



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**OBTENCIÓN DE β -CAROTENO A ESCALA LABORATORIO A PARTIR DE BIOFACTORIAS
FOTOSINTÉTICAS DE *Spirulina* spp., MEDIANTE EL USO DE MEZCLA TERNARIA**

Eddy Mauricio Viana Ruano

Asesorado por la Inga. Hilda Palma de Martini
Coasesorado por el Ing. Mario José Mérida Meré

Guatemala, julio de 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**OBTENCIÓN DE β -CAROTENO A ESCALA LABORATORIO A PARTIR DE BIOFACTORIAS
FOTOSINTÉTICAS DE *Spirulina* spp., MEDIANTE EL USO DE MEZCLA TERNARIA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

EDDY MAURICIO VIANA RUANO

ASESORADO POR LA INGA. HILDA PALMA DE MARTINI
COASESORADO POR EL ING. MARIO JOSÉ MÉRIDA MERÉ

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO

GUATEMALA, JULIO DE 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
VOCAL I	Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Inga. Elvia Miriam Ruballos Samayoa
VOCAL IV	Br. Narda Lucía Pacay Barrientos
VOCAL V	Br. Walter Rafael Véliz Muñoz
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
EXAMINADOR	Ing. César Ariel Villela Rodas
EXAMINADORA	Inga. Hilda Piedad Palma de Martini
EXAMINADOR	Ing. Jorge Emilio Godínez Lemus
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

OBTENCIÓN DE β -CAROTENO A ESCALA LABORATORIO A PARTIR DE BIOFACTORIAS FOTOSINTÉTICAS DE *Spirulina* spp., MEDIANTE EL USO DE MEZCLA TERNARIA

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 27 de agosto de 2012.



Eddy Mauricio Viana Ruano



Guatemala, 27 de agosto de 2012
Ref. EI.Q.TG-DI.052.2012

Ingeniero
Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Monzón:

Como consta en el Acta TG-054-2012-DI le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

**DISEÑO DE INVESTIGACIÓN DE TRABAJO DE GRADUACIÓN
-Modalidad Seminario de Investigación-**

Solicitado por el estudiante universitario: **Eddy Mauricio Viana Ruano**

Identificado con número de carné: **2007-14191**

Previo a optar al título de INGENIERO QUÍMICO.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

**OBTENCIÓN DE β -CAROTENO A ESCALA LABORATORIO A PARTIR DE
BIOFACTORIAS FOTOSINTÉTICAS DE *Spirulina*,
MEDIANTE EL USO DE MEZCLA TERNARIA**

El Trabajo de Graduación es asesorado por la Ingeniera Química: **Hilda Palma**.

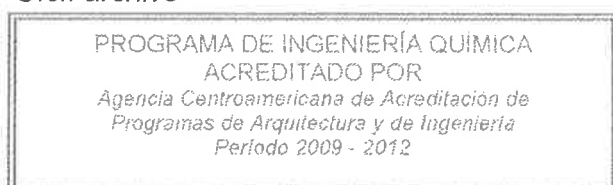
Se autoriza al estudiante, proceder con la fase de ejecución del proyecto de investigación, del trabajo de graduación de acuerdo al cronograma aprobado.

"ID Y ENSEÑAR A TODOS"

Ing. Víctor Herbert de León
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo





Guatemala, 01 de abril de 2014

Ingeniero Químico
Víctor Manuel Monzón Valdez
Director de la Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala.

Respetable Ingeniero Monzón:

Por este medio me es grato saludarle y desearle lo mejor en sus labores diarias. El motivo de la presente es para informarle que he asesorado el Informe Final de Trabajo de Graduación, titulado; **“Obtención de β -caroteno a escala laboratorio a partir de biofactorias fotosintéticas de *Spirulina spp.*, mediante el uso de mezcla ternaria”** el cual fue elaborado por el estudiante Eddy Mauricio Viana Ruano, quien se identifica en la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala con el número de carné 2007-14191.

Después de haberlo revisado doy por aprobado el mismo. Por tal motivo extiendo la presente para que se continúe con los trámites respectivos.

Atentamente,

Hilda Palma de Martini

Ingeniera Química

Colegiada No. 453

INGA. HILDA PALMA DE MARTINI
COLEGIADO No. 453



Guatemala, 28 de mayo de 2014
Ref. EIQ.TG.070.2014

Señores
Área de Lingüística
Facultad de Ingeniería
Presente,

Estimados Señores

Como consta en el registro de evaluación del informe final EIQ-PRO-REG-007 correlativo **054-2012** le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por el estudiante universitario: **Eddy Mauricio Viana Ruano**.
Identificado con número de carné: **2007-14191**.

Previo a optar al título de **INGENIERO QUÍMICO**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

OBTENCIÓN DE β -CAROTENO A ESCALA LABORATORIO A PARTIR DE BIOFACTORIAS FOTOSINTÉTICAS DE *Spirulina spp.*, MEDIANTE EL USO DE MEZCLA TERNARIA

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por la Ingeniera Química: **Hilda Piedad Palma de Martini**.

Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"



Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



C.c.: archivo





Guatemala, 28 de mayo de 2014
Ref. EIQ.TG-IF.018.2014

Ingeniero
Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Monzón:

Como consta en el registro de evaluación del informe final EIQ-PRO-REG-007 correlativo **054-2012** le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Solicitado por el estudiante universitario: **Eddy Mauricio Viana Ruano**.
Identificado con número de carné: **2007-14191**.

Previo a optar al título de **INGENIERO QUÍMICO**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

OBTENCIÓN DE β -CAROTENO A ESCALA LABORATORIO A PARTIR DE BIOFACTORIAS FOTOSINTÉTICAS DE *Spirulina spp.*, MEDIANTE EL USO DE MEZCLA TERNARIA

El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por la Ingeniera Química: **Hilda Piedad Palma de Martini**.

Habiendo encontrado el referido informe final del trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Ing. Víctor Herbert de León Morales
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo

Ref.EIQ.TG.107.2014

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación del estudiante, **EDDY MAURICIO VIANA RUANO** titulado: "**OBTENCIÓN DE β -CAROTENO A ESCALA LABORATORIO A PARTIR DE BIOFACTORIAS FOTOSINTÉTICAS DE SPIRULINA SPP., MEDIANTE EL USO DE MEZCLA TERNARIA**". Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.



Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química

Guatemala, julio 2014

Cc: Archivo
VMMV/ale



El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **OBTENCIÓN DE β -CAROTENO A ESCALA LABORATORIO A PARTIR DE BIOFACTORÍAS FOTOSINTÉTICAS DE *Spirulina spp.*, MEDIANTE EL USO DE MEZCLA TERNARIA**, presentado por el estudiante universitario: **Eddy Mauricio Viana Ruano** y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, se autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.

Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos
DECANO



Guatemala, julio de 2014

/cc

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Padre Todopoderoso y omnipotente, porque nunca me ha dejado solo en mí caminar y todo lo que soy se lo debo a él.
- La Virgen** María madre de gracia y misericordia, porque siempre me ha tomado de la mano y ha intercedido por mí ante su hijo Jesucristo.
- Mi madre** Lizeth Argelia Viana, la mujer que siempre me acompaña, siempre ha creído en mí, me ha cuidado con su vida y ha formado como persona.
- Mis tíos** Pedro Pineda, Fredy Viana, Roberto Ruano, Abelardo Viana, Álvaro Ruano y René Viana (q.e.p.d.). Todos y cada uno de ustedes me han querido, cuidado y hecho sentir como si fuera su hijo.
- Mis abuelos** Abelardo Viana y Argelia Ruano, los cuales han sido mis segundos padres, me han aconsejado y me enseñaron que luchando ante las adversidades se puede salir adelante.

Mi hermana

Andrea Sofía Simón, por todos esos momentos que hemos compartido juntos y las alegrías que me has dado. Siempre nos tendremos el uno al otro.

Víctor Manuel Simón

Por apoyarme siempre y nunca dejar que nada me faltara.

AGRADECIMIENTOS A:

- Dios** Por tu infinito amor y misericordia. Gracias por las bendiciones y por permitirme alcanzar esta meta.
- Mi madre** Lizeth Argelia Viana, por trabajar para mi sustento. Porque todo lo que soy se lo debo a la enseñanza ética y moral que de ti recibí. Gracias por todo lo que me has dado.
- Víctor Manuel Simón** Por ser como un padre para mí y apoyarme siempre en mis decisiones. Por nunca dejarme solo en los problemas que durante toda mi vida se me han presentado.
- Diana Gabriela Jo** Gracias por todo su amor y apoyo incondicional, por ser mi sostén, mi confidente y mi mejor amiga. Desde que llegó a mi vida todo cambio para bien, gracias a usted hoy estoy acá cumpliendo uno de mis sueños.
- Familia Jo Hernández** Por su amistad, consejos, atenciones, confianza, cariño y por aceptarme como parte de su familia.
- Karla Lisseth Caal López** Por todos los años de amistad que llevamos y las veces que me has escuchado, aconsejado y apoyado. Gracias por tu amistad limpia y sincera.

**Manuel José Viana
Vidal**

Por todas las aventuras que vivimos en nuestra niñez, por tus consejos y ayuda en las clases. Por ser el hermano que nunca tuve.

Liceo Guatemala

Por todas las enseñanzas básicas, éticas, los valores y la fe que aprendí en mi estadía en el colegio. Gracias por mi formación ciudadana.

**Laboratorio de
Investigación de
Extractos Vegetales
(LIXVE)**

Por todo el apoyo brindado, la confianza y permitirme desarrollar este trabajo de investigación.

Mis asesores

Ing. Mario Mérida e Inga. Hilda Palma, por su cariño y amistad sincera, por toda la paciencia. Gracias por compartir sus conocimientos a lo largo de mi carrera.

**Universidad de San
Carlos de Guatemala**

Por permitirme alcanzar mi sueño y formarme como profesional, por los conocimientos teóricos y la educación que me ha brindado. Mi alma máter.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VII
GLOSARIO	IX
RESUMEN.....	XIII
OBJETIVOS.....	XV
Hipótesis.....	XVI
INTRODUCCIÓN	XVII
1. ANTECEDENTES	1
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Carotenoides	5
2.1.1. Definición	6
2.1.2. Distribución y estado natural.....	7
2.1.3. Extracción de insaponificables. Carotenoides	8
2.2. El β -caroteno	9
2.2.1. Producción de β -caroteno.....	10
2.2.2. Precursores de vitamina A.....	11
2.3. Biofactorías fotosintéticas.....	13
2.4. Microalgas (<i>Spirulina spp.</i>).....	13
2.4.1. Morfología.....	14
2.4.2. Hábitat	15
2.5. Medios de cultivo	16
2.5.1. Consideraciones generales de los cultivos de microalgas	17

2.6.	Métodos de análisis para carotenoides	18
2.6.1.	Saponificación	18
2.6.2.	Extracción.....	20
2.6.2.1.	Extracción líquido-líquido	21
2.6.2.2.	Regla de fases	22
2.6.2.3.	Equilibrio de fases	22
2.6.2.4.	Coeficientes de distribución.....	23
2.6.2.5.	Equilibrio líquido	23
2.6.2.6.	Métodos de representación gráfica del equilibrio ternario.	23
2.6.3.	Separación	24
2.6.3.1.	Cromatografía en columna.....	24
2.6.3.1.1.	Cromatografía de adsorción.....	25
2.6.3.1.2.	Cromatografía de reparto.....	26
2.6.3.1.3.	Cromatografía iónica	26
2.6.3.1.4.	Cromatografía de exclusión por tamaño	26
2.6.3.1.5.	Cromatografía líquida de alta resolución	27
3.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	31
3.1.	Localización	31
3.2.	Variables	31
3.3.	Delimitación de campo de estudio	32
3.4.	Obtención de las muestras.....	32
3.5.	Recursos humanos disponibles	33
3.6.	Recursos materiales disponibles.....	33

3.6.1.	Materia prima.....	34
3.6.2.	Equipo	34
3.6.3.	Cristalería	34
3.6.4.	Materiales auxiliares	35
3.6.5.	Reactivos	35
3.6.6.	Otros.....	35
3.7.	Técnica cualitativa o cuantitativa	35
3.7.1.	Pruebas preliminares.....	36
3.7.2.	Extracción a escala laboratorio por el método de mezcla ternaria	36
3.7.2.1.	Relación biomasa/etanol 1:10.....	36
3.7.2.2.	Relación biomasa/etanol 1:20.....	37
3.7.3.	Método para la determinación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución	38
3.7.3.1.	Condiciones para la cromatografía	38
3.7.3.2.	Preparación de reactivos	38
3.7.3.3.	Determinación.....	39
3.7.3.4.	Cuantificación	40
3.7.4.	Determinación de las condiciones para la cromatografía.....	41
3.7.5.	Diseño teórico de una columna cromatográfica para identificación de β -caroteno.....	41
3.7.5.1.	Determinación de la altura de la columna cromatográfica	43
3.7.5.2.	Determinación del tiempo de retención ajustado	43
3.7.5.3.	Determinación del factor de retención	43

3.7.5.4.	Determinación del número de platos teóricos.....	44
3.7.5.5.	Determinación de la altura equivalente a un plato teórico.....	44
3.8.	Análisis estadístico.....	44
4.	RESULTADOS.....	47
4.1.	Diseño de la columna cromatográfica de identificación de β - caroteno	47
4.2.	Rendimiento de extracción de β -caroteno.....	48
5.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	51
	CONCLUSIONES.....	57
	RECOMENDACIONES	59
	BIBLIOGRAFÍA.....	61
	APÉNDICES.....	63

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1.	Clasificación de los lípidos presentes en una microalga.....	7
2.	Estructura del β -caroteno	10
3.	Esquema idealizado de una extracción líquido-líquido	22
4.	Diagrama de equilibrio ternario.....	24
5.	Orden de elusión de compuestos y polaridad.....	27
6.	Cromatograma: parámetros característicos.....	42
7.	Curva de calibración para el β -caroteno resultado del análisis HPLC (tiempo de retención = 3,959 minutos) (longitud de onda = 454 nm).....	49

TABLAS

I.	Actividad vitamínica de algunos carotenoides	12
II.	Ubicación taxonómica de la <i>Spirulina</i>	14
III.	Líneas de investigación para el trabajo de graduación	32
IV.	Experimento de dos factores.....	45
V.	Varianza en un experimento de dos factores	46
VI.	Dimensiones de la columna cromatográfica.....	47
VII.	Rendimiento porcentual de la extracción de β -caroteno a partir de la microalga <i>Spirulina spp.</i> utilizando las relaciones biomasa/etanol 1:10 y 1:20	48
VIII.	Resultados de la curva de calibración para las diferentes soluciones de β -caroteno (4.8, 8.0, 16.0 y 24.0 mg/L)	49

IX. Concentración de β -caroteno detectada en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para los diferentes extractos (longitud de onda = 454 nm).....50

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
cm	Centímetro
X	Concentración
ρ	Densidad
σ	Desviación estándar
°C	Grados centígrados
g	Gramos
H_i	Hipótesis alternativa
H_o	Hipótesis nula
KOH	Hidróxido de potasio
m	Metro
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
mg	Miligramo
mm	Milímetro
mL	Mililitro
min	Minutos
ppm	Partes por millón
pH	Potencial de Hidrógeno
%	Porcentaje
r	Relación de fase
w/w	Relación peso-peso
V	Volumen

GLOSARIO

Acíclico	Son compuestos orgánicos de cadena abierta, que no forman un anillo entre sus enlaces de átomos de carbono.
Analito	Son especies químicas cuya presencia o concentración en una muestra se desea conocer.
ANOVA	Análisis de la varianza (<i>analysis of variance</i>) es una colección de modelos estadísticos y procedimientos asociados, en el cual la varianza está fraccionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas.
AOAC	Siglas en inglés para referirse a Association of Official Analytical Chemist, que hace referencia a métodos estandarizados para realizar los procedimientos y pruebas químicas.
Carotenoides	Son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en plantas, algas, algunas clases de hongos y bacterias.

Colorante	Sustancia o mezcla de sustancia capaz de conferir o intensificar el color de alimentos, tejidos u otros objetos.
Cromatografía	Técnica de separación en la que los solutos se distribuyen entre una fase móvil y otra estacionaria.
Cromatograma	Es un diagrama de picos que da como resultado de la separación de cada uno de los componentes químicos de una muestra analizada en una cromatografía.
Flavonoides	Son los pigmentos virtualmente universales en las plantas. Casi siempre solubles en agua y son responsables del color de flores, frutos y, algunas veces, de las hojas. Los flavonoides están también universalmente presentes en la cutícula de la hoja y células epidérmicas, donde aseguran protección contra el efecto de la radiación ultravioleta.
HPLC	Siglas en inglés que significan High Performance Liquid Chromatography, lo que en español es una cromatografía líquida de alta resolución.
Provitaminico	Que es precursor de alguna vitamina.

Quimiotaxonomía	Método de clasificación biológica basado en las semejanzas estructurales de ciertos compuestos bioquímicos entre los organismos que se clasifican.
Saponificación	Es una reacción química entre un ácido graso (o un lípido saponificable, portador de residuos de ácidos grasos) y una base o álcali, en la que se obtiene como principal producto la sal de dicho ácido y de dicha base.
Secado	Operación unitaria que consiste en la eliminación de un solvente de un sólido o una solución que lo contiene por medios no mecánicos y químicos, sino únicamente térmicos.
Varianza	Medida de dispersión definida como la esperanza del cuadrado de la desviación de dicha variable respecto a su media.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación consiste en obtener β -caroteno a escala laboratorio a partir de una microalga llamada *Spirulina spp.*, utilizando una extracción líquido-líquido.

El objetivo principal de la investigación radica en evaluar que tanta cantidad de β -caroteno se obtiene al utilizar dos relaciones diferentes de biomasa/solvente, para extraer el β -caroteno presente en la microalga *Spirulina spp.*, para luego poder diseñar teóricamente una columna cromatográfica para su identificación y cuantificación en el análisis de cromatografía líquida de alta resolución.

