació, esterificació i extracció detallats a l'apartat 5.1.1.

- Patrons:
 - Glycerol trioleate (≥ 99%) → Lípid neutre (NL)
 - Cholesteryl oleate (≥ 98%) → Lípid neutre (NL)
 - L-α-Phosphatidylcholine (≥ 99%) → Lípid polar (PL)
 - 1-oleoyl-rac-glycerol (≥ 99%) → Lípid neutre (NL)
 - Cholesterol (≥ 99%) → Lípid neutre (NL)
 - 1,3-Diolein (≥ 99%) → Lípid neutre (NL)
 - Heptadecanoic acid (≥ 98%) → Àcid gras lliure (FFA)

En la taula 2 es detalla la puresa, perillositat i les precaucions per a els reactius anteriors que puguin tenir algun perill i no s'hagi detallat anteriorment.

Taula 2. Puresa, perillositat i precaucions dels reactius

COMPOST	PURESA	PERILLOSITAT	PRECAUCIONS
Hexà (I)	≥ 97,0%	Inflamable, corrosiu, tòxic	Ulleres, campana, bata, guants
Isopropanol (I)	Per anàlisi	Inflamable, irritant	Ulleres, campana, bata, guants
Èter etílic (I)	≥ 99,5%	Inflamable, explosiu, tòxic	Ulleres, campana, bata, guants
Àcid acètic (I)	≥ 99,8	Corrosiu, inflamable	Ulleres, campana, bata, guants
Èter de petroli (I)	Extra pur	Inflamable, tòxic	Ulleres, campana, bata, guants
Acetat d'etil (I)	≥ 99,5%	Inflamable, irritant	Ulleres, campana, bata, guants
2,7-diclorofluor-esceïna (s)	Per anàlisi	Irritant, tòxic	Ulleres, campana, bata, guants

5.2.2. Metodologia

Per tal de realitzar el fraccionament lipídic de les mostres i el posterior anàlisi per GC-FID es realitzen unes etapes intermèdies necessàries per al desenvolupament d'aquest mètode. Aquestes etapes són les següents:

5.2.2.1. Extracció lipídica

Per a la preparació de la mostra és necessari realitzar una extracció dels lípids que aquesta conté per tal d'eliminar part de la mostra que no és del nostre interès i que ens podria produir contaminacions o interferències en el mètode a desenvolupar. L'extracció que es realitza en aquest treball es basa en una simplificació de diferents mètodes ja establerts per a realitzar extraccions lipídiques.^{29,30}

Per a realitzar aquesta extracció lipídica es pesen 0,5 g de mostra en tubs de plàstic de 15 ml, s'afegeix 10 ml de solvent d'extracció i s'agita amb el vòrtex durant 1 minut. A continuació es porten els diferents tubs a la centrífuga durant 5 minuts a 5000 rpm i passat aquest temps extraiem la part sobrenedant amb pipetes Pasteur i ho transvasem a un altre tub de 15 ml prèviament tarat.

Per tal de saber quina quantitat de mostra hem extret s'evapora el solvent sota corrent de nitrogen fins a sequedat, es pesa i es compara amb la tara del tub per saber la quantitat de mostra extreta.

Redissoldrem en els ml de CHCl_3 corresponents segons la concentració de la mostra que ens interressi passar posteriorment per l'SPE. En aquest cas es decideix redissoldre el sòlid en 10 ml de CHCl_3 .

5.2.2.2. Extracció en fase sòlida (SPE)

Per a realitzar la SPE primer cal que tinguem el muntatge adequat correctament. Aquest compta d'una bomba de buit, d'un recipient per a poder fer correctament el buit dels diferents cartutxos i, finalment, els cartutxos que farem servir. Els cartutxos amb els que treballarem

seran uns cartutxos reblerts de sílice modificada amb grups aminopropil (Strata NH₂, 500 mg/3 ml) ja que a la bibliografia aquests cartutxos donen bons resultats per a fer aquest tipus de separació lipídica.³¹

A la figura 5 es detalla un esquema general del muntatge adequat per a realitzar la SPE.

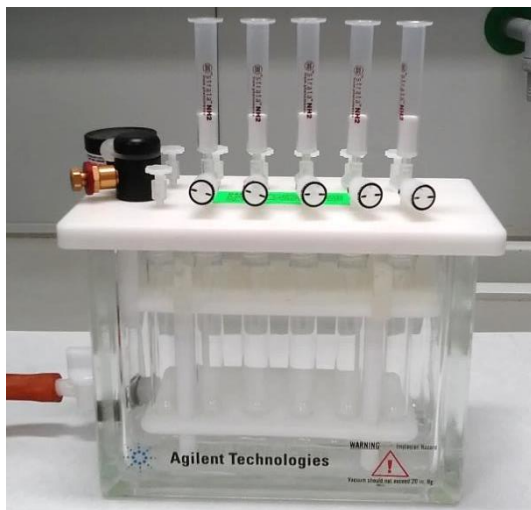


Figura 5. Esquema general del muntatge per a realitzar una extracció en fase sòlida.

Un cop ja tenim el muntatge adequat preparat correctament ja podem procedir a realitzar la SPE segons el mètode de Kaluzny; *et al.*³¹ Aquesta s'inicia amb l'etapa de solvatació del cartutx fent passar 10 ml d'hexà per la columna seguit de 10 ml de cloroform per tal de condicionar-la.

Un cop ja tenim la columna condicionada passem a realitzar l'etapa de càrrega de la mostra fent passar 500 µL de la mostra dissolta en cloroform preparada prèviament al finalitzar l'extracció lipídica. A continuació passem 4 ml de l'eluent 1, 2 i 3 respectivament i recollim cadascuna de les fraccions obtingudes en l'extracció.

Finalment, es neteja el cartutx fent passar hexà altre cop i deixant passar aire per aconseguir que el solvent residual que hi pugui haver a la columna s'evapori.

Els diferents extractes obtinguts són portats sota corrent de nitrogen fins a a sequeat per eliminar el solvent i un cop tinguem el sòlid sec el redissolem i el següent pas serà realitzar la cromatografia de capa fina (TLC) per assegurar-nos de que en l'SPE hi ha hagut una bona separació de les diferents famílies.

Si la TLC no es realitza el mateix dia els extractes es guarden a la nevera entre 2 i 10 °C fins al moment de realitzar-la. L'SPE la realitzarem inicialment amb una mescla de patrons representatius de cada família prèviament preparada i posteriorment aplicarem el mètode a una mostra escollida per triplicat.

Cal destacar que el buit del sistema ha de ser adequat per evitar que els eluents passin massa ràpid per la mostra i no arrastrin els compostos d'interès ni massa lent per evitar que elueixin en aquella fracció compostos que no són d'interès.

5.2.2.3. Cromatografia de capa fina (TLC)

Un cop ja tenim les diferents fraccions es procedeix a realitzar la cromatografia de capa fina per veure si en l'SPE hi ha una bona separació utilitzant diversos eluents descrits en diferents mètodes.^{1, 31, 32, 33}

Per a fer-ho, preparem una placa de 20 cm d'amplada i 10 cm d'alçada i l'eluent que utilitzarem. En la part inferior de la placa, a 1 cm d'alçada, es punxaran 20 µL de cada fracció de mostra que vulguem analitzar dissolta en cloroform i deixarem assecar uns segons. Entre una punxada i l'altre ha d'haver aproximadament 1 cm de distància.

Per altra banda, en el recipient adient afegirem el solvent que s'utilitzarà sense sobrepassar 1 cm d'altura i afegirem també paper de filtre en el recipient per a que aquest s'humidifiqui i saturi l'ambient del solvent. Un cop tinguem totes les punxades de les diferents mostres i patrons sobre la placa i el recipient amb el paper de filtre i solvent adient procedim a col·locar la placa dins del recipient, tapar-lo i esperar a que el solvent pugui per la placa arrastrant les diferents famílies lipídiques.

Traiem la placa aproximadament 2 cm abans de que el solvent arribi a dalt de tot de la placa i marquem el front del solvent. Deixem evaporar el solvent i quan la placa estigui seca afegirem en forma d'esprai una solució reveladora, en aquest cas, la 2,7-diclorofluorsceïna al 0,1% (p/v) en metanol, deixarem assecar i finalment mirarem sota llum UV, a una longitud d'ona de 254 nm, els diferents compostos que hi ha en cada fracció comparant-ho amb els patrons prèviament punxats.

S'ha optimitzat la separació de les fraccions per TLC i els paràmetres assajats són els següents:

1. Tipus d'eluent: Eluents 4, 5, 6 i 7
2. Mida placa sílice: 10 cm*20 cm, 20 cm*20 cm

5.2.2.4. Anàlisi de FAMES mitjançant GC-FID

És la mateixa metodologia detallada en l'apartat 5.1.2.1. Aquest procés es realitzarà per a cadascuna de les fraccions separades mitjançant l'SPE.

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

6.1. Contingut total d'àcids grassos en diferents microalgues

Per determinar el contingut total d'àcids grassos en les diferents mostres de microalgues a analitzar és necessari prèviament conèixer a quins àcids grassos corresponen cadascun dels pics que apareixen en els cromatogrames de cada mostra i, un cop ja els tinguem tots identificats, podrem procedir a la quantificació d'aquests.

6.1.1. Identificació dels àcids grassos en les microalgues

Totes les microalgues del mateix tipus tenen el mateix perfil cromatogràfic i, per tant, l'estudi es farà amb una d'elles i serà representatiu per a la resta de microalgues que formen part d'aquell bloc. La microalga escollida per al bloc APSA108 ha estat l'APSA108-005, per al bloc APSA103 ha estat l'APSA103-017 i per al bloc APSA102 ha estat l'APSA102-025.

Abans de començar amb la identificació de les microalgues, s'analitza també el mateix dia el patró de FAMES i, a més a més, es proposa una alternativa per tal d'augmentar els compostos que puguem identificar en les mostres posteriorment; analitzar un oli de peix anomenat Menhaden Oil del qual en sabem la composició. Aquest oli conté més àcids grassos, sobretot PUFAs, que el patró de FAMES i això ens podrà ajudar a identificar pics que amb el patró de FAMES no serem capaços d'identificar degut a l'absència d'aquests compostos.

Identificació del patró de FAMES i de l'oli Menhaden

Pel que fa al patró comercial, s'analitza mitjançant GC-FID i, com que coneixem els compostos que conté aquest patró i l'ordre d'elució d'aquests en la nostra columna, ja es pot identificar cadascun dels pics segons aquest ordre. El cromatograma del patró de FAMES comercial amb els pics identificats es mostra a la figura 6.

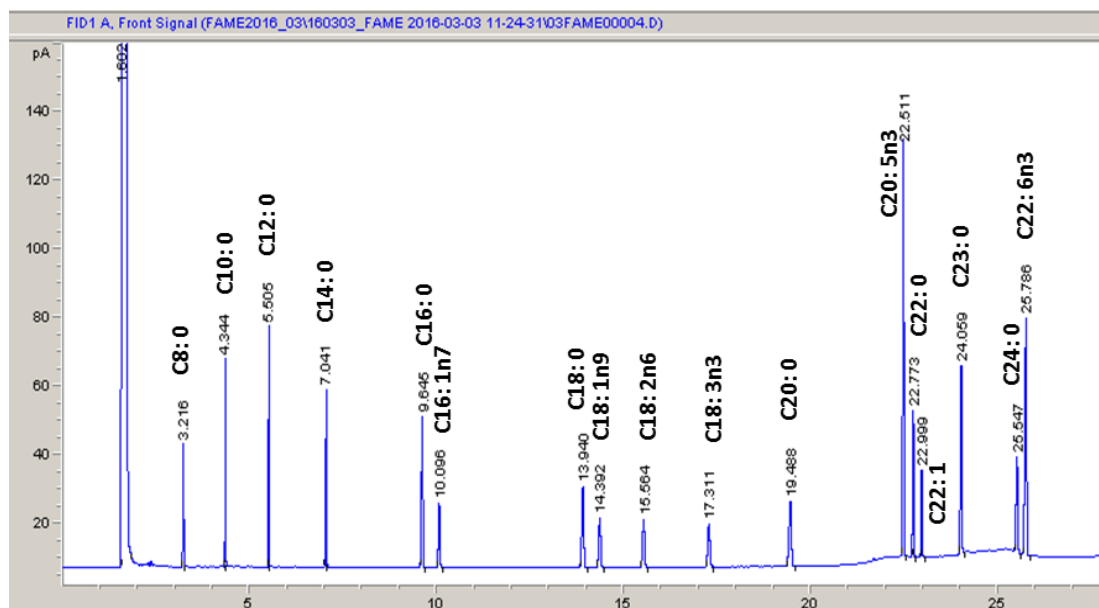


Figura 6. Cromatograma obtingut en l'anàlisi del patró comercial de FAMES mitjançant GC-FID.

