

T-15/17

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 17-junio 94
ENTRADA NUM. 916

UNIVERSIDAD DE GRANADA

T
11
138

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES DE ALMERÍA**

TESIS DOCTORAL

Extracción, concentración y purificación de ácidos grasos poliinsaturados *n3* a partir de aceite de hígado de bacalao y de la microalga marina *Isochrysis galbana*..

**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA**
Nº Documento 019676001
Nº Copia 121722563

Junio 1994

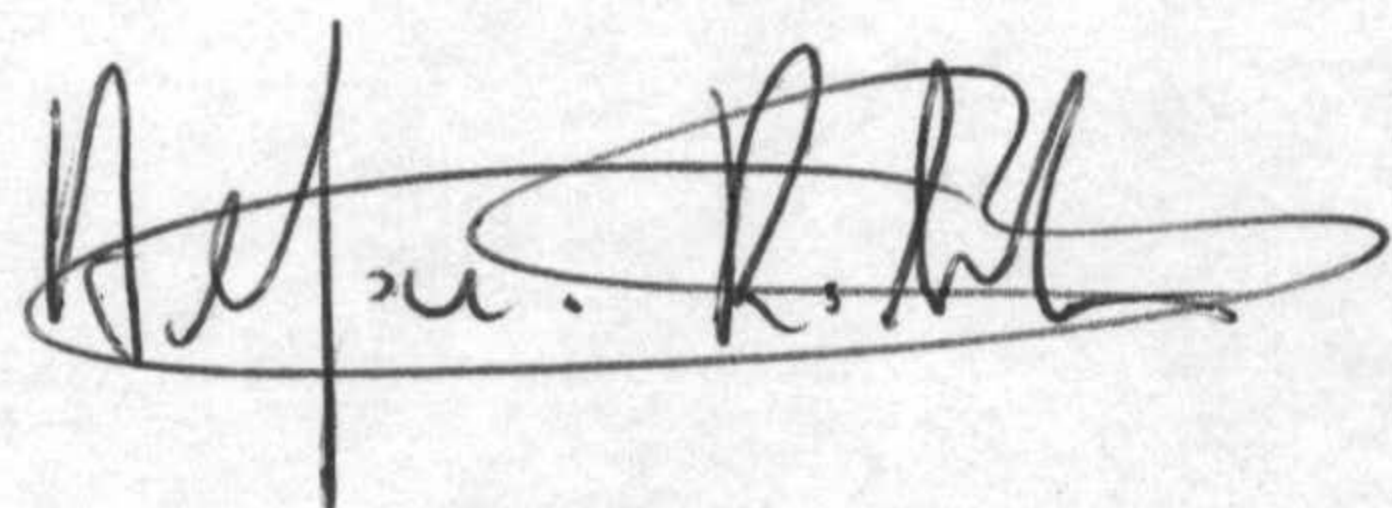
Antonio Giménez Giménez

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

EXTRACCION, CONCENTRACION Y PURIFICACION DE ACIDOS
GRASOS POLIINSATURADOS n3 A PARTIR DE ACEITE DE
HIGADO DE BACALAO Y DE LA MICROALGA MARINA
ISOCHRYSIS GALBANA

Trabajo presentado para optar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS (SECCION DE QUIMICAS)



Fds: Alfonso Robla Medina
Director de la Tesis



Fds: Emili Molina Guina
Director de la Tesis



Fdo.: Antonio Giménez Giménez
Ldo. en Ciencias (Sección de Químicas)
Granada, 17 de junio de 1994

4.-Resultados experimentales



4.- RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1.- EXTRACCION DE LIPIDOS Y ACIDOS GRASOS DE LA BIOMASA DE LA MICROALGA MARINA *Isochrysis galbana*

4.1.1.- Fraccionamiento de los lípidos en columna (aparatado 3.1.8)

Tabla 4.1.1.: Fraccionamiento en columna de los lípidos: Composición en ácidos grasos de la biomasa inicial y de las fracciones obtenidas con cada una de las fases móviles utilizadas. Porcentaje de ácidos grasos eluido con cada una de las fase móviles.

A.graso	Biomasa	Eluyentes			
		CHCl ₃	Acetona	MeOH	Sílica
14:0	10,1	5,7	7,3	6,6	6,0
16:0	20,3	22,1	19,9	24,9	27,0
16:1 n7	21,4	21,3	23,5	6,4	6,1
18:0	0,7	2,2	3,1	3,6	0,0
18:1 n9	1,4	3,2	4,4	7,0	4,6
18:1 n7	3,6	2,5	2,2	4,5	3,0
18:2 n6	0,9	2,3	2,7	2,7	0,0
18:3 n6	0,2	0,5	0,3	0,2	0,0
20:0	0,0	0,8	0,1	0,4	0,0
18:3 n3	1,2	1,7	1,6	2,7	0,0
20:1 n9	0,1	0,3	0,7	1,7	0,0
18:4 n3	6,4	5,3	7,4	1,5	0,0
20:3 n6	0,3	0,4	0,3	3,5	0,0
22:0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
20:4 n6	0,7	1,6	0,8	1,2	0,0
22:1 n11	0,1	0,0	0,2	0,7	0,0
22:1 n9	0,0	0,3	0,1	0,2	0,0
20:5 n3	22,6	21,8	20,5	16,1	37,4
24:0	0,1	0,0	0,0	0,6	0,0
22:4 n6	1,3	0,3	0,2	0,0	0,0
22:5 n3	0,2	0,3	0,1	0,0	0,0
22:6 n3	8,4	7,1	4,7	15,4	15,8
Suma	100,0	100,0	100,0	100,0	99,9
Saturad,	31,2	31,1	30,5	36,1	33,0
Monoins,	26,6	27,7	31,0	20,6	13,7
Pufas-n3	38,8	36,2	34,3	35,8	53,2
Pufas-n6	3,4	5,0	4,2	7,5	0,0
% a.grasos		26,0	59,6	12,6	1,8

4.1.2.- Extracción de lípidos de la biomasa microalgal

- Composiciones en ácidos grasos de los extractos y refinados determinados por CG .

Tabla 4.1.2. Composición en ácidos grasos de la biomasa inicial y del extracto y refinado obtenidos con el sistema extractante A:CHCl₃/MeOH/H₂O 1:2:0,8 v/v/v

A. Graso	Biomasa	Extracto	Refinado
14:0	10,10	10,10	18,10
16:0	20,30	18,30	25,10
16:1n7	21,40	19,70	19,50
18:0	0,65	0,50	1,30
18:1n9	1,40	1,60	1,50
18:1n7	3,60	3,80	3,00
18:2n6	0,90	0,90	0,80
18:3n6	0,20	0,20	0,30
20:0	0,00	0,10	0,00
18:3n3	1,20	1,20	1,20
20:1n9	0,15	0,00	0,10
18:4n3 (SA)	6,40	7,50	8,30
20:3n6	0,40	0,20	0,00
22:0	0,10	0,10	0,00
20:4n6	0,80	0,70	0,70
22:1n11	0,10	0,00	0,00
22:1n9	0,10	0,30	0,00
20:5n3 (EPA)	22,60	24,80	16,70
24:0	0,10	0,10	0,10
22:4n6	1,30	1,30	0,00
22:5n3	0,20	0,20	0,00
22:6n3 (DHA)	8,40	8,40	4,80
Total	100,00	100,00	100,00
Σ Saturados.	31,25	29,20	44,60
Σ Monoinsat.	26,75	25,40	24,10
Σ n3	38,80	42,10	31,00
Σ n6	3,60	3,30	1,80

Tabla 4.1.3. Composición en ácidos grasos de la biomasa inicial y del extracto y refinado obtenidos con el sistema extractante B: Hexano/EtOH(96%)/1:2,5 v/v

A. graso	Biomasa	Extracto	Refinado
14:0	10,10	6,90	16,50
16:0	20,30	20,20	23,20
16:1n7	21,40	25,70	16,30
18:0	0,65	1,00	0,70
18:1n9	1,40	1,40	0,50
18:1n7	3,60	3,90	4,20
18:2n6	0,90	0,40	1,60
18:3n6	0,20	0,20	0,30
20:0	0,00	0,40	1,00
18:3n3	1,20	1,10	1,30
20:1n9	0,15	0,00	0,00
18:4n3 (SA)	6,40	5,70	7,20
20:3n6	0,40	0,40	0,20
22:0	0,10	0,00	0,00
20:4n6	0,80	0,90	0,50
22:1n11	0,10	0,10	0,00
22:1n9	0,10	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	22,60	21,40	20,50
24:0	0,10	0,20	0,00
22:4n6	1,30	1,50	0,80
22:5n3	0,20	0,40	0,00
22:6n3 (DHA)	8,40	8,20	5,20
Total	100,00	100,00	100,00
Σ Saturados.	31,25	28,70	41,40
Σ Monoinsat.	26,75	31,10	21,00
Σ n3	38,80	36,80	34,20
Σ n6	3,60	3,40	3,40

Tabla 4.1.4. Composición en ácidos grasos de la biomasa inicial y del extracto y refinado obtenidos con el sistema extractante C: Hexano/EtOH(96%) 1:0,9 v/v

A. graso	Biomasa	Extracto	Refinado
14:0	10,10	6,40	6,50
16:0	20,30	19,20	13,10
16:1n7	21,40	27,00	20,70
18:0	0,65	0,90	1,30
18:1n9	1,40	1,40	1,00
18:1n7	3,60	3,00	3,10
18:2n6	0,90	0,30	0,70
18:3n6	0,20	0,10	0,30
20:0	0,00	0,00	0,00
18:3n3	1,20	1,10	1,50
20:1n9	0,15	0,20	0,60
18:4n3 (SA)	6,40	6,50	8,90
20:3n6	0,40	0,40	0,30
22:0	0,10	0,00	0,30
20:4n6	0,80	1,00	0,60
22:1n11	0,10	0,00	0,00
22:1n9	0,10	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	22,60	22,30	29,90
24:0	0,10	0,10	0,00
22:4n6	1,30	1,40	1,20
22:5n3	0,20	0,20	0,00
22:6n3 (DHA)	8,40	8,50	10,00
Total	100,00	100,00	100,00
Σ Saturados.	31,25	26,60	21,20
Σ Monoinsat.	26,75	31,60	25,40
Σ n3	38,80	38,60	50,30
Σ n6	3,60	3,20	3,10

Tabla 4.1.5. Composición en ácidos grasos de la biomasa inicial y del extracto obtenido con el sistema extractante D: n-butanol.

A.graso	Biomasa	Extracto
14:0	10,10	9,54
16:0	20,30	20,64
16:1n7	21,40	22,28
18:0	0,65	1,50
18:1n9	1,40	0,18
18:1n7	3,60	4,26
18:2n6	0,90	0,42
18:3n6	0,20	0,20
20:0	0,00	0,10
18:3n3	1,20	1,07
20:1n9	0,15	0,00
18:4n3 (SA)	6,40	6,41
20:3n6	0,40	0,17
22:0	0,10	0,02
20:4n6	0,80	0,66
22:1n11	0,10	1,86
22:1n9	0,10	0,00
20:5n3 (EPA)	22,60	21,58
24:0	0,10	0,16
22:4n6	1,30	1,46
22:5n3	0,20	0,24
22:6n3 (DHA)	8,40	7,25
Total	100,00	100,00
Σ Saturados.	31,25	31,97
Σ Monoinsat.	26,75	28,58
Σ n3	38,80	36,54
Σ n6	3,60	2,91

Tabla 4.1.6. Composición en ácidos grasos de la biomasa inicial y del extracto obtenido con el sistema extractante E: EtOH (96%)

A.graso	Biomasa	Extracto
14:0	10,10	9,88
16:0	20,30	20,32
16:1n7	21,40	23,19
18:0	0,65	0,79
18:1n9	1,40	0,98
18:1n7	3,60	2,98
18:2n6	0,90	1,44
18:3n6	0,20	0,35
20:0	0,00	0,11
18:3n3	1,20	1,07
20:1n9	0,15	0,20
18:4n3 (SA)	6,40	6,99
20:3n6	0,40	0,14
22:0	0,10	0,04
20:4n6	0,80	0,80
22:1n11	0,10	0,06
22:1n9	0,10	0,05
20:5n3 (EPA)	22,60	22,00
24:0	0,10	0,00
22:4n6	1,30	0,08
22:5n3	0,20	0,26
22:6n3 (DHA)	8,40	8,29
Total	100,00	100,00
Σ Saturados.	31,25	31,14
Σ Monoinsat.	26,75	27,46
Σ n3	38,80	38,60
Σ n6	3,60	2,81

Tabla 4.1.7. Composición en ácidos grasos de la biomasa inicial y del extracto obtenido con el sistema extractante F: EtOH (96%)/H₂O 1:1 v/v

A.graso	Biomasa	Extracto
14:0	10,10	10,77
16:0	20,30	18,82
16:1n7	21,40	26,29
18:0	0,65	0,91
18:1n9	1,40	1,10
18:1n7	3,60	2,54
18:2n6	0,90	0,51
18:3n6	0,20	0,29
20:0	0,00	0,00
18:3n3	1,20	1,19
20:1n9	0,15	0,00
18:4n3 (SA)	6,40	8,25
20:3n6	0,40	0,15
22:0	0,10	0,12
20:4n6	0,80	0,47
22:1n11	0,10	0,54
22:1n9	0,10	0,00
20:5n3 (EPA)	22,60	23,43
24:0	0,10	0,00
22:4n6	1,30	0,38
22:5n3	0,20	0,00
22:6n3 (DHA)	8,40	4,25
Total	100,00	100,00
Σ Saturados.	31,25	30,62
Σ Monoinsat.	26,75	30,46
Σ n3	38,80	37,12
Σ n6	3,60	1,80

Tabla 4.1.8. Composición en ácidos grasos de la biomasa inicial y del extracto obtenido con el sistema extractante G:Hexano/IsopropOH 1:1,5 v/v

A.graso	Biomasa	Extracto
14:0	10,10	8,55
16:0	20,30	19,70
16:1n7	21,40	24,99
18:0	0,65	0,98
18:1n9	1,40	0,00
18:1n7	3,60	4,00
18:2n6	0,90	0,51
18:3n6	0,20	0,20
20:0	0,00	0,15
18:3n3	1,20	1,25
20:1n9	0,15	0,00
18:4n3 (SA)	6,40	7,20
20:3n6	0,40	0,26
22:0	0,10	0,09
20:4n6	0,80	0,75
22:1n11	0,10	0,00
22:1n9	0,10	0,00
20:5n3 (EPA)	22,60	22,99
24:0	0,10	0,00
22:4n6	1,30	1,07
22:5n3	0,20	0,34
22:6n3 (DHA)	8,40	6,97
Total	100,00	100,00
Σ Saturados.	31,25	29,47
Σ Monoinsat.	26,75	28,99
Σ n3	38,80	38,76
Σ n6	3,60	2,79

- Rendimientos en la extracción de lípidos saponificables.

Tabla 4.1.9 .- Rendimientos obtenidos (expresados en tanto por cien de ácidos grasos saponificables) en la extracción de lípidos con cada uno de los sistemas extractantes utilizados. Ecuación [3.1.5]

Sistema extractante Tiempo y temperatura.	Rendimiento		
	Extracto	Refinado	Global
A: CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 1:2:0,8 v/v/v 1 hora, t ^a ambiente	92,9	0,9	93,8
B: Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v 1 hora, t ^a ambiente	52,2	27,4	79,6
C: Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v 1 hora, t ^a ambiente	49,5	8,3	57,8
D: n-Butanol 1 hora, t ^a ambiente	70,4	-	70,4
E: Etanol(96%) 1 hora, t ^a ambiente	84,4	-	84,4
F: Etanol(96%)/H ₂ O 1:1 v/v 1 hora, t ^a ambiente	63,3	-	63,3
G: Hexano/IsopropOH 1:2,5 v/v 1 hora, t ^a ambiente	66,0	-	66,0

4.1.3.- Extracción de ácidos grasos por saponificación directa de la biomasa

- Composiciones en ácidos grasos de los extractos determinados por CG.

Tabla 4.1.10: Composiciones en ácidos grasos de los extractos obtenidos con el sistema B (Hexano-Etanol 96% 1:2,5 v/v, KOH) en las dos condiciones experimentales utilizadas: B1, 1 h y 60°C; B2, 8 h y temperatura ambiente.

A.graso	Biomasa	Condiciones de operación	
		B1:1h,60C°	B2:8h,T ^a _{amb.}
14:0	10,1	10,7	10,4
16:0	20,3	21,0	16,7
16:1 n7	21,4	21,9	23,9
18:0	0,7	0,9	0,7
18:1 n9	1,4	1,1	0,0
18:1 n7	3,6	3,7	3,1
18:2 n6	0,9	0,3	1,5
18:3 n6	0,2	0,2	0,3
18:3 n3	1,2	1,2	1,3
18:4 n3 (SA)	6,4	6,5	7,6
20:0	0,0	0,2	0,1
20:1 n9	0,1	0,0	0,0
20:3 n6	0,3	0,3	0,2
20:4 n6	0,7	0,7	0,8
20:5 n3 (EPA)	22,6	22,3	23,5
22:0	0,0	0,0	0,0
22:1n11	0,1	0,0	0,0
22:1 n9	0,0	0,0	0,0
22:4 n6	1,3	1,1	1,7
22:5 n3	0,2	0,4	0,3
22:6 n3 (DHA)	8,4	7,5	8,0
24:0	0,1	0,0	0,0
Total	100,0	100,0	100,0
Σ Saturados.	31,2	32,7	27,9
Σ Monoinsat.	26,6	26,7	27,0
Σ n3	38,8	38,0	40,7
Σ n6	3,4	2,6	4,5

Tabla 4.1.11: Composiciones en ácidos grasos de los extractos obtenidos con el sistema C (Hexano-Etanol 96% 1:0,9 v/v, KOH) en las dos condiciones experimentales utilizadas: C1, 1 h y 60°C; C2, 8 h y temperatura ambiente

A.graso	Biomasa	Condiciones de operación	
		C1:1h,60C°	C2:8h,T ^a _{amb.}
14:0	10,1	9,2	13,1
16:0	20,3	17,2	16,5
16:1 n7	21,4	26,3	20,4
18:0	0,7	1,0	3,0
18:1 n9	1,4	2,8	0,0
18:1 n7	3,6	0,3	5,0
18:2 n6	0,9	2,8	0,0
18:3 n6	0,2	0,8	0,6
18:3 n3	1,2	1,2	1,8
18:4 n3 (SA)	6,4	8,0	9,1
20:0	0,0	0,1	0,0
20:1 n9	0,1	0,3	0,5
20:3 n6	0,3	0,1	0,2
20:4 n6	0,7	0,5	0,9
20:5 n3 (EPA)	22,6	22,1	22,0
22:0	0,0	0,0	0,0
22:1n11	0,1	0,0	0,0
22:1 n9	0,0	0,0	0,0
22:4 n6	1,3	0,2	1,0
22:5 n3	0,2	0,1	0,0
22:6 n3 (DHA)	8,4	6,9	5,9
24:0	0,1	0,1	0,0
Total	100,0	100,0	100,0
Σ Saturados.	31,2	27,6	32,6
Σ Monoinsat.	26,6	29,6	25,9
Σ n3	38,8	38,3	38,8
Σ n6	3,4	4,4	2,7

Tabla 4.1.12. : Composiciones en ácidos grasos de los extractos obtenidos con el sistema D (n-ButOH/KOH) en las dos condiciones experimentales utilizadas: D1, 1 h y 60°C; D2, 8 h y temperatura ambiente.