Se realizó una extracción a escala laboratorio del β -caroteno presente en la microalga (*Spirulina spp.*), con el fin de determinar el rendimiento en su extracción. La extracción consistió básicamente en tres pasos, los cuales fueron: la saponificación, extracción y concentración de la sustancia a analizar.

Se realizó una saponificación directa, previa a la extracción con el objetivo de eliminar la clorofila y material graso que pueda interferir en la cromatografía líquida e hidrolizar los ésteres de carotenoides, que disminuirían el resultado final de la cuantificación de carotenoides libres, para ello se utilizó hidróxido de potasio, tal y como lo indica el método de Whyte (1987) modificado. Luego se llevó a cabo el proceso de extracción, para el cual se utilizó una mezcla ternaria biocompatible con la biomasa, la cual fue de etanol-agua-hexano y finalmente se concentró el extracto en un rotavaporador, esto

para evitar que el excedente de hexano interfiriera en el análisis del carotenoide.

Posteriormente se caracterizaron fisicoquímicamente los extractos con análisis de color y cuantificación de los carotenoides presentes, específicamente del β -caroteno por medio de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Con base en los resultados de la extracción se determinó que mientras más grande sea la relación biomasa/solvente, mayor será el rendimiento de la extracción.

El resultado de los análisis cromatográficos confirmó la presencia de β -caroteno en las diferentes extracciones realizadas a la microalga *Spirulina spp.*, utilizando una mezcla ternaria biocompatible de etanol-agua-hexano, por lo tanto esta microalga si puede ser utilizada como una fuente natural de β -caroteno, ya que su contenido de este es elevado.

OBJETIVOS

General

Obtener β -caroteno a escala laboratorio a partir de biofactorias fotosintéticas de la microalga *Spirulina spp.*, mediante el uso de mezcla ternaria biocompatible, en función del diseño teórico de la columna de identificación líquido-líquido (HPLC).

Específicos

1. Diseñar teóricamente la columna cromatográfica de identificación de β -caroteno.
2. Evaluar el rendimiento de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, utilizando las relaciones biomasa/etanol siguientes:
 - 1g de biomasa / 10 mL de etanol
 - 1g de biomasa / 20 mL de etanol
3. Identificar cuantitativamente el β -caroteno presente en la microalga *Spirulina spp.*, por medio del método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Hipótesis

Es factible la extracción de β -caroteno, con un rendimiento aceptable, a partir de la microalga *Spirulina spp.*, comparando con dos variantes de la relación biomasa/etanol utilizada en la extracción.

Hipótesis nula:

H₀: no existe diferencia significativa en el rendimiento de extracción de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, en función de dos variaciones de la relación biomasa/etanol utilizada.

$$\mu_{S1} = \mu_{S2}$$

Hipótesis alternativa:

H₁: existe diferencia significativa en el rendimiento de extracción de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, en función de dos variaciones de la relación biomasa/etanol utilizada.

$$\mu_{S1} \neq \mu_{S2}$$

INTRODUCCIÓN

La exploración de nuevas formas de aprovechamiento de la energía solar por medio de sistemas biológicos se ha enfocado en los últimos años hacia la explotación comercial de las microalgas; en un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga se refiere a aquellos microorganismos con estructura eucariota (es decir, que su material genético se encuentra en el núcleo celular), fotoautótrofos o sea capaces de transformar la energía solar en energía química mediante fotosíntesis con una elevada eficiencia y capaces de asimilar carbono en forma de CO₂.

En las últimas décadas el desarrollo tecnológico en cuanto a la producción de microalgas a gran escala ha sido importante, todo ello vinculado con su incorporación en la alimentación y recientemente en la industria farmacéutica y cosmética.

Spirulina spp., es una cianobacteria filamentosa, autótrofa, reconocida también como alga verde-azul, y que deriva su nombre de la naturaleza helicoidal o en espiral de sus filamentos.

Según la revista de Biología Marina y Oceanografía, su alto contenido nutricional justifica que se analice su producción en cantidades suficientemente altas para permitir su comercialización en un ámbito nacional e internacional. *Spirulina spp.*, contiene entre 50 – 60% de proteína bruta. El espectro de sus aminoácidos es similar al de otros microorganismos y patrones proteínicos alimenticios como huevos o leche, aún cuando es deficiente en metionina, cisteína y lisina. Es también una fuente importante de vitaminas, especialmente

vitamina B₁₂ y carotenos; también de minerales como el hierro y de ácidos grasos esenciales como el gama-linoleico.

Spirulina spp., puede cultivarse fácilmente, en biorreactores y sistemas acuosos abiertos, naturales y artificiales, en los que el medio de cultivo líquido contiene sales como bicarbonato de sodio y nitratos, que contribuyen a la alcalinidad del medio, uno de los factores más determinantes en el escalado y producción. La iluminación es importante por ser la *Spirulina spp.*, una microalga con organismo fotoautotrófico, y para lograr una adecuada distribución de nutrientes, se mantiene la agitación por medio mecánico o por burbujeo.

Los carotenoides son hidrocarburos poliénicos formados hasta por 8 unidades de isoprenoides y por lo tanto poseen un esqueleto de 40 átomos de carbono. Solo pueden ser sintetizados en las plantas y se dividen en dos grupos principales: carotenos y xantofilas. A diferencia de los carotenos, que constituyen una serie de hidrocarburos poliénicos, las xantofilas contienen funciones de oxígeno (grupos hidroxilo, epoxi y oxo). El color brillante de los carotenoides (amarillo-rojizo) es debido a la presencia de dobles enlaces conjugados en la cadena. El β -caroteno, es el carotenoide más abundante en los cloroplastos.

Los β -carotenos son considerados como provitaminas, ya que se pueden convertir en vitamina A activas. Esta vitamina sirve para varias funciones biológicas, entre todas estas se destaca la participación en la síntesis de determinadas glicoproteínas, además de funcionar como un excelente antioxidante y antiradicalario. Varios estudios demuestran que el β -caroteno ofrece protección contra el cáncer de pulmón, colorectal, útero y próstata.

Es por ello que en la presente investigación se establecerá el proceso para la obtención de β -caroteno a escala laboratorio, a partir de la microalga *Spirulina spp.*, mediante el uso de una mezcla ternaria; y el diseño teórico de la columna cromatográfica para cuantificar el β -caroteno presente.

1. ANTECEDENTES

Existen diversos trabajos de investigación enfocados sobre la determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en la microalga *Spirulina spp.*, y los métodos de extracción y caracterización de carotenos, que se han tomado como referencia por distintos autores, ya que pueden aportar beneficios a esta investigación. Entre los estudios más relevantes que tienen relación con el tema se citan los siguientes:

Hedí, (1941). Definió a las vitaminas como un compuesto químico cuya presencia en la dieta es esencial para mantener el crecimiento y la salud, y cuya ausencia o suministro inadecuado da como resultado el desarrollo de manifestaciones específicas de enfermedades en la salud.

En 1998, María José Ibáñez González realizó un estudio de Tesis doctoral con el siguiente título: *Obtención de ácido eicosapentanoico (20:5n3) a partir de la microalga Phaeodactylum tricornutum*. En la cual muestra la clase de lípidos en la célula microalgal y cómo es que en los insaponificables se encuentran los carotenoides. Muestra también la metodología que se debe utilizar para la identificación de los carotenoides, la cual se ha realizado a la biomasa y a las fases hexánica e hidroetanólica correspondientes a la extracción de insaponificables en el proceso de extracción de ácidos grasos por saponificación directa. Se utilizó para ello el método de Whyte (1987) modificado; para ello a 5 miligramos de biomasa se le adicionó 1 mililitro de disolución KOH del 60 por ciento en peso. La mezcla se somete a ultrasonidos durante 5 minutos. A continuación se realizó una saponificación durante 20 minutos a 40 grados Celsius en un baño de agua termostatzado. Se realizaron

tres extracciones con 1 mililitro de éter etílico cada una. En la fase etérea se encuentran los carotenoides.

En mayo del 2000 el estudiante Donado Miranda, Marco Antonio, realizó una investigación en el Centro de Investigaciones de la Facultad de Ingeniería de la USAC, el trabajo se titula *Extracción de carotenoides de la caléndula para su utilización como colorante natural en productos de consumo humano*. La extracción se realizó a nivel laboratorio, utilizando dos métodos de extracción, los cuales fueron por maceración dinámica y saponificación. Los resultados obtenidos tuvieron una diferencia significativa. Con el método A se obtuvo un rendimiento promedio de 16,5 por ciento y con el método B, 2,1 por ciento.

Martínez, (2003). Hizo un estudio en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) titulado *Carotenoides*. Realizó una descripción amplia de la constitución de los carotenoides, su clasificación, distribución, estructuras y métodos analíticos de extracción. Este trabajo aportará a la investigación lo referente a su fundamento teórico.

Tovar y colaboradores, (2007). *Análisis físico-químico y estudio de microalgas y hongos de las aguas de la salina "Las Cumaraguas" en Paraguaná, Estado Falcón*. Esta investigación se basó en un estudio de campo en la que se describieron microalgas y hongos, al mismo tiempo se descartó la presencia de *Escherichia coli*. Este trabajo se caracterizó por la metodología dentro de la cual se analizó parte de las condiciones fisicoquímicas de la salmuera en Las Cumaraguas. Para cumplir con los objetivo, en el trabajo se tomaron 5 muestras semanales en un período de 5 semanas entre marzo y abril. Los análisis fueron realizados en los laboratorios de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM) según la metodología descrita en la American Public Health Association (1989). Mediante la

observación directa a microscopio de luz se identificó la microalga *Dunaliella sp.*, además de esto se hicieron pruebas de tolerancia a diferentes niveles de salinidad.

Paredes y colaboradores, (2008). *Quimiotaxonomía de Triatoma longipennis por análisis de hidrocarburos cuticulares*. Básicamente en este trabajo se identificaron y cuantificaron los hidrocarburos cuticulares de las alas primarias y secundarias de las chinches *Triatoma longipennis*. Las alas de los insectos fueron desprendidas para la extracción de hidrocarburos y compuestos grasos utilizando hexano. Usando una columna cromatográfica de vidrio empacada con sílica-gel, diluidos con hexano para ser purificados los hidrocarburos cuticulares. Este trabajo se empleará como referencia durante el proceso de separación y purificación del β -caroteno realizado en el desarrollo del trabajo de investigación, ya que se especifica el procedimiento a emplear en el proceso para obtener las fracciones y de esta manera proseguir con la cromatografía de papel para realizar las comparaciones de las muestras obtenidas con la muestra de referencia.

Romero y colaboradores, (2008). *Cuantificación de carotenoides totales y β -caroteno en dos cepas de Dunaliella sp (Chlorophyta, Volvocales) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela*. El objetivo principal de esta investigación fue separar e identificar los carotenoides totales y en especial el β -caroteno. La identificación y cuantificación del β -caroteno en este estudio se realizó mediante una Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC), haciendo uso de un patrón comercial o estándar. Se probaron diferentes mezclas de solventes: acetona/agua, acetona/metanol y tetrahidrofurano/etanol, en tres proporciones cada una, 50/50, 70/30 y 90/10 V/V para obtener la mayor cantidad de estos carotenoides.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Carotenoides

Los carotenoides son una clase de pigmentos terpenoides con una estructura de 40 átomos de carbono, derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranilpirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo (por ejemplo el β -caroteno) y el rojo (por ejemplo el licopeno). Dentro de los carotenoides más distribuidos en la naturaleza se encuentra el α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, ϵ -caroteno, licopeno, luteína, violaxantina, zeaxantina, neoxantina, rubixantina, fucoxantina y criptoxantina.

Otra definición de los carotenoides es que estos son un amplio grupo de pigmentos, muy difundidos en los reinos vegetal y animal. La coloración de estos pigmentos es desde el amarillo, naranja, rojo, hasta el púrpura. Químicamente son insolubles en agua y se disuelven en grasas y en disolventes orgánicos, además de esto, se les clasifica como pigmentos lipocromos (pigmento graso), cabe mencionar que en la actualidad se conocen alrededor de 800 carotenoides presentes en la naturaleza.

De los carotenoides conocidos, solamente alrededor del 10 por ciento tienen valor como vitamina A. Además del β -caroteno, los más importantes entre ellos son el a caroteno y la b criptoxantina. La condición fundamental para que tengan actividad vitamínica es que tengan cerrado y sin oxidar al menos uno de los anillos de los extremos de la estructura. Consecuentemente, varios de los carotenoides más comunes, como el licopeno, zeaxantina y luteína no

tienen valor como vitamina A, aunque son muy importantes como pigmentos, y pueden tener también actividad como antioxidantes. En general, las xantofilas producen color amarillo, mientras que los carotenoides son anaranjados o rojizos.

La presencia de gran número de dobles enlaces hace a los carotenoides muy sensibles a la oxidación, especialmente en reacciones de fotooxidación con el oxígeno. También se oxidan en presencia de lipoxigenasas, pero no de forma directa, sino por reacción con los hidroperóxidos. Las reacciones de oxidación dan lugar en todos los casos a la pérdida de color. Generalmente, existe una gran dependencia entre la velocidad de oxidación y el ambiente en el que se encuentran. Dentro de los alimentos, los carotenoides son mucho más resistentes a la oxidación que en materiales pulverizados y secos, o en extractos.

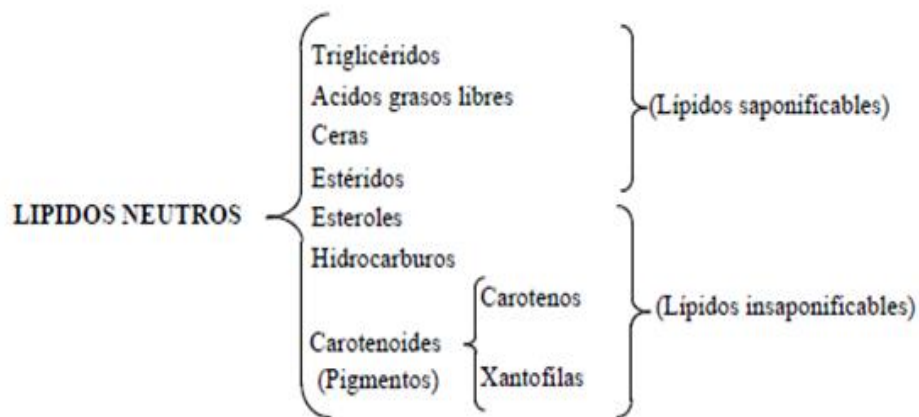
2.1.1. Definición

En la naturaleza existen dos grupos claramente definidos de carotenoides: el primero los carotenos y el otro las xantofilas, los primeros son denominados como hidrocarburos y estos están de manera minoritaria, por otra parte, las xantofilas contienen al menos un átomo de oxígeno en su molécula y de manera general estas representan la mayoría de los carotenoides. Además de esto, los autores destacan que todos los carotenos incluyen α , β y γ -caroteno, los únicos que poseen actividad como vitamina A.

Las algas producen una gran variedad de ácidos grasos y de lípidos. Los principales ácidos grasos de las microalgas son saturados e insaturados (isómeros cis) de 12 a 22 átomos de carbono y de 0 a 6 insaturaciones. La extracción de lípidos tiene la gran importancia de polaridad, la cual está

relacionada con su distribución en el interior de la célula microalgal y con las asociaciones con componentes no lipídicos como las proteínas. Los lípidos presentes en una microalga se pueden clasificar de varias formas, así por ejemplo pueden ser lípidos neutros y polares o bien saponificables e insaponificables.

Figura 1. **Clasificación de los lípidos presentes en una microalga**



Fuente: IBAÑEZ, María. *Obtención de ácido Eicosapentanoico (20:5n3) a partir de la micro alga Phaeodactylum tricornutum*. <<http://www.biblioeteca.com/biblioeteca.web>> Consulta: 10 de agosto 2012.

2.1.2. Distribución y estado natural

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en bacterias, y muy pocos se han reportado en animales (por ejemplo los colores rojizos de las plumas del flamingo son debidos a la cantaxantina, un carotenoide), y particularmente invertebrados marinos como las esponjas, estrellas de mar, pepinos de mar, erizos de mar, y otros. En los animales superiores el β -caroteno es un requerimiento dietario esencial, pues es

precursor de la vitamina A, la cual es un suplemento vitamínico que previene una serie de enfermedades en el ser humano. Los carotenoides también están presentes en partes aéreas de las plantas, especialmente en hojas, tallos y flores, en frutos (por ejemplo tomate, pimentón), y en menor proporción en raíces (por ejemplo la zanahoria).

2.1.3. Extracción de insaponificables. Carotenoides

Los carotenoides debido a la alta conjugación de enlaces dobles presentes en sus moléculas se descomponen por efecto de la luz, la temperatura y el aire. La luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide 13 (por ejemplo isomerismo cis y trans) es un factor a considerar al momento de realizar su extracción. El calor también favorece reacciones térmicas de degradación. El aire debido al oxígeno favorece la oxigenación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidroxilos y peróxidos, entre otros.

Por estas razones la extracción de carotenoides se debe realizar preferiblemente en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, y en ausencia de oxígeno (por ejemplo con una atmósfera artificial de nitrógeno). Además se debe realizar lo más rápido posible para evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos. Deben ser almacenados en la oscuridad, bajo atmósfera de nitrógeno o, en el caso de sólidos, a vacío y a -20 grados Celsius. Los carotenoides puros se conservan mejor como cristales sólidos, pero como pigmentos pueden ser almacenados disueltos en disolventes como éter de petróleo, hexano o benceno.

Los carotenoides, como los lípidos neutros son solubles en disolventes apolares como el hexano o el cloroformo. En un estudio realizado por Molina

Grima et al. (1994) separaron los carotenoides de las sales potásicas de los ácidos grasos de *Isochrysis galbana* de una disolución hidroetanólica extrayendo los primeros con hexano. Otra forma de extraer los carotenoides de un material biológico es mediante una extracción directa con disolventes miscibles con el agua, como acetona, etanol y metanol. El extracto obtenido está impurificado por otros lípidos y por clorofilas. Para la separación de estas sustancias el método más utilizado es la saponificación, que se utiliza incluso en presencia de carotenoides inestables a los álcalis; en este caso la saponificación se realiza durante un período breve de tiempo, antes de que se produzcan cambios en su estructura.