Per altra banda, pel que fa a l'oli Menhaden, sabem que hi ha certs àcids grassos però també hi ha altres compostos que no coneixem i no són del nostre interès i, a més a més, no sabem en quin ordre d'elució sortiran en la nostra columna. Llavors, s'analitza l'oli al GC-FID i comparem els temps de retenció amb els del patró de FAMES analitzat també per tal d'identificar els compostos que coincideixen. S'obté el cromatograma de la figura 7 amb alguns dels pics identificats.

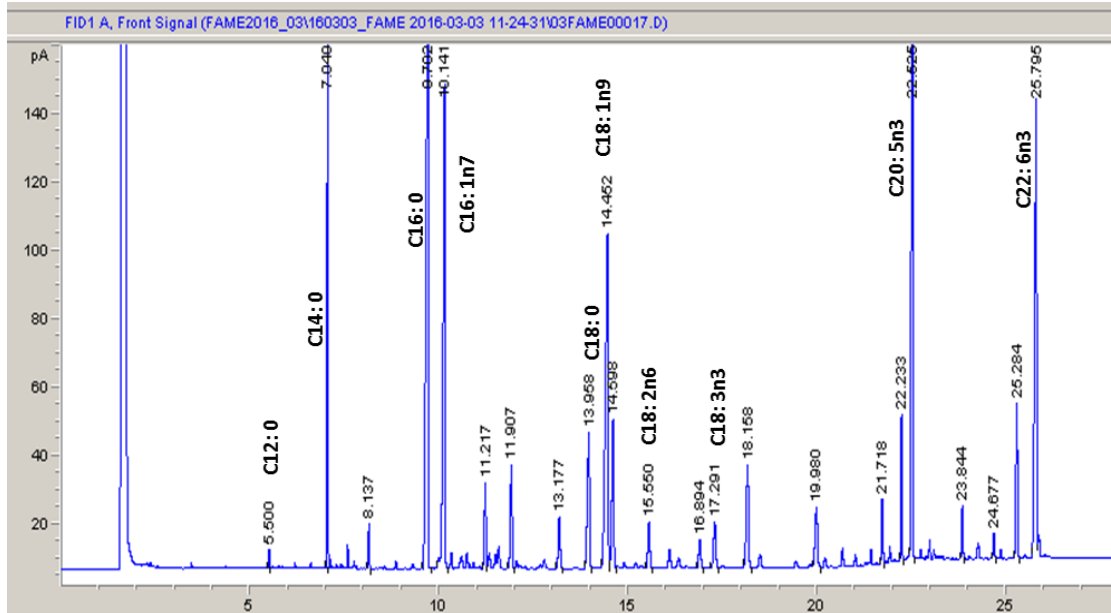


Figura 7. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de l'extracte d'oli de peix mitjançant GC-FID.

Per tal d'identificar els pics que no s'han pogut identificar a partir del patró de FAMES, s'analitza l'oli de Menhaden al GC-MS. El cromatograma obtingut de l'anàlisi de l'extracte d'oli al GC-MS és el que es mostra a la figura 8.

Un cop tenim identificats cadascun dels compostos en el cromatograma del GC-MS, mitjançant la comparació dels perfils dels cromatogrames obtinguts al GC-FID i al GC-MS, es completa la identificació dels pics que faltaven en el cromatograma del GC-FID. Així, aconseguim identificar tots els pics que pertanyen a àcids grassos presents a la mostra de l'extracte d'oli de peix obtenint el cromatograma que es mostra a la figura 9.

S'ha de tenir en compte que les columnes del GC-FID i del GC-MS són de diferent mida i diferent selectivitat ja que tenen diferent fase estacionària i això comportarà que els temps de retenció no siguin els mateixos i que, fins i tot, l'ordre d'elució es pugui veure afectat quan treballem en la comparació dels dos cromatogrames de qualsevol anàlisi.

A la taula 3 es detallen cadascun dels pics que apareixen en ambdós cromatogrames i el temps de retenció al que apareix cada compost en el FID i en el MS. A més a més, a la taula 3 també s'especifica en base a què s'ha fet la identificació, si pel patró de FAMES o a partir de la comparació dels espectres de la llibreria NIST del MS.

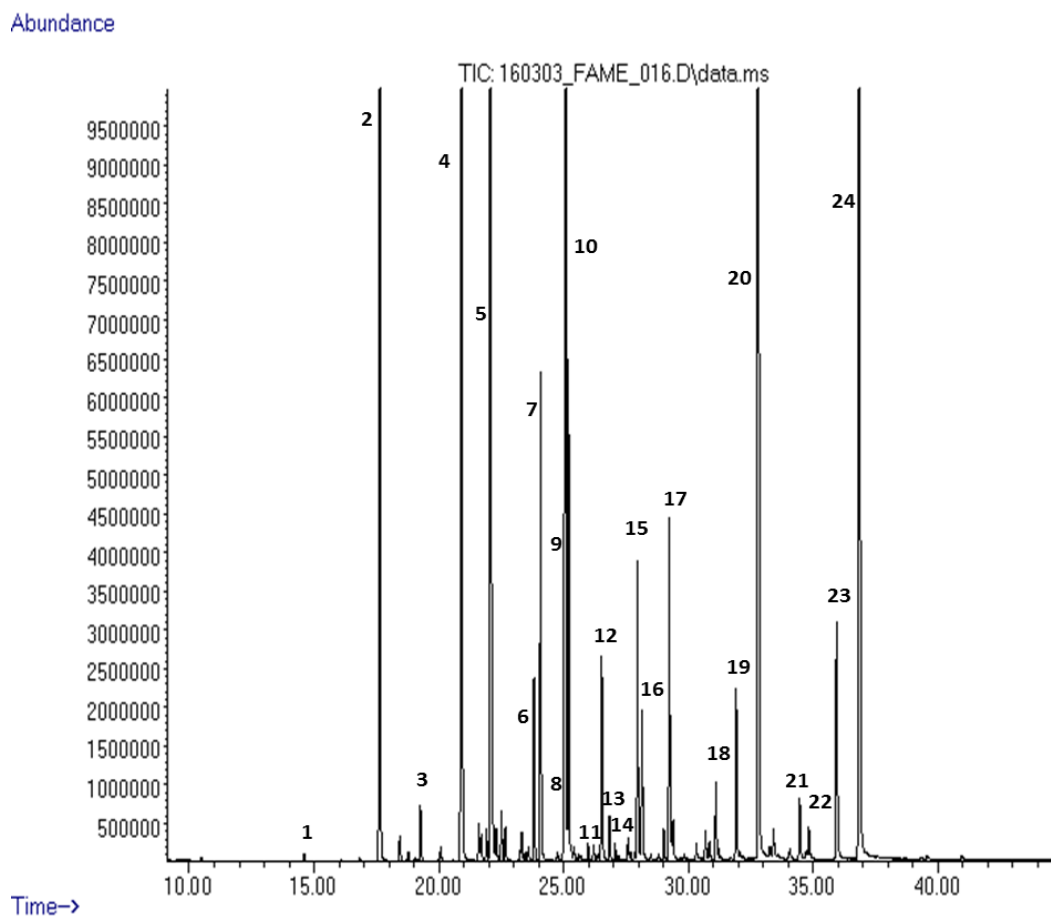


Figura 8. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de l'extracte d'oli de peix mitjançant GC-MS. La identificació de cada un dels pics enumerats al cromatograma es detalla a la taula 3.

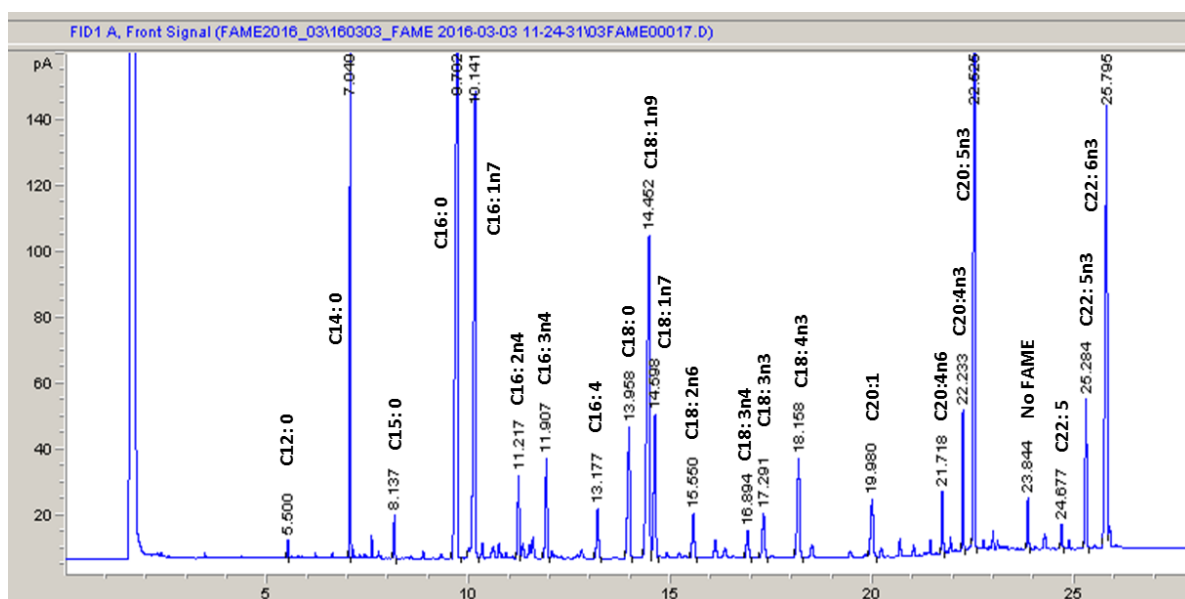


Figura 9. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de l'extracte de l'oli de peix mitjançant GC-FID.

Taula 3. Identificació dels pics dels cromatogrames de l'extracte d'oli de peix obtinguts mitjançant GC-FID i GC-MS.

Número	tr FID	tr MS	Compost	IDENTIFICACIÓ	
				tr Patró FAMES	MS
1	5,5	5,578	C12:0	Àcid dodecanoic	x
2	7,049	17,634	C14:0	Àcid mirístic	x
3	8,137	19,261	C15:0	Àcid pentadecanoic	x
4	9,702	20,907	C16:0	Àcid palmític	x
5	10,141	22,079	C16:1n7	Àcid palmitoleic	x
6	11,217	23,817	C16:2n4	Àcid hexadecadienoic	x
7	13,958	24,074	C18:0	Àcid esteàric	x
8	11,907	24,972	C16:3	Àcid hexadecatrienoic	x
9	14,452	25,069	C18:1n9	Àcid oleic	x
10	14,598	25,197	C18:1n7	Àcid octadecenoic	x
11	13,177	25,978	C16:4	Àcid hexadecatetraenoic	x
12	15,55	26,529	C18:2n6	Àcid linoleic	x
13	-	26,839	C18:2	Àcid octadecadienoic	x
14	16,894	27,657	C18:3n6	Àcid γ -linolenic	x
15	19,98	27,957	C20:1	Àcid eicosenoic	x
16	17,291	28,144	C18:3n3	Àcid α -Linolenic	x
17	18,158	29,23	C18:4n3	Àcid estearidònic	x
18	21,718	31,097	C20:4n6	Àcid araquidònic	x
19	22,233	31,915	C20:4n3	Àcid eicosatetraenoic	x
20	22,525	32,803	C20:5n3	Àcid eicosapentaenoic (EPA)	x
21	23,844	34,461	-	No FAME	x
22	24,677	34,825	C22:5	Àcid docosapentaenoic	x
23	25,284	35,937	C22:5n3	Àcid docosapentaenoic	x
24	25,795	36,852	C22:6n3	Àcid docosahexaenoic	x

Aquesta identificació ens servirà per a la identificació dels pics de les mostres a analitzar.