A.graso	Biomasa	Condiciones de operación	
		D1: 1h,60°	D2:8h,T ^a _{amb}
14:0	10,1	11,9	-
16:0	20,3	15,1	-
16:1 n7	21,4	18,0	-
18:0	0,7	2,5	-
18:1 n9	1,4	0,0	-
18:1 n7	3,6	7,8	-
18:2 n6	0,9	0,0	-
18:3 n6	0,2	0,0	-
18:3 n3	1,2	0,9	-
18:4 n3 (SA)	6,4	12,1	-
20:0	0,0	0,0	-
20:1 n9	0,1	2,3	-
20:3 n6	0,3	3,7	-
20:4 n6	0,7	0,0	-
20:5 n3 (EPA)	22,6	18,8	-
22:0	0,0	0,0	-
22:1n11	0,1	1,2	-
22:1 n9	0,0	0,0	-
22:4 n6	1,3	0,9	-
22:5 n3	0,2	0,0	-
22:6 n3 (DHA)	8,4	4,9	-
24:0	0,1	0,0	-
Total	100,0	100,0	-
Σ Saturados.	31,2	29,5	-
Σ Monoinsat.	26,6	29,3	-
Σ n3	38,8	36,7	-
Σ n6	3,4	4,6	-

Tabla 4.1.13: Composiciones en ácidos grasos de los extractos obtenidos con el sistema E (EtOH 96%/KOH) en las dos condiciones experimentales utilizadas: E1, 1 h y 60°C; E2, 8 h y temperatura ambiente:

A.Graso	Biomasa	Condiciones de operación	
		E1: 1h,60°C	E2: 8h,T ^a _{amb}
14:0	10,1	8,5	11,0
16:0	20,3	20,3	21,4
16:1 n7	21,4	21,4	22,2
18:0	0,7	0,8	0,6
18:1 n9	1,4	1,7	1,6
18:1 n7	3,6	4,0	3,8
18:2 n6	0,9	0,6	1,1
18:3 n6	0,2	0,6	0,3
18:3 n3	1,2	1,3	1,2
18:4 n3 (SA)	6,4	6,5	6,2
20:0	0,0	0,8	0,2
20:1 n9	0,1	0,3	0,4
20:3 n6	0,3	0,4	0,2
20:4 n6	0,7	0,0	0,7
20:5 n3 (EPA)	22,6	22,7	20,8
22:0	0,0	0,5	0,1
22:1n11	0,1	0,0	0,0
22:1 n9	0,0	0,4	0,1
22:4 n6	1,3	1,2	0,6
22:5 n3	0,2	0,2	0,1
22:6 n3 (DHA)	8,4	7,8	7,3
24:0	0,1	0,0	0,1
Total	100,0	100,0	100,0
Σ Saturados.	31,2	30,9	33,3
Σ Monoinsat.	26,6	27,8	28,1
Σ n3	38,8	38,4	35,6
Σ n6	3,4	2,9	3,0

Tabla 4.1.14: Composiciones en ácidos grasos de los extractos obtenidos con el sistema F (EtOH 96% /H₂O 1:1 v/v/KOH) en las dos condiciones experimentales utilizadas: F1, 1 h y 60°C; F2, 8 h y temperatura ambiente

A.Graso	Biomasa	Condiciones de operación	
		F1:1h,60°	F2:8h,T ^a _{amb}
14:0	10,1	12,1	12,3
16:0	20,3	16,9	15,6
16:1 n7	21,4	22,9	22,3
18:0	0,7	0,8	0,9
18:1 n9	1,4	1,1	1,2
18:1 n7	3,6	2,8	2,8
18:2 n6	0,9	0,9	0,8
18:3 n6	0,2	0,5	0,6
18:3 n3	1,2	1,2	1,3
18:4 n3 (SA)	6,4	7,9	8,2
20:0	0,0	0,3	0,3
20:1 n9	0,1	0,2	0,3
20:3 n6	0,3	0,3	0,3
20:4 n6	0,7	1,1	0,8
20:5 n3 (EPA)	22,6	22,5	22,2
22:0	0,0	0,0	0,3
22:1n11	0,1	0,0	0,0
22:1 n9	0,0	0,0	0,0
22:4 n6	1,3	1,4	1,0
22:5 n3	0,2	0,0	2,0
22:6 n3 (DHA)	8,4	7,0	6,9
24:0	0,1	0,0	0,0
Total	100,0	100,0	100,0
Σ Saturados.	31,2	30,2	29,4
Σ Monoinsat.	26,6	27,0	26,6
Σ n3	38,8	38,7	40,6
Σ n6	3,4	4,2	4,2

Tabla 4.1.15 : Composiciones en ácidos grasos de los extractos obtenidos con el sistema G (Hex/IsopropOH 1:1,5 v/v/KOH) en las dos condiciones experimentales utilizadas: G1, 1 h y 60°C; G2, 8 h y temperatura ambiente

A.Graso	Biomasa	Condiciones de operación	
		G1:1h,60°	G2:8h,T ^a _{amb}
14:0	10,1	12,1	12,1
16:0	20,3	17,7	13,7
16:1 n7	21,4	21,7	24,7
18:0	0,7	1,7	0,9
18:1 n9	1,4	1,0	0,0
18:1 n7	3,6	3,3	2,5
18:2 n6	0,9	2,0	1,4
18:3 n6	0,2	0,4	0,6
18:3 n3	1,2	2,2	1,4
18:4 n3 (SA)	6,4	7,8	9,1
20:0	0,0	0,2	0,0
20:1 n9	0,1	0,2	0,2
20:3 n6	0,3	0,1	0,1
20:4 n6	0,7	0,7	0,8
20:5 n3 (EPA)	22,6	20,9	24,6
22:0	0,0	0,0	0,0
22:1n11	0,1	0,2	0,0
22:1 n9	0,0	0,0	0,2
22:4 n6	1,3	0,0	0,7
22:5 n3	0,2	0,2	0,2
22:6 n3 (DHA)	8,4	7,0	6,8
24:0	0,1	0,6	0,0
Total	100,0	100,0	100,0
Σ Saturados.	31,2	32,2	26,7
Σ Monoinsat.	26,6	26,4	27,6
Σ n3	38,8	38,1	42,0
Σ n6	3,4	3,5	3,2

- Rendimientos en la extracción de ácidos grasos.

Tabla 4.1.16: Rendimientos obtenidos (en tanto por cien de ácidos grasos saponificables) en la extracción de ácidos grasos libres por saponificación directa de la biomasa con cada uno de los sistemas utilizados y en las dos condiciones experimentales empleadas con cada uno de ellos

Sistema de extracción/saponificación	Condiciones de operación	
	1 hora, 60°C	8 h, tamb
B. 8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v	81,0	75
C. 8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v	48,0	47,1
D. 8 g KOH / 380 ml n-butanol	9,0	-
E. 8 g KOH / 380 ml Etanol(96%)	79,8	79,2
F. 8 g KOH / 380 ml Etanol(96%)/H2O 1:1 v/v	46,5	45,5
G. 8 g KOH / 380 ml Hexano/Isopropanol)1:1,5 v/v	62	61,1

4.2.- OBTENCION DE CONCENTRADOS DE PUFAs POR EL METODO DE LOS COMPUESTOS DE INCLUSIÓN DE UREA

4.2.1.- Obtención de concentrados de PUFAs de aceite de hígado de bacalao

Tabla 4.2.1.- Composición en ácidos grasos (en tanto por cien en peso) de los aceites de hígado de bacalao empleados.

A.Graso	Aceite				
	A	B	C	D	E
14:0	4,20	5,06	4,11	4,12	3,83
16:0	10,63	12,20	10,53	10,55	10,64
16:1n7	7,79	5,61	7,54	7,18	6,97
18:0	2,57	2,57	2,59	2,60	2,73
18:1n9	16,95	22,49	16,72	17,68	14,48
18:1n7	4,64	3,18	4,99	4,01	4,90
18:2n6	1,47	7,60	1,46	1,45	1,41
18:3n6	0,15	0,14	0,15	0,14	0,17
20:0	0,17	0,31	0,17	0,17	0,00
18:3n3	0,78	3,55	0,78	0,80	0,72
20:1n9	10,76	3,81	10,63	10,87	9,40
18:4n3 (SA)	2,36	2,35	2,35	2,39	2,25
20:3n6	0,06	0,10	0,07	0,08	0,00
22:0	0,07	0,00	0,07	0,06	0,00
20:4n6	0,52	0,68	0,53	0,53	0,47
22:1n11	8,25	2,46	8,26	8,35	7,57
22:1n9	0,11	0,59	0,10	0,10	0,91
20:5n3 (EPA)	9,36	10,90	9,30	9,43	8,89
24:0	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00
22:4n6	0,51	0,47	0,50	0,51	0,50
22:5n3	1,17	1,55	1,18	1,17	1,13
22:6n3 (DHA)	10,98	5,90	10,96	11,30	10,72
Σ n.i.	6,50	8,48	7,01	6,33	12,31
Σ Saturados.	17,64	20,14	17,47	17,68	17,20
Σ Monoinsat.	48,50	38,14	48,24	48,19	44,23
Σ Sat,Monoins.	66,14	58,28	65,71	65,87	61,43
Σ SA,EPA,DHA	22,70	19,15	22,61	23,12	21,86
Σ n3	24,65	24,25	24,57	25,09	23,71
Σ n6	2,71	8,99	2,71	2,71	2,55

- Cristalización de los compuestos de inclusión en una sola etapa utilizando como disolvente metanol.

Tabla 4.2.2.- Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -36°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. (*) Aceite de partida empleado.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1	2:1(A*)	3:1(B*)	4:1(A*)
14:0		1,06	1,50	2,92
16:0		0,42	1,22	1,50
16:1n7		6,70	6,85	9,91
18:0		0,67	0,59	0,57
18:1n9		3,70	14,54	22,07
18:1n7		1,63	4,26	5,95
18:2n6		3,01	1,36	2,03
18:3n6		0,38	0,24	0,39
20:0		0,00	0,00	0,00
18:3n3		1,69	0,71	0,16
20:1n9		1,32	4,90	1,06
18:4n3 (SA)		6,32	9,34	8,29
20:3n6		0,29	0,39	0,13
22:0		0,00	0,00	0,00
20:4n6		1,31	0,52	0,76
22:1n11		0,66	2,30	3,29
22:1n9		0,00	0,53	0,00
20:5n3 (EPA)		24,03	12,17	12,46
24:0		0,00	0,00	0,00
22:4n6		1,42	0,89	0,77
22:5n3		2,92	1,20	1,60
22:6n3 (DHA)		29,94	22,90	14,88
Σ n.i.		12,53	13,59	11,26
Σ Saturados.		2,15	3,31	4,99
Σ Monoinsat.		14,01	33,38	42,28
Σ Sat,Monoins.		16,16	36,69	47,27
Σ SA,EPA,DHA		60,29	44,41	35,63
Σ n3		64,90	46,32	37,39
Σ n6		6,41	3,40	4,08

Tabla 4.2.3. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -28°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. (*) Aceite de partida empleado.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1	2:1(D*)	3:1(E*)	4:1(D*)
14:0		0,81	1,10	3,67
16:0		0,22	1,06	2,66
16:1n7		5,81	5,41	8,56
18:0		0,79	0,77	0,28
18:1n9		0,96	6,47	18,48
18:1n7		1,12	2,47	5,68
18:2n6		0,36	1,59	1,73
18:3n6		0,45	0,43	0,19
20:0		0,53	0,18	0,11
18:3n3		2,27	0,96	0,89
20:1n9		0,47	2,07	1,51
18:4n3 (SA)		7,09	9,53	8,52
20:3n6		0,22	0,00	0,08
22:0		0,00	0,00	0,00
20:4n6		1,55	0,72	0,65
22:1n11		0,25	0,94	4,58
22:1n9		0,00	0,00	0,72
20:5n3 (EPA)		25,29	14,29	11,32
24:0		0,00	0,00	0,00
22:4n6		1,74	1,37	0,66
22:5n3		3,44	1,66	1,36
22:6n3 (DHA)		30,51	36,66	18,52
Σ n.i.		16,12	12,32	9,83
Σ Saturados.		2,35	3,11	6,72
Σ Monoinsat.		8,61	17,36	39,53
Σ Sat,Monoins.		10,96	20,47	46,25
Σ SA,EPA,DHA		62,89	60,48	38,36
Σ n3		68,60	63,10	40,61
Σ n6		4,32	4,11	3,31

Tabla 4.2.4. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -20°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. (*) Aceite de partida empleado

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1	2:1(D*)	3:1(E*)	4:1(D*)
14:0		0,56	1,51	0,68
16:0		2,93	0,13	0,33
16:1n7		6,34	0,09	4,95
18:0		0,59	1,26	0,88
18:1n9		1,33	0,38	4,09
18:1n7		1,03	0,03	1,87
18:2n6		2,81	0,03	1,55
18:3n6		0,36	0,61	0,78
20:0		0,19	0,10	0,00
18:3n3		1,56	0,03	1,95
20:1n9		0,40	0,15	1,17
18:4n3 (SA)		6,34	12,77	9,31
20:3n6		0,20	0,04	0,00
22:0		0,00	0,00	0,00
20:4n6		1,15	0,07	2,70
22:1n11		0,54	0,30	0,32
22:1n9		0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)		23,49	11,89	16,55
24:0		0,00	0,00	0,00
22:4n6		2,19	1,88	1,16
22:5n3		2,77	0,08	1,59
22:6n3 (DHA)		29,80	58,63	32,74
Σ n.i.		15,42	10,02	17,38
Σ Saturados.		4,27	3,00	1,89
Σ Monoinsat.		9,64	0,95	12,40
Σ Sat,Monoins.		13,91	3,95	14,29
Σ SA,EPA,DHA		59,63	83,29	58,60
Σ n3		63,96	83,40	62,14
Σ n6		6,71	2,63	6,19

Tabla 4.2.5. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -12°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. Aceite de partida empleado A.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(A)	2:1(A)	3:1(A)	4:1(A)
14:0	2,38	0,63	1,29	1,55
16:0	1,58	0,20	1,12	0,00
16:1n7	9,42	8,32	1,62	0,00
18:0	0,45	0,53	1,25	1,56
18:1n9	15,63	5,22	1,33	0,66
18:1n7	5,75	2,51	0,51	0,00
18:2n6	2,14	2,93	0,66	0,00
18:3n6	0,24	0,32	0,00	0,00
20:0	0,00	0,21	0,00	0,00
18:3n3	1,04	1,62	0,51	0,58
20:1n9	9,11	1,38	0,43	0,00
18:4n3 (SA)	3,66	5,99	11,11	13,05
20:3n6	0,00	0,17	0,00	0,00
22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,90	0,23	0,35	0,00
22:1n11	3,19	0,23	0,68	0,60
22:1n9	0,00	0,24	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	14,52	23,76	17,28	17,70
24:0	0,35	0,45	1,27	1,34
22:4n6	0,98	1,31	1,74	1,67
22:5n3	1,93	2,95	0,73	0,00
22:6n3 (DHA)	17,66	29,23	55,52	58,53
Σ n.i.	9,07	11,57	2,60	2,76
Σ Saturados.	4,76	2,02	4,93	4,45
Σ Monoinsat.	43,10	17,90	4,57	1,26
Σ Sat,Monoins.	47,86	19,92	9,50	5,71
Σ SA,EPA,DHA	35,84	58,98	83,91	89,28
Σ n3	38,81	63,55	85,15	89,86
Σ n6	4,26	4,96	2,75	1,67

Tabla 4.2.6 Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -4°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. Aceite de partida empleado D.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(D)	2:1(D)	3:1(D)	4:1(D)
14:0	3,02	0,62	1,08	1,44
16:0	1,67	0,31	0,31	0,00
16:1n7	9,40	9,74	1,16	2,67
18:0	0,33	0,62	0,90	1,29
18:1n9	17,90	6,90	1,26	0,61
18:1n7	5,90	3,29	0,53	0,00
18:2n6	2,01	2,94	0,51	0,00
18:3n6	0,20	0,30	0,49	0,00
20:0	0,09	0,18	0,00	0,00
18:3n3	1,03	1,55	0,41	0,58
20:1n9	9,50	1,40	0,47	0,00
18:4n3 (SA)	3,35	5,55	9,10	11,65
20:3n6	0,09	0,00	0,00	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,73	1,15	0,79	0,53
22:1n11	3,70	0,34	0,49	0,63
22:1n9	0,91	0,27	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	13,40	22,00	24,76	15,05
24:0	0,27	0,51	0,88	1,29
22:4n6	0,72	0,51	0,88	1,29
22:5n3	1,66	2,69	0,80	0,45
22:6n3 (DHA)	16,43	27,02	43,96	55,70
Σ n.i.	7,62	12,11	11,22	6,82
Σ Saturados.	5,45	2,24	3,17	4,02
Σ Monoinsat.	47,31	21,94	3,91	3,91
Σ Sat,Monoins.	52,76	24,18	7,08	7,93
Σ SA,EPA,DHA	33,18	54,57	77,82	82,40
Σ n3	35,87	58,81	79,03	83,43
Σ n6	3,75	4,90	2,67	1,82

Tabla 4.2.7 Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 4°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. Aceite de partida empleado B.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(B)	2:1(B)	3:1(B)	4:1(B)
14:0	3,22	0,86	0,56	0,79
16:0	2,24	0,26	0,54	0,00
16:1n7	6,89	4,94	1,81	2,27
18:0	0,91	0,13	0,00	0,00
18:1n9	23,41	4,28	3,87	0,86
18:1n7	4,04	0,99	0,69	0,00
18:2n6	10,50	8,30	3,71	3,78
18:3n6	0,20	0,35	0,45	0,46
20:0	0,44	0,28	0,00	0,22
18:3n3	4,93	4,49	2,58	2,77
20:1n9	3,19	0,46	0,21	0,29
18:4n3 (SA)	3,30	6,23	8,01	8,49
20:3n6	0,17	0,24	0,25	0,25
22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	1,06	1,36	1,19	1,24
22:1n11	1,12	0,12	0,00	0,00
22:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	15,12	26,36	28,88	29,86
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,64	1,34	1,58	1,64
22:5n3	2,08	3,18	1,80	2,12
22:6n3 (DHA)	8,51	24,38	31,26	32,16
Σ n.i.	8,03	11,45	12,61	12,80
Σ Saturados.	6,81	1,53	1,10	1,01
Σ Monoinsat.	38,65	10,79	6,58	3,42
Σ Sat,Monoins.	45,46	12,32	7,68	4,43
Σ SA,EPA,DHA	26,93	56,97	68,15	70,51
Σ n3	33,94	64,64	72,53	75,40
Σ n6	12,57	11,59	7,18	7,37