Como consecuencia de la inestabilidad de los carotenoides las operaciones de extracción deben realizarse en atmósfera inerte, a baja temperatura (entre temperatura ambiente y -20 grados Celsius), en la oscuridad o con luz difusa, en ausencia de ácidos y usando disolventes libres de peróxidos. También puede ser conveniente añadir antioxidantes.

Debido a que los carotenoides son solubles en solventes apolares, para la extracción se utiliza solvente como éter etílico, benceno, cloroformo, acetona, acetato de etilo, entre otros.

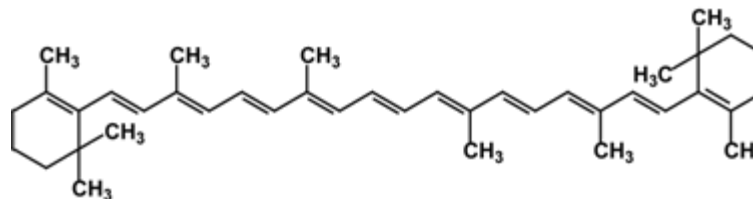
2.2. El β -caroteno

Es un miembro de la familia de los carotenoides, que son compuestos liposolubles con una gran pigmentación roja, naranja o amarilla presentes de forma natural en muchas especies vegetales. Estos carotenoides se dan de forma natural y al ser engestados pueden ser convertidos en vitamina A por el organismo, de igual forma, son denominados como “carotenoides provitamina

A”, el β -caroteno es el más abundante y el más eficiente que se halla en diversas especies vegetales.

Los β -carotenos son considerados como provitaminas, ya que se pueden convertir en vitamina A activas. Esta vitamina sirve para varias funciones biológicas, entre todas estas se destaca la participación en la síntesis de determinadas glicoproteínas, además de funcionar como un excelente antioxidante y antiradicalario. En definitiva varios estudios demuestran que es el β -caroteno el más activo. Estos carotenos, conjuntamente con el γ -caroteno, el licopeno y la luteína (que no tienen actividad como vitamina A), parecen ofrecer protección contra el cáncer de pulmón, colorectal, glándulas mamarias, útero, próstata y demás enfermedades.

Figura2. Estructura del β -caroteno



Fuente: <<http://fbio.uh.cu/sites/bioinfo/index.html>> Consulta: 11 de agosto 2012.

2.2.1. Producción de β -caroteno

Spirulina spp., es un organismo fotosintético capaz de generar una variedad de productos con interés industrial, de aquí deriva el interés científico y socioeconómico de estas algas en cuanto a la biotecnología que estas pequeñas plantas acuáticas representan. Entre los compuestos de gran interés comercial de la *Spirulina spp.*, sobresalen los carotenoides y de estos es el β -caroteno, el que se encuentra en mayor cantidad en las cepas de *Spirulina spp.*

La obtención de β -caroteno como compuesto de alta pureza está relacionado con una serie de reacciones de síntesis química clásica, en procesos que hoy en día son objeto de polémica al considerarse que vías alternativas partiendo de fuentes de origen natural vía fermentación o productos naturales unidos a procesos de extracción empleando solventes y condiciones de reacción menos problemáticas y factibles.

Está demostrado que los carotenoides y demás componentes terpénicos derivados en general y específicamente el β -caroteno en particular pueden obtenerse a partir de diferentes fuentes naturales, vegetales, algas, hongos, entre otros. Dentro de todo esto, lo que se busca es precisamente métodos de extracción seguros y que pueda extraer con precisión y pureza los debidos carotenoides.

2.2.2. Precusores de vitamina A

Desde el punto de vista nutricional los carotenoides son clasificados como:

- Provitaminicos
- Carotenoides inactivos.

De los carotenoides identificados, cerca de 50 de ellos muestran actividad provitamina A en animales.

La actividad provitamina A del β -caroteno es debida a su semejanza estructural con el retinol. Para tener actividad de vitamina A, un carotenoide debe tener al menos la mitad de la molécula de β -caroteno, es decir el anillo β -ionona. De ahí que, los carotenos acíclicos son inactivos. Substituciones en la

estructura básica, o cambios en dobles enlaces o estructura del anillo resulta generalmente en una pérdida de la actividad.

A continuación se muestran algunos de los carotenoides más abundantes.

Tabla I. **Actividad vitamínica de algunos carotenoides**

Grupo	Nombre común	Actividad vitamínica
Carotenos	Beta-caroteno	+
	Alfa-caroteno	+
	Gama-caroteno	+
	Beta-zeacaroteno	+
	Zeta-caroteno	-
	licopeno	-
Xantofilas	Alfa-criptoxantina	-
	Beta-criptoxantina	+
	zeinoxantina	-
	luteína	-
	violaxantina	-

Fuente: B.H., Davies. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. p. 232.

Los carotenoides existen en la naturaleza en la configuración más estable todo-trans (*all-trans*). Los isómeros *cis*, sin embargo, pueden encontrarse y se sabe que se incrementan durante la cocción o el procesamiento industrial (Chandler y Schwartz, 1988; Sweeney y Marsh, 1970). En términos nutricionales, las diferencias entre los isómeros *cis* y *trans* son muy importantes, ya que la forma *cis* posee menor actividad biológica.

2.3. Biofactorías fotosintéticas

Son aquellas áreas donde se producen en grandes cantidades un compuesto de interés con el uso de microorganismos autótrofos que se desarrollan en un sistema abierto. La utilización de la *Spirulina spp.*, como factorías celular, puede usarse para extracción de metabolitos secundarios con importantes actividades biológicas; tales como β -caroteno, vitaminas, enzimas y proteínas, entre otros que representan un especial interés para la industria. En este sentido Olaizola (2003) describe que el proceso para la producción de compuestos bioactivos que contempla al menos dos etapas:

- La identificación de nuevos compuestos, así como el mejoramiento de los ya identificados.
- Desarrollo de sistemas de producción adecuados que permitan el escalamiento a nivel industrial.

No obstante, advierte que aunque las microalgas poseen una alta productividad primaria, muchos compuestos químicos de interés son producto del metabolismo secundario, este último activado en condiciones no conducentes al crecimiento rápido. Este hecho ha sido corroborado en la obtención de pigmentos de interés a partir de *Spirulina spp.*

2.4. Microalgas (*Spirulina spp.*)

Lamentablemente existe una confusión entre los términos *Espirulina*, *Spirulina* y *Arthrospira*, la cual proviene a la vez de errores en las determinaciones científicas de los años 50 y de la denominación comercial de ciertas cianobacterias alimentarias.

Los términos al asignarse en momentos históricos y autores diferentes, pero al argumentar un conjunto de conceptos a favor de uno y otro término, parecen favorecer con mejores argumentos científicos la denominación *Arthrospira*. El género *Arthrospira sp.*, incluye el conjunto de cianobacterias alimentarias vendidas comercialmente bajo el nombre de espirulina.

Los nombres cianobacterias, algas verde-azules o cianofíceas, se consideran términos compatibles. El primero se refiere a la relación taxonómica y filogenética, mientras el segundo representa la correlación ecológica y biológica. Así, según la revisión actual para este microorganismo se puede clasificar taxonómicamente de la siguiente manera:

Tabla II. **Ubicación taxonómica de la *Spirulina***

Dominio: Bacteria
Phylum: Cyanobacteria
Clase: Cyanobacteria
Orden: Oscillatoriales
Familia: Oscillatoriaceae
Género: Spirulina
Especie: <i>S. máxima</i> (=Arthrospira)

Fuente: <<http://www.antenna.ch/manual/CULTIVO.html>> Consulta: 18 de octubre 2012.

2.4.1. **Morfología**

El género *Spirulina spp.*, pertenece a la familia Oscillatoriaceae. Las especies más representativas en diversas investigaciones son: *S. máxima* y *S. platensis*, y entre éstas existen también diferencias morfológicas en cuanto a los filamentos, las vacuolas y la regularidad externa de la cubierta o la cápsula de

cada filamento, que ayudan en la identificación taxonómica de las diferentes especies.

Esta familia contiene un grupo homogéneo de cianobacterias filamentosas caracterizadas por tener las células en forma de espiral (tricomas) y una fina membrana externa mucilaginosa llamada vaina.

Las dimensiones celulares, dependen del enrollamiento celular y del largo que pueden llegar a ser los filamentos. Estas dimensiones varían según la especie. Regularmente los filamentos son solitarios y flotan libremente. Las condiciones ambientales de crecimiento, también influirán en su tipo de configuración, pero siempre permanecerá la constante de la morfología en forma helicoidal.

2.4.2. Hábitat

Lo que diferencia el género *Spirulina spp.*, del resto de las cianobacterias, es su muy particular nicho ecológico, ya que estos microorganismos proliferan en aguas muy mineralizadas, extremadamente alcalinas y en ocasiones calientes. Estas condiciones excluyen a la mayoría de los seres vivos. El desarrollo de *Spirulina spp.*, en este tipo de medios se debe a 3 fenómenos:

- Al consumir los carbonatos y bicarbonatos de su medio, la *Spirulina spp.*, tiende a aumentar todavía más la alcalinidad del líquido llegando incluso hasta un pH de 11,5.
- Como son altamente pigmentadas y a menudo flotantes, los filamentos de *Spirulina spp.*, forman una pantalla muy eficaz, que priva de luz solar

a las raras algas que podrían acomodarse en su medio de cultivo, como por ejemplo *Chlorella spp.*, una microalga comestible que prolifera a veces en los cultivos de *Spirulina spp.*, poco concentrados.

- Se ha demostrado que la *Spirulina spp.*, es capaz de secretar moléculas proteicas como medio de defensa en su medio natural.

2.5. Medios de cultivo

Se han desarrollado diferentes medios para el cultivo de microalgas que van desde las fórmulas para enriquecer el agua de mar natural, hasta el uso de medios artificiales que permitan resultados constantes en contraste con los resultados tan variables que brinda el uso del agua de mar natural que entre otros factores depende del lugar donde se colecta esta, y el tiempo de almacenamiento de la misma.

Los medios artificiales se usan principalmente para fines experimentales, ya que como se ha mencionado, brinda resultados constantes, aunque existen algunas especies que no crecen en medios artificiales por factores desconocidos que afectan su crecimiento, las principales fórmulas utilizadas van desde el agua de Miguel, que data de 1910, desarrollada por Allen-Nelson; el medio de End-Schereiber de 1934, hasta fórmulas específicas para familias de microalgas como la fórmula del Laboratorio Haskins de Nueva York para diatomeas, Provasoli et al., 1975; Matthiese & Thorner, 1966; Mclachlan, 1973; Guillard F., 1973; Droop, 1975, 1979; Schoene, 1982. Las principales formulaciones de los medios de cultivo, tanto de mantenimiento de cepas de *Spirulina spp.*, como de producción masivas (minerales, enriquecidas y orgánicas), se describen a continuación.

2.5.1. Consideraciones generales de los cultivos de microalgas

Muchos factores contribuyen para el desarrollo óptimo de los cultivos de microalgas, algunos de estos afectan las características del crecimiento.

Los recipientes de cultivo más comúnmente usados son de materiales no tóxicos como las cajas de Petri, matraces Erlenmeyer, matraces Ferenback, carboyos o garrafas, entre otros, adecuados para cultivos de laboratorio. Para cultivos a gran escala los recipientes de plástico, madera y concreto son los más recomendables, incluyendo los estanques rústicos en áreas rurales son los sistemas más económicos.

En cultivos masivos la aereación es un factor muy importante para la homogenización de los nutrientes y para evitar la sedimentación de las microalgas.

Otro factor importante es la penetración de la luz en el cultivo; en los cultivos masivos la profundidad es tan grande que la intensidad de la luz insidente no es suficiente para la fotosíntesis, hasta el fondo del tanque. En los cultivos masivos a la intemperie, la penetración de la luz es más efectiva, pero se debe reducir la intensidad de la luz fuerte, cubriendo estos estanques con una malla. En cultivos a gran escala es recomendable la inyección de CO₂ (0,5%) para contribuir al proceso fotosintético.

Para muchas especies de algas unicelulares microscópicas, la temperatura óptima oscila entre los 15 y 20 grados Celsius, pocas especies de esta familia crecen a más de 28 grados Celsius, las cloroficeas pueden soportar altas temperaturas; un ejemplo es el cultivo masivo a la intemperie de *Chlorella*

saccharophila, cuyas temperaturas oscilan entre 12,5 – 30 grados Celsius (Hirata et al., 1974, 1975,1977; Torrentera, 1983).

El crecimiento y la división celular son afectados por la intensidad de la luz y el fotoperíodo (horas de iluminación y oscuridad) en relación también a la temperatura, por ejemplo en diatomeas a 20 grados Celsius y 1 000 lux se obtiene un crecimiento favorable.

2.6. Métodos de análisis para carotenoides

A continuación se describen 3 métodos básicos y sumamente importantes para poder realizar un análisis de carotenoides, los mismos fueron utilizados en el presente trabajo de investigación.

2.6.1. Saponificación

La saponificación es necesaria para eliminar material graso que pueda interferir en la cromatografía de adsorción e hidrolizar los ésteres de carotenoides, así como también para separar los pigmentos carotenoides de la clorofila, que disminuirían el resultado final de la cuantificación de carotenoides libres.

Según el método de Davies 1976, para saponificar el extracto se disuelve en alcohol (metanol o etanol) y luego se agrega KOH. Cuando el extracto no se solubiliza en alcohol, se puede utilizar benceno o éter de petróleo y luego se agrega la solución alcohólica de KOH. El extracto puede dejarse en reposo en la obscuridad o agitarse por un tiempo prudencial mientras se da la reacción. Para eliminar el álcali, toda la mezcla de saponificación se transfiere por fracciones, a una ampolla de separación conteniendo éter de petróleo o hexano,

y se lava con agua destilada hasta que los lavados sean neutros. Si se forma emulsión, se puede romper con unos mililitros de etanol o de solución diluida de cloruro de sodio.

En un estudio realizado por Rodríguez-Amaya y colaboradores, donde se compararon 3 métodos de saponificación:

- KOH en metanol al 10 por ciento.
- KOH en etanol al 60 por ciento.
- El método propuesto por la AOAC (1984): extraer con una mezcla hexano:acetona:etanol:tolueno 10:7:6:7 respectivamente y adicionar el KOH al 40 por ciento en metanol.

Todos los métodos se probaron a temperatura ambiente y calentando la mezcla en baño de agua. Según los resultados obtenidos, hay una pérdida de 0 a 3 por ciento al saponificar con KOH en metanol al 60 por ciento. Es importante notar que con el método de la AOAC hay pérdidas hasta del 100 por ciento, debido a que la presencia de acetona promueve condensaciones aldólicas e isomerizaciones. En conclusión, el aumento de la temperatura y el de la concentración de KOH aumentan la descomposición de carotenoides, así como la presencia de acetona.

Según otros estudios, no hay diferencia significativa entre muestras saponificadas y no saponificadas de vegetales. En el caso de frutas y algas, la saponificación es absolutamente necesaria, puesto que las xantofilas frecuentemente se encuentran esterificadas.

2.6.2. Extracción

Debido a que los carotenoides se encuentran distribuidos en diferentes tipos de tejidos, es difícil encontrar un método de extracción común. Las muestras deben ser analizadas frescas y si no es posible, se pueden guardar a -10 grados Celsius. Las muestras también se pueden liofilizar, aunque este procedimiento no es recomendado, pues da lugar a pérdidas significativas de carotenoides.

Los tejidos frescos contienen un alto porcentaje de agua, por eso el solvente orgánico utilizado para la extracción debe ser miscible con agua (acetona, etanol, metanos, por citar algunos ejemplos). En muestras que han sido liofilizadas se pueden utilizar solventes no miscibles con agua, como éter dietílico o hexano. Cuando se extrae con acetona, es importante eliminarla antes de la saponificación, pues la presencia de acetona y carotenoides en medio alcalino, dan lugar a condensaciones aldólicas.

La cantidad de muestra a utilizar varía dependiendo del contenido de carotenoides. Para vegetales de hojas verdes se utiliza de 2 a 5 gramos y para raíces y frutas de 10 a 40 gramos. Cuando se trabaja para aislar patrones por el método de cromatografía en columna abierta o con microalgas, se reporta el uso de hasta 100 gramos de muestra.

Para la extracción, el material se corta en trozos pequeños y se homogeniza con acetona fría, para aumentar la extracción se puede colocar la muestra picada en acetona fría por 20 minutos antes de llevarla a la mezcladora.

El extracto se puede filtrar por medio de succión utilizando papel filtro de porosidad 3 (poro entre 20 y 30 micrómetros) a presión de vacío, y el residuo es extraído nuevamente, hasta que el filtrado sea incoloro.

La mezcla obtenida se transfiere a una ampolla de separación que contenga hexano o éter de petróleo. Se agrega agua o una solución diluida de cloruro de sodio hasta separar la fase acuosa y la orgánica; en ésta última se encontrarán los carotenoides. Si el extracto se adiciona en una sola fracción, es necesario reextraer la fase acuosa con éter de petróleo o hexano y combinar los extractos (Rodríguez-Amaya et al., 1988). Se usa cloruro de sodio para evitar la formación de emulsiones; si éstas se formaran también pueden deshacerse adicionando etanol. Luego de transferir el extracto al éter, se lava 4 o 5 veces con agua, para remover la acetona. El extracto se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra para la saponificación.

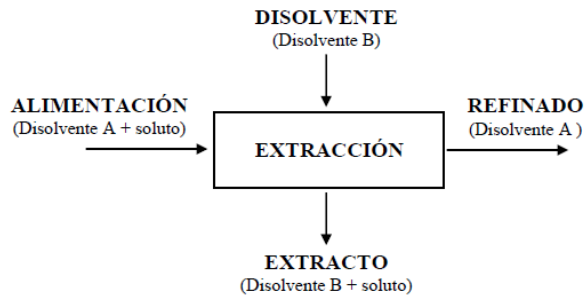
2.6.2.1. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es, junto a la destilación, la operación básica más importante en la separación de mezclas homogéneas líquidas. Consiste en separar una o varias sustancias disueltas en un disolvente mediante su transferencia a otro disolvente insoluble o parcialmente insoluble, en el primero. La transferencia de materia se consigue mediante el contacto directo entre las dos fases líquidas. Una de las fases es dispersada en la otra para aumentar la superficie interfacial y aumentar el caudal de materia transferida.