Identificació de les mostres APSA108, APSA103 i APSA102

Inicialment observem els cromatogrames, obtinguts mitjançant GC-FID, de cadascuna de les mostres corresponents a cada família i, comparant-lo amb el patró de FAMES analitzat el mateix dia, s'identifiquen aquells pics els temps de retenció dels quals coincideixen amb els del patró de FAMES. El cromatograma del patró de FAMES es pot veure en la figura 6 i els cromatogrames obtinguts en l'anàlisi de les mostres APSA108-005, APSA103-017 i APSA102-025 amb alguns dels pics ja identificats gràcies al patró de FAMES es poden veure en les figures A, B i C respectivament, que es troben en l'annex 1.

S'observa que, tot i ser capaços d'identificar alguns dels pics de les mostres gràcies al patró de FAMES, hi ha una sèrie de pics els temps de retenció dels quals no coincideix amb el de cap patró de FAMES present en la mescla patró analitzada. Per tant, procedim a punxar cadascuna de les mostres al GC-MS per a veure si mitjançant les llibreries d'espectres NIST i la comparació dels temps de retenció dels pics que s'obtenen amb els de l'oli de peix i els del patró de FAMES, que també s'han analitzat al GC-MS, podem identificar aquests pics que falten. Els cromatogrames corresponents es poden veure en les figures A, B i C de l'annex 2.

- APSA108

A la taula 4 es mostren els àcids grassos identificats en la microalga APSA108-005. En aquesta s'especifica en base a què s'ha fet la identificació de cada pic; o bé perquè el temps de retenció coincideix amb el de l'oli Menhaden i/o amb el del patró de FAMES o bé perquè s'ha trobat que l'espectre d'aquell pic coincideix amb un dels de la llibreria d'espectres de NIST.

Tal i com es pot observar a la taula 4, s'ha aconseguit identificar pics que no es coneixia de quin compost es tractava. Entre aquests destaquen un isòmer de l'àcid palmitoleic, un isòmer de l'àcid oleic, l'àcid hexadecatetraenoic, l'àcid estearidonic i l'àcid eicosenoic. La identificació més significativa és la de l'àcid hexadecatetraenoic degut a que el pic és dels majoritaris.

Pel que fa als pics 1, 4 i 5, segons la identificació de la llibreria d'espectres, no són àcids grassos. Pel que fa als pics 9 i 18, tot i que no s'han pogut identificar, s'observa que els patrons de fragmentació dels espectres de masses d'ambdós és molt semblant al d'un àcid gras poliinsaturat. A partir de la comparació de l'espectre dels pics 9 i 18 amb els de la llibreria NIST, el software els identifica ambdós com a l'àcid eicosapentaenoic (EPA), però no coincideixen amb el temps de retenció del patró ja que l'EPA elueix més tard i ja s'identifica a la mostra en el temps corresponent. Tot i això, com que els perfils de l'espectre són similars al d'un àcid gras poliinsaturat confirmem que aquests ho són i els deixem identificats com a PUFA 1 i PUFA 2.

Així doncs, s'aconsegueix identificar els pics que pertanyen a àcids grassos, excepte els pics 9 i 18 que sabem de quin tipus són i això ja ens serveix per als càlculs posteriors.

Un cop identificats nous pics gràcies a l'anàlisi mitjançant GC-MS, fem una comparació del perfil del cromatograma del GC-FID amb el del GC-MS i s'amplien els compostos identificats en el GC-FID.

El cromatograma del GC-FID de les algues del bloc APSA108 amb la majoria dels pics d'interès caracteritzats es pot veure en la figura 10 i la identificació realitzada es troba a la taula 4.

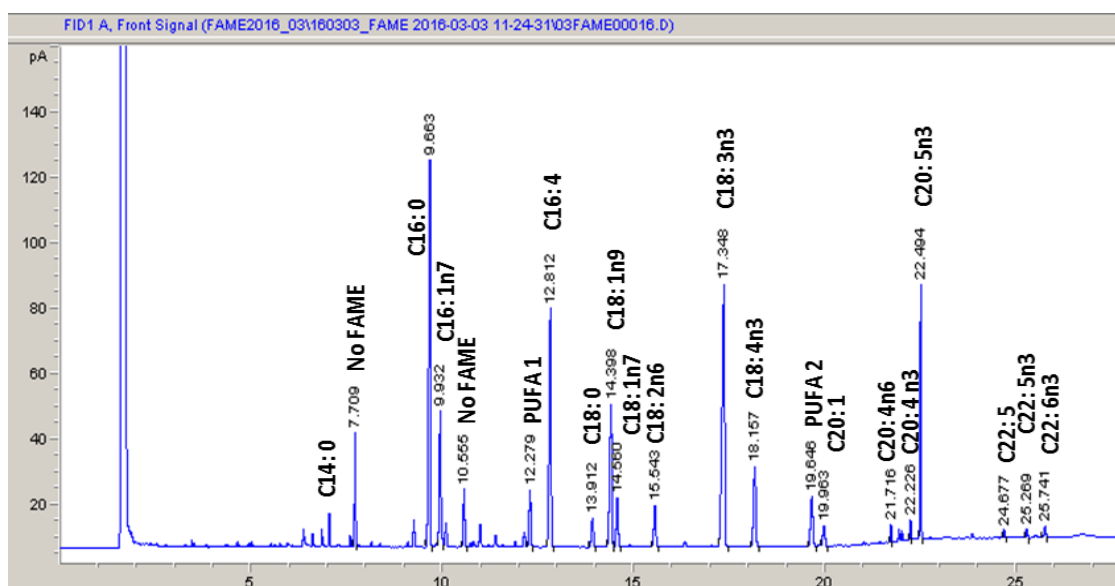


Figura 10. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la microalga APSA108-005 mitjançant GC-FID.

Taula 4. Identificació dels pics dels cromatogrames de la mostra APSA108-005 obtinguts mitjançant GC-FID i GC-MS.

Número	tr FID	tr MS	COMPOST	IDENTIFICACIÓ		MS
				tr Patró FAMES	tr Patró Oli	
1	7,709	16,73	-	No FAME		x
2	7,097	17,634	C14:0	Àcid mirístic	x	x
3	-	18,436	C15:0	Àcid pentadecanoic		x
4	9,369	19,559	-	No FAME		x
5	10,555	20,201	-	No FAME		x
6	9,663	20,897	C16:0	Àcid palmític	x	x
7	9,932	21,902	C16:1n7	Àcid palmitoleic	x	x
8	-	22,068	C16:1	Àcid hexadecenoic		x
9	12,279	22,571	-	Desconegut 1 (PUFA 1)		x
10	13,912	24,068	C18:0	Àcid esteàric	x	x
11	14,398	25,052	C18:1n9	Àcid oleic	x	x
12	14,56	25,197	C18:1n7	Àcid octodecenoic		x
13	12,812	25,978	C16:4	Àcid octadecatetraenoic		x
14	15,543	26,513	C18:2n6	Àcid linoleic	x	x
15	19,963	27,957	C20:1	Àcid eicosenoic		x
16	17,348	28,155	C18:3n3	Àcid α -Linolenic	x	x
17	18,157	29,23	C18:4n3	Àcid estearidonic		x
18	19,646	30,45	-	Desconegut 2 (PUFA 2)		x
19	21,716	31,189	C20:4n6	Àcid araquidònic		x
20	22,226	31,978	C20:4n3	Àcid eicosatetraenoic		x
21	22,494	32,787	C20:5n3	Àcid eicosapentaenoic (EPA)	x	x
22	24,677	34,825	C22:5	Àcid docosapentaenoic		x
23	25,269	35,937	C22:5n3	Àcid docosapentaenoic		x
24	25,741	36,852	C22:6n3	Àcid docosahexaenoic	x	x

- APSA103

Respecte a la mostra APSA103-017, la identificació d'alguns pics es mostra a la taula 5 en base a la comparació dels temps de retenció amb els de l'oli Menhaden i/o amb els del patró de FAMES o en base al què ens identifica el software del MS segons la llibreria d'espectres de NIST.

En la taula 5 es pot veure que s'ha aconseguit identificar nous pics com ara un isòmer de l'àcid oleic, l'àcid γ -linolenic, l'àcid hexadecatetraenoic i l'àcid estearidònic entre d'altres. D'aquests, la identificació més significativa ha estat la de l'àcid hexadecatetraenoic ja que és un dels pics majoritaris.

Pel que fa als pics 1, 3 i 4, el software els identifica com compostos que no són àcids grassos, per tant, els deixarem de tenir en compte perquè no són compostos del nostre interès.

Així doncs, un cop identificats nous pics gràcies a l'anàlisi mitjançant GC-MS, podem fer una comparació dels perfils del cromatograma del GC-FID amb el del GC-MS i ampliar els compostos identificats en el GC-FID.

El cromatograma de les algues del bloc APSA103, amb els pics d'interès caracteritzats, es pot veure en la figura 11 i la identificació realitzada es troba a la taula 5.

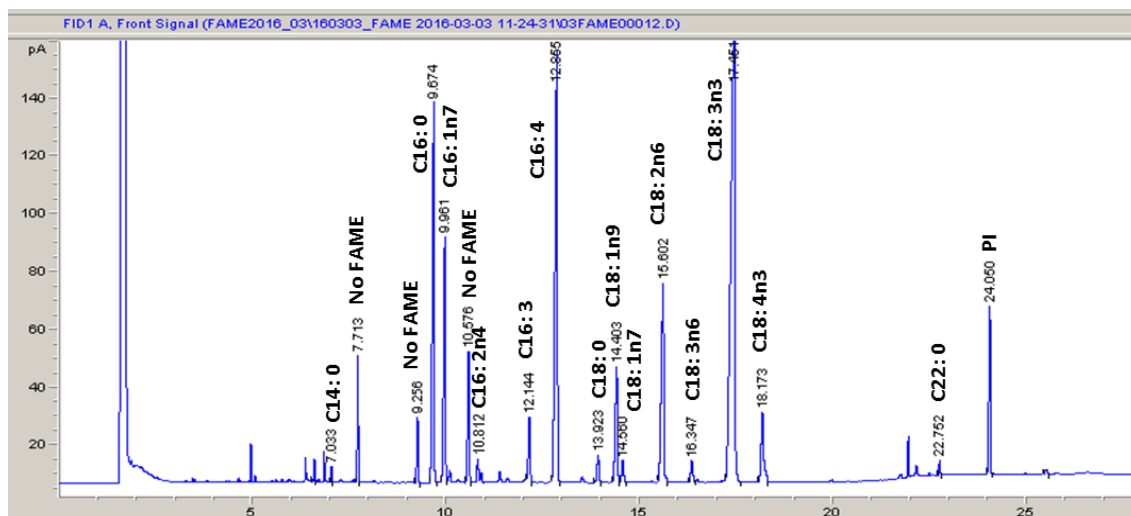


Figura 11. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la microalga APSA103-017 mitjançant GC-FID.

Taula 5. Identificació dels pics dels cromatogrames de la mostra APSA103-017 obtinguts mitjançant GC-FID i GC-MS.