Tabla 4.2.8. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 12°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. Aceite de partida empleado D.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(D)	2:1(D)	3:1(D)	4:1(D)
14:0	2,73	0,81	0,50	0,97
16:0	2,24	0,18	0,38	0,00
16:1n7	8,64	10,56	3,98	1,28
18:0	0,86	0,51	0,72	0,85
18:1n9	18,52	8,75	2,62	0,68
18:1n7	4,77	4,01	0,86	0,52
18:2n6	1,97	2,87	1,59	0,71
18:3n6	0,20	0,30	0,40	0,50
20:0	0,24	0,19	0,14	0,17
18:3n3	1,10	1,53	1,07	0,65
20:1n9	9,72	1,46	1,10	0,21
18:4n3 (SA)	3,26	5,14	7,22	8,92
20:3n6	0,09	0,43	0,20	0,17
22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,78	1,27	1,09	0,86
22:1n11	3,90	0,13	0,00	0,00
22:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	12,85	19,97	24,28	26,26
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,68	1,15	1,51	2,31
22:5n3	1,57	2,40	1,92	1,24
22:6n3 (DHA)	16,10	23,56	45,32	42,72
Σ n.i.	9,78	14,78	5,10	10,98
Σ Saturados.	6,07	1,69	1,74	1,99
Σ Monoinsat.	45,55	24,91	8,56	2,69
Σ Sat,Monoins.	51,62	26,60	10,30	4,68
Σ SA,EPA,DHA	32,21	48,67	76,82	77,90
Σ n3	34,88	52,60	79,81	79,79
Σ n6	3,72	6,02	4,79	4,55

Tabla 4.2.9. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 20°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. Aceite de partida empleado B.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(B)	2:1(B)	3:1(B)	4:1(B)
14:0	3,48	1,20	0,68	0,39
16:0	2,94	0,66	0,33	0,27
16:1n7	6,60	6,57	4,41	0,55
18:0	0,81	1,17	1,43	2,07
18:1n9	23,70	10,78	2,79	0,64
18:1n7	3,52	2,34	0,68	0,00
18:2n6	10,11	13,46	12,93	3,84
18:3n6	0,19	0,29	0,36	0,54
20:0	0,44	0,57	0,49	0,15
18:3n3	4,79	6,65	6,92	3,53
20:1n9	3,33	0,71	0,53	0,22
18:4n3 (SA)	3,11	4,73	6,18	8,41
20:3n6	0,16	0,25	0,29	0,33
22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,94	1,39	1,62	1,60
22:1n11	1,19	0,27	0,00	0,00
22:1n9	0,30	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	14,59	22,11	27,25	34,29
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,62	0,92	1,20	1,64
22:5n3	2,05	2,95	3,30	2,36
22:6n3 (DHA)	8,30	12,68	15,95	24,43
Σ n.i.	8,83	10,30	12,66	14,74
Σ Saturados.	7,67	3,60	2,93	2,88
Σ Monoinsat.	38,64	20,67	8,41	1,41
Σ Sat,Monoins.	46,31	24,27	11,34	4,29
Σ SA,EPA,DHA	26,00	39,52	49,38	67,13
Σ n3	32,84	49,12	59,60	73,02
Σ n6	12,02	16,31	16,40	7,95

Tabla 4.2.10. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 28°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. Aceite de partida empleado A.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(A)	2:1(A)	3:1(A)	4:1(A)
14:0	3,22	1,02	1,37	0,87
16:0	3,01	0,53	1,37	0,32
16:1n7	9,20	9,55	2,80	2,52
18:0	0,44	0,55	1,06	0,86
18:1n9	17,81	9,55	2,86	0,71
18:1n7	5,78	3,77	0,98	0,00
18:2n6	1,94	2,78	1,40	1,68
18:3n6	0,24	0,30	0,43	0,44
20:0	0,12	0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,97	1,44	1,07	1,29
20:1n9	9,62	2,44	1,50	0,39
18:4n3 (SA)	3,19	5,19	6,22	8,11
20:3n6	0,00	0,00	0,00	0,00
22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,69	1,25	1,26	1,07
22:1n11	4,20	0,47	0,83	0,31
22:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	12,87	20,74	25,78	28,65
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,74	1,15	1,49	1,65
22:5n3	1,60	2,52	2,34	2,54
22:6n3 (DHA)	15,49	25,34	36,23	38,22
Σ n.i.	8,87	11,41	11,01	10,37
Σ Saturados.	6,79	2,10	3,80	2,05
Σ Monoinsat.	46,61	25,78	8,97	3,93
Σ Sat,Monoins.	53,40	27,88	12,77	5,98
Σ SA,EPA,DHA	31,55	51,27	68,23	74,98
Σ n3	34,12	55,23	71,64	78,81
Σ n6	3,61	5,48	4,58	4,84

Tabla 4.2.11. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 36°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol. Aceite de partida empleado C.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(C)	2:1(C)	3:1(C)	4:1(C)
14:0	3,44	1,91	0,47	0,41
16:0	3,52	0,55	0,12	0,00
16:1n7	9,26	10,11	8,93	8,28
18:0	0,52	0,47	0,58	0,58
18:1n9	17,83	13,33	5,45	3,49
18:1n7	6,16	4,94	2,45	1,70
18:2n6	1,91	2,57	2,84	2,86
18:3n6	0,20	0,26	0,32	0,36
20:0	0,00	0,19	0,23	0,22
18:3n3	1,00	1,39	1,65	1,69
20:1n9	9,37	4,01	0,80	0,39
18:4n3 (SA)	3,23	4,58	5,96	7,20
20:3n6	0,00	0,13	0,17	0,00
22:0	0,00	0,00	0,11	0,00
20:4n6	1,26	0,97	1,11	1,19
22:1n11	4,75	0,66	0,21	0,27
22:1n9	0,00	0,18	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	12,67	18,26	23,46	25,22
24:0	0,18	0,18	0,47	0,58
22:4n6	0,66	1,05	1,31	1,36
22:5n3	1,59	2,21	2,76	2,80
22:6n3 (DHA)	15,47	22,09	29,10	31,56
Σ n.i.	6,98	9,96	11,50	9,84
Σ Saturados.	7,66	3,30	1,98	1,79
Σ Monoinsat.	47,37	33,23	17,84	14,13
Σ Sat,Monoins.	55,03	36,53	19,82	15,92
Σ SA,EPA,DHA	31,37	44,93	58,52	63,98
Σ n3	33,96	48,53	62,93	68,47
Σ n6	4,03	4,98	5,75	5,77

En las tablas 4.2.12 a 4.2.21 se recogen las composiciones de los concentrados de urea obtenidos con metanol referidos todos ellos a un mismo aceite de partida, el aceite A. Estas composiciones se han calculado mediante las ecuaciones:

$$f = \frac{x_{AU}(B, C, D \text{ ó } E)}{x_{AL}(B, C, D \text{ ó } E)} \quad [4.2.1]$$

$$x_{AU}(A) = x_{AL}(A) \cdot f \quad [4.2.2]$$

donde f es el factor de concentración que se calcula mediante la ecuación [4.2.1] donde el numerador y el denominador representan respectivamente las composiciones en el ácido graso considerado del concentrado (tablas 4.2.2 a 4.2.11) y del aceite de partida (tabla 4.2.1), $x_{AL}(A)$ es la composición del ácido graso considerado en el extracto de ácidos grasos del aceite A (tabla 4.2.1) y $x_{AU}(A)$ es la composición de cualquier ácido graso referida al aceite A (la que se tabula en las tablas 4.2.12 a 4.2.21).

Esta normalización de todas las composiciones de los concentrados a un solo aceite es necesaria para poder comparar entre sí las distintas condiciones experimentales utilizadas en el método de la urea.

Tabla 4.2.12. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -36°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol

A.graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20		1,08	1,64	2,98
16:0	10,63		0,42	1,22	1,51
16:1n7	7,79		7,27	7,66	10,75
18:0	2,57		0,66	0,56	0,56
18:1n9	16,95		3,55	17,02	21,16
18:1n7	4,64		1,89	4,03	6,88
18:2n6	1,47		3,05	1,42	2,06
18:3n6	0,15		0,41	0,21	0,42
20:0	0,17		0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,78		1,65	0,77	0,16
20:1n9	10,76		1,31	5,61	1,05
18:4n3 (SA)	2,36		6,24	9,80	8,19
20:3n6	0,06		0,22	0,00	0,10
22:0	0,07		0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52		1,29	0,58	0,75
22:1n11	8,25		0,65	2,51	3,25
22:1n9	0,11		0,00	0,06	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36		23,85	12,80	12,37
24:0	0,00		0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51		1,42	0,91	0,77
22:5n3	1,17		2,92	1,24	1,60
22:6n3 (DHA)	10,98		29,09	23,46	14,46
Σ n.i.	6,50		13,04	8,51	11,00
Σ Saturados.	17,64		2,17	3,42	5,05
Σ Monoinsat.	48,50		14,66	36,89	43,10
Σ Sat,Monoins.	66,14		16,83	40,31	48,15
Σ SA,EPA,DHA	22,70		59,18	46,06	35,01
Σ n3	24,65		63,75	48,07	36,77
Σ n6	2,71		6,38	3,11	4,09

Tabla 4.2.13 Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -28°C , a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol

A.graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20		0,83	1,21	3,74
16:0	10,63		0,22	1,06	2,68
16:1n7	7,79		6,30	6,05	9,29
18:0	2,57		0,78	0,72	0,28
18:1n9	16,95		0,92	7,57	17,72
18:1n7	4,64		1,30	2,34	6,57
18:2n6	1,47		0,36	1,66	1,75
18:3n6	0,15		0,48	0,38	0,20
20:0	0,17		0,53	0,00	0,11
18:3n3	0,78		2,21	1,04	0,87
20:1n9	10,76		0,47	2,37	1,49
18:4n3 (SA)	2,36		7,00	10,00	8,41
20:3n6	0,06		0,17	0,00	0,06
22:0	0,07		0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52		1,52	0,80	0,64
22:1n11	8,25		0,25	1,02	4,53
22:1n9	0,11		0,00	0,00	0,79
20:5n3 (EPA)	9,36		25,08	15,05	11,24
24:0	0,00		0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51		1,74	1,40	0,66
22:5n3	1,17		3,44	1,72	1,36
22:6n3 (DHA)	10,98		29,65	37,55	18,00
Σ n.i.	6,50		16,76	8,08	9,61
Σ Saturados.	17,64		2,36	2,99	6,81
Σ Monoinsat.	48,50		9,23	19,35	40,39
Σ Sat, Monoins.	66,14		11,59	22,34	47,20
Σ SA,EPA,DHA	22,70		61,73	62,59	37,65
Σ n3	24,65		67,38	65,35	39,88
Σ n6	2,71		4,27	4,23	3,32

Tabla 4.2.14 Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -206°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol.

A.graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20		0,83	1,21	3,74
16:0	10,63		0,22	1,06	2,68
16:1n7	7,79		6,30	6,05	9,29
18:0	2,57		0,78	0,72	0,28
18:1n9	16,95		0,92	7,57	17,72
18:1n7	4,64		1,30	2,34	6,57
18:2n6	1,47		0,36	1,66	1,75
18:3n6	0,15		0,48	0,38	0,20
20:0	0,17		0,53	0,00	0,11
18:3n3	0,78		2,21	1,04	0,87
20:1n9	10,76		0,47	2,37	1,49
18:4n3 (SA)	2,36		7,00	10,00	8,41
20:3n6	0,06		0,17	0,00	0,06
22:0	0,07		0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52		1,52	0,80	0,64
22:1n11	8,25		0,25	1,02	4,53
22:1n9	0,11		0,00	0,00	0,79
20:5n3 (EPA)	9,36		25,08	15,05	11,24
24:0	0,00		0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51		1,74	1,40	0,66
22:5n3	1,17		3,44	1,72	1,36
22:6n3 (DHA)	10,98		29,65	37,55	18,00
Σ n.i.	6,50		16,76	8,08	9,61
Σ Saturados.	17,64		2,36	2,99	6,81
Σ Monoinsat.	48,50		9,23	19,35	40,39
Σ Sat,Monoins.	66,14		11,59	22,34	47,20
Σ SA,EPA,DHA	22,70		61,73	62,59	37,65
Σ n3	24,65		67,38	65,35	39,88
Σ n6	2,71		4,27	4,23	3,32

Tabla 4.2.1.15. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -12°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol

A.graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	2,38	0,63	1,29	1,55
16:0	10,63	1,58	0,20	1,12	0,00
16:1n7	7,79	9,42	8,32	1,62	0,00
18:0	2,57	0,45	0,53	1,25	1,56
18:1n9	16,95	15,63	5,22	1,33	0,66
18:1n7	4,64	5,75	2,51	0,51	0,00
18:2n6	1,47	2,14	2,93	0,66	0,00
18:3n6	0,15	0,24	0,32	0,00	0,00
20:0	0,17	0,00	0,21	0,00	0,00
18:3n3	0,78	1,04	1,62	0,51	0,58
20:1n9	10,76	9,11	1,38	0,43	0,00
18:4n3 (SA)	2,36	3,36	5,99	11,11	13,05
20:3n6	0,06	0,00	0,17	0,00	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,90	0,23	0,35	0,00
22:1n11	8,25	3,19	0,23	0,68	0,60
22:1n9	0,11	0,00	0,24	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	14,52	23,76	17,28	17,70
24:0	0,00	0,35	0,45	1,27	1,34
22:4n6	0,51	0,98	1,31	1,74	1,67
22:5n3	1,17	1,93	2,95	0,73	0,00
22:6n3 (DHA)	10,98	17,66	29,23	55,52	58,53
Σ n.i.	6,50	9,37	11,57	2,60	2,76
Σ Saturados.	17,64	4,76	2,02	4,93	4,45
Σ Monoinsat.	48,50	43,10	17,90	4,57	1,26
Σ Sat,Monoins.	66,14	47,86	19,92	9,50	5,71
Σ SA,EPA,DHA	22,70	35,54	58,98	83,91	89,28
Σ n3	24,65	38,51	63,55	85,15	89,86
Σ n6	2,71	4,26	4,96	2,75	1,67

Tabla 4.2.16. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -4°C , a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol Temperatura de.

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	3,08	0,63	1,10	1,47
16:0	10,63	1,68	0,31	0,31	0,00
16:1n7	7,79	10,20	10,57	1,26	2,90
18:0	2,57	0,33	0,61	0,89	1,28
18:1n9	16,95	17,16	6,62	1,21	0,58
18:1n7	4,64	6,83	3,81	0,61	0,00
18:2n6	1,47	2,04	2,98	0,52	0,00
18:3n6	0,15	0,21	0,32	0,53	0,00
20:0	0,17	0,09	0,18	0,00	0,00
18:3n3	0,78	1,00	1,51	0,40	0,57
20:1n9	10,76	9,40	1,39	0,47	0,00
18:4n3 (SA)	2,36	3,31	5,48	8,99	11,50
20:3n6	0,06	0,07	0,00	0,00	0,00
22:0	0,07	0,08	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,72	1,13	0,78	0,52
22:1n11	8,25	3,66	0,34	0,48	0,62
22:1n9	0,11	1,00	0,30	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	13,30	21,84	24,58	14,94
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,72	0,51	0,88	1,29
22:5n3	1,17	1,66	2,69	0,80	0,45
22:6n3 (DHA)	10,98	15,96	26,25	42,72	54,74
Σ n.i.	6,50	7,51	12,55	13,49	9,15
Σ Saturados.	17,64	5,26	1,74	2,30	2,74
Σ Monoinsat.	48,50	48,25	23,01	4,03	4,10
Σ Sat,Monoins.	66,14	53,51	24,75	6,33	6,85
Σ SA,EPA,DHA	22,70	32,57	53,57	76,28	81,18
Σ n3	24,65	35,23	57,77	77,48	82,20
Σ n6	2,71	3,76	4,94	2,70	1,81

Tabla 4.2.17. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 4°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol.

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	2,67	0,71	0,46	0,66
16:0	10,63	1,95	0,23	0,47	0,00
16:1n7	7,79	9,57	6,86	2,51	3,15
18:0	2,57	0,91	0,13	0,00	0,00
18:1n9	16,95	17,64	3,23	2,92	0,65
18:1n7	4,64	5,89	1,44	1,01	0,00
18:2n6	1,47	2,03	1,61	0,72	0,73
18:3n6	0,15	0,21	0,38	0,48	0,49
20:0	0,17	0,24	0,15	0,00	0,12
18:3n3	0,78	1,08	0,99	0,57	0,61
20:1n9	10,76	9,01	1,30	0,59	0,82
18:4n3 (SA)	2,36	3,31	6,26	8,04	8,53
20:3n6	0,06	0,10	0,14	0,15	0,15
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,81	1,04	0,91	0,95
22:1n11	8,25	3,76	0,40	0,00	0,00
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,98	22,64	24,80	25,64
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,69	1,45	1,71	1,78
22:5n3	1,17	1,57	2,40	1,36	1,60
22:6n3 (DHA)	10,98	15,84	45,37	58,18	59,85
Σ n.i.	6,50	9,71	3,28	-4,88	-5,73
Σ Saturados.	17,64	5,78	1,22	0,94	0,78
Σ Monoinsat.	48,50	45,87	13,23	7,03	4,62
Σ Sat,Monoins.	66,14	51,65	14,46	7,97	5,40
Σ SA,EPA,DHA	22,70	32,14	74,26	91,02	94,02
Σ n3	24,65	34,79	77,65	92,94	96,23
Σ n6	2,71	3,85	4,62	3,97	4,10

Tabla 4.2.18. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 12°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol.

A.graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	2,78	0,83	0,51	0,99
16:0	10,63	2,26	0,18	0,38	0,00
16:1n7	7,79	9,37	11,46	4,32	1,39
18:0	2,57	0,85	0,50	0,71	0,84
18:1n9	16,95	17,76	8,39	2,51	0,65
18:1n7	4,64	5,52	4,64	1,00	0,60
18:2n6	1,47	2,00	2,91	1,61	0,72
18:3n6	0,15	0,21	0,32	0,43	0,54
20:0	0,17	0,24	0,19	0,14	0,17
18:3n3	0,78	1,07	1,49	1,04	0,63
20:1n9	10,76	9,62	1,45	1,09	0,21
18:4n3 (SA)	2,36	3,22	5,08	7,13	8,81
20:3n6	0,06	0,07	0,32	0,15	0,13
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,77	1,25	1,07	0,84
22:1n11	8,25	3,85	0,13	0,00	0,00
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,75	19,82	24,10	26,07
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,68	1,15	1,51	2,31
22:5n3	1,17	1,57	2,40	1,92	1,24
22:6n3 (DHA)	10,98	15,64	22,89	44,04	41,51
Σ n.i.	6,50	9,76	14,61	6,34	12,36
Σ Saturados.	17,64	6,13	1,70	1,74	2,00
Σ Monoinsat.	48,50	46,12	26,06	8,91	2,85
Σ Sat,Monoins.	66,14	52,25	27,76	10,66	4,85
Σ SA,EPA,DHA	22,70	31,62	47,79	75,27	76,38
Σ n3	24,65	34,26	51,68	78,23	78,26
Σ n6	2,71	3,72	5,95	4,77	4,54

Tabla 4.2.19. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 20°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol.