En una operación de extracción líquido-líquido se denomina alimentación a la disolución, cuyos componentes se pretende separar, disolvente de extracción al líquido que se va a utilizar para separar el componente deseado, refinado a la alimentación ya tratada y extracto a la disolución con el soluto

recuperado. En la figura 3 se muestra un esquema de las corrientes implicadas en la operación.

Figura 3. **Esquema idealizado de una extracción líquido-líquido**



Fuente: <http://www.uam.es>. Consulta: 8 de julio de 2012.

2.6.2.2. Regla de fases

El equilibrio entre dos fases en cualquier caso está restringido por la regla de fases:

$$F = C - P + 2$$

Donde P es el número de fases en equilibrio, C es el número de componentes totales en las dos fases (cuando no se verifican reacciones químicas), y F es el número de variantes o grados de libertad del sistema.

2.6.2.3. Equilibrio de fases

La separación de los componentes por medio de la extracción líquido-líquido depende básicamente de la distribución del equilibrio termodinámico de los componentes en las dos fases líquidas.

2.6.2.4. Coeficientes de distribución

En el equilibrio se conoce como coeficiente de distribución o reparto K al cociente de la fracción en peso del soluto en la fase del extracto y, dividida por la fracción en peso del soluto en la fase de refinado x.

$$K = y/x$$

2.6.2.5. Equilibrio líquido

La extracción supone el uso de sistemas compuestos por 3 sustancias cuando menos; aunque las fases insolubles son predominantemente muy distintas desde el punto de vista químico, en la mayoría de los casos los 3 componentes aparecen en cierto grado en las dos fases.

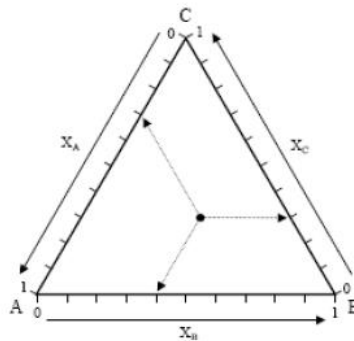
2.6.2.6. Métodos de representación gráfica del equilibrio ternario

En el diseño de una operación de extracción líquido-líquido suele considerarse que el refinado y el extracto se encuentran en equilibrio. Los datos de equilibrio que deberán manejarse serán como mínimo los correspondientes a un sistema ternario (dos disolventes y un soluto), con dos de los componentes inmiscibles o parcialmente inmiscibles entre sí.

Una de las formas más habituales de recoger los datos de equilibrio en sistemas ternarios son los diagramas triangulares. A continuación se muestra un diagrama triangular equilátero. Los vértices del triángulo representan compuestos puros, un punto sobre un lado correspondería a una mezcla binaria y un punto en el interior del triángulo representaría una mezcla ternaria. La

composición de una mezcla puede determinarse por lectura directa en el diagrama. La concentración de los componentes en el diagrama se muestra como fracción molar o fracción másica.

Figura 4. **Diagrama de equilibrio ternario**



Fuente: <http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mgilarra/experimentacionIQII/ExtraccliqLiq2006.pdf>
Consulta: 8 de julio 2012.

2.6.3. Separación

A continuación se muestran los diferentes métodos de cromatografía en columna que se van a utilizar para separar el β -caroteno de la solución resultante en la extracción, siendo el más eficiente el método físico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por sus siglas en inglés.

2.6.3.1. Cromatografía en columna

Es una técnica que se emplea para la separación de los componentes individuales de una mezcla y en ciertos casos, para identificar un compuesto comparando su comportamiento cromatográfico con el de sustancias conocidas empleadas como patrón. La cromatografía en columna es muy utilizada en

química orgánica, ya que permite separar y purificar cantidades apreciables de compuestos presentes en una mezcla (Alonso, 2010).

Se fundamenta en la afinidad diferencial de los compuestos que se desean separar por una fase estacionaria y una fase móvil. Las fases estacionarias también llamadas absorbentes son el gel de sílice y la alúmina. La fase móvil llamada eluyente puede ser cualquier disolvente adecuado a la polaridad de los componentes de la mezcla.

La mezcla de compuestos a separar se disuelve en una pequeña cantidad de disolvente y se coloca sobre el adsorbente en la parte superior de la columna, quedando adsorbida por el mismo. Luego se pasa un flujo de eluyente a través de la columna. Los compuestos constituyentes de la mezcla son arrastrados por el eluyente a su paso, haciéndoles avanzar a lo largo de la columna. Sin embargo, no todos los compuestos avanzan a la misma velocidad, y esta es precisamente la clave de la cromatografía.

Algunos compuestos se ven más fuertemente retenidos por el adsorbente (fase estacionaria) y por lo tanto avanzarán más despacio. Por el contrario, otros apenas son retenidos y avanzarán a mayor velocidad. Dependiendo del tipo de fase fija y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida puede ser:

2.6.3.1.1. Cromatografía de adsorción

La fase estacionaria es un sólido polar capaz de adsorber a los componentes de la mezcla mediante interacciones de tipo polar y se utiliza casi exclusivamente sílice (sílica) y en menor medida alúmina.

2.6.3.1.2. Cromatografía de reparto

En casi todos los casos, como fase estacionaria se utilizan compuestos unidos químicamente a un soporte sólido de sílica. Se la subdivide en cromatografía en fase normal y fase reversa. En la cromatografía en fase normal, la fase fija es polar (como por ejemplo agua o trietilenglicol) y los compuestos menos polares eluyen primero. En la cromatografía en fase reversa, el compuesto unido químicamente es un hidrocarburo alifático y se emplean fases móviles polares. En este caso, las sustancias más polares eluyen primero.

2.6.3.1.3. Cromatografía iónica

La fase estacionaria es un sólido que lleva anclados grupos funcionales ionizables, cuya carga se puede intercambiar por aquellos iones presentes en la fase móvil para posteriormente poder identificar los mismos.

2.6.3.1.4. Cromatografía de exclusión por tamaño

La fase fija está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros y llevan a cabo un fraccionamiento relacionado con el tamaño molecular. Las moléculas de tamaño mayor son excluidas y eluyen primero, mientras que las más pequeñas que penetran en los poros son retenidas más tiempo.

Figura 5. Orden de elusión de compuestos y polaridad



Fuente: LÓPEZ, Alejandro. *Cromatografía de columna*. <<http://es.scribd.com/doc/14172697/6-Cromatografia-en-Columna>> Consulta: 8 de julio de 2012.

2.6.3.1.5. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography* (HPLC) es un tipo de cromatografía en columna, utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica. También se la denomina cromatografía líquida de alta presión o *high pressure liquid chromatography* (HPLC), aunque esta terminología se considera antigua y está en desuso.

El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla, basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

En la HPLC isocrática el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente, dependiendo de las interacciones

químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna.

El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión, mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, metanol y acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente.

Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5 por ciento de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50 por ciento en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada, respecto de la afinidad por la fase estacionaria. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas, con tal de optimizar el gradiente, de forma que permita una buena separación de los compuestos.

Se utilizará el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para identificar el extracto de β -caroteno debido a que presenta las siguientes ventajas para el análisis de carotenoides con respecto a los otros métodos mencionados anteriormente:

- Rapidez y facilidad de análisis.
- Alta resolución y reproducibilidad.
- Hace posible la separación de pigmentos muy similares.
- Requiere de poca cantidad de muestra.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Localización

La parte experimental de la investigación se realizó en la Universidad de San Carlos de Guatemala y en la Universidad del Valle de Guatemala, específicamente en los siguientes laboratorios:

- Laboratorio de Investigación de Extractos Vegetales (LIEEXVE), Sección de Química Industrial, Centro de Investigaciones de Ingeniería, Facultad de Ingeniería.
- Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

3.2. Variables

La extracción del β -caroteno se realizará por medio del uso de una mezcla ternaria biocompatible. Durante el proceso se deben tomar en cuenta las variables que afectan la extracción del caroteno. Las variables que se deben considerar durante el proceso de extracción del β -caroteno son las siguientes:

- Variables independientes
 - El tipo de solvente utilizado
 - El agente saponificante
 - La relación gramo de biomasa/solvente

- Variables dependientes
 - Tiempo de saponificación
 - Velocidad de agitación
 - Rendimiento extractivo
 - Propiedades fisicoquímicas de los extractos

3.3. Delimitación de campo de estudio

La investigación es de tipo experimental – descriptivo, ya que se han planteado hipótesis y se llevó a cabo un análisis profundo de las mismas. El estudio está delimitado por las líneas de investigación de la carrera de ingeniería química, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla III. **Líneas de investigación para el trabajo de graduación**

Área científica y tecnológica	Área temática principal	Área temática secundaria	Línea de investigación prioritaria
Ingeniería y tecnología	Ciencias tecnológicas	Procesos tecnológicos	Extracción sólido-líquido
Ciencias Naturales y exactas	Química	Química orgánica	Bioingeniería

Fuente: Escuela de Ingeniería Química (<http://equimica.ingenieria-usac.edu.gt/index.php>).

Consulta: 12 de julio de 2012.

3.4. Obtención de las muestras

La materia prima se obtuvo del lago de Amatitlán, ubicado en el municipio de Amatitlán, situado en la parte sur del departamento de Guatemala. Se localiza en la latitud 14° 28' 42" y en la longitud 90° 37' 08". Limita al norte con los municipios de Villa Nueva, Petapa y Villa Canales (Guatemala); al sur

con los municipios de Palín y San Vicente Pacaya (Escuintla) y Villa Canales (Guatemala); al este con el municipio Villa Canales (Guatemala); y al oeste con los municipios de Santa María de Jesús y Magdalena Milpas Altas (Sacatepéquez). Cuenta con una extensión territorial de 204 kilómetros cuadrados, y se encuentra a una altura de 1 190 metros sobre el nivel del mar, el clima de esta región es templado.

La biomasa obtenida se secó en la Universidad del Valle de Guatemala. Se realizó la extracción a dos relaciones gramo de biomasa/mililitros de solvente, el cual fue etanol, mediante el método de mezcla ternaria (etanol-agua-hexano) a nivel laboratorio, posteriormente se caracterizó los extractos obtenidos.

3.5. Recursos humanos disponibles

- Investigador: Br. Eddy Mauricio Viana Ruano
- Asesora: Inga. Hilda Palma de Martini
- Coasesor: Ing. Mario José Mérida Meré
- Coasesora: Licda. Ana Silvia Colmenares

3.6. Recursos materiales disponibles

Los recursos para la investigación incluyen materia prima, equipo y cristalería, siendo el de mayor importancia para la investigación la materia prima y para la extracción, la cristalería y equipo.

3.6.1. Materia prima

- Microalga (*Spirulina* spp.)

3.6.2. Equipo

- Plancha de calentamiento con agitación VWR
- Balanza analítica digital Adventurer
- Balanza de humedad marca BOECO de 120V
- Balanza digital marca Sartorius, precisión de 0,001 gramo, percibe hasta 400 gramos
- Bomba de vacío
- Rotavapor BÜCHI modelo R-200/205, incluye condensador vertical de vidrio, con balón concentrador de 1000 mL y balón receptor de vidrio de plástico de 2 000 mililitros con juntas 24/40, sistema de vacío con bomba de vacío marca BÜCHI modelo R-5000, sistema de enfriamiento con bomba de agua, sistema de baño calefactor que va de 0 a 180 grados celsius y el sistema de rotación se puede ajustar de 20 a 280 R/min.
- Cromatografo marca Hypersil ODS

3.6.3. Cristalería

- *Beackers* con capacidad de 50, 100, 600 y 1000 mL
- Erlenmeyers
- Varillas de agitación
- Balón aforado de 250 mL
- Probetas graduadas de 100, 250 y 1 000 mL
- Kitasato de 1 000 mL
- *Beackers* con capacidad de 50,100,250,600 y 1 000 mL

- Balones aforados de 500 y 1 000 mL
- Embudo de vidrio
- Ampolla de decantación de 1 000 mL

3.6.4. Materiales auxiliares

- Papel parafilm
- Mangueras de plástico
- Agitadores magnéticos

3.6.5. Reactivos

- Hidróxido de potasio grado reactivo
- Hexano grado reactivo
- Etanol al 95 por ciento
- Agua desmineralizada
- Acetonitrilo
- Tetrahidrofurano

3.6.6. Otros

- β -caroteno estándar secundario, traceable a USP 1065480, marca PHR1239 Fluka.

3.7. Técnica cualitativa o cuantitativa

El método utilizado fue la extracción líquido-líquido, en la cual se utilizó el hidróxido de potasio para realizar la saponificación y también se varió la

cantidad de solvente utilizado con el fin de determinar en qué caso se obtiene más cantidad de β -caroteno.

A continuación se detalla la metodología utilizada en el ensayo realizado a escala laboratorio.

3.7.1. Pruebas preliminares

Comprenden las pruebas realizadas antes de iniciar el proceso de extracción del β -caroteno a partir de la micro alga *Spirulina spp.*, las cuales consistieron en tres pruebas.

3.7.2. Extracción a escala laboratorio por el método de mezcla ternaria

Debido a que la extracción es líquido-líquido y en esta intervienen 3 sustancias diferentes se presenta una mezcla ternaria. A continuación se describen las relaciones utilizadas durante la experimentación.

3.7.2.1. Relación biomasa/etanol 1:10

El proceso de extracción inició con la obtención de la biomasa (30 g de *Spirulina spp.*) que en este caso fue por medio de la operación de secado realizada en un secador eléctrico de bandejas de flujo transversal. El siguiente paso fue colocar la biomasa en la solución de KOH (0,4 g KOH / g biomasa seca) y Etanol al 95 por ciento (10 mL / g de biomasa seca) a una temperatura ambiente por 24 horas con una agitación constante por una hora, esto para favorecer la saponificación, luego de ese tiempo la mezcla obtenida se filtró con papel filtro utilizando una bomba de vacío para remover la masa residual. El

residuo se lavó con etanol al 95 por ciento (5 mL / g de biomasa seca) y luego se procedió a filtrar de nuevo, agregando este a la primera filtración obtenida.

El volumen total de filtrado se colocó en una ampolla de decantación a la cual se le adicionó 200 mililitros de agua para llevar la solución hidroalcohólica a una relación de 40 por ciento (w/w). Posteriormente a dicha solución obtenida se le realizó 2 extracciones con hexano utilizando 250 mililitros en cada extracción para tener una relación de fase de ($r = 0,4$), con el objetivo de separar los insaponificables.

Realizada la extracción líquido-líquido, se descartó la fase alcohólica y se trabajó únicamente con la fase hexánica, la cual contiene los insaponificables, que poseen los carotenoides.

Finalmente se tomó un volumen conocido y se eliminó el hexano mediante la utilización de un rotavapor.

3.7.2.2. Relación biomasa/etanol 1:20

Se utilizó el procedimiento descrito anteriormente con la variante que se uso una relación 1:20 entre la biomasa y el etanol, lo que significó que por cada gramo de biomasa se agregaron 20 mililitros de etanol.

Se necesitó de 300 mililitros de agua para obtener la relación de 40 por ciento (w/w) y de hexano se utilizó 420 mililitros para realizar las extracciones y obtener una relación de fase ($r = 0,4$). La eliminación del hexano se realizó también utilizando un rotavapor.

Luego de que se obtuvo la extracción de β -caroteno se cuantificó la presencia de β -caroteno de la siguiente forma.

3.7.3. Método para la determinación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía en columna es el método clásico utilizado para determinar carotenoides. El material adsorbente más utilizado es MgO:hyflosuper cel activado en varias proporciones, la más utilizada es 1:1. La sílica gel no es recomendada por su acidez inherente, que puede causar degradación o isomerización en los carotenoides (Rodríguez-Amaya & Amaya-Farfán, 1992). Debido a que, por el tamaño de partícula, las bandas se deforman y dificultan la separación, casi no se utiliza alúmina como fase estacionaria.

3.7.3.1. Condiciones para la cromatografía

- Precolumna 5 μm ODS2 de 100 x 2,1 mm.
- Columna Hypersil 5 μm ODS 200x 2,1 mm.
- Temperatura 22,5 $^{\circ}\text{C} \pm 0,1$
- Fase móvil acetnitrilo: tetrahidrofurano 85:15 v/v.
- Velocidad de flujo lineal 0,5 mL/min.
- Detección a 454 nm.
-

3.7.3.2. Preparación de reactivos

- Fase móvil: en una proporción 85:15 volumen de acetonitrilo y tetrahidrofurano.

- Soluciones madre de β -caroteno: en una concentración de 80 partes por millón, para ello pesar 0,40 gramos del estándar de β -caroteno y disolverlos en 75 mililitros de tetrahidrofurano y luego aforar a 500 mililitros con acetonitrilo.
- Soluciones de β -caroteno: en una concentración de 24, 16, 8 y 4,8 partes por millón, realizarlas con la solución madre y aforar con la fase móvil.

3.7.3.3. Determinación

- Disolver las 6 muestras resultado de la extracción del β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, con la fase móvil descrita anteriormente y aforar a 25 mililitros. Si las muestras se encuentran muy concentradas aforar a 50 mililitros.
- Filtrar las muestras y soluciones de β -caroteno con un microfiltro de 0,45 micrómetros especial para solventes HPLC, esto para eliminar cualquier partícula en suspensión y evitar que la columna del cromatógrafo se obstruya.
- Recoger aproximadamente 2 mililitros del filtrado en los viales, tapar los viales con sellos.
- Trasladar los viales al inyector del cromatógrafo e iniciar la determinación.

3.7.3.4. Cuantificación

La concentración de los carotenoides ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) se calcula usando los factores de respuesta en comparación con el β,β -caroteno o provitamina A, el cual es un estándar secundario trazado con la USP, mismo que se utilizó como patrón.