Número	tr FID	tr MS	COMPOST	IDENTIFICACIÓ		
				tr Patró	tr Patró	
				FAMEs	Oli	MS
1	7,713	16,721	-	No FAME		x
2	7,033	17,629	C14:0	Àcid mirístic	x	x
3	9,256	19,563	-	No FAME		x
4	10,576	20,217	-	No FAME		x
5	9,674	20,891	C16:0	Àcid palmític	x	x
6	9,961	21,897	C16:1n7	Àcid palmitoleic	x	x
7		22,068	C16:1	Àcid hexadecenoic		x
8		22,485	C17:0	Àcid heptadecanoic		x
9	10,812	23,437	C16:2n4	Àcid hexadecadienoic		x
10	13,923	24,068	C18:0	Àcid esteàric	x	x
11	14,403	25,053	C18:1n9	Àcid oleic	x	x
11'	14,56	-	C18:1n7	Àcid octodecenoic		x
12	12,144	25,186	C16:3	Àcid hexadecatrienoic		x
13	12,855	25,978	C16:4	Àcid hexadecatetraenoic		x
14	15,602	26,507	C18:2n6	Àcid linoleic	x	x
15	16,347	27,583	C18:3n6	Àcid γ-linolenic		x
16	17,451	28,166	C18:3n3	Àcid α-Linolenic	x	x
17	-	28,406	C18:3	Àcid octadecatrienoic		x
18	18,173	29,23	C18:4n3	Àcid estearidonic		x
19	22,752	29,84	C22:0	Àcid docosanoic		x
20	24,05	31,171	C23:0	Àcid tricosanoic (PI)	x	x

- APSA102

A la taula 6 es mostren els àcids grassos identificats en la microalga APSA102-025. En aquesta s'especifica en base a què s'ha fet la identificació de cada pic, o bé perquè el temps de retenció coincideix amb el de l'oli i/o patró de FAMES o bé perquè s'ha trobat que l'espectre d'aquell pic coincideix amb un dels de la llibreria d'espectres de NIST.

En la taula 6 es pot veure que s'ha aconseguit identificar nous pics. D'aquests, la identificació més significativa ha estat la de l'àcid estearidonic ja que és un dels pics majoritaris del cromatograma.

Pel que fa als pics 1 i 3, el software del MS els identifica com compostos que no són àcids grassos, per tant, els deixarem de tenir en compte perquè no són compostos del nostre interès.

Pel que fa al pic 16, el software l'identifica com a un àcid gras poliinsaturat, concretament com a l'àcid eicosapentaenoic (EPA). Aquesta assignació no és possible perquè aquest compost elueix minuts més tard i ja l'hem identificat com el compost corresponent al pic 18 a partir de la coincidència amb el temps de retenció de l'extracte d'oli i del patró, motiu més sòlid que el que ens pugui identificar el software de l'equip. Tot i això, com que el perfil de l'espectre és similar al d'un àcid gras poliinsaturat confirmem que aquest ho és i l'identifiquem com a PUFA.

Així doncs, un cop identificats nous pics gràcies a l'anàlisi mitjançant GC-MS, podem fer una comparació dels perfils del cromatograma del GC-FID amb el del GC-MS i ampliar els compostos identificats en el GC-FID.

El cromatograma de les algues del bloc APSA102 amb els pics d'interès caracteritzats es pot veure en la figura 12 i la identificació realitzada es troba a la taula 6.

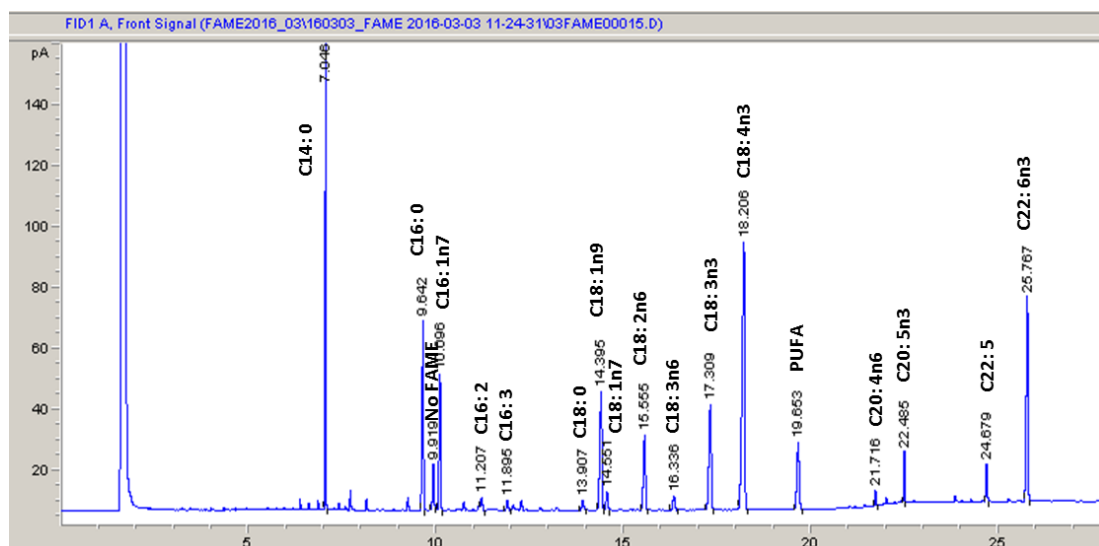


Figura 12. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la microalga APSA102-025 mitjançant GC-FID.

Taula 6. Identificació dels pics dels cromatogrames de la mostra APSA102-025 obtinguts mitjançant GC-FID i GC-MS.

Número	tr FID	tr MS	COMPOST	IDENTIFICACIÓ		
				tr Patró FAMES	tr Patró Oli	MS
1	-	16,856	-	No FAME		x
2	7,046	17,623	C14:0	Àcid mirístic	x	x
3	9,919	20,203	-	No FAME		x
4	9,642	20,886	C16:0	Àcid palmític	x	x
5	10,096	22,068	C16:1n7	Àcid palmitoleic	x	x
6	11,207	23,336	C16:2	Àcid hexadecadienoic		x
7	-	23,591	C17:1	Àcid heptadecenoic		x
8	-	23,822	C16:2	Àcid hexadecadienoic		x
9	13,907	24,074	C18:0	Àcid esteàric	x	x
10	14,395	25,052	C18:1n9	Àcid oleic	x	x
11	14,551	25,186	C18:1n7	Àcid octodecenoic		x
12	15,555	26,507	C18:2n6	Àcid linoleic	x	x
13	16,336	27,582	C18:3n6	Àcid γ-linolenic		x
14	17,309	28,144	C18:3n3	Àcid α-Linolenic	x	x
15	18,206	29,24	C18:4n3	Àcid estearidonic		x
16	19,653	30,444	-	(Desconegut) PUFA		x
17	21,716	31,107	C20:4n6	Àcid araquidònic		x
18	22,485	32,792	C20:5n3	Àcid eicosapentaenoic (EPA)	x	x
19	24,679	34,82	C22:5	Àcid docosapentaenoic		x
20	25,767	36,841	C22:6n3	Àcid docosahexaenoic	x	x

S'observa que entre les diferents famílies de mostres el perfil d'àcids grassos és diferent i mitjançant el patró de FAMES, l'oli Menhaden, el GC-MS i les llibreries d'espectres s'ha pogut identificar els pics que pertanyen a àcids grassos o almenys saber a quin tipus d'àcid gras correspon. Ara ja es pot passar a la quantificació de les mostres.

6.1.2. Quantificació dels àcids grassos en les microalgues

S'usa una recta patró preparada prèviament amb diversos patrons de FAMES per a quantificar la concentració de cada àcid gras en cada microalga a través de l'àrea de cada pic obtinguda amb el GC-FID. Els patrons utilitzats es guarden a -20°C i s'utilitzen com patrons control. S'accepta un 15% d'error.

Mitjançant el cromatògraf de gasos amb detector de ionització en flama es quantifiquen els àcids grassos de cadascuna de les mostres. S'han analitzat diferents mostres de cada bloc de microalgues. Per tal de simplificar els resultats, només es presentaran els resultats de dues mostres de cada bloc que han estat cultivades en diferents condicions i es compararan entre elles.

A les taules 7, 8 i 9 es pot observar la comparació de les concentracions dels àcids grassos entre les mostres APSA102-024 i APSA102-027, APSA103-008 i APSA103-016 i APSA108-003 i APSA108-004 respectivament amb l'RSD de cadascun dels valors de concentració calculats.

A més a més, a les figures 13, 14 i 15 s'observa gràficament la comparació de les concentracions d'àcids grassos saturats, monoinsaturats, poliinsaturats, DHA i EPA i del total d'àcids grassos entre cada parell de mostres comparades.

Taula 7. Comparació de la concentració de les mostres APSA102-024 i APSA102-027 amb les RSD corresponents.

Bloc 102	APSA102-024		APSA102-027	
	mg/g	RSD (%)	mg/g	RSD (%)
C14:0	14,2	5,8	13,1	01
C16:0	11,3	3,4	9,6	0,7
C16:1 n-7	6,5	5,5	5,8	0,7
C18:0	0,9	14,5	1,3	6,2
C18:1 n-9	10,5	5,7	7,5	2,4
C18:2 n-6	5,4	2,9	4,8	0,3
α-C18:3 n-3	7,5	7,2	6,9	0,4
C20:5 n-3 (EPA)	1,3	0,9	1,2	1,1
C22:6 n-3 (DHA)	12,0	2,1	8,6	0,1
C18:1	1,3	2,1	1,3	0,2
C18:3n6	0,8	0,1	0,7	2,3
C18:4	17,2	0,9	14,6	0,2
PUFA	3,1	0,6	1,7	0,6
C22:5	2,1	0,1	1,3	0,8
SFA	26,4	5,1	24,1	0,7
MUFA	18,3	5,1	14,6	1,5
PUFA	49,2	2,2	39,9	0,1
EPA+DHA	13,3	1,8	9,7	0,2
TOTAL	93,9	3,6	78,6	0,5

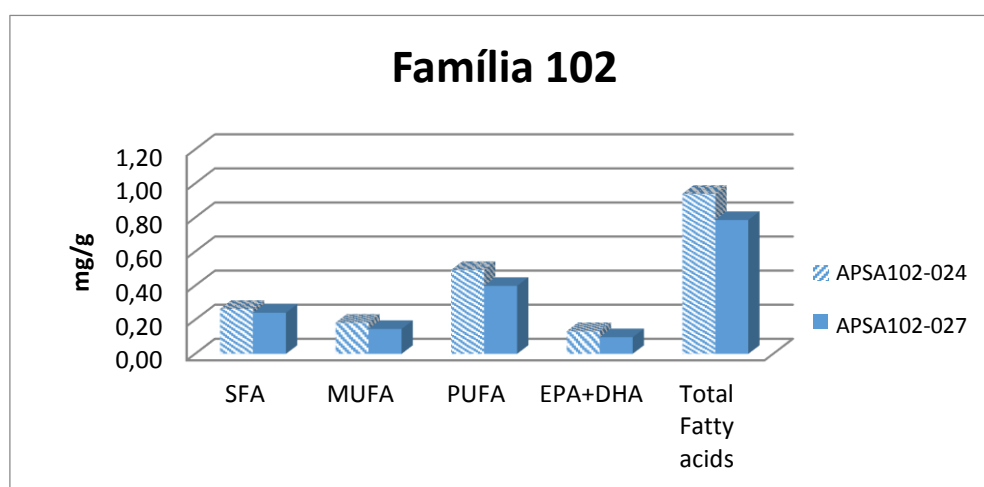


Figura 13. Comparació de la concentració de FAMES de les mostres APSA102-024 i APSA102-027.

Es coneix que la diferències de cultiu entre una mostra i l'altre ha estat el medi on s'han cultivat.

Observem que la mostra APSA102-024 conté més àcids grassos SFA, MUFA, PUFA, DHA i EPA i totals que la mostra APSA102-027. Ambdues pertanyen a la mateixa espècie de microalgues, són de la mateixa soca i també del mateix fabricant.

Taula 8. Comparació de la concentració de les mostres APSA103-008 i APSA103-016 amb les RSD corresponents.