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	2,89	1,00	0,56	0,32
16:0	10,63	2,56	0,58	0,29	0,24
16:1n7	7,79	9,16	9,12	6,12	0,76
18:0	2,57	0,81	1,17	1,43	2,07
18:1n9	16,95	17,86	8,12	2,10	0,48
18:1n7	4,64	5,14	3,41	0,99	0,00
18:2n6	1,47	1,96	2,60	2,50	0,74
18:3n6	0,15	0,20	0,31	0,39	0,58
20:0	0,17	0,24	0,31	0,27	0,08
18:3n3	0,78	1,05	1,46	1,52	0,78
20:1n9	10,76	9,40	2,01	1,50	0,62
18:4n3 (SA)	2,36	3,12	4,75	6,21	8,45
20:3n6	0,06	0,10	0,15	0,17	0,20
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,72	1,06	1,24	1,22
22:1n11	8,25	3,99	0,91	0,00	0,00
22:1n9	0,11	0,06	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,53	18,99	23,40	29,45
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,67	1,00	1,30	1,78
22:5n3	1,17	1,55	2,23	2,49	1,78
22:6n3 (DHA)	10,98	15,45	23,60	29,70	45,14
Σ n.i.	6,50	10,54	17,22	17,81	5,31
Σ Saturados.	17,64	6,50	3,05	2,55	2,71
Σ Monoinsat.	48,50	45,61	23,57	10,72	1,87
Σ Sat,Monoins.	66,14	52,12	26,63	13,27	4,58
Σ SA,EPA,DHA	22,70	31,10	47,34	59,31	83,04
Σ n3	24,65	33,70	51,02	63,32	85,59
Σ n6	2,71	3,65	5,13	5,60	4,52

Tabla 4.2.20. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 28°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol.

A.graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	3,22	1,02	1,37	0,87
16:0	10,63	3,01	0,53	1,37	0,32
16:1n7	7,79	9,20	9,55	2,80	2,52
18:0	2,57	0,44	0,55	1,06	0,86
18:1n9	16,95	17,81	9,55	2,86	0,71
18:1n7	4,64	5,78	3,77	0,98	0,00
18:2n6	1,47	1,94	2,78	1,40	1,68
18:3n6	0,15	0,24	0,30	0,43	0,44
20:0	0,17	0,12	0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,78	0,97	1,44	1,07	1,29
20:1n9	10,76	9,62	2,44	1,50	0,39
18:4n3 (SA)	2,36	3,19	5,19	6,22	8,11
20:3n6	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,69	1,25	1,26	1,07
22:1n11	8,25	4,20	0,47	0,83	0,31
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,87	20,74	25,78	28,65
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,74	1,15	1,49	1,65
22:5n3	1,17	1,60	2,52	2,34	2,54
22:6n3 (DHA)	10,98	15,49	25,34	36,23	38,22
Σ n.i.	6,50	8,87	11,41	11,01	10,37
Σ Saturados.	17,64	6,79	2,10	3,80	2,05
Σ Monoinsat.	48,50	46,61	25,78	8,97	3,93
Σ Sat,Monoins.	66,14	53,40	27,88	12,77	5,98
Σ SA,EPA,DHA	22,70	31,55	51,27	68,23	74,98
Σ n3	24,65	34,12	55,23	71,64	78,81
Σ n6	2,71	3,61	5,48	4,58	4,84

Tabla 4.2.21. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 36°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente metanol.

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	3,52	1,95	0,48	0,42
16:0	10,63	3,55	0,56	0,12	0,00
16:1n7	7,79	9,57	10,45	9,23	8,55
18:0	2,57	0,52	0,47	0,58	0,58
18:1n9	16,95	18,08	13,51	5,52	3,54
18:1n7	4,64	5,73	4,59	2,28	1,58
18:2n6	1,47	1,92	2,59	2,86	2,88
18:3n6	0,15	0,20	0,26	0,32	0,36
20:0	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,78	1,00	1,39	1,65	1,69
20:1n9	10,76	9,48	4,06	0,81	0,39
18:4n3 (SA)	2,36	3,24	4,60	5,99	7,23
20:3n6	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	1,24	0,95	1,09	1,17
22:1n11	8,25	4,74	0,66	0,21	0,27
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,75	18,38	23,61	25,38
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,67	1,07	1,34	1,39
22:5n3	1,17	1,58	2,19	2,74	2,78
22:6n3 (DHA)	10,98	15,50	22,13	29,15	31,62
Σ n.i.	6,50	6,71	10,20	12,03	10,18
Σ Saturados.	17,64	7,58	2,97	1,18	0,99
Σ Monoinsat.	48,50	47,60	33,27	18,05	14,34
Σ Sat,Monoins.	66,14	55,18	36,24	19,23	15,33
Σ SA,EPA,DHA	22,70	31,49	45,11	58,75	64,23
Σ n3	24,65	34,07	48,69	63,14	68,70
Σ n6	2,71	4,03	4,87	5,60	5,79

Tabla 4.2.22: Rendimientos en ácidos grasos totales en los concentrados de urea obtenidos a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos empleadas, utilizando como disolvente metanol (ecuación [3.2.1]).

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	41,83	32,94	28,08	26,35
28	39,96	30,02	25,83	24,70
20	36,25	28,00	26,12	22,49
12	32,54	25,20	21,76	22,28
4	33,26	26,35	20,76	19,81
-4	34,27	27,35	24,00	19,07
-12	28,98	23,11	14,20	13,64
-20		21,46	11,24	11,32
-28		19,58	13,20	10,32
-36		18,36	11,60	9,15

Tabla 4.2.23.: Rendimientos en la recuperación en los concentrados de urea de ácido estearidónico (SA), a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos, empleando como disolvente metanol (ecuación [3.2.2])

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	57,25	64,21	70,91	80,72
28	54,01	66,02	68,08	84,88
20	47,77	56,12	68,40	80,53
12	44,40	54,14	65,74	83,17
4	46,65	69,78	70,55	71,60
-4	48,07	63,51	91,32	92,93
-12	44,94	58,66	66,85	75,42
-20		56,92	63,58	44,13
-28		58,08	55,93	36,78
-36		48,55	48,27	31,71

Tabla 4.2.24.: Rendimientos en la recuperación en los concentrados de urea de ácido eicosapentaenoico (EPA), a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos, empleando como disolvente metanol (ecuación [3.2.2])

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	56,98	64,68	78,93	71,45
28	54,95	66,52	71,14	75,60
20	48,53	56,81	65,30	70,74
12	44,33	53,36	56,03	62,13
4	46,12	63,74	55,01	54,27
-4	48,70	63,82	63,03	30,44
-12	44,96	58,66	26,22	25,79
-20		53,33	15,01	19,85
-28		52,46	21,20	12,37
-36		46,74	15,86	12,11

Tabla 4.2.25.: Rendimientos en la recuperación en los concentrados de urea de ácido docosahexaenoico (DHA), a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos, empleando como disolvente metanol (ecuación [3.2.2])

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	59,05	66,30	74,42	75,83
28	56,41	69,17	85,16	85,93
20	51,17	60,18	70,65	92,38
12	46,35	52,56	87,20	84,21
4	47,98	108,88	109,98	107,98
-4	49,63	65,26	93,33	95,00
-12	46,61	61,52	71,80	72,71
-20		56,60	61,47	32,81
-28		52,87	45,14	16,92
-36		48,64	24,78	12,05

Tabla 4.2.26.: Rendimientos en la recuperación en los concentrados de urea de PUFAs n3 (suma de SA, EPA y DHA), a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos, empleando como disolvente metanol (ecuaciones [3.2.2])

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	58,01	65,42	75,91	74,53
28	55,56	67,75	77,60	81,56
20	49,73	58,37	68,21	82,22
12	45,31	53,05	72,11	75,00
4	47,08	86,20	83,21	82,05
-4	49,08	64,48	80,63	68,16
-12	45,76	60,05	52,49	53,65
-20		55,29	42,53	28,64
-28		53,25	36,39	17,11
-36		47,85	23,55	14,12

- **Cristalización de los compuestos de inclusión en varias etapas utilizando como disolvente metanol.**

Tabla 4.2.27.-Composiciones en ácidos grasos de aceite de partida () y de los concentrados obtenidos en cada una de las etapas de adición de urea y cristalización de los compuestos de inclusión. También se tabulan las relaciones entre las composiciones en cada etapa del EPA/DHA, Sat+Monoinsat/SA+EPA+DHA y Sat/Monoinsat.

A.Graso	CLO-2'	Etapas1	Etapas2	Etapas3	Etapas4	Etapas5
14:0	4,12	2,90	0,57	0,92	0,72	0,46
16:0	10,55	2,07	0,18	0,10	0,10	0,23
16:1n7	7,18	8,94	0,95	0,41	0,42	0,72
18:0	2,60	0,41	0,77	0,83	0,82	0,87
18:1n9	17,68	17,61	1,42	0,32	0,45	0,97
18:1n7	4,01	5,45	0,39	0,19	0,05	0,41
18:2n6	1,45	1,97	0,99	0,94	0,92	0,98
18:3n6	0,14	0,21	0,46	0,48	0,49	0,47
20:0	0,17	0,00	0,00	0,11	0,03	0,00
18:3n3	0,80	1,04	0,91	0,91	0,90	0,92
20:1n9	10,87	9,09	0,76	0,10	0,14	0,23
18:4n3	2,39	3,32	7,96	8,39	8,22	8,11
20:3n6	0,08	0,12	0,20	0,21	0,23	0,21
22:0	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,53	0,73	0,99	0,99	0,99	0,98
22:1n11	8,35	3,77	0,39	0,13	0,20	0,25
22:1n9	0,10	0,97	1,99	0,02	0,00	0,00
20:5n3	9,43	13,36	27,58	28,76	28,43	27,95
24:0	0,18	0,21	0,26	0,18	0,29	0,15
22:4n6	0,51	0,76	1,75	1,56	1,78	1,73
22:5n3	1,17	1,68	2,49	2,26	2,26	2,11
22:6n3	11,30	16,27	39,28	41,08	40,98	40,16
n.i	6,33	9,16	9,77	11,17	11,64	13,40
Satur	17,68	5,58	1,78	2,12	1,94	1,70
Monoins	48,19	45,82	5,88	1,16	1,25	2,37
Sat+Monoins	65,87	51,40	7,66	3,28	3,19	4,07
SA+EPA+DHA	23,12	32,95	74,81	78,23	77,62	76,21
Σ n3	25,09	35,67	78,21	81,39	80,78	78,18
Σ n6	2,71	3,78	4,38	4,17	4,40	4,36
EPA/DHA	0,83	0,82	0,70	0,70	0,69	0,70
(Sat+Mono)/(SA+EPA+DHA)	2,85	1,56	0,10	0,04	0,04	0,05
Sat/Monoins	0,37	0,12	0,30	1,83	1,55	0,72

- **Cristalización de los compuestos de inclusión en una sola etapa utilizando como disolvente etanol.**

Tabla 4.2.28. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -36°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. Aceite de hígado de bacalao de partida empleado E.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1	2:1(E)	3:1(E)	4:1(E)
14:0		0,62	2,98	4,33
16:0		0,05	0,59	5,06
16:1n7		7,18	1,60	3,47
18:0		0,63	1,66	3,24
18:1n9		3,35	3,87	7,91
18:1n7		1,70	1,08	2,45
18:2n6		2,78	0,32	0,85
18:3n6		0,34	0,53	0,25
20:0		0,12	0,16	0,14
18:3n3		1,52	0,20	0,37
20:1n9		0,43	0,55	6,23
18:4n3 (SA)		6,41	10,68	9,08
20:3n6		0,19	0,00	0,00
22:0		0,13	0,00	0,00
20:4n6		1,11	0,16	0,29
22:1n11		0,22	1,02	4,10
22:1n9		1,73	1,04	2,33
20:5n3 (EPA)		22,98	9,50	9,97
24:0		0,00	0,00	0,00
22:4n6		1,48	2,03	4,03
22:5n3		2,86	0,28	0,63
22:6n3 (DHA)		31,50	44,07	14,18
Σ n.i.		12,67	17,68	21,09
Σ Saturados.		1,55	5,39	12,77
Σ Monoinsat.		14,61	9,16	26,49
Σ Sat,Monoins.		16,16	14,55	39,26
Σ SA,EPA,DHA		60,89	64,25	33,23
Σ n3		65,27	64,73	34,23
Σ n6		5,90	3,04	5,42

Tabla 4.2.29.. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -28°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. (*)Aceite de hígado de bacalao de partida empleado.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1	2:1(D*)	3:1(E*)	4:1(D*)
14:0		0,61	1,42	0,87
16:0		0,07	0,45	0,80
16:1n7		7,51	0,97	1,12
18:0		0,07	1,06	1,48
18:1n9		3,88	1,21	2,32
18:1n7		1,91	0,34	0,32
18:2n6		2,82	0,50	3,13
18:3n6		0,34	0,61	0,40
20:0		0,00	0,00	0,00
18:3n3		1,53	0,52	0,54
20:1n9		0,61	0,66	0,34
18:4n3 (SA)		6,15	10,55	9,56
20:3n6		0,18	0,00	0,11
22:0		0,00	0,00	0,00
20:4n6		1,12	0,58	0,64
22:1n11		0,28	0,54	0,66
22:1n9		1,71	0,00	1,25
20:5n3 (EPA)		23,90	16,42	16,81
24:0		0,00	0,00	0,00
22:4n6		1,44	1,69	1,77
22:5n3		2,88	1,10	1,27
22:6n3 (DHA)		31,10	47,69	41,22
Σ n.i.		11,89	13,69	15,39
Σ Saturados.		0,75	2,93	3,15
Σ Monoinsat.		15,90	3,72	6,01
Σ Sat,Monoins.		16,65	6,65	9,16
Σ SA,EPA,DHA		61,15	74,66	67,59
Σ n3		65,56	76,28	69,40
Σ n6		5,90	3,38	6,05

Tabla 4.2.30.-Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -20°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. Aceite de hígado de bacalao de partida empleado E.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1	2:1(E)	3:1(E)	4:1(E)
14:0		0,30	1,24	0,70
16:0		0,54	0,00	0,15
16:1n7		8,28	1,27	5,20
18:0		0,75	0,95	0,68
18:1n9		7,29	1,28	3,23
18:1n7		2,88	0,42	1,33
18:2n6		2,93	0,66	2,16
18:3n6		0,30	0,53	0,40
20:0		0,08	0,00	0,09
18:3n3		1,46	0,42	1,25
20:1n9		1,35	0,54	0,85
18:4n3 (SA)		5,44	10,13	8,48
20:3n6		0,17	0,00	0,17
22:0		0,12	0,00	0,00
20:4n6		1,06	0,79	1,00
22:1n11		0,30	0,71	0,11
22:1n9		0,02	0,00	0,24
20:5n3 (EPA)		21,56	21,64	19,38
24:0		0,00	0,00	0,00
22:4n6		1,33	1,82	1,54
22:5n3		2,64	0,76	2,46
22:6n3 (DHA)		27,71	47,14	38,45
Σ n.i.		13,49	9,70	12,13
Σ Saturados.		1,79	2,19	1,62
Σ Monoinsat.		20,12	4,22	10,96
Σ Sat,Monoins.		21,91	6,41	12,58
Σ SA,EPA,DHA		54,71	78,91	66,31
Σ n3		58,81	80,09	70,02
Σ n6		5,79	3,80	5,27

Tabla 4.2.31. . Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -12°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. Aceite de hígado de bacalao de partida empleado C.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(C)	2:1(C)	3:1(C)	4:1(C)
14:0	2,75	0,18	0,25	1,49
16:0	1,01	0,21	0,27	0,33
16:1n7	9,43	7,10	1,56	1,77
18:0	0,37	0,71	1,01	1,28
18:1n9	16,67	2,81	2,88	2,74
18:1n7	6,41	1,52	1,03	1,00
18:2n6	2,15	2,56	0,57	0,84
18:3n6	0,23	0,39	0,51	0,53
20:0	0,16	0,22	0,30	0,39
18:3n3	1,06	0,95	0,20	0,98
20:1n9	7,70	2,95	1,33	1,10
18:4n3 (SA)	3,47	6,01	9,47	9,67
20:3n6	0,08	0,52	0,14	0,17
22:0	0,06	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,73	1,02	0,55	0,50
22:1n11	2,25	0,18	0,29	0,23
22:1n9	0,00	1,65	0,41	0,62
20:5n3 (EPA)	13,53	23,60	18,07	14,77
24:0	0,30	0,24	0,00	
22:4n6	0,77	1,31	1,68	1,33
22:5n3	1,67	2,76	0,46	0,71
22:6n3 (DHA)	16,87	29,32	47,92	44,82
Σ n.i.	12,33	13,79	11,10	14,73
Σ Saturados.	4,65	1,56	1,83	3,49
Σ Monoinsat.	42,46	16,21	7,50	7,46
Σ Sat,Monoins.	47,11	17,77	9,33	10,95
Σ SA,EPA,DHA	33,87	58,93	75,46	69,26
Σ n3	36,60	62,64	76,12	70,95
Σ n6	3,96	5,80	3,45	3,37

Tabla 4.2.32.. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a -4°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. Aceite de hígado de bacalao de partida empleado D.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(D)	2:1(D)	3:1(D)	4:1(D)
14:0	3,29	1,35	0,86	1,16
16:0	2,17	0,36	0,25	0,00
16:1n7	9,38	9,86	1,20	0,74
18:0	0,39	0,50	0,87	1,01
18:1n9	17,59	8,29	1,36	0,74
18:1n7	5,89	3,80	0,45	0,00
18:2n6	2,10	2,88	1,01	0,71
18:3n6	0,22	0,33	0,53	0,73
20:0	0,16	0,20	0,16	0,00
18:3n3	1,02	1,44	0,51	0,31
20:1n9	9,20	1,59	0,38	0,23
18:4n3 (SA)	3,39	5,13	8,12	9,02
20:3n6	0,00	0,00	0,00	0,00
22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,79	1,04	0,85	0,46
22:1n11	3,53	0,32	0,41	0,51
22:1n9	0,00	0,27	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	12,96	20,00	24,00	14,73
24:0	0,24	0,48	0,88	1,03
22:4n6	0,68	1,10	1,64	1,39
22:5n3	1,64	2,39	1,09	0,57
22:6n3 (DHA)	16,05	24,70	40,26	41,06
Σ n.i.	9,31	13,97	15,17	25,60
Σ Saturados.	6,25	2,89	3,02	3,20
Σ Monoinsat.	45,59	24,13	3,80	2,22
Σ Sat,Monoins.	51,84	27,02	6,82	5,42
Σ SA,EPA,DHA	32,40	49,83	72,38	64,81
Σ n3	35,06	53,66	73,98	65,69
Σ n6	3,79	5,35	4,03	3,29