Se calculará el factor relativo de respuesta de la siguiente manera:

$$RF = \frac{\text{Área del pico de la solución del carotenoide} \left(\frac{1\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{\text{Área del pico de la solución de } \beta,\beta - \text{Caroteno} \left(\frac{1\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}$$

Para luego calcular la concentración de las muestras de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{Conc. del carotenoide} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) &= \frac{\text{Área del pico del carotenoide}}{\text{Área del } \beta,\beta - \text{Caroteno}} \times RF \times \text{factor de dilución} \\ &\times \frac{100}{\% \text{rec. del SI}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Conc. del carotenoide} \left(\frac{\mu\text{g}}{100\text{g}}\right) &= \frac{\text{Conc. de carotenoide} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{\text{conc. del alimento en el extracto} \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)} \times 100 \end{aligned}$$

3.7.4. Determinación de las condiciones para la cromatografía

Se realizaron pruebas para determinar la mejor separación en un tiempo adecuado de los carotenoides de interés, los parámetros a considerar son:

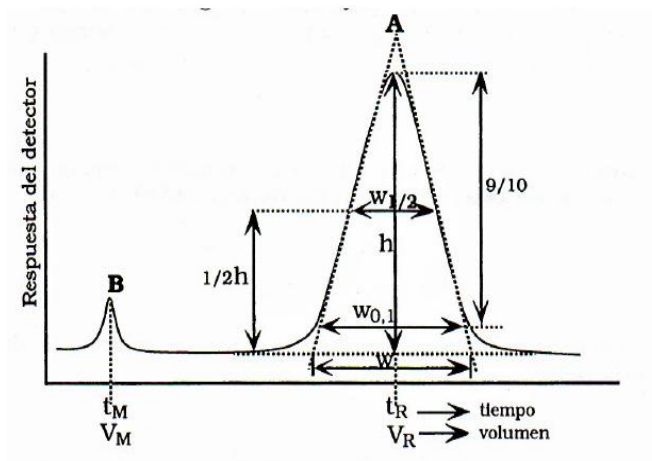
- La columna
- La composición de la fase móvil
- Longitud de onda de la detección
- Velocidad del flujo

3.7.5. Diseño teórico de una columna cromatográfica para identificación de β -caroteno

Para poder diseñar una columna cromatográfica se requiere de un cromatograma, que no es más que el conjunto de la curva Gaussiana (en forma de campana) que el detector muestra, después que los compuestos eluidos son trasportados por la fase móvil, y las señales que esto conlleva, las cuales se conocen como picos.

El cromatograma simula una gráfica con la descripción antes mencionada, en donde en el eje de las ordenadas se encuentra la señal del detector, mientras que en el eje de las abscisas el tiempo de retención.

Figura 6. **Cromatograma: parámetros característicos**



Fuente: GONZÁLEZ PEREZ, Claudio. *Introducción a los métodos cromatográficos*. p. 11.

Donde:

- t_M : tiempo muerto (tiempo requerido para que una especie no retenida alcance el detector)
- V_M : volumen muerto (volumen de fase móvil que se requiere para eluir una especie no retenida)
- t_R : tiempo de retención (tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el componente alcanza el detector)
- V_R : volumen de retención (volumen de fase móvil que se requiere para eluir un soluto de la columna cromatográfica)
- h : altura de pico; w : anchura de pico; $w_{1/2}$: anchura de pico a la semialtura
- $w_{0,1}$: anchura de pico a un décimo de la altura.

3.7.5.1. Determinación de la altura de la columna cromatográfica

Teniendo estos datos, aunados a los proporcionados (por Hart & Scott, 1998) en el método para determinación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se procederá a calcular la altura de la columna utilizando la ecuación 2 descrita en la sección del apéndice 1, referente a la muestra de cálculo.

3.7.5.2. Determinación del tiempo de retención ajustado

El tiempo de retención puede considerarse que está constituido por dos componentes. Uno de ellos es el ya mencionado tiempo muerto, que es el mismo para todos los analitos en un sistema cromatográfico determinado, y el otro es el denominado tiempo de retención ajustado, t'_R , que es el tiempo que realmente se invierte en la retención de un soluto por la fase estacionaria, el cual se calcula mediante la ecuación 3 del apéndice 1 en la sección de la muestra de cálculo.

3.7.5.3. Determinación del factor de retención

Las características de retención de los componentes suelen describirse en la práctica por el factor de retención o factor de capacidad, k' , el cual se calculará utilizando la ecuación 4 descrita en el apéndice 1 de la sección muestra de cálculo.

3.7.5.4. Determinación del número de platos teóricos

Si el resultado del pico muestra un comportamiento Gaussiano se utiliza la ecuación 5 descrita en la sección de muestra de cálculo del apéndice 1, para calcular el número de platos teóricos, N, en la columna.

El cálculo del número de platos cuando los picos son asimétricos, es más complicado que cuando son simétricos.

3.7.5.5. Determinación de la altura equivalente a un plato teórico

Es evidente que el número de platos teóricos será directamente proporcional a la longitud de la columna, de forma que si esta se representa por L, la denominada altura equivalente a un plato teórico, H, será calculada por medio de la ecuación 6 descrita en la sección de muestra de cálculo del apéndice 1.

3.8. Análisis estadístico

Contempla todo el diseño de la obtención de los datos experimentales de las diferentes etapas de la investigación, así como el análisis de resultados según bases estadísticas para verificar su validez.

Se analizó mediante un experimento de 2 factores y un análisis de varianza, el efecto que tiene la relación biomasa/solvente en el rendimiento extractivo y propiedades químicas para los extractos de la micro alga (*Spirulina spp.*).

- Análisis factorial

Tabla IV. Experimento de dos factores

A	B		Total	Media
	1	2		
Micro alga	Y_{111}	Y_{121}	$T_{1..}$	$X_{1..}$
	Y_{112}	Y_{122}		
	Y_{113}	Y_{123}		
Media	$X_{.1.}$	$X_{.2.}$		$X_{...}$

Fuente: RAYMOND, Walpole. *Probabilidad y estadística*. p. 32.

Donde:

$T_{i..}$ = suma de las observaciones para el i-ésimo nivel del factor A

$T_{.j.}$ = suma de las observaciones para el j-ésimo nivel del factor B

$T_{...}$ = suma de todas las abn observaciones

$X_{i..}$ = media de las observaciones para el i-ésimo nivel del factor A

$X_{.j.}$ = media de las observaciones para el j-ésimo nivel del factor B

$X_{...}$ = media de todas las abn observaciones.

A = carotenoides

B = relación biomasa solvente

- Análisis de Varianza (ANOVA)

Según los resultados del análisis de varianza (ANOVA), para evaluar el rechazo de cada una de las hipótesis estadísticas planteadas, se seguirá una distribución de Fisher con un nivel de confianza del 95 por ciento para encontrar la F crítica, y compararla con la F calculada, siguiendo el siguiente criterio:

- Si la F calculada es mayor a la F crítica, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.
- Si la F calculada es menor que la F crítica, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alternativa. .

Tabla V. **Varianza en un experimento de dos factores**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	f calculada
Efecto Principal A	SSA	$a - 1$	$S^2_1 = SSA / a - 1$	$f_1 = S^2_1 / S^2$
B	SSB	$b - 1$	$S^2_2 = SSB / b - 1$	$f_2 = S^2_2 / S^2$
Interacción de dos factores AB	SS(AB)	$(a-1)(b-1)$	$S^2_3 = \frac{SS(AB)}{(a-1)(b-1)}$	$f_3 = S^2_3 / S^2$
Error	SSE	$ab(n-1)$	$S^2 = SSE / ab(n-1)$	
Total	SST	$abn - 1$		

Fuente: RAYMOND, Walpole. *Probabilidad y estadística*. p. 34.

4. RESULTADOS

Resultados obtenidos para todos los cálculos y ensayos realizados para la extracción de β -caroteno y el diseño de una columna cromatográfica que pueda detectar la cantidad de este que hay presente en un extracto.

4.1. Diseño de la columna cromatográfica de identificación de β -caroteno

A continuación se presentan los resultados obtenidos de largo (L), número de platos teóricos (N) y altura de los platos teóricos (H) de la columna cromatográfica, determinados en base a los cromatogramas.

Tabla VI. Dimensiones de la columna cromatográfica

No. Extracción	L (mm)	N	H (mm)
1	101.05	284.69	0.35
2	101.05	305.79	0.33
3	157.35	152.78	1.03
4	154.46	150.31	1.03
5	155.19	90.36	1.72
6	99.61	244.41	0.41

Fuente: elaboración propia, datos del apéndice 2.

4.2. Rendimiento de extracción de β -caroteno

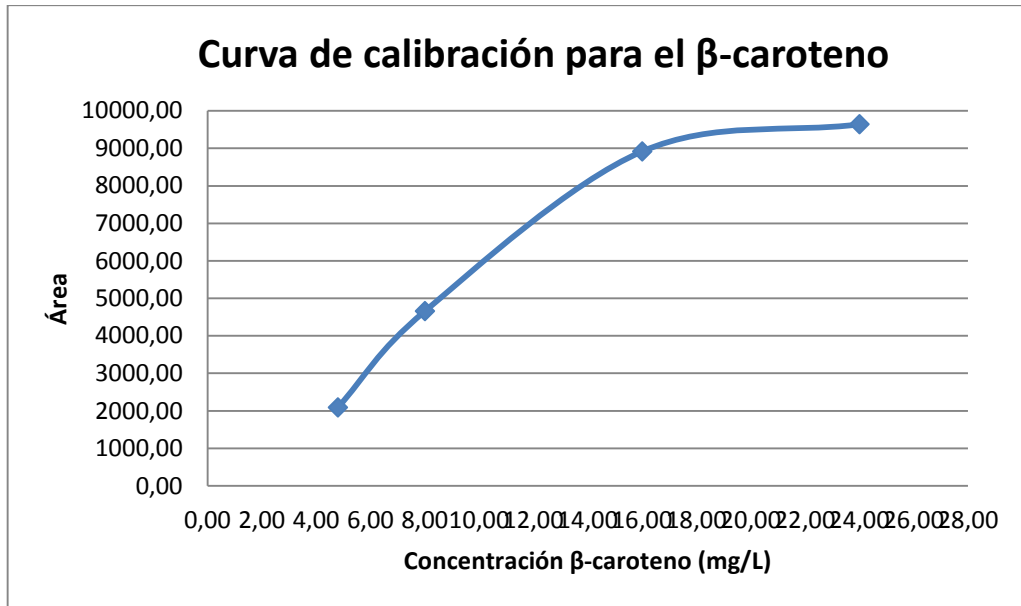
Los resultados obtenidos del rendimiento porcentual de β -caroteno se tomaron en base a los pesos finales de extracto, tomando en cuenta las diferentes relaciones biomasa/etanol utilizadas.

Tabla VII. **Rendimiento porcentual de la extracción de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, utilizando las relaciones biomasa/etanol 1:10 y 1:20**

Relación biomasa / etanol	Extracción No.	% Rendimiento	Media	Desviación Estándar
1:10	1	3.24	3.38	± 0.43
	2	2.93		
	3	3.96		
1:20	4	5.25	5.23	± 0.20
	5	4.97		
	6	5.47		

Fuente: elaboración propia, datos del apéndice 2.

Figura 7. **Curva de calibración para el β -caroteno resultado del análisis HPLC (tiempo de retención = 3,959 min) (longitud de onda = 454 nm)**



Fuente: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Universidad de Valle de Guatemala.

Tabla VIII. **Resultados de la curva de calibración para las diferentes soluciones de β -caroteno (4.8, 8.0, 16.0 y 24.0 mg/L)**

Soluciones β -caroteno	Concentración (mg/L)	Área
1	4.80	2092.04
2	8.00	4655.67
4	16.00	8916.91
3	24.00	9639.91

Fuente: figura 5, datos del apéndice 2.

Tabla IX. **Concentración de β -caroteno detectada en la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para los diferentes extractos (longitud de onda = 454 nm)**

Extracción No.	Concentración (ppm)
1	2.05570
2	3.65154
3	3.97597
4	2.08022
5	3.44962
6	4.06216

Fuente: elaboración propia, datos del apéndice 2.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla VII se muestran los resultados del rendimiento porcentual de la extracción de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, utilizando las relaciones biomasa/etanol de 1 gramo de biomasa por cada 10 mililitros de etanol y 1 gramo de biomasa por cada 20 mililitros de etanol; claramente se puede observar que el mayor porcentaje de rendimiento en la extracción se obtiene al utilizar la relación 1:20 biomasa/etanol, correspondiéndole específicamente el máximo rendimiento a la extracción 6, el cual fue de 5,47 por ciento $\pm 0,20$ por ciento.

En el apéndice 2, se encuentra el análisis estadístico realizado para la variable del rendimiento extractivo, en donde se evaluó si existe diferencia significativa entre el rendimiento extractivo en función a la cantidad de etanol utilizado como solvente extractivo. Al comparar el valor de la F calculada con el valor de la F crítica, se determinó con un nivel de confianza del 95 por ciento, que existe diferencia significativa del rendimiento extractivo en función de la cantidad de etanol usado como solvente extractivo. Es decir, el valor del rendimiento extractivo depende de la cantidad de etanol utilizado como solvente extractivo que se utilice en la metodología.

Debido a que se determina la existencia de diferencia significativa en el rendimiento de extracción a causa de la variación de la cantidad de solvente, se rechaza la hipótesis nula.

La tabla VI muestra las dimensiones teóricas de las columnas cromatográficas, en cuanto a: largo de la columna (L), número de platos

teóricos (N) y altura de los platos teóricos (H), para poder identificar las diferentes cantidades de β -caroteno obtenido en cada extracción. Se puede observar que el largo de la columna mayor es de 157,35 milímetros y corresponde a la extracción 3, así también teóricamente debería tener 152 platos y la altura de cada uno de ellos es de 1,03 milímetros. Para la extracción que mejor porcentaje de rendimiento mostró (extracción 6), las medidas de la columna cromatográfica para identificar cuantitativamente el β -caroteno presente son: el largo de la columna es de 99,61 milímetros, el número de platos es de 244 y la altura de cada plato sería de 0,41 milímetros.

En la figura 7 sobre la curva de calibración para el β -caroteno resultado del análisis HPLC con un tiempo de retención de 3,959 minutos y una longitud de onda de detección de 454 nanómetros, se observa que a medida que se aumenta la concentración del β -caroteno patrón se estabiliza el área de detección, y por lo tanto el tamaño de pico en la gráfica. El modelo matemático que utiliza la gráfica es $y = mx$, la cual corresponde a una línea recta, donde m es pendiente de la recta, x la concentración de β -caroteno y Y es el área. Para la curva de calibración en mención el modelo matemático es: $y = 458,43x$, con esta ecuación y las áreas de detección reportadas en los diferentes análisis HPLC fue posible calcular la concentración que cada extracto tiene de β -caroteno. La tabla VIII muestra los resultados de la curva de calibración.

Para poder determinar la concentración de β -caroteno en la *Spirulina spp.*, fue necesario elaborar una curva de calibración con un estándar de β -caroteno, el cual poseía una pureza de 100 por ciento. Las concentraciones elegidas para las soluciones de la curva fueron de 24, 16, 8 y 4,8 partes por millón. Para poder realizar las soluciones se eligió que fase móvil se utilizaría en la cromatografía, ya que con ésta se disolvería el estándar, inicialmente se determinó utilizar una combinación de tetrahidrofurano, acetonitrilo y agua

HPLC en una proporción 85:12,5:2,5 volumen/volumen. Pero al momento de adicionar el estándar, éste no se disolvió completamente y al pasar el tiempo se sedimentó una mayor cantidad del mismo, por lo que, la coloración y concentración variaba notablemente.

Debido a esos percances se decidió modificar los solventes de la fase móvil, realizando varias pruebas, se intentó disolver únicamente en tetrahidrofurano, en acetonitrilo, en una combinación de isopropanol/metanol, únicamente en isopropanol y únicamente en metanol.

Después de realizar todas estas diluciones se observó que la solución de β -caroteno se disolvió por completo, únicamente en tetrahidrofurano. Teniendo este dato, se procedió a realizar pruebas con la solución estándar y el tetrahidrofurano para determinar si el β -caroteno precipitaba al adicionar otro solvente, para ello se adicionó una cantidad conocida de acetonitrilo en otra solución de estándar, los resultados obtenidos fueron que la solución de estándar, tetrahidrofurano y agua presentaron un precipitado y la solución de estándar, tetrahidrofurano y acetonitrilo no presentó ningún precipitado, por lo que se concluyó que el agua fue el causante de que el β -caroteno no se disolviera inicialmente, este resultado es congruente ya que el β -caroteno es un pigmento liposoluble.

Ya teniendo la composición de la fase móvil, siendo esta tetrahidrofurano y acetonitrilo en una proporción 85:15 volumen/volumen, se procedió a realizar las soluciones estándares para la curva de calibración. Debido a que las concentraciones eran muy pequeñas, la cantidad de estándar de β -caroteno a disolver era de igual forma muy pequeña, por ello se decidió elaborar una solución madre de 80 partes por millón, para ello se pesaron 0,040 gramos de

estándar y se disolvieron en 75 mililitros de tetrahidrofurano, para luego aforar hasta 500 mililitros con acetonitrilo.

Con la solución madre se realizaron los demás estándares, para la solución de 24 partes por millón se tomo una alícuota de 15 mililitros y se aforo a 24 mililitros con fase móvil, para la solución de 16 partes por millón se tomo una alícuota de 10 mililitros y se aforó a 25 mililitros con la fase móvil de la misma manera para la solución de 8 partes por millón se tomó una alícuota de 5 mililitros y para la solución de 4,8 partes por millón se tomó una alícuota de 3 mililitros. Estas se almacenaron en frío, envueltas en aluminio y en lugar oscuro debido a que el β -caroteno se ve afectado por altas temperaturas convirtiéndose en su forma cis, en la cual es más susceptible a degradación. De igual forma es susceptible a la luz, esta induce su ruptura con la consiguiente formación de compuestos incoloros de bajo peso molecular.