Bloc 103	APSA103-008		APSA103-016	
	mg/g	RSD (%)	mg/g	RSD (%)
C16:0	21,9	8,8	14,8	3,9
C16:1 n-7	9,4	5,7	10,5	2,6
C18:0	2,3	31,2	1,9	2,0
C18:1 n-9	12,1	5,1	4,9	4,0
C18:2 n-6	19,9	5,3	5,8	3,8
α-C18:3 n-3	15,4	5,0	40,3	4,9
C16:3n3	3,4	6,3	1,7	2,0
C16:4	6,3	8,1	19,6	4,5
C18:1 n7	1,5	2,4	1,5	1,4
C18:3n6	2,1	4,1	0,7	1,2
C18:4n3	2,6	6,0	4,0	0,4
SFA	24,2	10,9	16,8	3,2
MUFA	23,0	5,2	16,9	2,7
PUFA	49,7	5,6	72,1	4,4
EPA+DHA	0,0	0,0	0,0	0,0
TOTAL	96,9	6,8	105,8	3,9

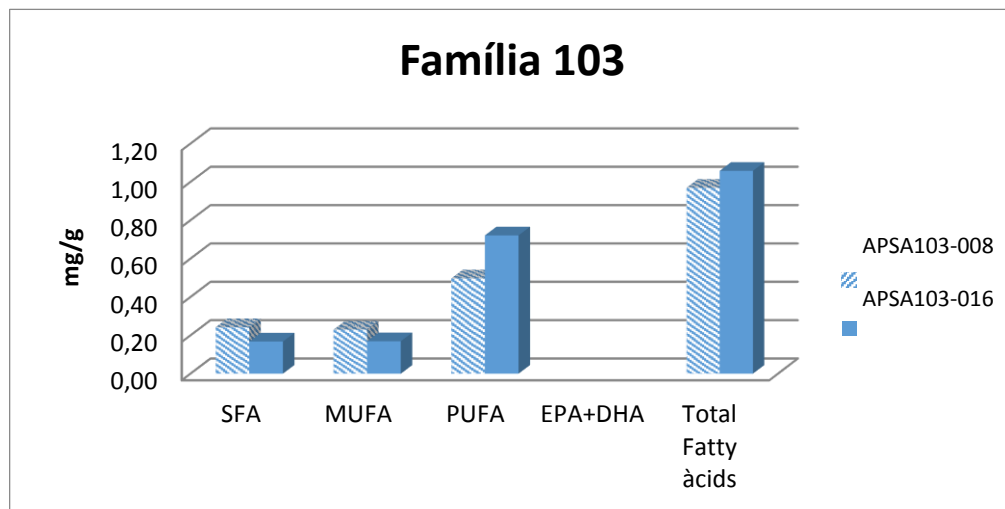


Figura 14. Comparació de la concentració de FAMES de les mostres APSA103-008 i APSA103-016.

Es coneix que les diferències de cultiu entre la mostra APSA103-008 i APSA 103-016 és el fabricant i, per tant, les condicions d'un cultiu i les soques entre una i l'altre són diferents.

Podem observar com la mostra APSA103-008 conté més àcids grassos saturats i monoinsaturats que l'APSA103-016 però pel que fa als àcids grassos poliinsaturats i al total és l'APSA102-016 qui en conté més. Aquesta espècie, tal i com es pot veure en el gràfic, no conté DHA ni EPA. Així, el fabricant de la mostra APSA103-016 permet cultivar una mateixa microalga amb menors continguts de SFA i MUFA i majors PUFAs, la majoria més beneficiosos per la salut que no pas els saturats.

Taula 9. Comparació de la concentració de les mostres APSA108-003 i APSA108-004 amb les RSD corresponents.

Bloc 108	APSA108-003		APSA108-004	
	mg/g	RSD (%)	mg/g	RSD (%)
C14:0	0,7	2,3	0,9	1,4
C16:0	18,8	10,0	23,6	0,1
C16:1 n-7	9,1	14,1	10,8	0,1
C18:0	2,1	15,1	2,0	18,1
C18:1 n-9	15,1	9,8	6,8	0,4
C18:2 n-6	3,2	10,4	1,5	1,7
α-C18:3 n-3	13,8	8,1	21,6	1,4
C20:5 n-3 (EPA)	4,3	5,0	7,5	0,7
PUFA 1	0,9	11,5	1,1	0,3
C16:4	10,1	13,7	20,4	1,7
C18:1n-7	2,2	7,6	2,4	1,5
C18:4	2,0	5,4	6,1	0,8
PUFA 2	0,9	5,7	6,3	3,4
C20:1	1,2	4,7	1,5	2,2
SFA	21,6	7,3	26,5	1,5
MUFA	27,5	10,8	21,4	0,2
PUFA	35,2	9,4	64,4	1,3
EPA+DHA	4,3	5,0	7,5	0,7
TOTAL	84,3	9,3	112,3	0,4

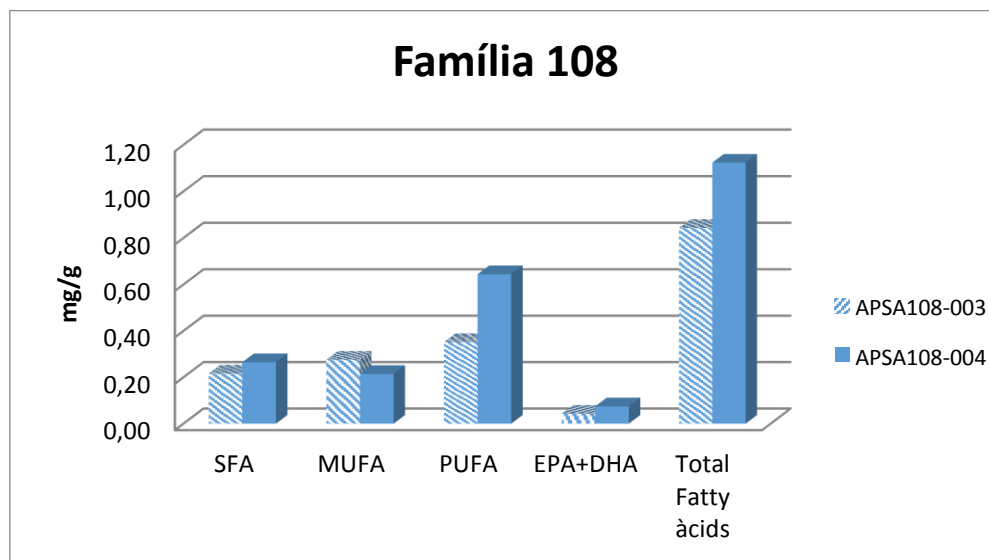


Figura 15. Comparació de la concentració de FAMES de les mostres APSA108-003 i APSA108-004.

Es coneix que les diferències de cultiu entre la mostra APSA108-003 i APSA108-004 és el fabricant i, per tant, les condicions d'un cultiu i les soques entre una i l'altre són diferents.

S'observa que la mostra APSA108-004 conté més àcids grassos SFA, DHA i EPA i totals que la mostra APSA108-003 mentre que els MUFA d'aquesta última són majors que els de la

mostra APSA108-004. Així, el fabricant de l'APSA108-004 permet cultivar una mateixa microalga amb major continguts de PUFAs.

En aquesta sèrie de gràfics i comparacions de les diferents famílies es pot observar com afecten les condicions de cultiu en el contingut d'àcids grassos en una mateixa espècie de microalgues. Entre diferents espècies hi ha molta diferència en el perfil d'àcids grassos tal i com havíem vist en la identificació. A més a més, ara també podem confirmar que les condicions de cultiu dins d'una mateixa espècie fan modificar el contingut d'àcids grassos en les microalgues. S'observa també de manera general en les diferents microalgues estudiades que el contingut de PUFAs destaca entre el de SFA i MUFA.

6.2. Desenvolupament d'un mètode de fraccionament lipídic

Es pretén realitzar una separació de la composició lipídica en tres famílies de lípids (lípids neutres, àcids grassos lliures i lípids polars) per tal de veure en quina forma es troben els diferents FAMES quantificats. Tal com s'ha explicat en l'apartat 5.2.2.3., per tal de comprovar l'SPE s'usa la TLC i aquesta s'optimitza. Cal destacar que l'optimització de la TLC s'ha realitzat amb solucions dels diferents patrons individualment.

S'ha realitzat la TLC amb els diferents eluents 4, 5 i 6 detallats a l'apartat 5.2.1. Les diferents plaques obtingudes per a cada eluent són les que es poden observar en la figura 16.

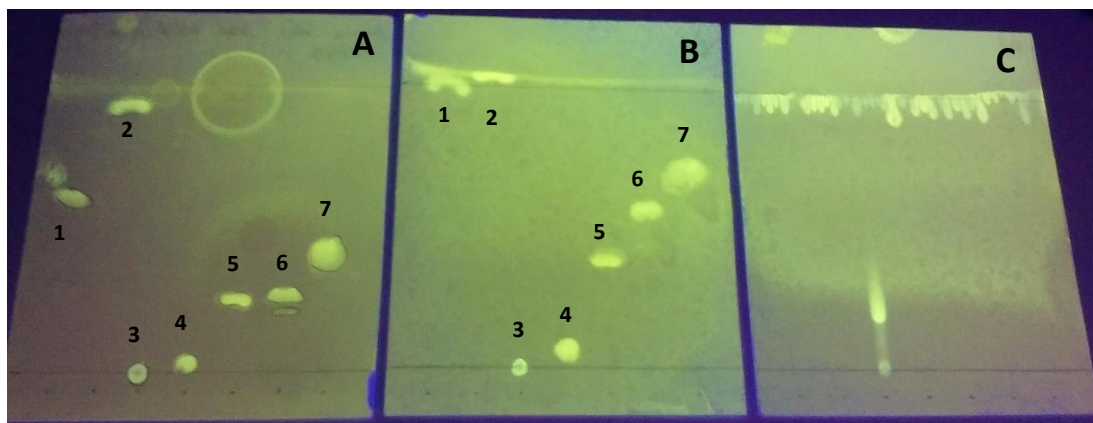


Figura 16. Plaques obtingudes per als diferents eluents provats. A) Eluent 4 (Hexà/èter etílic/àcid acètic (70:30:1)), B) Eluent 5 (Èter de petroli/acetat d'etil/àcid acètic (80:20:1)) i C) Eluent 6 (Cloroform/metanol/aigua/àcid acètic (90:50:5:2)). Les punxades que s'observen en cada placa són solucions dels patrons: Glycerol trioleate(1), cholesteryl oleate(2), L- α -phosphatidylcholine(3), 1-oleoyl-rac-glycerol(4), colesterol (5), 1,3-diolein(6) i heptadecanoic acid(7).

Tal i com es pot observar a la figura 16, amb l'eluent 6 hi ha una separació molt dolenta perquè no es poden ni detectar les taques dels diferents patrons punxats i, a més a més, apareixen una sèrie de taques desconegudes al front del solvent. Per tant, aquest eluent es descarta. Pel que fa a l'eluent 4 i 5, observem que amb l'eluent 5 els dos primers compostos apareixen a la part superior de la placa a una altura excessivament similar. L'eluent 4 és el que ens permet una millor separació entre tots els compostos i intentarem optimitzar-lo per tal d'intentar separar millor els compostos 5 i 6.

Per a millorar la separació que s'obté amb l'eluent 4 provem de modificar la polaritat d'aquest i augmentar-la mitjançant les proporcions dels dissolvents que el componen. Així

doncs, s'obté l'eluent 7 que consta dels mateixos dissolvents que el 4 però les proporcions són de 50:50:1 en comptes de 70:30:1. La TLC que s'obté amb l'eluent 7 comparant-la amb la de l'eluent 4 es pot observar a la figura 17.