Tabla 4.2.33.. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 4°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. Aceite de hígado de bacalao de partida empleado C.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(C)	2:1(C)	3:1(C)	4:1(C)
14:0	3,04	0,61	0,64	0,99
16:0	1,88	0,47	0,00	0,41
16:1n7	8,59	8,26	1,38	2,90
18:0	0,71	0,82	1,29	1,03
18:1n9	19,47	5,79	0,98	2,05
18:1n7	5,12	2,13	0,00	0,60
18:2n6	5,27	7,16	2,75	3,85
18:3n6	0,23	0,37	0,60	0,53
20:0	0,17	0,23	0,00	0,00
18:3n3	2,65	3,84	2,07	2,36
20:1n9	1,37	0,72	0,27	0,37
18:4n3 (SA)	3,45	5,47	8,01	6,94
20:3n6	0,13	0,00	0,00	0,00
22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,84	1,24	1,13	1,08
22:1n11	1,89	0,21	0,00	0,00
22:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	14,35	22,74	26,87	25,06
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,73	1,26	1,43	1,21
22:5n3	1,85	2,80	1,44	1,90
22:6n3 (DHA)	13,33	22,14	30,82	27,62
Σ n.i.	14,93	13,74	20,32	21,10
Σ Saturados.	5,80	2,13	1,93	2,43
Σ Monoinsat.	36,44	17,11	2,63	5,92
Σ Sat,Monoins.	42,24	19,24	4,56	8,35
Σ SA,EPA,DHA	31,13	50,35	65,70	59,62
Σ n3	35,63	56,99	69,21	63,88
Σ n6	7,20	10,03	5,91	6,67

Tabla 4.2.34.. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 12°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. Aceite de hígado de bacalao de partida empleado E.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(E)	2:1(E)	3:1(E)	4:1(E)
14:0	2,63	1,26	0,30	0,76
16:0	1,88	0,43	0,09	0,47
16:1n7	10,40	9,85	3,50	7,31
18:0	0,75	0,50	1,36	0,60
18:1n9	14,84	11,48	0,94	5,76
18:1n7	9,22	4,49	0,40	2,25
18:2n6	0,20	2,59	0,18	2,80
18:3n6	0,12	0,29	0,30	0,32
20:0	0,05	0,12	0,00	0,12
18:3n3	0,90	1,38	1,05	1,42
20:1n9	5,51	3,28	1,38	1,64
18:4n3 (SA)	3,33	4,99	7,01	6,00
20:3n6	0,56	0,14	0,47	0,18
22:0	0,00	0,08	0,00	0,00
20:4n6	0,64	0,93	0,67	1,03
22:1n11	4,97	0,36	0,00	0,00
22:1n9	0,00	0,20	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	11,65	18,23	21,79	22,05
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,94	1,12	1,78	1,35
22:5n3	1,41	2,33	1,79	2,63
22:6n3 (DHA)	19,57	22,58	42,26	28,35
Σ n.i.	10,43	13,37	14,73	14,96
Σ Saturados.	5,31	2,39	1,75	1,95
Σ Monoinsat.	44,94	29,66	6,22	16,96
Σ Sat,Monoins.	50,25	32,05	7,97	18,91
Σ SA,EPA,DHA	34,55	45,80	71,06	56,40
Σ n3	36,86	49,51	73,90	60,45
Σ n6	2,46	5,07	3,40	5,68

Tabla 4.2.35.. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 20°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. Aceite de hígado de bacalao de partida empleado C.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(C)	2:1(C)	3:1(C)	4:1(C)
14:0	3,75	1,84	0,14	0,42
16:0	2,67	0,57	0,21	0,28
16:1n7	6,67	6,99	3,75	0,94
18:0	0,79	1,02	1,44	0,21
18:1n9	23,47	13,51	1,75	0,93
18:1n7	3,96	2,73	0,39	0,00
18:2n6	9,95	12,47	11,91	6,31
18:3n6	0,20	0,30	0,46	0,60
20:0	0,41	0,52	0,49	0,22
18:3n3	4,67	6,05	6,51	4,24
20:1n9	4,41	7,41	4,91	8,74
18:4n3 (SA)	3,18	4,34	6,00	7,36
20:3n6	0,18	0,19	0,26	0,26
22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,87	1,20	1,49	1,49
22:1n11	1,08	0,19	0,00	0,00
22:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	14,23	19,49	26,56	28,69
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,66	0,84	1,18	1,31
22:5n3	1,77	2,48	3,14	2,40
22:6n3 (DHA)	8,11	12,52	15,74	18,90
Σ n.i.	8,97	5,34	13,67	16,70
Σ Saturados.	7,62	3,95	2,28	1,13
Σ Monoinsat.	39,59	30,83	10,80	10,61
Σ Sat,Monoins.	47,21	34,78	13,08	11,74
Σ SA,EPA,DHA	25,52	36,35	48,30	54,95
Σ n3	31,96	44,88	57,95	61,59
Σ n6	11,86	15,00	15,30	9,97

Tabla 4.2.36.. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 28°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. Aceite de hígado de bacalao de partida empleado A

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(A)	2:1(A)	3:1(A)	4:1(A)
14:0	3,22	1,02	1,37	0,87
16:0	3,01	0,53	1,37	0,32
16:1n7	9,20	9,55	2,80	2,52
18:0	0,44	0,55	1,06	0,86
18:1n9	17,81	9,55	2,86	0,71
18:1n7	5,78	3,77	0,98	0,00
18:2n6	1,94	2,78	1,40	1,68
18:3n6	0,24	0,30	0,43	0,44
20:0	0,12	0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,97	1,44	1,07	1,29
20:1n9	9,62	2,44	1,50	0,39
18:4n3 (SA)	3,19	5,19	6,22	8,11
20:3n6	0,00	0,00	0,00	0,00
22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,69	1,25	1,26	1,07
22:1n11	4,20	0,47	0,83	0,31
22:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	12,87	20,74	25,78	28,65
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,74	1,15	1,49	1,65
22:5n3	1,60	2,52	2,34	2,54
22:6n3 (DHA)	15,49	25,34	36,23	38,22
Σ n.i.	8,87	11,41	11,01	10,37
Σ Saturados.	6,79	2,10	3,80	2,05
Σ Monoinsat.	46,61	25,78	8,97	3,93
Σ Sat, Monoins.	53,40	27,88	12,77	5,98
Σ SA,EPA,DHA	31,55	51,27	68,23	74,98
Σ n3	34,12	55,23	71,64	78,81
Σ n6	3,61	5,48	4,58	4,84

Tabla 4.2.37.. Composición en ácidos grasos de los concentrados de urea (filtrados) obtenidos a 36°C a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol. Aceite de hígado de bacalao de partida empleado C.

A.Graso	Relación urea/a.grasos			
	1:1(C)	2:1(C)	3:1(C)	4:1(C)
14:0	3,03	2,81	1,78	1,50
16:0	4,28	1,23	0,67	0,43
16:1n7	8,55	10,04	9,70	9,43
18:0	0,59	0,39	0,55	0,54
18:1n9	17,71	15,35	10,68	6,73
18:1n7	5,77	5,46	4,03	2,94
18:2n6	1,89	2,23	2,52	2,72
18:3n6	0,21	0,27	0,29	0,34
20:0	0,00	0,00	0,20	0,19
18:3n3	0,99	1,08	1,38	1,49
20:1n9	10,16	5,59	2,26	1,13
18:4n3 (SA)	3,13	3,86	4,66	5,31
20:3n6	0,00	0,00	0,16	0,21
22:0	0,00	0,00	0,12	0,12
20:4n6	0,83	0,87	0,96	1,05
22:1n11	4,53	1,00	0,46	0,19
22:1n9	0,00	0,00	0,29	0,29
20:5n3 (EPA)	12,50	15,10	18,60	21,15
24:0	0,24	0,31	0,48	0,56
22:4n6	0,79	1,42	1,06	1,18
22:5n3	1,60	1,85	2,29	2,53
22:6n3 (DHA)	15,18	18,44	23,21	26,14
Σ n.i.	8,02	12,70	13,65	13,83
Σ Saturados.	8,14	4,74	3,80	3,34
Σ Monoinsat.	46,72	37,44	27,42	20,71
Σ Sat,Monoins.	54,86	42,18	31,22	24,05
Σ SA,EPA,DHA	30,81	37,40	46,47	52,60
Σ n3	33,40	40,33	50,14	56,62
Σ n6	3,72	4,79	4,99	5,50

De igual manera que se ha hecho con las composiciones de los concentrados de urea obtenidos utilizando metanol como disolvente, las composiciones que se recogen en las tablas 2.2.28 a 4.2.37 se han normalizado a un sólo aceite para poder comparar entre sí los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales ensayadas en el método de la urea.

En las tablas 4.2.38 a 4.2.47 se recogen las composiciones de los concentrados de urea obtenidos con metanol referidos todos ellos a un mismo aceite de partida, el aceite A. Estas composiciones se han calculado mediante las ecuaciones [4.2.1] y [4.2.2]. $x_{AU}(B,C,D \text{ ó } E)$ y $x_{AL}(B,C,D \text{ ó } F)$ están tabulados en las tablas 4.2.28 a 4.2.37 y en la 4.2.1, respectivamente, $x_{AL}(A)$ también en la tabla 4.2.1 y $x_{AU}(A)$ se tabula en las tablas 4.2.38 a 4.2.47.

Tabla 4.2.38 Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -36°C , a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol.

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20		0,68	3,27	4,75
16:0	10,63		0,05	0,59	5,06
16:1n7	7,79		8,02	1,79	3,88
18:0	2,57		0,59	1,56	3,05
18:1n9	16,95		3,92	4,53	9,26
18:1n7	4,64		1,61	1,02	2,32
18:2n6	1,47		2,90	0,33	0,89
18:3n6	0,15		0,30	0,47	0,22
20:0	0,17		0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,78		1,65	0,22	0,40
20:1n9	10,76		0,49	0,63	7,13
18:4n3 (SA)	2,36		6,72	11,20	9,52
20:3n6	0,06		0,00	0,00	0,00
22:0	0,07		0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52		1,23	0,18	0,32
22:1n11	8,25		0,24	1,11	4,47
22:1n9	0,11		0,21	0,13	0,28
20:5n3 (EPA)	9,36		24,19	10,00	10,50
24:0	0,00		0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51		1,51	2,07	4,11
22:5n3	1,17		2,96	0,29	0,65
22:6n3 (DHA)	10,98		32,26	45,14	14,52
Σ n.i.	6,50		10,45	15,47	18,67
Σ Saturados.	17,64		1,32	5,42	12,85
Σ Monoinsat.	48,50		14,50	9,21	27,34
Σ Sat,Monoins.	66,14		15,82	14,63	40,19
Σ SA,EPA,DHA	22,70		63,18	66,34	34,54
Σ n3	24,65		67,79	66,85	35,60
Σ n6	2,71		5,94	3,05	5,54

Tabla 4.2.39. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -28°C , a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20		0,67	1,56	0,95
16:0	10,63		0,07	0,45	0,80
16:1n7	7,79		8,39	1,08	1,25
18:0	2,57		0,07	1,00	1,39
18:1n9	16,95		4,54	1,42	2,72
18:1n7	4,64		1,81	0,32	0,30
18:2n6	1,47		2,94	0,52	3,26
18:3n6	0,15		0,30	0,54	0,35
20:0	0,17		0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,78		1,66	0,56	0,59
20:1n9	10,76		0,70	0,76	0,39
18:4n3 (SA)	2,36		6,45	11,07	10,03
20:3n6	0,06		0,00	0,00	0,00
22:0	0,07		0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52		1,24	0,64	0,71
22:1n11	8,25		0,31	0,59	0,72
22:1n9	0,11		0,21	0,00	0,15
20:5n3 (EPA)	9,36		25,16	17,29	17,70
24:0	0,00		0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51		1,47	1,72	1,81
22:5n3	1,17		2,98	1,14	1,31
22:6n3 (DHA)	10,98		31,85	48,85	42,22
Σ n.i.	6,50		9,19	10,50	13,35
Σ Saturados.	17,64		0,80	3,00	3,15
Σ Monoinsat.	48,50		15,95	4,17	5,53
Σ Sat, Monoins.	66,14		16,76	7,17	8,68
Σ SA, EPA, DHA	22,70		63,47	77,20	69,95
Σ n3	24,65		68,11	78,90	71,85
Σ n6	2,71		5,95	3,43	6,13

Tabla 4.2.40.-Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -20°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20		0,33	1,36	0,77
16:0	10,63		0,54	0,00	0,15
16:1n7	7,79		9,25	1,42	5,81
18:0	2,57		0,71	0,89	0,64
18:1n9	16,95		8,53	1,50	3,78
18:1n7	4,64		2,73	0,40	1,26
18:2n6	1,47		3,05	0,69	2,25
18:3n6	0,15		0,26	0,47	0,35
20:0	0,17		0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,78		1,58	0,46	1,35
20:1n9	10,76		1,55	0,62	0,97
18:4n3 (SA)	2,36		5,71	10,63	8,89
20:3n6	0,06		0,00	0,00	0,00
22:0	0,07		0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52		1,17	0,87	1,11
22:1n11	8,25		0,33	0,77	0,12
22:1n9	0,11		0,00	0,00	0,03
20:5n3 (EPA)	9,36		22,70	22,78	20,40
24:0	0,00		0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51		1,36	1,86	1,57
22:5n3	1,17		2,73	0,79	2,55
22:6n3 (DHA)	10,98		28,38	48,28	39,38
Σ n.i.	6,50		9,08	6,22	8,60
Σ Saturados.	17,64		1,57	2,25	1,56
Σ Monoinsat.	48,50		22,39	4,71	11,97
Σ Sat,Monoins.	66,14		23,96	6,96	13,53
Σ SA,EPA,DHA	22,70		56,79	81,69	68,68
Σ n3	24,65		61,10	82,93	72,58
Σ n6	2,71		5,85	3,89	5,28

Tabla 4.2.41. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -12°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	2,81	0,18	0,25	1,52
16:0	10,63	1,02	0,21	0,27	0,33
16:1n7	7,79	9,74	7,70	1,69	1,83
18:0	2,57	0,37	0,70	1,00	1,27
18:1n9	16,95	16,90	2,69	2,76	2,78
18:1n7	4,64	5,96	1,76	1,19	0,93
18:2n6	1,47	2,16	2,60	0,58	0,85
18:3n6	0,15	0,23	0,42	0,55	0,53
20:0	0,17	0,16	0,22	0,30	0,39
18:3n3	0,78	1,06	0,93	0,20	0,98
20:1n9	10,76	7,79	2,92	1,32	1,11
18:4n3 (SA)	2,36	3,48	5,93	9,35	9,71
20:3n6	0,06	0,07	0,39	0,11	0,15
22:0	0,07	0,06	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,72	1,00	0,54	0,49
22:1n11	8,25	2,25	0,18	0,29	0,23
22:1n9	0,11	0,00	1,82	0,45	0,68
20:5n3 (EPA)	9,36	13,62	23,42	17,94	14,87
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,79	1,31	1,68	1,36
22:5n3	1,17	1,66	2,76	0,46	0,70
22:6n3 (DHA)	10,98	16,90	28,49	46,56	44,90
Σ n.i.	6,50	12,26	14,36	12,52	14,39
Σ Saturados.	17,64	4,42	1,32	1,83	3,52
Σ Monoinsat.	48,50	42,64	17,07	7,70	7,56
Σ Sat,Monoins.	66,14	47,06	18,39	9,52	11,08
Σ SA,EPA,DHA	22,70	34,00	57,85	73,85	69,48
Σ n3	24,65	36,72	61,54	74,50	71,16
Σ n6	2,71	3,96	5,71	3,45	3,37

Tabla 4.2.42.-Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a -4°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	3,35	1,38	0,88	1,18
16:0	10,63	2,19	0,36	0,25	0,00
16:1n7	7,79	10,18	10,70	1,30	0,80
18:0	2,57	0,39	0,49	0,86	1,00
18:1n9	16,95	16,86	7,95	1,30	0,71
18:1n7	4,64	6,82	4,40	0,52	0,00
18:2n6	1,47	2,13	2,92	1,02	0,72
18:3n6	0,15	0,24	0,35	0,57	0,78
20:0	0,17	0,16	0,20	0,16	0,00
18:3n3	0,78	0,99	1,40	0,50	0,30
20:1n9	10,76	9,11	1,57	0,38	0,23
18:4n3 (SA)	2,36	3,35	5,07	8,02	8,91
20:3n6	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,78	1,02	0,83	0,45
22:1n11	8,25	3,49	0,32	0,41	0,50
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,86	19,85	23,82	14,62
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,68	1,10	1,64	1,39
22:5n3	1,17	1,64	2,39	1,09	0,57
22:6n3 (DHA)	10,98	15,60	24,00	39,12	39,90
Σ n.i.	6,50	9,20	14,53	17,33	27,94
Σ Saturados.	17,64	6,09	2,43	2,15	2,18
Σ Monoinsat.	48,50	46,45	24,93	3,91	2,24
Σ Sat,Monoins.	66,14	52,54	27,37	6,06	4,42
Σ SA,EPA,DHA	22,70	31,81	48,92	70,96	63,42
Σ n3	24,65	34,44	52,71	72,55	64,30
Σ n6	2,71	3,82	5,39	4,07	3,34

Tabla 4.2.43.- Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 4°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	2,52	0,51	0,53	0,82
16:0	10,63	1,64	0,41	0,00	0,00
16:1n7	7,79	11,93	11,47	1,92	4,03
18:0	2,57	0,71	0,82	1,29	1,03
18:1n9	16,95	14,67	4,36	0,74	1,55
18:1n7	4,64	7,47	3,11	0,00	0,00
18:2n6	1,47	1,02	1,38	0,53	0,74
18:3n6	0,15	0,25	0,40	0,64	0,57
20:0	0,17	0,09	0,13	0,00	0,00
18:3n3	0,78	0,58	0,84	0,45	0,52
20:1n9	10,76	3,87	2,03	0,76	1,04
18:4n3 (SA)	2,36	3,46	5,49	8,04	6,97
20:3n6	0,06	0,08	0,00	0,00	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,64	0,95	0,86	0,83
22:1n11	8,25	6,34	0,70	0,00	0,00
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,32	19,53	23,07	21,52
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,79	1,37	1,55	1,31
22:5n3	1,17	1,40	2,11	1,09	1,43
22:6n3 (DHA)	10,98	24,81	41,20	57,36	51,40
Σ n.i.	6,50	5,40	3,18	1,15	6,24
Σ Saturados.	17,64	4,96	1,86	1,82	1,85
Σ Monoinsat.	48,50	44,28	21,68	3,42	6,62
Σ Sat,Monoins.	66,14	49,24	23,54	5,24	8,47
Σ SA,EPA,DHA	22,70	40,59	66,22	88,47	79,89
Σ n3	24,65	42,57	69,18	90,02	81,84
Σ n6	2,71	2,78	4,10	3,59	3,45

Tabla 4.2.44. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 12°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol.