Debido a que uno de los componentes de la mezcla ternaria es hexano, el siguiente paso antes de ingresar las muestras a la columna de HPLC fue evaporar el hexano de las muestras, ya que este compuesto no puede ser ingresado en la columna del cromatografo debido a que se utilizó una columna ODS hypersil, la cual únicamente utiliza compuestos polares. Este compuesto fue evaporado bajo nitrógeno gaseoso para evitar la oxidación del β -caroteno. Listas las muestras se procedió a disolverlas con la fase móvil, llevándolas a un volumen de 25 mililitros, si las muestras se encontraban muy concentradas se llevaron a un volumen de 50 mililitros para asegurar que se encontraran dentro de la curva de calibración.

Listas las muestras y los estándares de la curva de calibración se llevó a cabo su filtración con un microfiltro de 0,45 micrómetros especial para solventes HPLC, esto para eliminar cualquier partícula que se encuentre en suspensión

que pueda obstruir la columna del cromatografo. Del filtrado de cada muestra se tomó una alícuota de aproximadamente 2 mililitros la cual se traslado a un vial y este fue sellado. Por último se colocaron todos los viales en el inyector y se inicio la determinación. Es importante mencionar que se utilizó un detector ultravioleta-visible y se leyó en una longitud de onda de 454 nanómetros.

La tabla IX muestra los resultados de las concentraciones de β -caroteno obtenidas que se pueden observar en los cromatogramas adjuntos, apéndice 3, estos fueron los esperados, ya que para las muestras número uno se obtuvo una concentración de 2,0557 partes por millón, para la dos 3,6515 partes por millón y la tres 3,9759 partes por millón; las cuales se extrajeron con una relación biomasa/etanol de 1:10, mientras que para la muestra cuatro se obtuvo una concentración de 2,0802 partes por millón, para la cinco 3,4496 partes por millón y para la sexta 4,0621 partes por millón; las cuales se extrajeron con una relación biomasa/etanol de 1:20. En este caso tuvo mayor aporte para la extracción la relación biomasa/etanol de 1:20. Lo que lleva a concluir que el mejor método de extracción del β -caroteno presente en el alga *Spirulina spp.* sin que este sufra cambios es utilizando una velocidad de agitación elevada y una mayor cantidad de solventes extractores.

CONCLUSIONES

1. Ha sido factible la obtención de β -caroteno con diferentes relaciones biomasa/solvente utilizada.
2. Las dimensiones teóricas de la columna cromatográfica para identificar la mayor cantidad de β -caroteno presente en una extracción a escala laboratorio, de la microalga *Spirulina spp.*, utilizando una relación 1:20 de biomasa/solvente extractor, deben ser de: el largo de la columna 156 milímetros, el número de platos teóricos de 91 y la altura de cada plato de 1,72 milímetros.
3. Según los resultados obtenidos, el mayor porcentaje de rendimiento en la extracción a escala laboratorio, de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, se obtiene al utilizar una relación 1:20 de biomasa/etanol. Con lo que se determina que la muestra 6 brindó mayor cantidad de β -caroteno presente, correspondiéndole un valor de 406,216 gramos sobre litros o 4,0621 partes por millón. Mientras más grande sea la relación biomasa/solvente, mayor será el rendimiento de la extracción.
4. Con base en los resultados obtenidos, se confirma la presencia de β -caroteno en las diferentes extracciones realizadas a la micro alga *Spirulina spp.*, utilizando una mezcla ternaria biocompatible de etanol-agua-hexano, por lo tanto esta microalga si puede ser utilizada como una fuente natural de β -caroteno ya que su contenido es elevado.

5. Existe diferencia significativa en el porcentaje de rendimiento de extracción de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, debido a la relación biomasa solvente utilizada, en función a la concentración de etanol como solvente extractivo.

RECOMENDACIONES

1. Realizar extracciones de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, seleccionando otras variables independientes para comparar los resultados obtenidos con este estudio.
2. Realizar el escalamiento hacia un nivel planta piloto, de las extracciones de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, para comparar los resultados obtenidos en este estudio.
3. Evaluar otra mezcla ternaria biocompatible para realizar la extracción de β -caroteno a partir de la microalga *Spirulina spp.*, para comparar cual de los dos estudios es más factible económicamente hablando y llevarlo a cabo a nivel industrial.
4. Realizar un estudio para determinar si el β -caroteno obtenido en la presente investigación puede ser utilizado como un colorante natural en la industria de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. BONIFAZ PEÑA, Vania Elvira. *Selección de una metodología analítica para la determinación de provitamina A (beta-caroteno) en muestras de jugo de zanahoria (Daucus carota)*. Tesis a nivel licenciatura. Universidad de las Américas Puebla, Escuela de Ciencias, Departamento de Química y Biología. México. 2004. 27 p.
2. BOTTMINGEN RÜEGG, Rudolf. *Extraction process for beta-carotene*. Suiza, 1984. <<http://www.google.com/patents>> [consulta: 25 de junio de 2012].
3. CIFUENTES, Ana S.; GONZALEZ, Mariela; PARRA, Oscar; ZUÑIGA, Miguel. Cultivo de sepas de Spirulina spp. (Teodoresco 1905) en diferentes medios bajo condiciones de laboratorio. Tesis a nivel licenciatura. Universidad de Concepción, Casilla 2407, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Chile. 1996. 8 p.
4. FIKSELOVÁ, Martina; SILHÁR, Stanislav; MARECEK, Ján; FRANČÁKOVÁ, Helena. *Extraction of Carrot (Daucus carota L.) Carotenes under different conditions*. Tesis doctoral. Universidad Eslovaca de Agricultura, Facultad de Biotecnología y Ciencias de la Alimentación, República de Eslovaquia. 2008. 7 p.

5. IBÁÑEZ GONZÁLEZ, María José. *Obtención de ácido Eicosapentaenoico (20:5n3) a partir de la microalga Phaeodactylum tricornutum*. Tesis doctoral. Universidad de Almería, Facultad de Ciencias Experimentales, Departamento de Ingeniería Química, España. 1998. 481 p.
6. LAIDLER, Keith. *Fisicoquímica*. México: CECSA, 1997. 1 027 p. ISBN: 968 444 316 1.
7. MEYER R., Veronica. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 5a ed. Suiza: Wiley. 2010. 5 p. ISBN 0 470 68 217 5.
8. MOLINA GRIMA, Emilio; FERNANDEZ SEVILLA, José María. ACIEN FERNANDEZ, Francisco Gabri; CERON GARCIA, Maria del Carme. *Extracción de carotenoides mediante el uso de mezclas ternarias*. Universidad de Almería, España. 2007. 4 p.
9. PERRY, Robert. *Manual del ingeniero químico*. 7a ed. España: McGraw Hill. 2001. 3 166 p.
10. WARPOLE, Ronald; MYERS, Raymond; MYERS, Sharon. *Probabilidad y estadística para ingenieros*. Ricardo Cruz. [trad.] 6a ed. México: Prentice-Hall. 1999. 752 p. ISBN 970 17 0264 6.

APÉNDICES

MUESTRA DE CÁLCULO

Determinación de las propiedades físicas y químicas del β -caroteno presente en la microalga *Spirulina spp.*, así como las medidas teóricas para una columna cromatográfica de identificación de β -caroteno.

Apéndice 1. **Determinación de β -caroteno en el extracto alcohólico**

Para ello se procede a medir la absorvancia y el coeficiente de absorvancia que el equipo de medición muestre, para luego aplicar la siguiente ecuación:

$$\beta - \text{caroteno} = \frac{A \times d \times V}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times w} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

Donde:

β = beta-caroteno (g/mL)

A = absorvancia

d = dilución

$E_{1\text{cm}}$ = coeficiente de absorvancia

w = peso de la muestra (g)

V = volumen (mL)

Apéndice 2. **Determinación de la altura de la columna cromatográfica**

Para determinar la altura de una columna cromatográfica se necesita el cromatograma proporcionado por el análisis HPLC, en el cual se leen los valores que utiliza la siguiente ecuación:

$$L = \mu * t_M \quad \text{[Ecuación 2]}$$

Donde:

L = longitud de la columna (mm)

μ = velocidad de flujo lineal (mm/s)

t_M = tiempo muerto (s)

Apéndice 3. **Determinación del tiempo de retención ajustado**

Para determinar el tiempo de retención ajustado es necesario obtener en el cromatograma el tiempo de retención y el tiempo muerto para luego aplicar la siguiente ecuación:

$$t'_R = t_R - t_M \quad \text{[Ecuación 3]}$$

Donde:

t'_R = tiempo de retención ajustado (s)

t_M = tiempo muerto (s)

t_R = tiempo de retención (s)

Apéndice 4. **Determinación del factor de retención**

Para la determinación del factor de retención de la muestra en la columna cromatográfica se utiliza la siguiente ecuación:

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} \quad \text{[Ecuación 4]}$$

Donde:

t'_R = tiempo de retención ajustado (s)

t_M = tiempo muerto (s)

k' = factor de retención

Apéndice 5. **Determinación del número de platos teóricos**

Para determinar el número de platos teóricos que debe tener la columna cromatográfica se necesita el tiempo de retención ajustado calculado anteriormente y el valor de la anchura del pico a la semialtura que se encuentra en el cromatograma resultado del análisis, para posteriormente utilizar la siguiente ecuación:

$$N = 5.54 * \left(\frac{t'_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{[Ecuación 5]}$$

Donde:

t'_R = tiempo de retención ajustado (s)

$w_{1/2}$ = anchura de pico a la semialtura (s)

N = número de platos teóricos

Apéndice 6. **Determinación de la altura equivalente a un plato teórico**

Para determinar la altura equivalente a un plato teórico en una columna cromatográfica se utiliza la siguiente ecuación:

$$H = \frac{L}{N} \quad [\text{Ecuación 6}]$$

Donde:

L = longitud de la columna (mm)

N = número de platos teóricos

H = altura de un plato teórico (mm)

Apéndice 7. **Determinación del rendimiento de extracción de cada muestra**

Para determinar el rendimiento de extracción es necesario obtener los datos de la masa final obtenida de cada extracto, para luego utilizar la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left(\frac{W_f}{W_o} \right) * 100 \quad [\text{Ecuación 7}]$$

Donde:

W_f = peso final del caroteno (g)

W_o = peso inicial de biomasa seca (g)

DATOS ORIGINALES Y CALCULADOS

Apéndice 8. **Cantidad de masa obtenida de muestra luego de haber realizado la rota evaporación de la extracción**

Relación biomasa / etanol	Extracción No.	Masa del extracto (g)	Media
1:10	1	0,972	1,013
	2	0,879	
	3	1,188	
1:20	4	1,575	1,568
	5	1,491	
	6	1,639	

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 9. **Porcentaje de rendimiento en la extracción de β -caroteno para cada muestra**

No. De extracción	masa inicial (g)	masa final (g)	% rendimiento
1	30	0,972	3,24
2	30	0,879	2,93
3	30	1,188	3,96
4	30	1,575	5,25
5	30	1,491	4,97
6	30	1,641	5,47

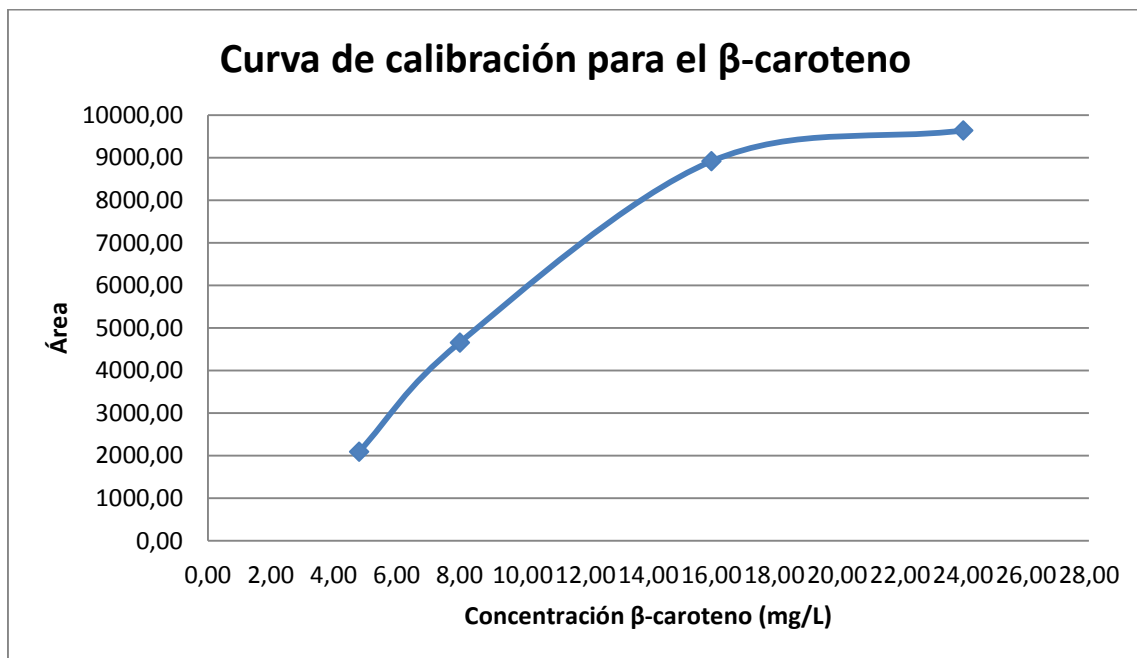
Fuente: elaboración propia, ecuación 7.

Apéndice 10. **Datos para la curva de calibración de la solución estándar de β -caroteno con las respectivas diluciones a las cuales fue sometida**

Soluciones β -caroteno	Concentración (mg/L)	Área	Conc/área
1	4,80	2092,04	0,0023
2	8,00	4655,67	0,0017
4	16,00	8916,91	0,0018
3	24,00	9639,91	0,0025

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 11. **Curva de calibración para el β -caroteno resultado del análisis HPLC (tiempo de retención = 3,959 minutos) (longitud de onda = 454 nm)**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 12. **Tiempos de retención y tiempos muertos resultados del análisis HPLC, para cada muestra evaluada**

Muestra	t. ret (min)	t. muerto (min)
1	3,909	1,40
2	3,926	1,40
3	3,913	2,18
4	3,911	2,14
5	3,927	2,15
6	3,904	1,38

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 13. **Medidas de largo, tiempos de retención, muertos, de retención ajustados y velocidad de flujo lineal en la inyección de cada muestra al HPLC**

Muestra No.	t. ret (s)	T. muerto (s)	μ (mm/s)	L (mm)	t' ret. (s)
1	234,54	84,0	1,2030	101,051	150,54
2	235,56	84,0	1,2030	101,051	151,56
3	234,78	130,8	1,2030	157,350	103,98
4	234,66	128,4	1,2030	154,463	106,26
5	235,62	129,0	1,2030	155,185	106,62
6	234,24	82,8	1,2030	99,607	151,44

Fuente: elaboración propia, ecuación 2 y ecuación 3.

Apéndice 14. **Factores de retención, número de platos teóricos y altura de cada plato teórico para cada muestra analizada por medio del HPLC**

Muestra No.	K'	W ½ (s)	N	H (mm)
1	1,792	21,0	284,692	0,355
2	1,804	20,4	305,787	0,330
3	0,795	19,8	152,784	1,030
4	0,828	20,4	150,310	1,028
5	0,827	26,4	90,361	1,717
6	1,829	22,8	244,411	0,408

Fuente: elaboración propia, ecuación 4, ecuación 5 y ecuación 6.

Apéndice 15. **Concentración de β-caroteno presente en cada extracción realizada**

Extracción No.	Concentración (ppm)
1	2,05571
2	3,65154
3	3,97597
4	2,08022
5	3,44962
6	4,06216

Fuente: elaboración propia, ecuación 1.

Apéndice 16. **Análisis de varianza entre la relación biomasa etanol y la concentración de β -caroteno obtenido**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Concentración (ppm)	6	19,27521	3,212535	0,83481

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,25	1	0,25	0,11	0,74	4,96
Dentro de los grupos	21,67	10	2,17			

Fuente: elaboración propia, con base en las técnicas cuantitativas de la investigación.

Apéndice 17. **Análisis de varianza entre el peso final obtenido de β -caroteno y el porcentaje de rendimiento en la extracción**

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
wf (g)	6	7,75	1,29	0,11
% ren	6	25,82	4,30	1,17

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	27,22	1	27,22	42,79	6,54233E-05	4,96
Dentro de los grupos	6,36	10	0,64			

Fuente: elaboración propia, con base en las técnicas cuantitativas de la investigación.

Apéndice 18. Descripción estadística para la cuantificación de β -caroteno

Concentración (ppm)

Media	3,213
Error típico	0,373
Mediana	3,551
Desviación estándar	0,914
Varianza de la muestra	0,835
Curtosis	-1,895
Coefficiente de asimetría	-0,725
Rango	2,006
Mínimo	2,056
Máximo	4,062
Suma	19,275
Nivel de confianza(95.0%)	0,959

Fuente: elaboración propia, con base en las técnicas cuantitativas de la investigación.

Apéndice 19. Descripción estadística para la relación 1:10 de biomasa/etanol

Relación 1:10 biomasa/etanol

Media	3,228
Error típico	0,593
Mediana	3,652
Desviación estándar	1,028
Varianza de la muestra	1,057
Coefficiente de asimetría	-1,540
Rango	1,920
Mínimo	2,056
Máximo	3,976
Suma	9,683
Cuenta	3,000
Nivel de confianza(95.0%)	2.553

Fuente: elaboración propia, con base en las técnicas cuantitativas de la investigación.