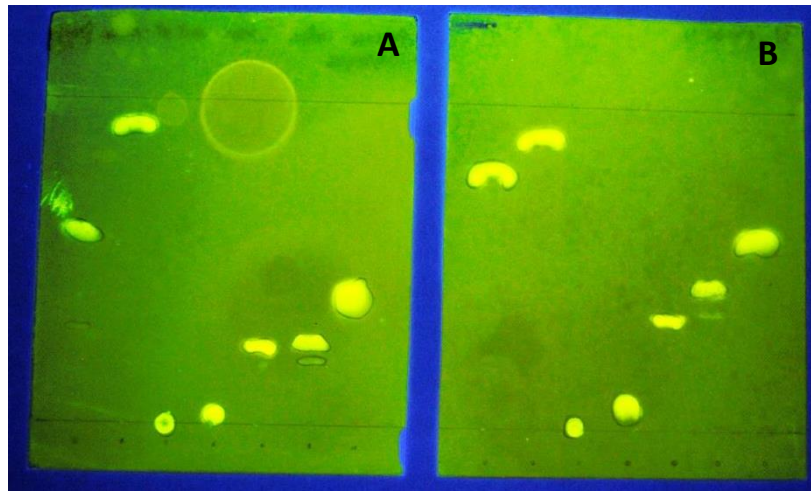


Figura 17. Comparació de les plaques obtingudes entre A) Eluent 4 (Hexà/èter etílic/àcid acètic (70:30:1) i B) Eluent 7 (Hexà/èter etílic/àcid acètic (50:50:1). La identificació de cadascuna de les taques segueix el mateix ordre i perfil que en la figura 22.

Tal i com es veu clarament a la figura 17 s'observa que amb el nou eluent 7 s'obté una millor separació que amb l'eluent 4 de proporcions 70:30:1. Per tant, ens quedem amb l'eluent 7 ja s'aconsegueix una molt bona separació entre els diferents compostos i s'elegeix l'eluent 7 com a l'òptim obtingut.

Per altra banda, s'ha provat de realitzar la cromatografia amb dues mides diferents de plaques: una amb 20 cm d'altura i l'altra amb només 10 cm per veure si hi ha diferències significatives. Per a fer aquesta comparació entre les mides de les plaques s'ha fet servir el mateix eluent en ambdues plaques i aquestes han estat realitzades el mateix dia. Es troba que amb la placa de major altura hi ha una millor separació però com que no es disposa d'un recipient adequat que tanqui hermèticament d'aquestes mides es descarta la possibilitat de fer-ho amb aquesta placa ja que no es pot assegurar que hi hagi repetibilitat en l'anàlisi degut a que l'eluent no puja fins a la part superior de la placa. Així doncs, ens quedem amb la placa de 10 cm d'altura.

Un cop es té optimitzada la TLC ja es pot realitzar l'extracció en fase sòlida d'una mostra i mitjançant la TLC comprovar la separació de l'SPE.

Després de realitzar l'extracció lipídica i l'SPE s'observa que les diferents fraccions extretes presenten un color diferent degut a la diferència de pigments que han quedat presents en cada fracció. Aquesta diferència es pot observar a la figura 18.



Figura 18. Diferents fraccions extretes en l'SPE.

Un cop es procedeix a realitzar l'SPE de la mostra s'observa que no és possible assegurar mitjançant la TLC que s'ha produït una bona separació en les mostres degut a que els pigments presents en la mostra impedeixen veure qualsevol altre taca corresponent als compostos. Així, tot i haver realitzat amb èxit la comprovació de l'SPE amb la TLC amb patrons, no podem utilitzar-la per a les mostres.

A la figura 19 es pot observar la complexitat de l'estudi de la TLC d'una mostra a diferents concentracions, una més diluïda (1900 ppm) a l'esquerra i l'altre més concentrada (19000 ppm) a la dreta.

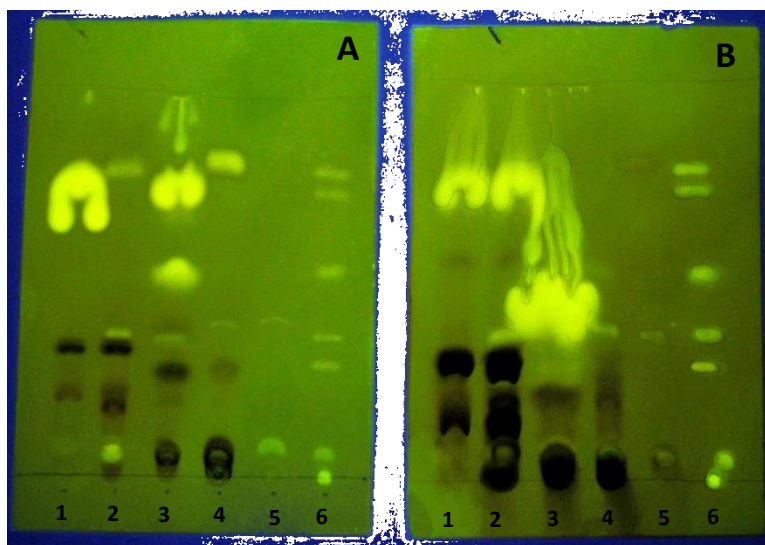


Figura 19. TLC de la mostra APSA103-008 a 19000 ppm (B) i a 1900 ppm(A). Cadascuna de les 6 punxades de cada placa correspon, d'esquerra a dreta a: 1) Fracció recollida al passar la mostra per la SPE, 2) Fracció recollida amb l'eluent 1, 3) Fracció recollida amb l'eluent 2, 4) Fracció recollida amb l'eluent 3, 5) Fracció recollida amb un rentat final amb MeOH i 6) Mescla de patrons punxada directament sense passar per l'SPE a 285,7 ppm cada patró (6B) i 100 ppm cada patró (6A).

Com a alternativa es planteja realitzar directament l'anàlisi de FAMES mitjançant GC-FID de cadascuna de les fraccions obtingudes de l'SPE d'una mescla de patrons i comparar els perfils del GC-FID amb els d'una mescla de patrons de cadascuna de les tres famílies a separar.

Es realitza, amb els diferents patrons, tres solucions corresponents a les tres famílies de lípids que hauríem de separar mitjançant l'SPE i, a continuació, els saponifiquem, esterifiquem, extraïem i analitzem les tres fraccions per GC-FID. Aquest procés s'ha realitzat per duplicat.

Per tal de comprovar que hi ha una bona separació en l'SPE el que es realitza és una extracció en fase sòlida d'una mescla de tots els patrons. Posteriorment es saponifiquen, s'esterifiquen, s'extreuen i s'analitzen per GC-FID les fraccions obtingudes de manera que si els cromatogrames obtinguts de les fraccions de l'SPE contenen els mateixos àcids grassos que els cromatogrames de les solucions corresponents a cada fracció de lípids preparades prèviament podrem dir que s'ha produït una bona separació.

Com que els cromatogrames que s'obtenen en cada fracció de la mescla de patrons contenen els mateixos àcids grassos que els cromatogrames de cada solució preparada

prèviament corresponent a cada família de lípids podem comprovar que hi ha una bona separació en l'SPE.

Així doncs, es realitza l'SPE d'una mostra i a continuació es procedeix a fer tot el procés experimental següent de cadascuna de les fraccions obtingudes i aquestes s'analitzen per GC-FID. A mode quantitatiu, mitjançant la recta de calibratge de patró intern es calcula la concentració de cada àcid gras en cada fracció. Aquest anàlisi es realitza per triplicat i la mostra que s'ha analitzat ha estat l'APSA103-008.

En la taula 10 es pot veure la distribució de cada àcid gras identificat en la mostra APSA103-008 en les diferents famílies de lípids en tant per cent. És a dir, quin tant per cent del total de cada àcid gras està en forma de lípids neutres (F1), quin tant per cent en forma d'àcids grassos lliures (F2) i quin tant per cent en forma de lípids polars(F3). El percentatge ha estat calculat a partir de la mitjana entre les tres rèpliques.

Taula 10. Distribució de cada àcid gras en les diferents famílies de lípids

103008	% en F1	% en F2	% en F3
C16:0	10,39	80,28	9,33
C16:1n7	69,90	30,10	
C18:0	22,27	38,70	39,03
C18:1n9	8,05	91,95	
C18:2n6	7,80	92,20	
C18:3n3	7,60	92,40	
C18:1		100	
C18:3n6		100	
C18:4n3		100	
C16:2		100	
C16:3		100	
C16:4		100	

Tal i com es pot veure a la taula 10 la majoria d'àcids grassos presents en la mostra es troben en forma d'àcids grassos lliures (F2). Així doncs, o bé tota la quantitat d'àcid gras que hi ha a la mostra es troba el 100% en forma de lliure com és el cas del C18:1, C18:3n6, C18:4n3, C16:2, C16:3 i C16:4, o bé la majoria de cada àcid gras està en forma d'àcid gras lliure com és el cas del C16:0, C18:1n9, C18:2n6 i C18:3n3. Com a excepcions trobem el C16:1n7, que la majoria d'aquest es troba en forma de lípid neutre(F1), i el C18:0, que la majoria d'aquest es troba en forma de lípid polar(F3).

Cal destacar que aquest resultat obtingut concorda amb un altre estudi trobat a la bibliografia amb el mateix tipus d'alga.¹

A més a més, també s'ha calculat quin percentatge hi ha de cada àcid gras en cada fracció per tal de trobar quin o quins àcids grassos destaquen per sobre dels altres en cada una de les famílies lipídiques.

A les figures 20, 21 i 22 es representa gràficament el contingut de cadascuna de les fraccions 1, 2 i 3 de la mostra APSA103-008 respectivament i el percentatge de cadascun dels àcids grassos en aquestes.

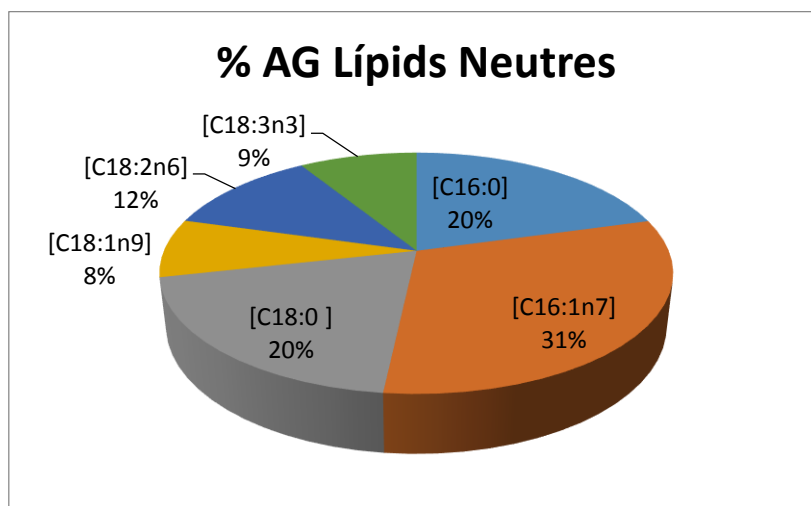


Figura 20. Contingut d'àcids grassos en la família de lípids neutres de la mostra APSA103-008.

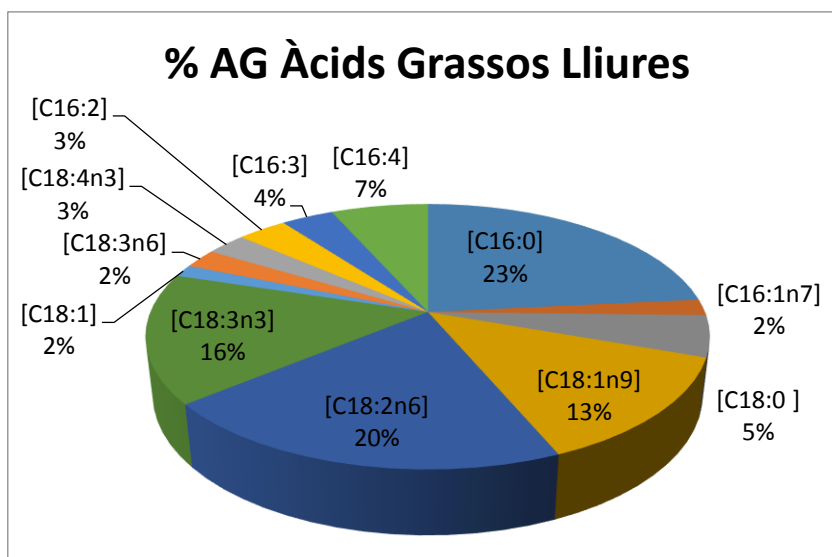


Figura 21. Contingut d'àcids grassos lliures de la mostra APSA103-008.