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	2,88	1,38	0,33	0,83
16:0	10,63	1,88	0,43	0,09	0,47
16:1n7	7,79	11,62	11,01	3,91	8,17
18:0	2,57	0,71	0,47	1,28	0,56
18:1n9	16,95	17,37	13,44	1,10	6,74
18:1n7	4,64	8,73	4,25	0,38	2,13
18:2n6	1,47	0,21	2,70	0,19	2,92
18:3n6	0,15	0,11	0,26	0,26	0,28
20:0	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,78	0,97	1,50	1,14	1,54
20:1n9	10,76	6,31	3,75	1,58	1,88
18:4n3 (SA)	2,36	3,49	5,23	7,35	6,29
20:3n6	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,71	1,03	0,74	1,14
22:1n11	8,25	5,42	0,39	0,00	0,00
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,27	19,19	22,94	23,22
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,96	1,14	1,82	1,38
22:5n3	1,17	1,46	2,41	1,85	2,72
22:6n3 (DHA)	10,98	20,04	23,13	43,28	29,04
Σ n.i.	6,50	4,86	8,28	11,75	10,69
Σ Saturados.	17,64	5,47	2,28	1,70	1,87
Σ Monoinsat.	48,50	49,45	32,85	6,97	18,92
Σ Sat,Monoins.	66,14	54,92	35,13	8,67	20,79
Σ SA,EPA,DHA	22,70	35,80	47,56	73,58	58,55
Σ n3	24,65	38,24	51,46	76,57	62,81
Σ n6	2,71	1,98	5,13	3,01	5,72

Tabla 4.2.45. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 20°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol.

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	3,11	1,53	0,12	0,35
16:0	10,63	2,33	0,50	0,18	0,24
16:1n7	7,79	9,26	9,71	5,21	1,31
18:0	2,57	0,79	1,02	1,44	0,21
18:1n9	16,95	17,69	10,18	1,32	0,70
18:1n7	4,64	5,78	3,98	0,57	0,00
18:2n6	1,47	1,92	2,41	2,30	1,22
18:3n6	0,15	0,21	0,32	0,49	0,64
20:0	0,17	0,22	0,29	0,27	0,12
18:3n3	0,78	1,03	1,33	1,43	0,93
20:1n9	10,76	12,45	20,93	13,87	24,68
18:4n3 (SA)	2,36	3,19	4,36	6,03	7,39
20:3n6	0,06	0,11	0,11	0,16	0,16
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,67	0,92	1,14	1,14
22:1n11	8,25	3,62	0,64	0,00	0,00
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,22	16,74	22,81	24,64
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,72	0,91	1,28	1,42
22:5n3	1,17	1,34	1,87	2,37	1,81
22:6n3 (DHA)	10,98	15,09	23,30	29,29	35,17
Σ n.i.	6,50	8,24	-1,04	9,73	-2,14
Σ Saturados.	17,64	6,45	3,33	2,01	0,92
Σ Monoinsat.	48,50	48,81	45,44	20,96	26,69
Σ Sat,Monoins.	66,14	55,26	48,76	22,97	27,61
Σ SA,EPA,DHA	22,70	30,51	44,39	58,13	67,20
Σ n3	24,65	32,87	47,60	61,93	69,94
Σ n6	2,71	3,63	4,68	5,37	4,58

Tabla 4.2.46. Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 28°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol.

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	3,86	2,70	0,42	0,79
16:0	10,63	5,45	1,30	0,21	0,44
16:1n7	7,79	9,43	10,92	9,25	6,80
18:0	2,57	1,28	0,57	0,56	0,69
18:1n9	16,95	19,14	13,74	4,61	1,92
18:1n7	4,64	6,11	5,28	2,26	0,86
18:2n6	1,47	1,75	2,38	2,76	2,60
18:3n6	0,15	0,18	0,00	0,39	0,47
20:0	0,17	0,15	0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,78	0,85	1,25	1,34	1,52
20:1n9	10,76	10,87	4,96	0,37	0,76
18:4n3 (SA)	2,36	2,86	4,31	5,66	6,57
20:3n6	0,06	0,07	0,00	0,24	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,61	0,84	1,07	1,17
22:1n11	8,25	5,94	0,83	0,08	0,00
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	9,79	15,85	22,15	24,28
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,52	0,87	1,23	1,32
22:5n3	1,17	1,17	1,60	2,54	2,45
22:6n3 (DHA)	10,98	11,38	18,91	27,27	30,15
Σ n.i.	6,50	8,59	13,69	17,59	17,21
Σ Saturados.	17,64	10,74	4,57	1,19	1,92
Σ Monoinsat.	48,50	51,49	35,73	16,57	10,34
Σ Sat,Monoins.	66,14	62,23	40,30	17,76	12,26
Σ SA,EPA,DHA	22,70	24,03	39,07	55,08	61,00
Σ n3	24,65	26,05	41,92	58,96	64,97
Σ n6	2,71	3,13	4,09	5,69	5,56

Tabla 4.2.47.- Composición en ácidos grasos del aceite A y de los concentrados de urea referidos a este aceite, obtenidos a 36°C, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos y utilizando como disolvente etanol

A.Graso	Relación urea/a.grasos				
	1:0(A)	1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	3,10	2,87	1,82	1,53
16:0	10,63	4,32	1,24	0,68	0,43
16:1n7	7,79	8,83	10,37	10,02	9,74
18:0	2,57	0,59	0,39	0,55	0,54
18:1n9	16,95	17,95	15,56	10,83	6,82
18:1n7	4,64	5,37	5,08	3,75	2,73
18:2n6	1,47	1,90	2,25	2,54	2,74
18:3n6	0,15	0,21	0,27	0,29	0,34
20:0	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
18:3n3	0,78	0,99	1,08	1,38	1,49
20:1n9	10,76	10,28	5,66	2,29	1,14
18:4n3 (SA)	2,36	3,14	3,88	4,68	5,33
20:3n6	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,81	0,85	0,94	1,03
22:1n11	8,25	4,52	1,00	0,46	0,19
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,58	15,20	18,72	21,29
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,81	1,45	1,08	1,20
22:5n3	1,17	1,59	1,83	2,27	2,51
22:6n3 (DHA)	10,98	15,21	18,47	23,25	26,19
Σ n.i.	6,50	7,80	12,55	14,46	14,75
Σ Saturados.	17,64	8,00	4,50	3,04	2,50
Σ Monoinsat.	48,50	46,96	37,67	27,34	20,63
Σ Sat,Monoins.	66,14	54,96	42,17	30,38	23,14
Σ SA,EPA,DHA	22,70	30,93	37,55	46,65	52,81
Σ n3	24,65	33,51	40,46	50,30	56,81
Σ n6	2,71	3,73	4,82	4,85	5,31

Tabla 4.2.48 : Rendimientos en ácidos grasos totales en los concentrados de urea obtenidos a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos ensayadas, utilizando como disolvente etanol (ecuación [3.2.1]).

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	48.96	42.34	38.70	33.91
28	46.20	34.02	34.01	33.20
20	37.69	32.04	30.10	30.08
12	36.43	29.88	28.60	27.32
4	36.64	30.60	20.40	25.20
-4	45.54	32.76	28.20	27.68
-12	40.68	29.34	20.16	18.40
-20		26.78	17.16	15.36
-28		25.56	16.00	14.24
-36		24.19	16.56	12.40

Tabla 4.2.49.: Rendimientos en la recuperación en los concentrados de urea de ácido estearidónico (SA), a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos, empleando como disolvente etanol (ecuación [3.2.2])

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	64.93	69.25	76.42	76.30
28	55.99	62.13	81.57	92.43
20	50.79	58.92	76.53	93.81
12	53.87	66.22	89.07	72.81
4	53.56	70.92	69.24	74.11
-4	64.64	70.24	95.83	104.50
-12	60.33	73.72	79.87	76.02
-20		64.79	77.29	57.93
-28		69.86	75.05	60.52
-36		68.78	78.59	49.97

Tabla 4.2.50.: Rendimientos en la recuperación en los concentrados de urea de ácido eicosapentaenoico (EPA), a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos, empleando como disolvente etanol (ecuación [3.2.2])

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	65.80	68.76	77.40	77.13
28	48.32	57.61	80.48	86.12
20	49.21	57.30	73.35	79.18
12	47.76	61.29	70.09	67.77
4	48.23	63.85	50.28	57.94
-4	62.57	69.48	71.77	43.24
-12	59.19	73.41	38.62	29.21
-20		64.86	32.56	33.49
-28		68.62	29.56	26.93
-36		62.54	17.69	13.91

Tabla 4.2.51.: Rendimientos en la recuperación en los concentrados de urea de ácido docosahexaenoico (DHA), a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos, empleando como disolvente etanol (ecuación [3.2.2])

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	67.78	70.95	81.77	80.61
28	47.97	58.56	84.56	91.32
20	51.83	59.24	80.32	96.43
12	66.22	62.59	112.76	72.26
4	82.76	114.82	106.64	117.97
-4	64.70	71.61	100.42	100.59
-12	62.61	76.16	85.49	75.24
-20		69.22	75.45	55.80
		74.17	71.18	54.76
-28				16.40
-36				

Tabla 4.2.52.: Rendimientos en la recuperación en los concentrados de urea de PUFAs n3 (suma de SA, EPA y DHA), a las distintas temperaturas y relaciones urea/ácidos grasos, empleando como disolvente etanol (ecuaciones [3.2.2])

Temperatura(°C)	Relación urea/ácidos grasos (p/p)			
	1:1	2:1	3:1	4:1
36	66.67	69.87	79.41	78.72
28	48.95	58.54	82.57	89.29
20	50.64	58.41	77.05	89.05
12	57.33	62.43	92.70	70.47
4	65.48	89.24	79.52	88.66
-4	63.82	70.59	88.13	77.35
-12	60.97	74.77	65.58	56.34
-20		66.96	57.96	46.82
-28		71.43	54.42	43.88
		67.32	48.40	18.86
-36				

Tabla 4.2.53.-Composición en ácidos grasos (% sobre a. grasos totales) de la biomasa de *Isochrysis galbana*, del extracto y del concentrado de urea. El extracto es una mezcla de extractos obtenidos por saponificación directa con todos los sistemas y condiciones de operación descritos en el apartado 3.1.5. El concentrado fue obtenido por el método de los compuestos de inclusión de urea con metanol, a 4°C y relación urea/a.grasos 4:1.

A.graso	Biomasa	Extracto	Concentrado
14:0	10,10	10,71	0,29
16:0	20,30	18,93	0,22
16:1n7	21,40	23,25	4,33
18:0	0,65	0,47	1,47
18:1n9	1,40	1,66	0,15
18:1n7	3,60	3,22	0,78
18:2n6	0,90	0,87	0,17
18:3n6	0,20	0,22	0,44
20:0	0,00	0,11	0,20
18:3n3	1,20	1,28	0,80
20:1n9	0,15	0,25	0,26
18:4n3	6,40	7,31	22,58
20:3n6	0,40	0,21	0,24
22:0	0,10	0,05	0,08
20:4n6	0,80	0,71	1,06
22:1n11	0,10	0,05	0,13
22:1n9	0,10	0,05	0,13
20:5n3	22,60	22,35	39,38
24:0	0,10	0,08	0,07
22:4n6	1,30	1,25	3,60
22:5n3	0,20	0,14	0,13
22:6n3	8,40	6,76	23,44
n.i	-0,40	0,07	0,05
Saturados	31,25	30,35	2,33
Monoinsaturados.	26,75	28,48	5,78
Satur+Monoinsat.	8,00	58,83	8,11
SA+EPA+DHA	37,40	36,42	85,40
Σ n3	38,80	37,84	86,33
Σ n6	3,60	3,26	5,51

Tabla 4.2.54.-Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) de la biomasa de *Isochrysis galbana*, del extracto y del concentrado. El extracto se ha obtenido por saponificación directa con el sistema Hexano/EtOH (96%) 1:2,5 v/v , KOH a 60°C y 1h, (apartado 3.1.5). El concentrado se obtuvo por el método de los compuestos de inclusión de urea con metanol, a 4°C y relación urea/a.grasos 4:1

Graso	Biomasa	Extracto	Concentrado
14:0	10,10	11,50	0,61
16:0	20,30	19,10	0,76
16:1n7	21,40	22,50	4,52
18:0	0,65	1,10	1,8
18:1n9	1,40	0,50	1,08
18:1n7	3,60	4,10	0
18:2n6	0,90	0,60	0,42
18:3n6	0,20	0,20	0,45
20:0	0,00	0	0
18:3n3	1,20	1,20	0,95
20:1n9	0,15	0,10	0
18:4n3	6,40	7,0	19,83
20:3n6	0,40	0,3	0
22:0	0,10	0	0
20:4n6	0,80	0,7	0,95
22:1n11	0,10	0,1	0,38
22:1n9	0,10	0,1	0
20:5n3	22,60	22,40	40,42
24:0	0,10	0,1	0
22:4n6	1,30	1,1	2,81
22:5n3	0,20	0,1	0
22:6n3	8,40	7,0	20,47
N.I	-0,40	0,20	4,55
Saturados	31,25	31,8	3,17
Monoinsat.	26,75	27,4	5,98
Sat.+Monoins.	8,00	59,2	9,15
SA+EPA+DHA	37,40	36,4	80,72
Σ n3	38,80	37,7	81,67
Σ n6	3,60	2,9	4,63

4.3.-SEPARACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tabla 4.3.1.-Condiciones cromatográficas (composición y caudal de la fase móvil, cantidad de muestra) utilizadas en la elución isocrática de los patrones EPA y DHA (E2011 y D2534 de Sigma Chemical Co.) y tiempos de retención (t_R) obtenidos. Columna analítica.

Fase móvil		Muestra	t_R	
Composición	Caudal, ml/min	Cantidad mg	EPA	DHA
MeOH/H ₂ O(1%AcH) 80:20	0,50	0,04	54,50	80,70
	0,75	0,04	37,00	52,40
	0,75	0,04	36,10	50,60
	0,75	0,02	-	54,60
	0,75	0,02	38,60	-
MeOH/H ₂ O(1%AcH) 85:15	0,25	0,04	63,90	84,10
	0,50	0,04	31,40	41,40
	0,50	0,04	32,80	43,20
	0,75	0,04	22,00	29,10
	1,00	0,04	16,20	21,30
MeOH/H ₂ O(1%AcH) 90:10	0,50	0,40	17,80	21,60
	0,50	0,04	18,90	23,00
	0,75	0,04	12,70	15,41
	1,00	0,20	9,14	-
	1,00	0,20	-	10,45
	1,00	0,20	-	11,35
	1,00	0,40	9,16	11,34
	1,00	0,40	8,90	10,69
EtOH/H ₂ O(1%AcH) 70:30	0,15	0,04	89,10	114,40
	0,40	0,04	32,60	41,70
EtOH/H ₂ O(1%AcH) 80:20	0,15	0,04	33,60	37,10
	0,15	0,02	34,20	37,10
	0,20	0,04	26,10	29,10
	0,25	0,02	21,70	24,50
	0,25	0,02	22,70	25,80
EtOH/H ₂ O(1%AcH) 70:30(*)	2,00	1,00	33,60	44,80

(*):Columna semipreparativa

4.3.1.-Separación de PUFAs de aceite de hígado de bacalao por HPLC.

Tabla 4.3.2.-Concentraciones y composición en ácidos grasos (% sobre ácidos grasos totales) de los concentrados de urea procedentes de aceite de hígado de bacalao, cargados en las columnas cromatográficas.

A.graso	Concentrados		
	58,5 mg/ml (1)	37,14 mg/ml (2)	27,73 mg/ml (2)
14:0	0,30	0,79	1,04
16:0	0,16	0,00	0,10
16:1n7	0,27	2,27	0,50
18:0	0,31	0,00	0,95
18:1n9	5,18	0,86	0,37
18:1n7	0,20	0,00	1,36
18:2n6	3,09	3,78	1,36
18:3n6	3,75	0,46	0,52
20:0	0,00	0,22	0,00
18:3n3	3,75	2,77	1,29
20:1n9	0,35	0,29	0,73
18:4n3	9,82	8,49	9,48
20:3n6	0,27	0,25	0,45
22:0	0,00	0,00	0,21
20:4n6	1,95	1,24	1,27
22:1n11	0,00	0,00	1,88
22:1n9	0,00	0,00	0,00
20:5n3	35,28	29,86	35,93
24:0	0,00	0,00	1,60
22:4n6	1,92	1,64	0,51
22:5n3	2,41	2,12	2,13
22:6n3	22,87	32,16	35,78
N.I	8,12	12,80	2,54
SATUR	0,77	1,01	3,90
MONOINS	6,00	3,42	4,84
Sat+Monoins	6,77	4,43	8,74
SA+EPA+DHA	67,97	70,51	81,19
Suma n3	74,13	75,40	84,61
Suma n6	10,98	7,37	4,11

(1): Determinada por gravimetría.

(2): Determinadas por cromatografía gaseosa.

A.-Separaciones con las fases móviles metanol-agua (1% AcH).

-Columna analítica. Elución isocrática.