Apéndice 20. **Descripción estadística para la relación 1:20 de biomasa/etanol**

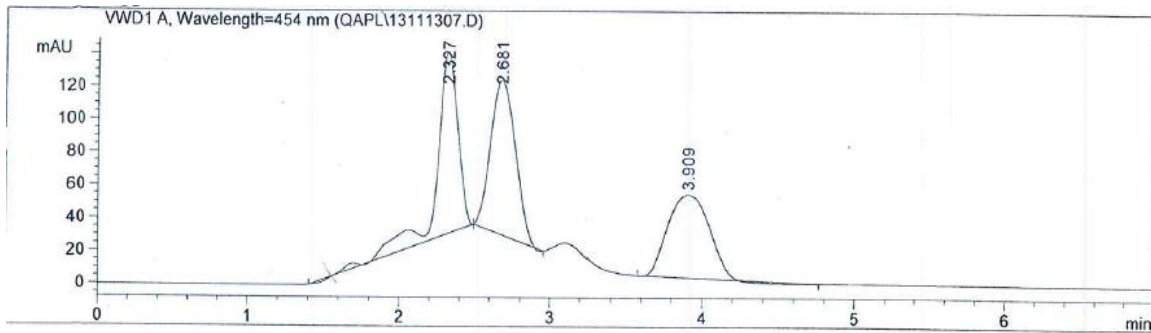
Relación 1:20 biomasa/etanol

Media	3,197
Error típico	0,586
Mediana	3,450
Desviación estándar	1,015
Varianza de la muestra	1,030
Coefficiente de asimetría	-1,050
Rango	1,982
Mínimo	2,080
Máximo	4,062
Suma	9,592
Cuenta	3,000
Nivel de confianza (95.0%)	2,521

Fuente: elaboración propia, con base en las técnicas cuantitativas de la investigación.

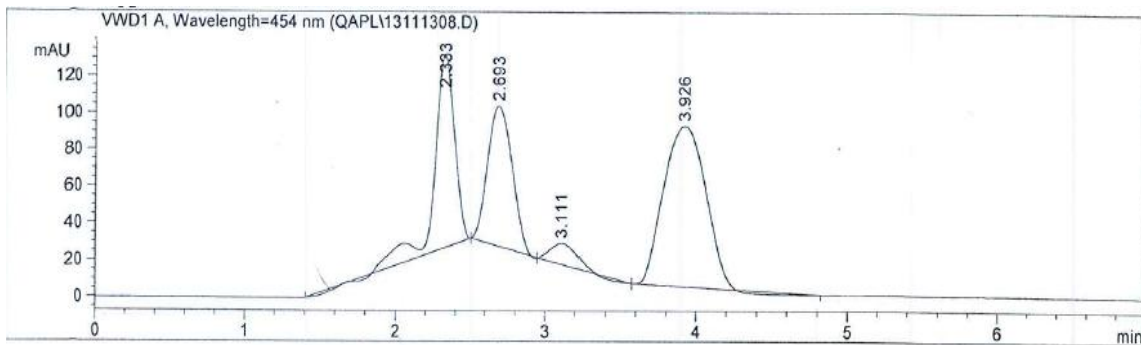
CROMATOGRAMAS RESULTADO DEL ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Apéndice 21. **Cromatograma correspondiente a la extracción número 1, utilizando una relación biomasa etanol 1:10**



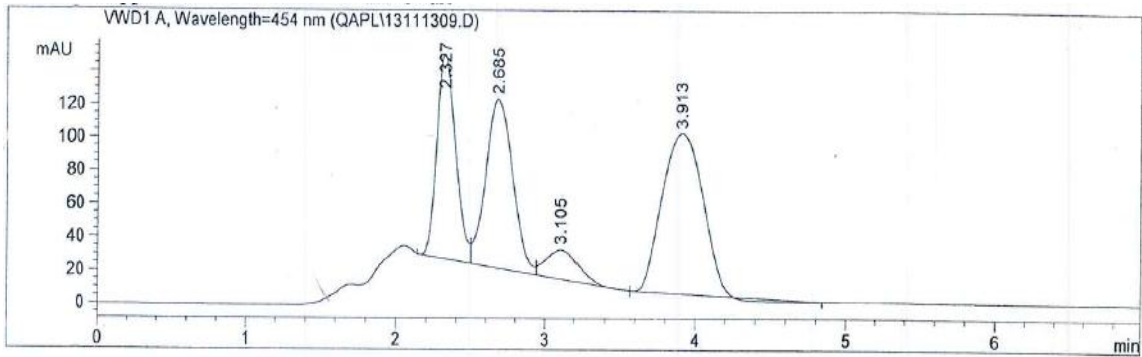
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 22. **Cromatograma correspondiente a la extracción número 2, utilizando una relación biomasa etanol 1:10**



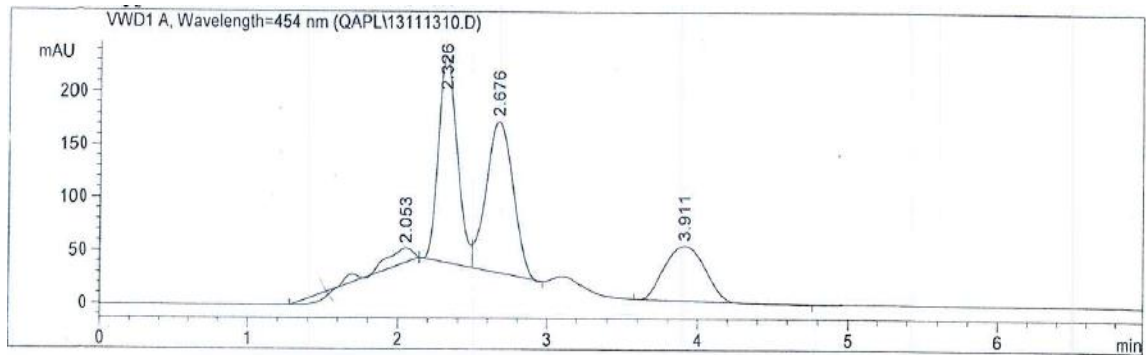
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 23. **Cromatograma correspondiente a la extracción número 3, utilizando una relación biomasa etanol 1:10**



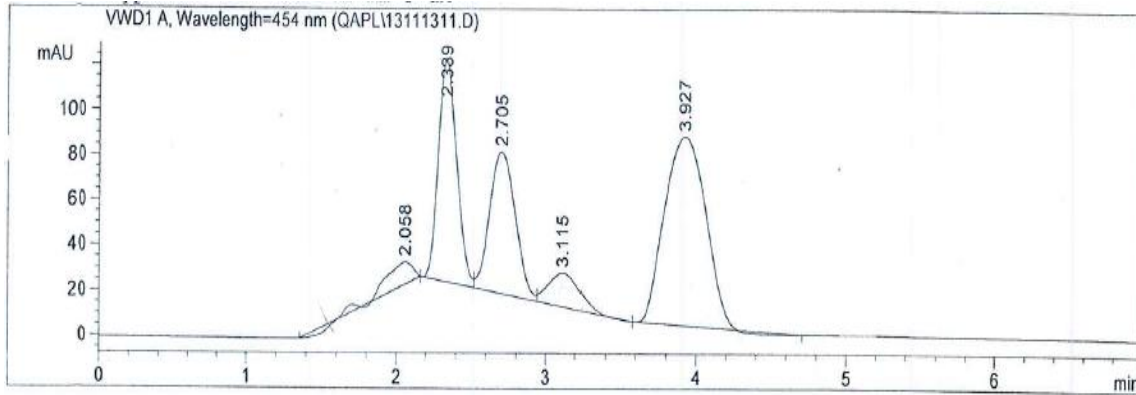
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 24. **Cromatograma correspondiente a la extracción número 4, utilizando una relación biomasa etanol 1:20**



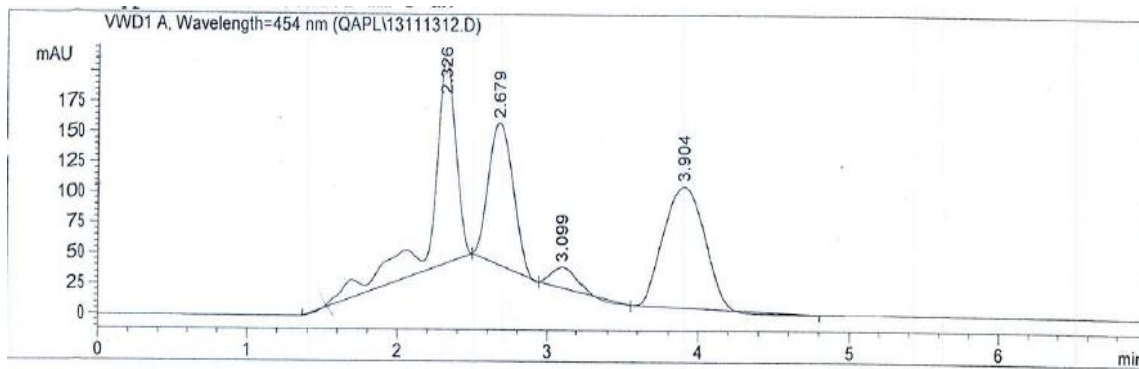
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 25. Cromatograma correspondiente a la extracción número 5, utilizando una relación biomasa etanol 1:20



Fuente: elaboración propia.

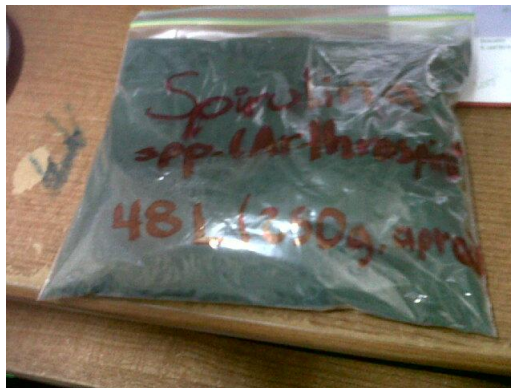
Apéndice 26. Cromatograma correspondiente a la extracción número 6, utilizando una relación biomasa etanol 1:20



Fuente: elaboración propia.

IMÁGENES DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE β -CAROTENO

Apéndice 27. **Obtención de la materia prima (*Spirulina spp.*)**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 28. **Preparación de la solución de KOH y Etanol**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 29. **Proceso de saponificación y homogenización de la microalga (*Spirulina spp.*) con la solución de KOH y Etanol**



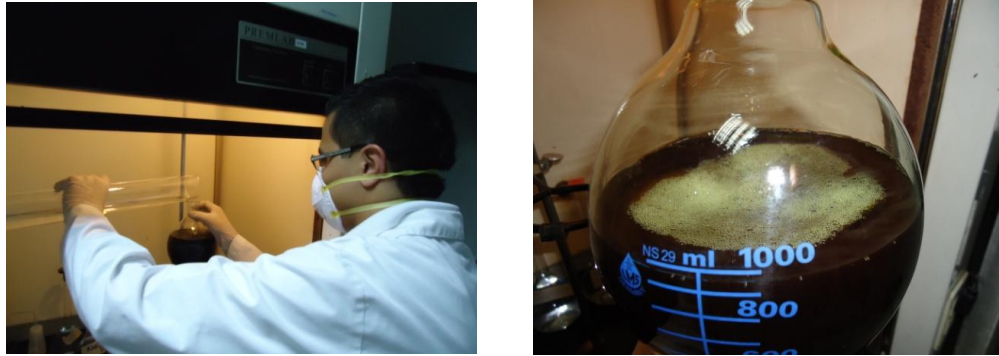
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 30. **Filtración de la mezcla saponificada**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 31. **Adición de agua para llevar la solución hidroalcohólica a una relación de 40% (w/w)**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 32. **Extracción a la solución hidroalcohólica para separar los insaponificables presentes en la microalga (*Spirulina spp.*)**



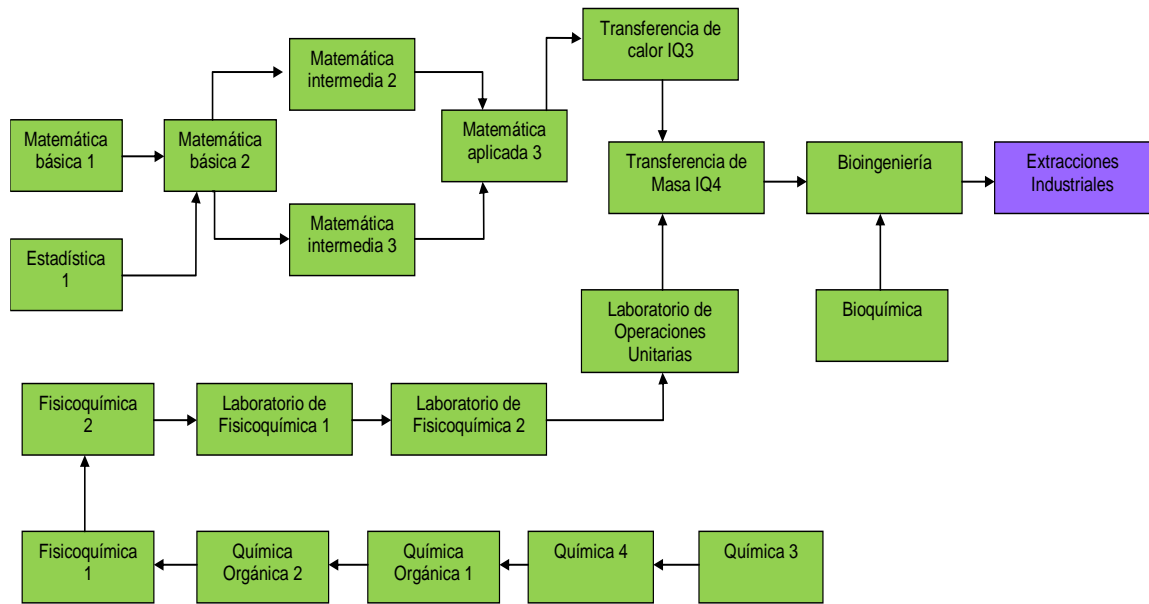
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 33. **Rotavaporación de los compuestos hexánicos de la microalga (*Spirulina spp.*)**



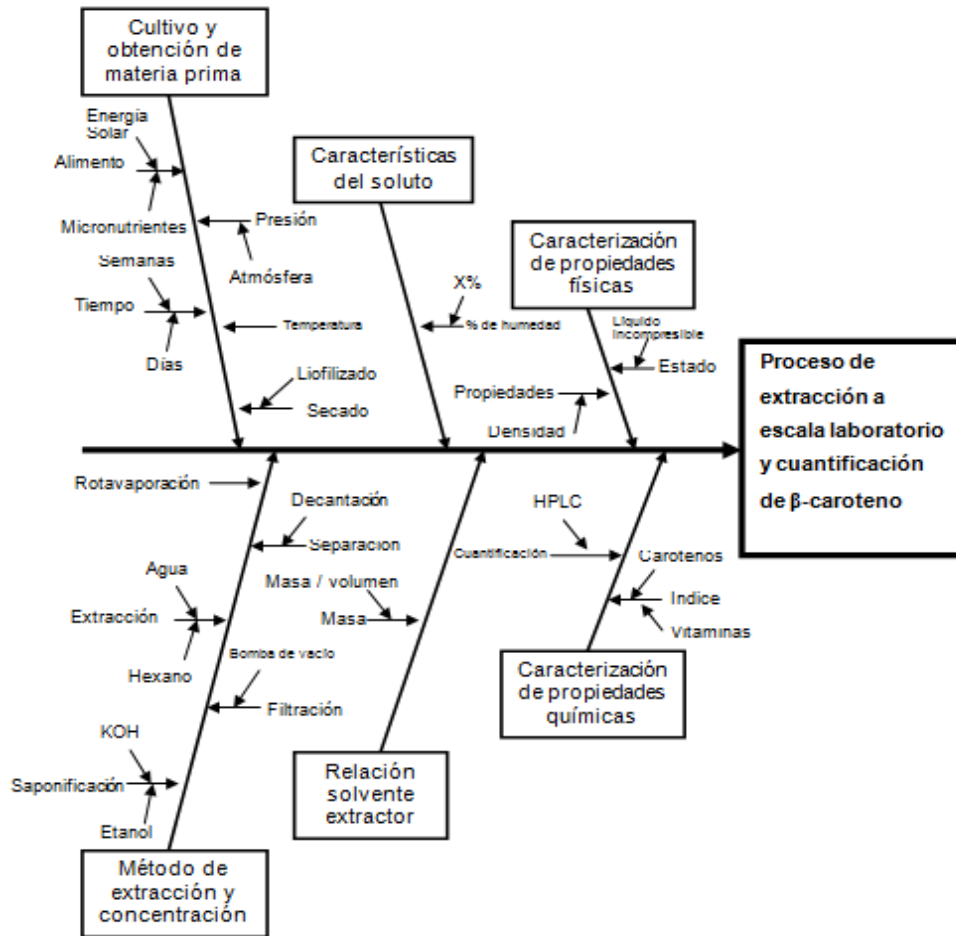
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 34. **Tabla de requisitos académicos**



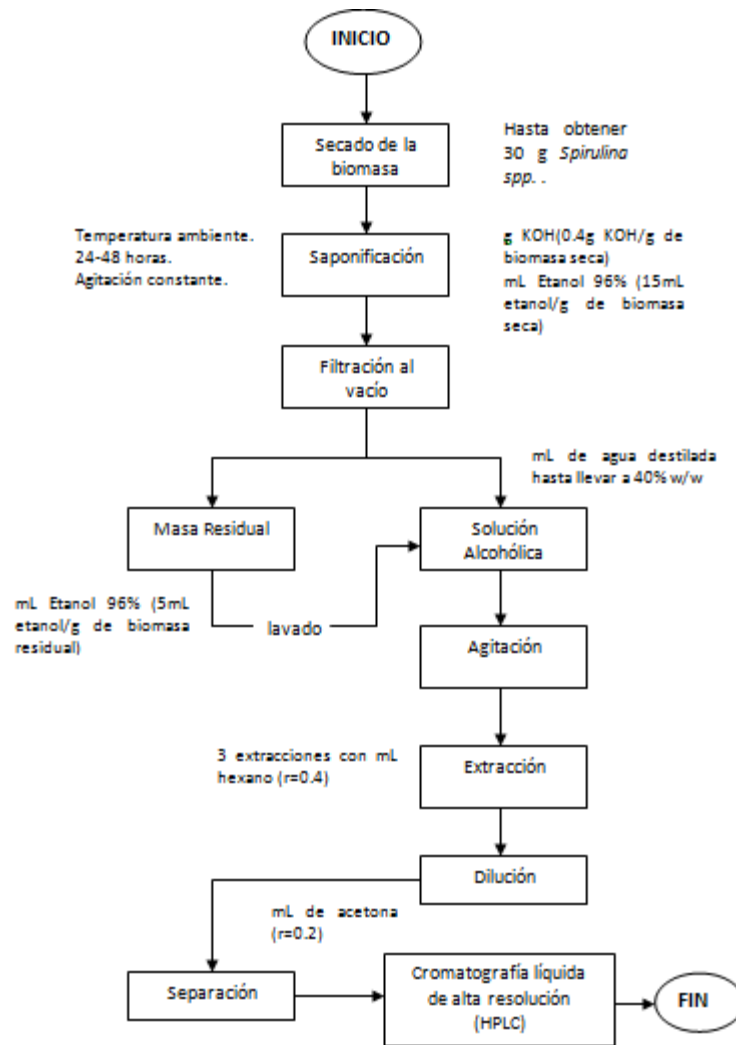
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 35. Diagrama de Ishikawa



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 36. **Procedimiento de la extracción de β -caroteno a partir de la microalga (*Spirulina spp*)**



Fuente: elaboración propia.