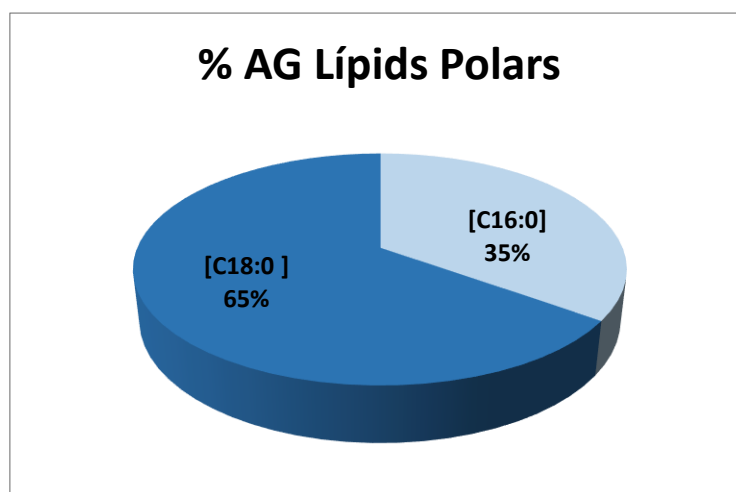


Figura 22. Contingut d'àcids grassos en la família de lípids polars de la mostra APSA103-008.

En la fracció dels lípids neutres s'observa que destaca amb diferència el contingut de l'àcid palmitoleic amb un 31% del total seguit de l'àcid palmític i esteàric, ambdós amb un 20% del total. Els altres es troben amb un % menor del 10%.

En la fracció dels àcids grassos lliures destaquen el contingut de l'àcid palmític amb un 23% del total seguit de l'àcid linoleic amb un 20%, l'àcid α -linolenic amb un 16% i l'àcid oleic amb un 13%. Els altres es troben amb un % menor del 10%.

En la fracció dels lípids polars s'observa el contingut d'únicament dos àcids grassos. Per una banda es troba l'àcid esteàric amb un 65% del total i per l'altre hi ha l'àcid palmític amb un 35% del total.

7. CONCLUSIONS

Fatty acids profile varies significantly according to microalgae family.

The use of Menhaden Oil has been a very useful complementary tool to FAMES standards in the identification of different fatty acids from microalgae, mainly PUFAs.

For each microalgae family, there are significant differences in the content of fatty acids according to growing conditions.

The SPE methodology applied allows us to fractionate microalgae fat in different lipid classes: neutral lipids, free fatty acids and polar lipids.

The use of TLC allows us to know the efficiency of the SPE method when standards are used. However, in the analysis of real samples, the microalgae pigments interfere with TLC analysis.

Microalgae studied contain a high content of polyunsaturated fatty acids. A high percentage of fatty acids identified in APSA103-008 microalgae are in free form.

8. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Yao, Linxing; Gerde, Josa A.; Lee, Show-Ling; Wang, Tong; Harrata, Kamel A. Microalgae Lipid Characterization. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 1773-1787.
- ² Becker, E.W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press: Cambridge, 1994; pp 1-42.
- ³ Colorado Gómez, M. A.; Moreno Tirado, D. A.; Pérez Posada, J. L. Desarrollo, producción y beneficio ambiental de la producción de microalgas. La experiencia en La Guajira, Colombia. *Ambient. Desarro.* **2013**, 17(32), 113-126 .
- ⁴ Diego Rubio Fernández, Diego; Chica, Claudia; Parra, Mónica. Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación. *Elementos.* **2013**, 3, 1-9.
- ⁵ L.D., Olmstead; R.A. Hill, David, A. Dias, Daniel; Jayasinghe, NS; Callahan, DL; Kentish, SE; Scales, PJ; Martin, GJ. A Quantitative Analysis of Microalgal Lipids for Optimiztion of Biodiesel and Omega-3 Production. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, 1-9.
- ⁶ Yongmanitchai, W.; ard, O. P. ω -3 fatty acids. Alternative sources of production. *Process. Biochem.* **1989**, 24, 117-125.
- ⁷ Borowitzka, M.A.; Borowitzka, M.A. Fats, oils and hydrocarbons. *Micro-algal biotechnology.* **1988**, 257.
- ⁸ Roessler, P.G. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: Commercial implications and future research directions. *J. Phycol.* **1990**, 26, 393-399.
- ⁹ López Alonso, D.; Molina Grima, E.; Sánchez Pérez, J.A.; Garcia Sánchez, J.L.; García Camacho, F. Isolation of clones of *Isochrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid. *Aquaculture.* **1992**, 102, 363-371.
- ¹⁰ López Alonso, D.; Molina Grima, E.; Sánchez Pérez, J.A.; Garcia Sanchez, J.L.; García Camacho, F.-«Fatty acid variation among different isolates of a single strain of *Isochrysis Galbana*. *Phytochemistry.* **1992**, 31, 3901-3904.
- ¹¹ Alvarez Dovelas, M. Lipids in microalgae. A review II. Environment. *Grasas y Aceites.* **1989**, 40, 213-223.
- ¹² Voet, Donald; G.Voet, Judith; W.Pratt; Charlotte. *Fundamentos De Bioquímica: la vida a nivel molecular*, Ed. 2; Ed. Médica Panamericana: Buenos Aires, 2007, 9, pp 234-238.
- ¹³ Fahy, E.; S., Subramaniam; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H.; Jr; Murphy, R.C.; Raetz, C.R.H.; Russell, D.W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; VanNieuwenhze, M.S.; White, S.H.; Witztum, J.L.; Dennis, E.A. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **2005**, 46, 839-861.

-
- ¹⁴ Spiller, Gene A. Lipids in foods: Chemistry and nomenclature. In *Handbook of Lipids in Human Nutrition*. CRC Press: U.S.A, 1995; 1, pp 3-11.
- ¹⁵ Hernández-Pérez, Alexis; Labbé, José I. Microalgas, cultivo y beneficios. *RBMO*. **2014**, 49, 157-173.
- ¹⁶ Megafort Pharma, S.L. Omegafort. <http://www.omegafort.es/omega-3-2/> (data de consulta 1 abril 2016).
- ¹⁷ Simopoulos, A.P; Cleland, L.G. *Omega-6/omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence*, Karger: Washington, U.S.A., 2003; 92, pp 1-5.
- ¹⁸ Glass, R.L. Alcoholysis, saponification and the preparation of fatty acid methyl esters. *Lipids*, **1971**, 6, 919-925.
- ¹⁹ Kitson, Fulton G.; Larsen, Barbara S.; McEwen, Charles N. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. Academic Press, San Diego, 1996, pp 45.
- ²⁰ Ruiz-Gutierrez, Valentina; Pérez Camino, M. C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J. Chromatogr. A*. **2000**, 885, 321-341.
- ²¹ Gary D., Christian; Purnendu, K. Dasgupta; Kevin, A. Schug. *Analytical chemistry*, 7th ed; New York, 2014, pp 702.
- ²² Fried, Bernard. Lipids. In *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Ed.3; Sherma, Joseph. Ed.; Marcel Dekker, INC: Easton, Pennsylvania, U.S.A, 2005; 89, pp 826-876.
- ²³ Jork, W.; Funk, W.; Fishcer, W.; Wimmer, H. *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods*, VCH: Germany, 1990; 1, pp 3-109.
- ²⁴ Poole, C.F. *Gas chromatography*, 1st ed, Elsevier: Amsterdam, 2012; pp 563-621.
- ²⁵ Universitat Autònoma de Barcelona. Servei d'Anàlisi química. <http://sct.uab.cat/saq/content/aplicacions-gc> (Data de consulta 13 Abril 2016).
- ²⁶ Sevsik, Jiri. Detectors in gas chromatography. In *Journal of chromatography*. Elsevier: Amsterdam, 1975; 4, pp 51-72.
- ²⁷ Larsen, Delmar. UC Davis ChemWiki. http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography (data de consulta 15 abril 2016).
- ²⁸ ALS Environmental. Lab Science news- Technical Blog. <http://www.caslab.com/News/gcms-full-scan-vs-cgms-sim.html> (data de consulta 15 abril 2016).
- ²⁹ Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 911-917.

³⁰ Folch, J; Ascoli, I.; Lees, M.; Meath, J.A.; Lebaron, F.N. Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.* **1951**, *191*, 833-841.

³¹ Kaluzny, M.A.; Duncan, L.A.; Merritt, M.V.; Epps, D.E. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 135-140.

³² Flurkey, William H. Use of Solid Phase Extraction in the Biochemistry Laboratory to Separate Different Lipids. *Biochem Mol Biol Educ.* **2005**, *33*, 357-360.

³³ Schweisguth, D.C.; Quelle, F.W.; Wachob, G.; Hammerstedt, R.H. Isolation and Characterization of Brain Lipids by Solid Phase Extraction and Thin Layer Chromatography. *Biochem. Educ.* **1989**, *17*, 211-213.

9. ANNEXOS

ANNEX 1

- Cromatogrames obtinguts en l'anàlisi de les mostres APSA108-005, APSA103-017 i APSA102-025 amb alguns dels pics ja identificats (Figures A, B i C respectivament).

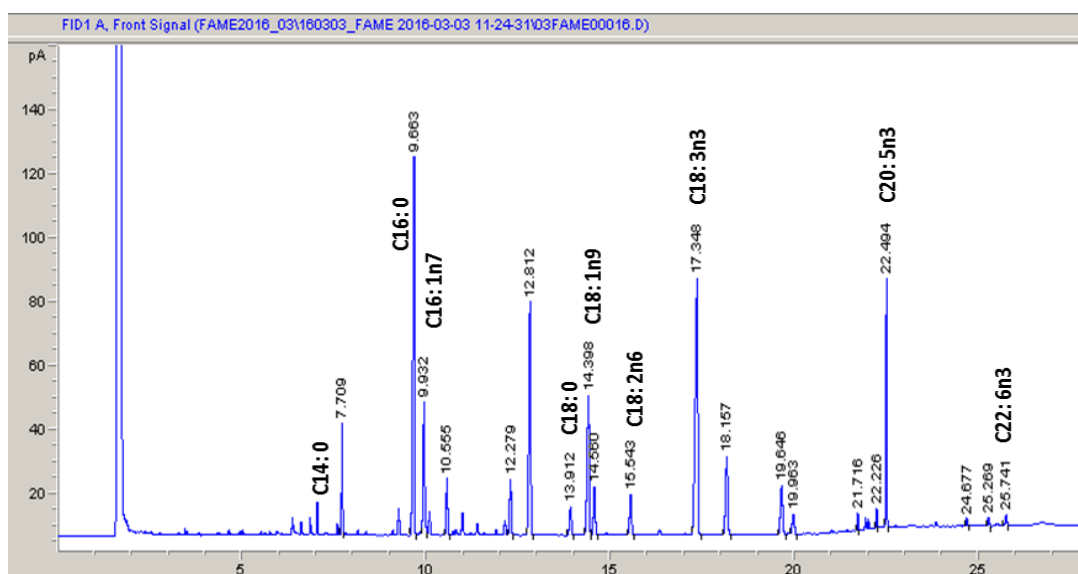


Figura A. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la microalga APSA108-005 mitjançant GC-FID.