Tabla 4.3.3. Condiciones cromatográficas (caudal de fase móvil y cantidad de muestra) utilizadas en la elución de muestras de concentrados de PUFAs de aceite de hígado de bacalao. Tiempos muertos (t_m), tiempos de retención (t_R) y anchos de banda (t_w) de los ácidos SA, EPA y DHA. Columna analítica. Fase móvil: MeOH/H₂O (1%AcH) 80:20

Condiciones			t_m , min	t_R , min			t_w , min		
Caudal (ml/min)	Conc (mg/ml)	Carga (mg)		SA	EPA	DHA	SA	EPA	DHA
0,50	58,50	0,584	-	-	52,7	76,9	-	-	-
0,50	58,50	5,850	-	35,8	55,7	76,7	-	-	-
0,50	58,50	5,850	-	34,8	55,5	77,3	-	-	-
0,60	27,73	1,108	5,64	24,3	32,6	49,1	1,64	6,67	9,49
0,60	27,73	1,387	6,00	23,2	29,6	44,9	1,76	7,20	11,20
0,60	27,73	2,218	5,73	23,0	26,6	40,1	2,50	5,20	15,16
0,75	37,14	0,033	-	28,4	38,8	54,2	-	-	-
0,75	37,14	0,743	5,00	24,2	34,8	50,4	2,44	3,34	5,22
0,75	37,14	0,743	5,00	23,1	32,9	47,2	2,26	4,11	6,56
0,75	37,14	1,114	5,00	21,4	30,6	44,8	1,11	5,17	8,94
1,25	37,14	0,186	3,40	16,6	22,8	32,5	1,23	1,94	2,76
1,25	37,14	0,371	3,00	16,0	22,2	31,5	1,60	1,80	2,93
1,25	37,14	0,743	3,30	13,5	19,5	28,1	1,64	2,46	4,09
1,25	37,14	0,743	3,10	13,5	19,3	27,9	1,64	2,66	3,68
1,25	37,14	0,743	3,10	13,9	20,0	28,8	1,41	1,92	3,20
1,25	37,14	1,114	3,30	13,2	18,7	27,9	0,76	2,56	4,34
1,25	37,14	1,486	3,00	12,6	17,2	25,6	1,02	3,70	6,13
1,25	37,14	1,857	2,90	12,4	16,2	24,8	1,23	4,14	6,75
1,25	37,14	1,857	2,90	12,6	16,0	24,8	1,23	4,29	6,60
1,25	37,14	1,857	3,10	12,6	16,0	24,6	1,10	4,76	6,00
1,25	37,14	2,228	2,60	12,4	14,5	23,3	1,23	3,68	7,07

Tabla 4.3.4. Condiciones cromatográficas (caudal de fase móvil y cantidad de muestra) utilizadas en la elución de muestras de concentrados de PUFAs de aceite de hígado de bacalao. Tiempos muertos (t_m), tiempos de retención (t_R) y anchos de banda (t_w) de los ácidos SA, EPA y DHA. Columna analítica. Fase móvil: MeOH/H₂O (1%AcH) 85:15

Condiciones			t_R , min			t_w , min			
Caudal (ml/min)	Conc (mg/ml)	Carga (mg)	t_m , min	SA	EPA	DHA	SA	EPA	DHA
0,25	37,14	0,033	-	54,7	68,7	89,2	-	-	-
0,25	37,14	0,743	14,4	41,0	50,0	68,1	1,82	11,94	15,20
0,50	37,14	0,033	7,6	24,8	31,8	42,0	1,88	2,64	3,60
0,50	37,14	0,033	7,9	25,0	31,9	42,1	-	-	-
0,50	37,14	0,743	6,7	20,7	25,9	36,3	0,95	4,60	7,20
0,50	37,14	0,743	6,7	20,8	25,1	36,1	1,00	4,85	7,95
0,50	37,14	0,743	7,1	20,4	24,1	34,0	0,90	4,00	4,90
0,50	37,14	1,114	6,5	19,3	21,4	30,8	1,24	1,73	6,88
0,50	37,14	1,486	6,8	19,2	21,3	27,5	1,23	3,04	8,16
0,50	37,14	1,857	7,4	19,9	22,1	20,8	1,27	3,23	8,92
0,50	58,50	2,925	7,8	21,8	29,0	38,8	1,71	6,36	8,14
0,50	58,50	5,850	8,0	-	29,7	33,4	-	4,79	17,09
0,50	58,50	11,700	7,7	-	-	-	-	-	-
0,75	37,14	0,033	4,1	17,2	21,9	28,8	1,20	1,40	1,78
0,75	37,14	0,743	4,5	13,7	16,9	23,8	0,78	4,22	5,72
0,75	37,14	0,743	4,6	14,2	17,9	25,1	0,50	3,90	5,20
0,75	27,70	1,109	4,4	12,5	13,7	18,1	0,60	1,50	5,37
0,75	37,14	1,114	4,5	12,8	14,1	19,9	0,66	1,15	4,33
0,75	27,70	1,386	4,6	12,3	13,6	17,6	0,70	1,95	6,00
0,75	37,14	1,486	4,8	12,8	14,1	17,8	1,20	1,60	4,70
0,75	37,14	1,857	4,4	12,9	14,3	17,4	0,85	1,75	5,45
1,00	37,14	0,033	3,6	12,7	16,2	21,4	-	-	-
1,00	37,14	0,743	3,6	10,6	13,0	18,4	-	-	-
1,00	37,14	0,743	3,5	10,6	13,0	17,0	-	-	-
1,00	37,70	1,114	3,7	10,3	11,5	16,4	0,55	1,50	3,20
1,00	37,70	1,114	3,4	10,1	11,4	16,5	0,60	1,60	3,34
1,00	37,70	1,486	3,4	-	-	-	-	-	-
1,00	37,70	1,857	3,7	10,0	11,1	13,8	-	-	-
1,25	37,14	0,743	2,7	8,0	9,6	13,6	-	-	-
1,25	37,14	1,114	2,9	8,2	9,1	12,8	0,53	0,87	2,67
1,25	27,72	1,386	2,5	7,4	8,1	10,4	-	-	-
1,25	37,14	1,486	2,8	7,8	8,7	11,3	-	-	-
1,25	37,14	1,857	2,7	7,8	8,5	10,4	-	-	-

Tabla 4.3.5. Condiciones cromatográficas (caudal de fase móvil y cantidad de muestra) utilizadas en la elución de muestras de concentrados de PUFAs de aceite de hígado de bacalao. Tiempos muertos (t_m), tiempos de retención (t_R) y anchos de banda (t_w) de los ácidos SA, EPA y DHA. Columna analítica. Fase móvil: MeOH/H₂O (1%AcH) 90:10

Condiciones			t_m, min	t_R, min			t_w, min		
Caudal (ml/min)	Conc (mg/ml)	Carga (mg)		SA	EPA	DHA	SA	EPA	DHA
0,50	14,60	0,584	-	-	16,3	20,9	-	-	-
0,50	14,60	0,730	7,1	16,7	18,3	22,4			
							0,80	1,90	3,00
0,60	37,14	0,743	5,2	12,0	12,5	13,7	0,55	0,87	4,14
0,75	27,70	0,416	4,1	9,5	10,1	12,5	0,44	0,59	2,80
0,75	37,14	0,557	4,1	9,5	9,9	11,7	0,41	0,66	3,81
0,75	37,14	0,743	4,5	9,7	10,2	12,2	0,53	0,85	3,71
0,75	37,14	0,743	4,4	9,6	10,1	11,6	0,43	0,72	3,85
0,75	37,14	0,929	4,3	9,5	10,0	11,0	0,40	0,70	2,95
0,75	37,14	1,114	4,4	9,7	10,2	11,0	0,38	0,80	1,71
0,75	37,14	1,486	4,2	9,3	9,8	10,5	0,50	1,10	1,78
1,00	14,60	0,730	3,6	8,3	9,1	11,0	0,47	1,00	1,54

-Columna analítica. Elución en gradiente.

Tabla 4.3.6.a- Tiempos de retención (t_R) de las eluciones en gradiente realizadas con mezclas EPA-DHA (0,02 mg de cada uno). Caudal: 0,5 ml/min. Fases móviles : A, MeOH/H₂O (1%AcH),90:10 p/p y B, MeOH/H₂O (1%AcH),80:20 p/p.

t_m ,min	t_F , min	Δt , min	t_R ,min		Observaciones
			EPA	DHA	
4,29			18,9	23,0	Isocrática. 100% A
4,36	125	120	18,6	22,8	
4,77	65	60	19,0	23,1	
5,16	30	25	19,2	25,6	
5,17	25	20	19,0	26,2	
5,65	20	15	20,2	31,4	

$t_i=5$ min (tiempo al que se inicia el gradiente (100% A).

t_f : tiempo al que finaliza el gradiente (100% B)

Δt : tiempo que transcurre desde 100% A a 100%B

Tabla 4.3.6.b Tiempos de retención (t_R) de las eluciones en gradiente realizadas con un concentrado de PUFAs de aceite de hígado de bacalao 0,584 mg). Caudal: 0,5 ml/min. Fases móviles : A: MeOH/H₂O (1%AcH),90:10 p/p y B: MeOH/H₂O (1%AcH),80:20 p/p..

t_m ,min	t_F min	Δt	t_R ,min		Observaciones
			EPA	DHA	
5,73	-	-	16,30	20,90	Isocrática 100% A
5,17	25	20	15,40	21,90	
7,20	-	-	52,73	76,88	Isocrática 100% B

$t_i=5$ min (tiempo al que se inicia el gradiente (100% A).

t_f : tiempo al que finaliza el gradiente (100% B)

Δt : tiempo que transcurre desde 100% A a 100%B

-Columna semipreparativa. Elución isocrática.

Tabla 4.3.7. Condiciones cromatográficas (composición y caudal de fase móvil y cantidad de muestra) utilizadas en la elución isocrática de muestras de concentrados de PUFAs de aceite de hígado de bacalao. Tiempos de retención (t_R) para los ácidos SA, EPA y DHA. Columna semipreparativa. Fase móvil: metanol-agua (1% AcH).

Fase móvil		Muestra		t_R , min		
Composición	Caudal (ml/min)	Conc (mg/ml)	Carga (mg)	SA	EPA	DHA
MeOH/H ₂ O (1%AcH) 80:20	3,0	27,7	10,53	19,73	23,42	34,52
" "	3,0	27,7	10,53	18,96	22,36	32,00
" "	3,0	27,7	10,53	19,24	22,43	32,90
MeOH/H ₂ O (1%AcH)85:15	3,5	27,7	5,260	10,90	12,10	15,80
" "	3,5	27,7	6,650	11,10	12,20	14,00
" "	3,5	27,7	6,650	11,20	12,30	14,80
MeOH/H ₂ O (1%AcH)90:10	3,5	27,7	1,940	8,000	8,600	10,200
" "	3,5	27,7	-	8,000	8,700	10,800
" "	3,5	27,7	-	8,300	8,800	11,100
" "	3,5	27,7	-	8,200	8,800	10,800

Tabla 4.3.8 - Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) del extracto del aceite de hígado de bacalao inicial, del concentrado de urea y de las fracciones obtenidas por HPLC. Condiciones de obtención de las fracciones: columna semipreparativa; cantidad de a. grasos cargados , 10,53 mg; composición y caudal de la fase móvil , MeOH/H₂O(1% AcH) 80:20 y 3 ml/min. Peso de ácidos grasos en cada fracción: SA, 1,069 mg; EPA, 3,981 mg; DHA, 4,300 mg.

A.Graso	Extracto del aceite	Concentrado	Fracciones		
			SA	EPA	DHA
14:0	4,12	1,04	0,26	0,25	1,98
16:0	10,55	0,10	0,58	0,23	0,44
16:1n7	7,18	0,50	-	-	1,52
18:0	2,60	0,95	1,61	0,21	-
18:1n9	17,68	0,37	-	-	-
18:1n7	4,01	1,36	-	-	-
18:2n6	1,45	1,46	-	-	-
18:3n6	0,14	0,52	-	1,31	-
20:0	0,17	0,00	-	-	-
18:3n3	0,80	1,29	-	2,79	-
20:1n9	10,87	0,73	0,68	-	-
18:4n3 (SA)	2,39	9,48	91,91	0,46	-
20:3n6	0,08	0,45	-	-	-
22:0	0,06	0,21	-	-	-
20:4n6	0,53	1,27	1,13	-	2,82
22:1n11	8,35	1,88	0,21	-	4,25
22:1n9	0,10	0,00	-	-	-
20:5n3(EPA)	9,43	35,93	0,50	94,36	0,74
24:0	0,18	1,60	-	-	3,64
22:4n6	0,51	0,51	-	-	-
22:5n3	1,17	2,13	2,74	-	-
22:6n3(DHA)	11,30	35,78	0,38	0,41	84,59
n.i	6,33	2,44	0,00	-0,02	0,02

Condiciones de obtención del extracto y del concentrado de urea:

- Extracto : saponificación y extracción de aceite de hígado de bacalao.
- Concentrado : disolvente metanol, temperatura de cristalización 4°C, relación urea/a.grasos 4:1.

Tabla 4.3.9 - Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) del extracto del aceite de hígado de bacalao inicial, del concentrado de urea y de las fracciones obtenidas por HPLC. Condiciones de obtención de las fracciones: columna semipreparativa; cantidad de a. grasos cargados , 6,65 mg; composición y caudal de la fase móvil , MeOH/H₂O(1% AcH) 85:15 y 3,5 ml/min. Peso de ácidos grasos en cada fracción: SA, 0,574 mg; EPA, 2,489 mg; DHA, 2,674 mg.

A.graso	Extracto	Concentrado	Fracciones		
			SA	EPA	DHA
14:0	4,12	1,04	0,61	0,37	1,83
16:0	10,55	0,10	2,27	-	0,33
16:1n7	7,18	0,50	1,90	-	1,43
18:0	2,60	0,95	1,05	0,29	-
18:1n9	17,68	0,37	0,89	-	-
18:1n7	4,01	1,36	-	-	-
18:2n6	1,45	1,46	-	-	-
18:3n6	0,14	0,52	-	1,28	-
20:0	0,17	0,00	-	-	-
18:3n3	0,80	1,29	-	2,71	-
20:1n9	10,87	0,73	-	-	-
18:4n3	2,39	9,48	89,52	1,71	0,36
20:3n6	0,08	0,45	0,77	-	-
22:0	0,06	0,21	-	-	-
20:4n6	0,53	1,27	-	-	2,54
22:1n11	8,35	1,88	0,40	-	4,30
22:1n9	0,10	0,00	-	-	-
20:5n3	9,43	35,93	1,01	93,64	-
24:0	0,18	1,60	-	-	3,50
22:4n6	0,51	0,51	-	-	-
22:5n3	1,17	2,13	-	-	-
22:6n3	11,30	35,78	1,05	-	84,89
n.i	6,33	2,44	0,53	-0,00	0,82

Condiciones de obtención del extracto y del concentrado de urea:

- a) Extracto : saponificación y extracción de aceite de hígado de bacalao.
- b) Concentrado : disolvente metanol, temperatura de cristalización 4°C, relación urea/a.grasos 4:1.

Tabla 4.3.10 Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) del extracto del aceite de hígado de bacalao inicial, del concentrado de urea y de las fracciones obtenidas por HPLC. Condiciones de obtención de las fracciones: columna semipreparativa; cantidad de a. grasos cargados , 1,94 mg; composición y caudal de la fase móvil , MeOH/H₂O(1% AcH) 90:10 y 3,5 ml/min. Peso de ácidos grasos en cada fracción: SA, 0,184 mg; EPA, 0,169 mg; DHA, 1,456 mg

A.graso	Extracto	Concentrado	Fracciones		
			SA	EPA	DHA
14:0	4,12	1,04	-	0,62	1,34
16:0	10,55	0,10	0,46	3,99	2,21
16:1n7	7,18	0,50	1,11	-	2,88
18:0	2,60	0,95	1,71	0,71	-
18:1n9	17,68	0,37	-	-	-
18:1n7	4,01	1,36	-	-	-
18:2n6	1,45	1,46	-	-	-
18:3n6	0,14	0,52	-	1,06	-
20:0	0,17	0,00	-	-	-
18:3n3	0,80	1,29	-	2,51	-
20:1n9	10,87	0,73	0,65	-	-
18:4n3	2,39	9,48	93,21	2,98	-
20:3n6	0,08	0,45	-	-	-
22:0	0,06	0,21	-	-	-
20:4n6	0,53	1,27	0,87	-	2,14
22:1n11	8,35	1,88	0,35	-	4,55
22:1n9	0,10	0,00	-	-	-
20:5n3	9,43	35,93	1,63	88,12	3,01
24:0	0,18	1,60	-	-	3,35
22:4n6	0,51	0,51	-	-	-
22:5n3	1,17	2,13	-	-	-
22:6n3	11,30	35,78	-	-	80,51
n.i	6,33	2,44	0,01	0,01	0,01

Condiciones de obtención del extracto y del concentrado de urea:

- a) Extracto : saponificación y extracción de aceite de hígado de bacalao.
- b) Concentrado : disolvente metanol, temperatura de cristalización 4°C, relación urea/a.grasos 4:1.

B.-Separaciones con las fases móviles etanol-agua (1% AcH).

-Columna analítica. Elución isocrática.

Tabla 4.3.11.-Condiciones cromatográficas (composición y caudal de la fase móvil y cantidad de muestra) utilizadas en la elución de concentrados de PUFAs de aceite de hígado de bacalao. Tiempos muertos (t_m), tiempos de retención (t_R) y anchos de banda (t_w) de los ácidos SA, EPA y DHA. Columna analítica. Fase móvil: EtOH/H₂O (1% AcH).

Fase móvil		Muestra:			t_R, min			t_w, min			
Composic.	Caudal (ml/min)	Conc (mg/ml)	Carga (mg)	t_m, min	SA	EPA	DHA	SA	EPA	DHA	
70:30	0,15	37,14	0,376	22,9	75,6	84,1	104,5	2,87	3,59	15,08	
	0,15	37,14	0,743	20,0	66,7	74,0	80,3	3,27	4,17	12,73	
	0,15	37,14	1,486	20,0	65,1	72,5	79,1	4,57	4,03	10,74	
	0,30	27,13	0,376	10,2	33,1	36,8	45,3	1,84	1,76	9,08	
	0,30	27,13	0,554	9,6	31,5	35,5	40,3	1,90	2,04	7,80	
	0,30	27,13	0,564	10,0	33,0	36,9	41,7	-	-	-	
	0,40	37,14	0,376	7,6	25,3	28,1	35,1	1,21	1,20	7,84	
	0,40	37,14	0,416	7,8	24,3	27,0	32,7	1,56	1,57	5,85	
	0,40	37,14	0,554	7,8	24,6	27,4	30,8	1,55	1,47	6,46	
	0,40	37,14	0,564	7,6	23,9	27,5	30,6	1,77	1,53	7,45	
	75:25	0,20	27,70	0,416	13,7	35,4	39,0	42,0	1,45	2,16	4,25
		0,30	27,70	0,277	9,0	23,4	25,8	27,8	0,77	0,99	1,42
0,30		27,70	0,416	9,2	24,6	27,0	29,1	1,22	1,54	2,80	
0,40		27,70	0,416	7,0	18,0	19,7	21,2	0,91	0,96	1,97	
80:20	0,15	37,14	0,186	-	-	-	-	-	-	-	
	0,25	27,70	0,055	11,6	23,1	25,7	27,7	-	-	-	
	0,30	27,70	0,138	8,6	18,2	19,8	21,5	1,22	1,64	1,58	
	0,30	27,70	0,277	9,6	18,9	20,2	21,3	1,35	1,42	2,31	
	0,30	27,70	0,416	8,8	18,5	19,7	20,9	1,62	1,13	2,71	

-Columna semipreparativa. Elución isocrática.