Apéndice 37.

Cromatograma de la tabla y curva de calibración

```

-----
                        Calibration Table
-----
Beta Caroteno
Calib. Data Modified :      11/14/2013 10:16:49 AM
Calculate             :      External Standard
Based on              :      Peak Area

Rel. Reference Window :      5.000 %
Abs. Reference Window :      0.000 min
Rel. Non-ref. Window  :      15.000 %
Abs. Non-ref. Window  :      0.000 min
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Uncalibrated Peaks    :      not reported
Partial Calibration    :      Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times:      No, only for identified peaks

Curve Type            :      Linear
Origin                :      Forced
Weight                :      Equal

Recalibration Settings:
Average Response      :      Average all calibrations
Average Retention Time:      Floating Average New 75%

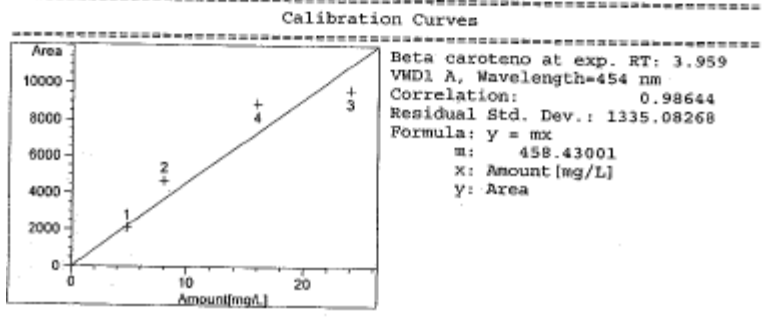
Calibration Report Options :
Printout of recalibrations within a sequence:
  Calibration Table after Recalibration
  Normal Report after Recalibration
If the sequence is done with bracketing:
  Results of first cycle (ending previous bracket)
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=454 nm

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [mg/L]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.959	1 1	4.80000	2092.04395	2.29441e-3	Beta caroteno
	2	8.00000	4655.67236	1.71833e-3	
	4	16.00000	8916.90820	1.79434e-3	
	3	24.00000	9639.90820	2.48965e-3	

```

-----
                        Peak Sum Table
-----
***No Entries in table***
  
```



Fuente: elaboración propia.

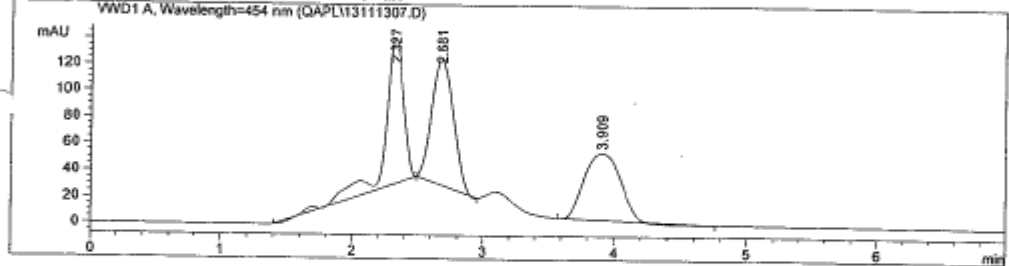
Apéndice 38.

Cromatograma del análisis de la muestra número 1

```

=====
Injection Date : 11/13/2013 2:46:21 PM      Seq. Line : 8
Sample Name    : M# 3                      Location  : Vial 8
Acq. Operator : AdEM                      Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2             Inj Volume : 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BCAROTE.M
Last changed   : 11/13/2013 2:03:21 PM by AdEM
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BCAROTE.M
Last changed   : 11/14/2013 10:22:39 AM by AdEM
                  (modified after loading)

Metodo para analisis carotenos.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN:THF (85:15)
Flujo 0.5 ml/min
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



```

=====
External Standard Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 11/14/2013 10:16:49 AM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=454 nm

RetTime Type   Area   Amt/Area   Amount   Grp   Name
 [min]  mAU   *s          [mg/L]
-----|-----|-----|-----|---|-----
  3.909 VP    942.39429  2.18136e-3  2.05570  Beta caroteno

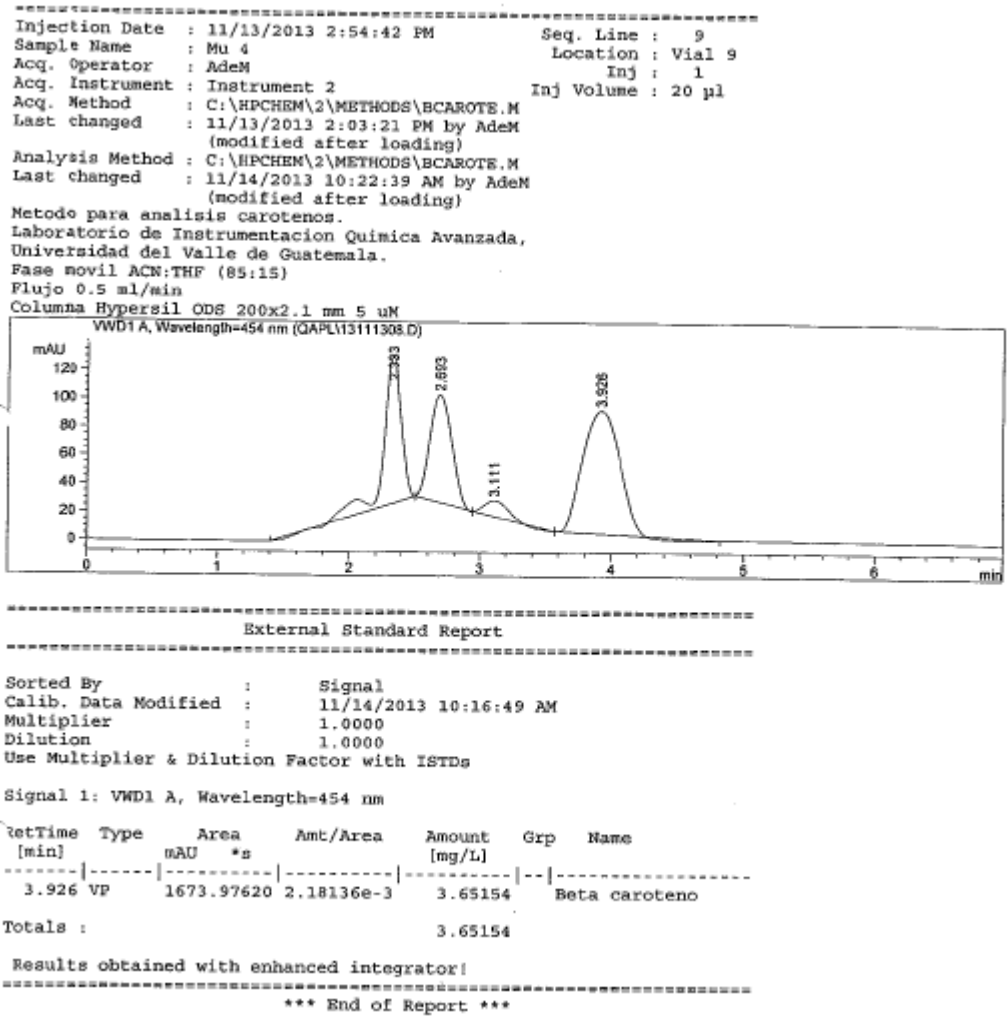
Totals :                               2.05570

Results obtained with enhanced integrator!
=====
*** End of Report ***
    
```

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 39.

Cromatograma del análisis de la muestra número 2



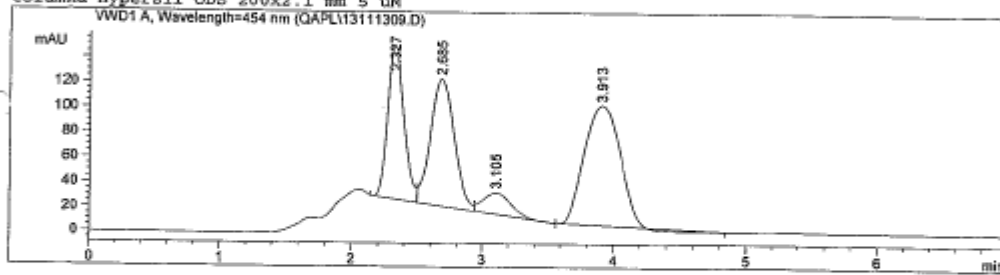
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 40.

Cromatograma del análisis de la muestra número 3

```

=====
Injection Date : 11/13/2013 3:03:04 PM          Seq. Line : 10
Sample Name   : Mu 5                          Location  : Vial 10
Acq. Operator : Adem                          Inj       : 1
Acq. Instrument : Instrument 2                 Inj Volume: 20 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\BCAROTE.M
Last changed  : 11/13/2013 2:03:21 PM by Adem
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BCAROTE.M
Last changed  : 11/14/2013 10:22:39 AM by Adem
                (modified after loading)
Metodo para analisis carotenos.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase movil ACN:THF (85:15)
Flujo 0.5 ml/min
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



```

=====
External Standard Report
=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 11/14/2013 10:16:49 AM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=454 nm

RetTime Type Area Amt/Area Amount Grp Name
[ min ] [ mAU *s ] [ ] [ mg/L ]
-----|-----|-----|-----|-----|
3.913 VP 1822.70544 2.18136e-3 3.97597 Beta caroteno

Totals : 3.97597

Results obtained with enhanced integrator!
=====
*** End of Report ***
    
```

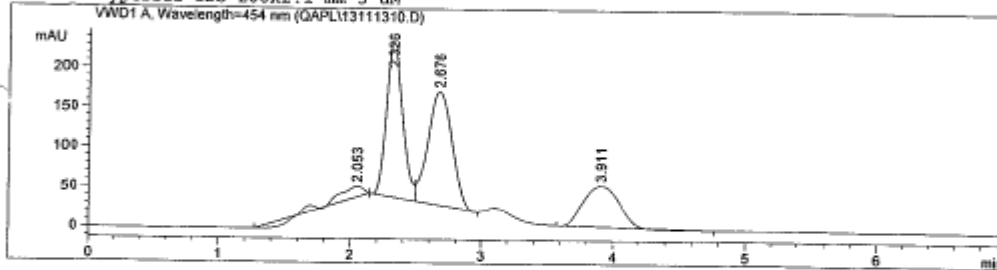
Fuente: elaboración propia.

Apéndice 41.

Cromatograma del análisis de la muestra número 4

```

-----
Injection Date : 11/13/2013 3:11:25 PM      Seq. Line : 11
Sample Name    : Mu 6                        Location  : Vial 11
Acq. Operator : AdeM                        Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume : 20 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\2\METHODS\BCAROTE.M
Last changed   : 11/13/2013 2:03:21 PM by AdeM
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BCAROTE.M
Last changed   : 11/14/2013 10:22:39 AM by AdeM
                (modified after loading)
Metodo para analisis carotenos.
Laboratorio de Instrumentacion Química Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase móvil ACN:THF (85:15)
Flujo 0.5 ml/min
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
    
```



External Standard Report

```

-----
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 11/14/2013 10:16:49 AM
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=454 nm

RetTime [min]	Type	Area mAU *s	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
3.911	VP	953.63562	2.18136e-3	2.08022		Beta caroteno

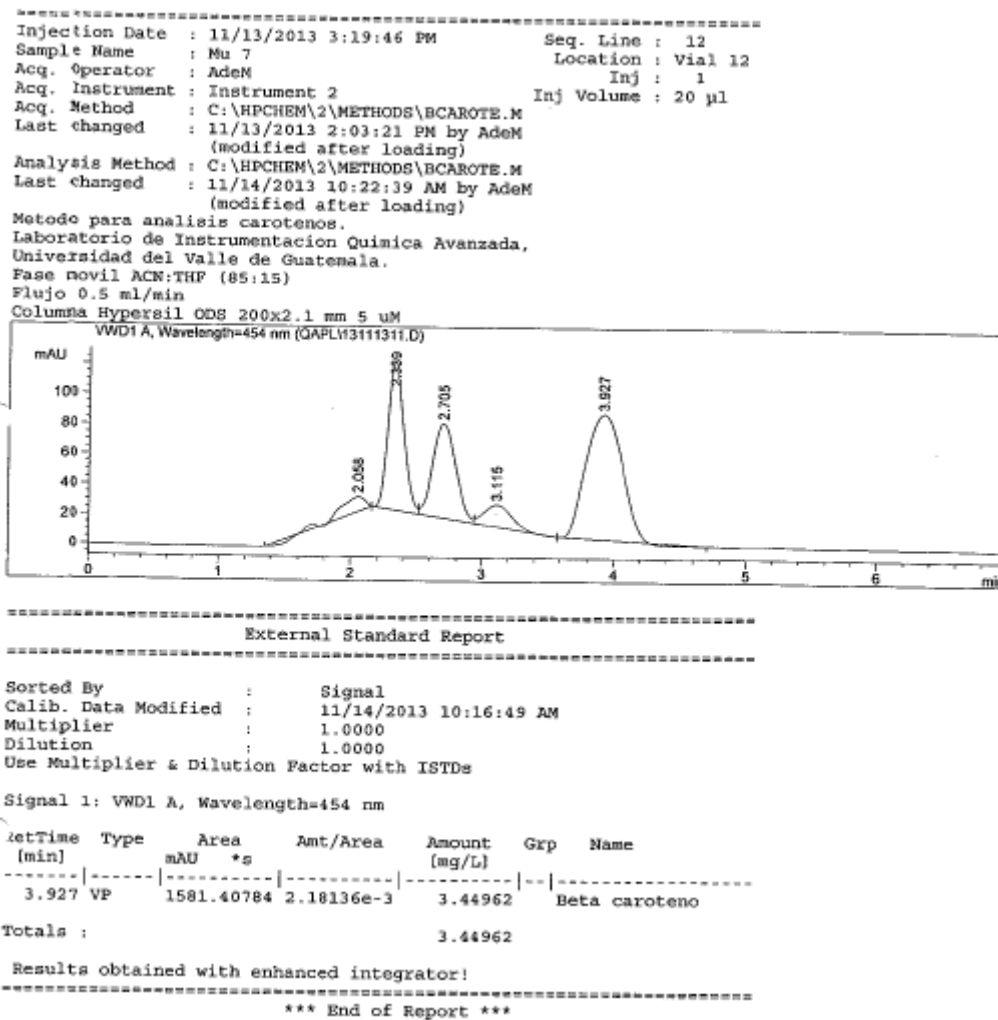
Totals : 2.08022

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 42. Cromatograma del análisis de la muestra número 5



Fuente: elaboración propia.

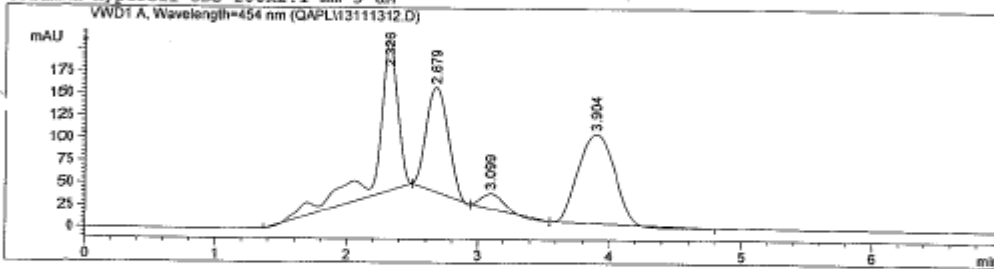
Apéndice 43.

Cromatograma del análisis de la muestra número 6

```

=====
Injection Date : 11/13/2013 3:28:05 PM      Seq. Line : 13
Sample Name   : Mu 8                        Location  : Vial 13
Acq. Operator : Aden                       Inj      : 1
Acq. Instrument : Instrument 2              Inj Volume : 20 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\2\METHODS\BCAROTE.M
Last changed  : 11/13/2013 2:03:21 PM by Aden
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\2\METHODS\BCAROTE.M
Last changed  : 11/14/2013 10:22:39 AM by Aden
                (modified after loading)

Metodo para analisis carotenos.
Laboratorio de Instrumentacion Quimica Avanzada,
Universidad del Valle de Guatemala.
Fase móvil ACN:THF (85:15)
Flujo 0.5 ml/min
Columna Hypersil ODS 200x2.1 mm 5 µm
=====
  
```



```

=====
External Standard Report
=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified : 11/14/2013 10:16:49 AM
Multiplier    :      1.0000
Dilution      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=454 nm

RetTime Type Area Amt/Area Amount Grp Name
[min] [mAU *s] [mg/L]
-----|-----|-----|-----|-----|-----
3.904 VP 1862.21436 2.18136e-3 4.06216 Beta caroteno

Totals : 4.06216

Results obtained with enhanced integrator!
=====
*** End of Report ***
  
```

Fuente: elaboración propia.