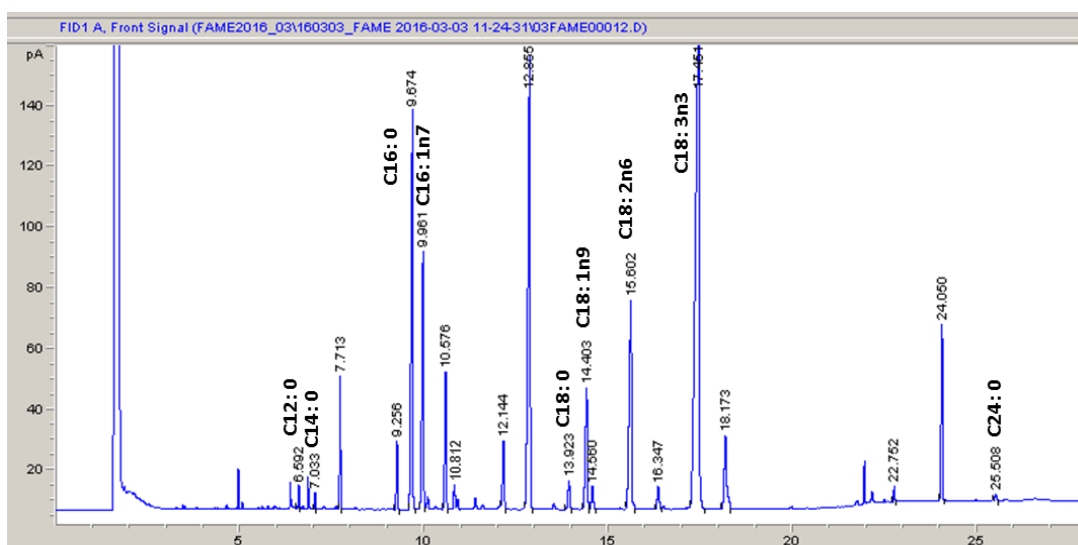


Figura B. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la microalga APSA103-017 mitjançant GC-FID.

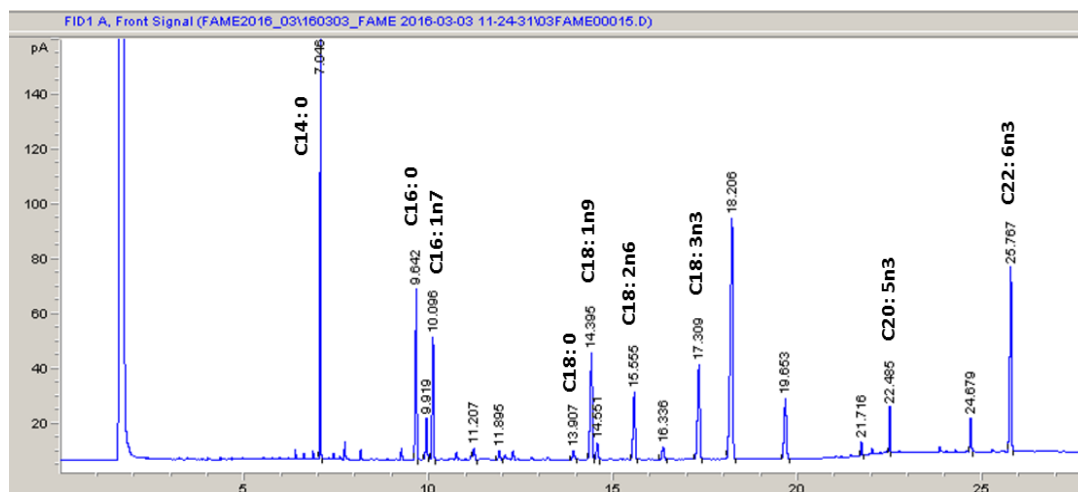


Figura C. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la microalga APSA102-025 mitjançant GC-FID.

ANNEX 2

- Cromatogrames de les mostres APSA108-005, APSA103-017 i APSA102-025 analitzades per GC-MS (Figures A, B i C respectivament). La identificació de cadascun dels pics es troba a les taules 4, 5 i 6 respectivament (Apartat 6.1.1.).

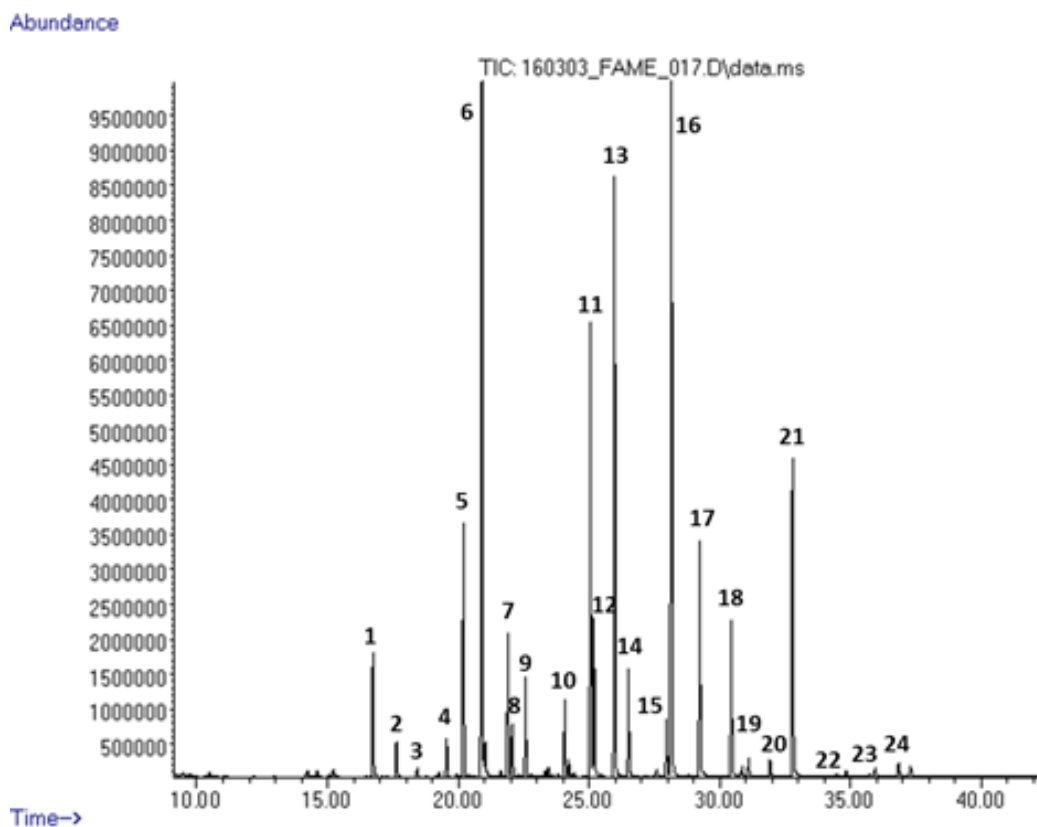


Figura A. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la microalga APSA108-005 mitjançant GC-MS.

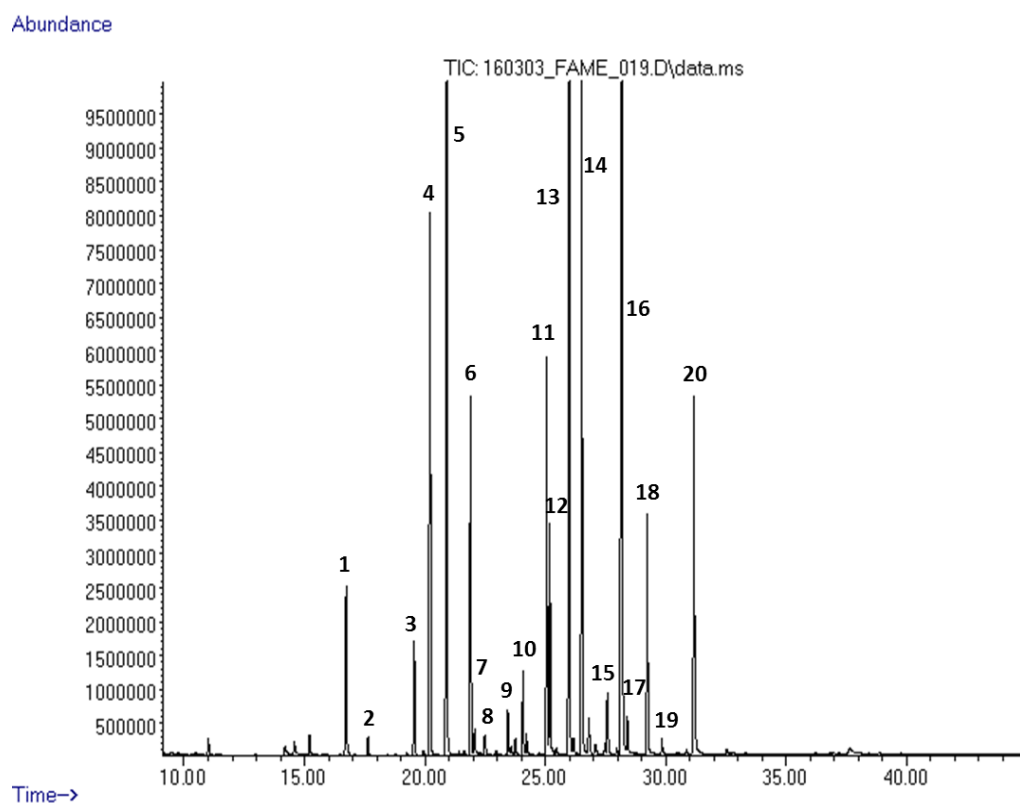


Figura B. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la microalga APSA103-017 mitjançant GC-MS.

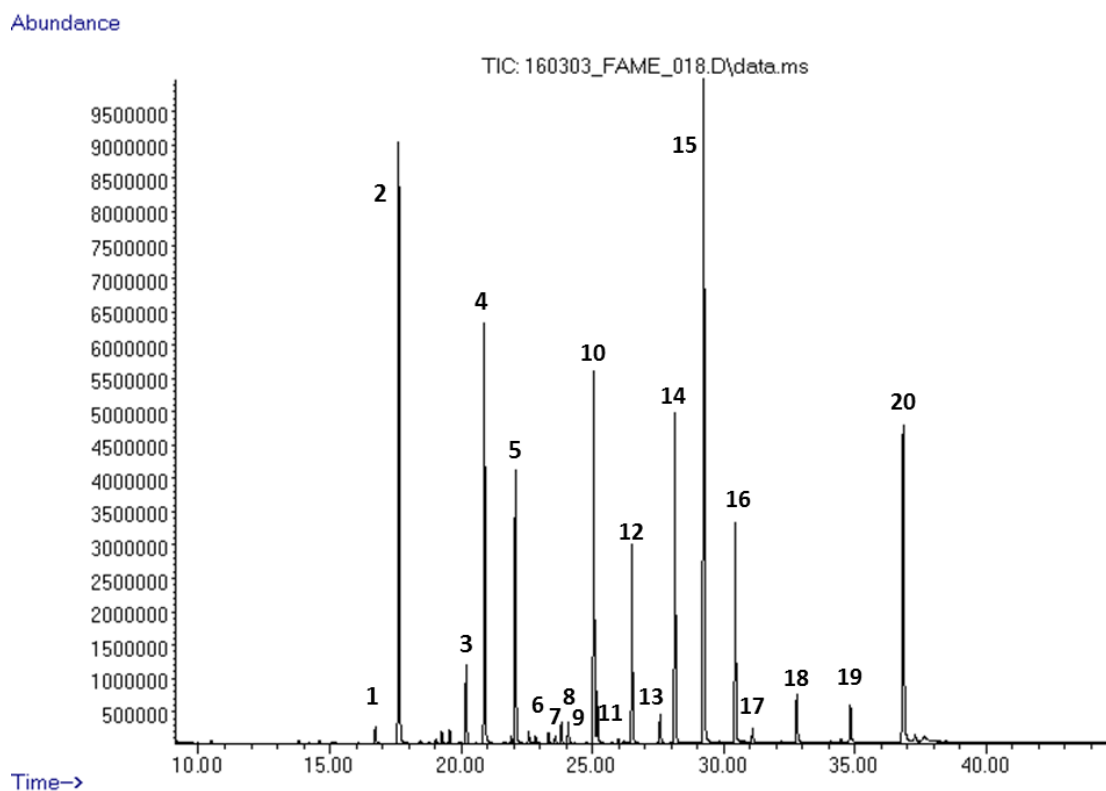


Figura C. Cromatograma obtingut en l'anàlisi de la microalga APSA102-025 mitjançant GC-MS.