Tabla 4.3.12. Condiciones cromatográficas (caudal y composición de la fase móvil y cantidad de muestra cargada) utilizadas en la elución isocrática de concentrados de PUFAs de aceite de hígado de bacalao. Tiempos de retención (t_R) de los ácidos SA,EPA,DHA Columna semipreparativa. Fase móvil : EtOH/H₂O(1%AcH)

Fase móvil		Muestra: conc. A.H.B.		t_R ,min		
Composición	Caudal (ml/min)	Conc (mg/ml)	Carga (mg)	SA	EPA	DHA
70:30	2,00	27,73	1,940	20,18	22,30	27,92
70:30	2,00	27,73	1,940	20,39	22,59	28,68
70:30	2,00	27,73	2,770	20,10	22,26	25,65
70:30	2,00	27,73	2,770	19,70	21,70	24,40
75:25	1,50	27,13	1,940	20,00	21,80	23,50
75:25	1,50	27,13	1,386	20,00	22,10	23,60
75:25	1,50	27,13	1,386	20,80	23,20	24,90
80:20	1,50	27,13	0,693	16,10	17,60	18,60
80:20	1,50	27,13	0,693	16,00	17,50	18,50

Tabla 4.3.13.- Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) del extracto del aceite de hígado de bacalao inicial, del concentrado de urea y de las fracciones obtenidas por HPLC. Condiciones de obtención de las fracciones: columna semipreparativa; cantidad de a. grasos cargados , 2,77 mg; composición y caudal de la fase móvil , EtOH/H2O(1% AcH) 70:30 y 2,0 ml/min. Peso de ácidos grasos en cada fracción: SA, 0,299 mg; EPA, 0,960 mg; DHA, 1,349 mg

A.Graso	Extracto	Concentrado	Fracciones		
			SA	EPA	DHA
14:0	4,12	1,04	-	0,48	2,74
16:0	10,55	0,10	3,13	1,13	0,74
16:1n7	7,18	0,50	-	0,84	1,15
18:0	2,60	0,95	3,65	1,52	0,73
18:1n9	17,68	0,37	-	0,39	0,52
18:1n7	4,01	1,36	-	-	-
18:2n6	1,45	1,46	-	-	0,97
18:3n6	0,14	0,52	-	1,22	-
20:0	0,17	0,00	-	-	-
18:3n3	0,80	1,29	-	2,91	-
20:1n9	10,87	0,73	-	-	-
18:4n3	2,39	9,48	69,74	0,21	0,26
20:3n6	0,08	0,45	-	-	-
22:0	0,06	0,21	-	-	-
20:4n6	0,53	1,27	-	-	1,96
22:1n11	8,35	1,88	-	-	4,62
22:1n9	0,10	0,00	-	-	-
20:5n3	0,00	35,93	23,48	91,30	3,37
24:0	0,18	1,60	-	-	3,45
22:4n6	0,51	0,51	-	-	-
22:5n3	1,17	2,13	-	-	-
22:6n3	11,30	35,78	-	-	79,37
n.i	6,33	2,44	0,00	0,00	0,12

Condiciones de obtención del extracto y del concentrado de urea:

- a) Extracto : saponificación y extracción de aceite de hígado de bacalao.
- b) Concentrado : disolvente metanol, temperatura de cristalización 4°C, relación urea/a.grasos 4:1. Concentración 27,73 mg/ml

Tabla 4.3.14.- Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) del extracto del aceite de hígado de bacalao inicial, del concentrado de urea y de las fracciones obtenidas por HPLC. Condiciones de obtención de las fracciones: columna semipreparativa; cantidad de a. grasos cargados , 1,386 mg; composición y caudal de la fase móvil , EtOH/H2O(1% AcH) 75:25 y 1,5 ml/min. Peso de ácidos grasos en cada fracción: SA, 0,127 mg; EPA, 0,454 mg; DHA, 0,456 mg.

A.graso	Extracto del aceite	Concentrado	Fracciones		
			SA	EPA	DHA
14:0	4,12	1,04	-	0,47	2,33
16:0	10,55	0,10	1,81	1,06	0,90
16:1n7	7,18	0,50	-	0,91	1,76
18:0	2,60	0,95	2,12	0,56	0,71
18:1n9	17,68	0,37	-	-	-
18:1n7	4,01	1,36	-	-	-
18:2n6	1,45	1,46	-	-	-
18:3n6	0,14	0,52	-	1,09	-
20:0	0,17	0,00	-	-	-
18:3n3	0,80	1,29	-	2,76	-
20:1n9	10,87	0,73	-	-	-
18:4n3	2,39	9,48	84,50	1,38	-
20:3n6	0,08	0,45	-	-	-
22:0	0,06	0,21	-	-	-
20:4n6	0,53	1,27	-	0,47	2,75
22:1n11	8,35	1,88	-	-	-
22:1n9	0,10	0,00	-	-	-
20:5n3	0,00	35,93	8,42	90,34	3,47
24:0	0,18	1,60	-	-	-
22:4n6	0,51	0,51	-	-	-
22:5n3	1,17	2,13	-	-	-
22:6n3	11,30	35,78	3,15	0,97	79,60
n.i	6,33	2,44	0,00	-0,01	8,48

Condiciones de obtención del extracto y del concentrado de urea:

- a) Extracto : saponificación y extracción de aceite de hígado de bacalao.
- b) Concentrado : disolvente metanol, temperatura de cristalización 4°C, relación urea/a.grasos 4:1. Concentración 27,73 mg/ml

Tabla 4.3.15.- Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) del extracto del aceite de hígado de bacalao inicial, del concentrado de urea y de las fracciones obtenidas por HPLC. Condiciones de obtención de las fracciones: columna semipreparativa; cantidad de a. grasos cargados , 0,693 mg; composición y caudal de la fase móvil , EtOH/H2O(1% AcH) 80:20 y 1,5 ml/min. Peso de ácidos grasos en cada fracción: SA, 0,069 mg; EPA, 0,261 mg; DHA, 0,291 mg.

A.Graso	Extracto	Concentrado	Fracciones		
			SA	EPA	DHA
14:0	4,12	1,04	1,16	0,84	2,16
16:0	10,55	0,10	3,49	2,45	0,82
16:1n7	7,18	0,50	2,99	1,05	1,87
18:0	2,60	0,95	3,42	0,84	0,77
18:1n9	17,68	0,37	1,67	0,98	0,39
18:1n7	4,01	1,36	-	-	-
18:2n6	1,45	1,46	-	-	-
18:3n6	0,14	0,52	-	1,21	-
20:0	0,17	0,00	-	-	-
18:3n3	0,80	1,29	-	2,76	0,27
20:1n9	10,87	0,73	-	-	-
18:4n3	2,39	9,48	87,25	0,77	-
20:3n6	0,08	0,45	-	-	-
22:0	0,06	0,21	-	-	-
20:4n6	0,53	1,27	-	-	3,33
22:1n11	8,35	1,88	-	0,46	2,49
22:1n9	0,10	0,00	-	-	5,94
20:5n3	0,00	35,93	-	87,43	5,49
24:0	0,18	1,60	-	-	3,07
22:4n6	0,51	0,51	-	-	-
22:5n3	1,17	2,13	-	-	0,69
22:6n3	11,30	35,78	-	1,21	72,16
n.i	6,33	2,44	0,02	0,00	0,55

Condiciones de obtención del extracto y del concentrado de urea:

- Extracto : saponificación y extracción de aceite de hígado de bacalao.
- Concentrado : disolvente metanol, temperatura de cristalización 4°C, relación urea/a.grasos 4:1. Concentración 27,73 mg/ml

4.3.2.-Separación de PUFAs de *I. galbana* por HPLC.

-Columna semipreparativa. Elución isocrática

Tabla 4.3.16. Condiciones cromatográficas (composición y caudal de la fase móvil y cantidad de muestra) utilizadas en la elución isocrática de un concentrado de PUFAs de *I. galbana*. Tiempos de retención, (t_R), de los ácidos SA,EPA,DHA. Columna semipreparativa.

a). Fase móvil : MeOH/H2O(1%AcH)						
Fase móvil		Muestra: Conc. <i>I.galbana</i>		t_R , min		
Composición	Caudal (ml/min)	Conc (mg/ml)	Carga (mg)	SA	EPA	DHA
80:20	3,00	39,55	5,93	24,3	32,0	45,0
80:20	3,00	39,55	9,49	23,5	30,8	43,6
80:20	3,00	39,55	9,49	28,5	37,9	55,0
80:20	3,00	39,55	9,49	28,8	38,4	54,0

b). Fase móvil : EtOH/H2O(1%AcH)						
Fase móvil		Muestra: Conc. <i>I.galbana</i>		t_R , min		
Composición	Caudal (ml/min)	Conc (mg/ml)	Carga (mg)	SA	EPA	DHA
70:30	1,50	39,55	2,77	30,2	36,2	47,4
70:30	1,50	39,55	2,77	30,5	36,5	47,4
70:30	1,50	39,55	2,77	30,2	36,2	47,6
70:30	2,00	39,55	2,77			
70:30	2,00	39,55	2,77	30,1	32,1	42,4

Tabla 4.3.17- Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) de la biomasa de *I. galbana*, del extracto de ácidos grasos, del concentrado de urea y de las fracciones obtenidas por HPLC. Condiciones de obtención de las fracciones: columna semipreparativa y precolumna; cantidad de a. grasos cargados , 9,49 mg; composición y caudal de la fase móvil , MeOH/H2O(1% AcH) 80:20 y 3,0 ml/min. Peso de ácidos grasos en cada fracción: SA, 2,435 mg; EPA, 3,872 mg; DHA, 2,230 mg.

A.Graso	Biomasa	Extracto	Concentrado.	Fracciones		
				SA	EPA	DHA
14:0	10,10	10,71	0,29	-	-	-
16:0	20,30	18,93	0,22	1,09	-	-
16:1n7	21,40	23,25	4,33	-	-	-
18:0	0,65	0,47	1,47	1,07	-	-
18:1n9	1,40	1,66	0,15	-	-	-
18:1n7	3,60	3,22	0,78	-	-	-
18:2n6	0,90	0,87	0,17	-	-	1,44
18:3n6	0,20	0,22	0,44	-	2,07	-
20:0	0,00	0,11	0,20	-	-	-
18:3n3	1,20	1,28	0,80	-	1,96	-
20:1n9	0,15	0,25	0,26	-	-	-
18:4n3(SA)	6,40	7,31	22,58	94,80	-	-
20:3n6	0,40	0,21	0,24	-	-	-
22:0	0,00	0,05	0,08	-	-	-
20:4n6	0,70	0,71	1,06	-	-	3,67
22:1n11	0,10	0,05	0,13	-	-	-
22:1n9	0,00	0,05	0,13	-	-	-
20:5n3(EPA)	22,60	22,35	39,38	-	95,97	-
24:0	0,00	0,08	0,07	-	-	-
22:4n6	1,30	1,25	3,60	-	-	-
22:5n3	0,20	0,14	0,13	-	-	-
22:6n3(DHA)	8,40	6,76	23,44	-	-	94,89
n.i	-0,00	0,07	0,05	3,04	0,00	-0,00

Condiciones de obtención del extracto de ácidos grasos y del concentrado:

- a) Extracto : mezcla de extractos obtenida por saponificación directa con todos los sistemas y condiciones de operación que se especifican en el apartado 3.1.5.
- b) Concentrado : Metanol, 4°C , relación urea/a.grasos 4:1

Tabla 4.3.18: Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) de la biomasa de *I. galbana*, del extracto de ácidos grasos, del concentrado de urea y de las fracciones obtenidas por HPLC. Condiciones de obtención de las fracciones: columna semipreparativa y precolumna; cantidad de a. grasos cargados , 2,77 mg; composición y caudal de la fase móvil , EtOH/H2O(1% AcH) 70:30 y 2,0 ml/min. Peso de ácidos grasos en cada fracción: EPA, 1,919 mg; DHA, 1,209 mg.

A.Graso	Biomasa	Extracto	Concentrado	Fracciones		
				SA	EPA	DHA
14:0	10,10	10,71	0,29	-	0,92	0,35
16:0	20,30	18,93	0,22	-	1,17	1,54
16:1n7	21,40	23,25	4,33	-	0,49	0,86
18:0	0,65	0,47	1,47	-	0,78	0,64
18:1n9	1,40	1,66	0,15	-	0,70	1,11
18:1n7	3,60	3,22	0,78	-	-	-
18:2n6	0,90	0,87	0,17	-	-	0,76
18:3n6	0,20	0,22	0,44	-	1,86	-
20:0	0,00	0,11	0,20	-	-	-
18:3n3	1,20	1,28	0,80	-	1,97	-
20:1n9	0,15	0,25	0,26	-	-	-
18:4n3	6,40	7,31	22,58	-	0,48	-
20:3n6	0,40	0,21	0,24	-	0,79	-
22:0	0,00	0,05	0,08	-	-	-
20:4n6	0,70	0,71	1,06	-	-	3,51
22:1n11	0,10	0,05	0,13	-	-	0,33
22:1n9	0,00	0,05	0,13	-	-	-
20:5n3	22,60	22,35	39,38	-	90,82	0,82
24:0	0,00	0,08	0,07	-	-	-
22:4n6	1,30	1,25	3,60	-	-	-
22:5n3	0,20	0,14	0,13	-	-	-
22:6n3	8,40	6,76	23,44	-	-	90,07
n.i	-0,00	0,07	0,05	-	0,02	0,01

Condiciones de obtención del extracto de ácidos grasos y del concentrado:

- a) Extracto : mezcla de extractos obtenida por saponificación directa con todos los sistemas y condiciones de operación que se especifican en el apartado 3.1.5.
- b) Concentrado : Metanol, 4°C , relación urea/a.grasos 4:1

Tabla 4.3.19 -Composición en ácidos grasos (% sobre a.grasos totales) de la biomasa de *I. galbana*, del extracto de ácidos grasos, del concentrado de urea y de las fracciones obtenidas por HPLC. Condiciones de obtención de las fracciones: columna semipreparativa y precolumna; cantidad de a. grasos cargados , 2,77 mg; composición y caudal de la fase móvil , EtOH/H2O(1% AcH) 70:30 y 1,5 ml/min. Peso de ácidos grasos en cada fracción: SA, 1,071 mg; EPA, 1,319 mg; DHA, 1,234 mg.

A.graso	Biomasa	Extracto	Concentrado	Fracciones		
				SA	EPA	DHA
14:0	10,10	10,71	0,29	-	0,80	-
16:0	20,30	18,93	0,22	1,47	0,44	0,55
16:1n7	21,40	23,25	4,33	-	-	0,39
18:0	0,65	0,47	1,47	2,78	0,49	0,33
18:1n9	1,40	1,66	0,15	0,89	0,85	0,88
18:1n7	3,60	3,22	0,78	-	-	-
18:2n6	0,90	0,87	0,17	-	1,67	0,40
18:3n6	0,20	0,22	0,44	-	0,85	-
20:0	0,00	0,11	0,20	-	0,42	-
18:3n3	1,20	1,28	0,80	-	1,74	-
20:1n9	0,15	0,25	0,26	1,21	-	-
18:4n3	6,40	7,31	22,58	88,72	-	0,38
20:3n6	0,40	0,21	0,24	0,49	-	-
22:0	0,00	0,05	0,08	-	-	-
20:4n6	0,70	0,71	1,06	-	0,78	3,09
22:1n11	0,10	0,05	0,13	-	-	0,62
22:1n9	0,00	0,05	0,13	-	-	0,62
20:5n3	22,60	22,35	39,38	4,40	91,96	-
24:0	0,00	0,08	0,07	-	-	-
22:4n6	1,30	1,25	3,60	-	-	-
22:5n3	0,20	0,14	0,13	-	-	0,70
22:6n3	8,40	6,76	23,44	-	-	92,04
n.i	0,00	0,07	0,05	0,04	0,00	0,00

Condiciones de obtención del extracto de ácidos grasos y del concentrado:

- Extracto : mezcla de extractos obtenida por saponificación directa con todos los sistemas y condiciones de operación que se especifican en el apartado 3.1.5.
- Concentrado : Metanol, 4°C , relación urea/a.grasos 4:1

5.-Discusión de resultados

5.- DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

5.1.- EXTRACCION DE LIPIDOS Y ACIDOS GRASOS DE LA BIOMASA DE *ISOCHRYSIS GALBANA*

5.1.1.- Extracción de lípidos

Como ya se ha indicado en el apartado 3.1.2 la extracción de lípidos de la microalga marina *Isochrysis galbana* se ha realizado con los siguientes sistemas extractantes:

A.- Cloroformo-metanol-agua 1:2:0,8 v/v/v,

B.- Hexano-etanol (96% v/v) 1:2,5 v/v,

C.- Hexano-etanol (96% v/v) 1:0,9 v/v

D.- n-Butanol

E.- Etanol 96% v/v

F.- Etanol (96% v/v)/Agua 1:1 v/v

G.- Hexano-Isopropanol 1:1,5 v/v

(todas las extracciones se realizaron a temperatura ambiente y durante 1 h)

El sistema A, cloroformo/metanol/agua 1:2:0,8 v/v es el sistema más utilizado para la extracción de lípidos de fuentes naturales, siendo su utilización fundamentalmente con fines analíticos. En este trabajo se ha utilizado para comparar con él el resto de los sistemas utilizados, los cuales se han elegido por su carácter biocompatible, ya que, hasta donde sabemos, algunos de ellos (los sistemas ternarios B y C) no se han utilizado con este fin. Estos sistemas ternarios se han elegido para seguir un procedimiento de extracción-purificación lo más paralelo posible al método de Kates (1988) con el sistema A, pero sustituyendo el cloroformo por hexano y el metanol por etanol por las razones de biocompatibilidad ya comentadas.

En la tablas 4.1.2 a 4.1.8 se muestra el perfil de los ácidos grasos de la biomasa de *I. galbana* y de los diferentes extractos y refinados lipídicos obtenidos con los siete sistemas extractantes utilizados. En general todos los extractos reproducen el perfil de la biomasa original, las pequeñas diferencias que se obserban tan sólo tienen interés para comprender que las diferencias que suelen aparecer en bibliografía entre perfiles de una misma microalga se deben también a los diferentes métodos de extracción utilizados.

Por otra parte, como se observa en las tablas 4.1.2 a 4.1.4, los perfiles de ácidos grasos de los refinados de los sistemas ternarios A, B y C son distintos del de la biomasa original, aunque no se observa una tendencia generalizada.

Los rendimientos en la extracción de lípidos obtenidos con los siete sistemas extractantes se muestran en la tabla 4.1.9. El rendimiento más alto se obtiene con el sistema A, cloroformo/metanol/agua 1:2:0,8 v/v (93,8% sumando el extracto y el refinado), seguido por el sistema E, etanol 96% v/v (84,4%), y el sistema ternario B, hexano/etanol 96% 1:2,5 v/v (79,6%, extracto más refinado). Estos últimos datos son quizás los resultados más destacados ya que se han obtenido con disolventes usuales en la industria agroalimentaria (biocompatibles) mientras que los sistemas utilizados por Folch (1957), Bligh y Dyers (1959) y Kochert (1978) emplean cloroformo y metanol que son nocivos (Hara y Radin, 1978) y por tanto no recomendables cuando los lípidos se van a emplear como aditivos en alimentos y probablemente en ensayos clínicos.

Sin embargo, el sistema B tiene la desventaja con respecto al A de que en el refinado queda aún un porcentaje considerable de lípidos (27,4%, tabla 4.1.9), si bien estos lípidos se recuperan extrayéndolos con hexano. En el caso del sistema ternario C este porcentaje es menor (8,3%, tabla 4.1.9) pero también lo es el rendimiento total de lípidos extraídos (57,8%, tabla 4.1.9).

Las operaciones realizadas con los sistemas ternarios B y C, encaminadas primero a la extracción e inmediatamente después a la purificación de los lípidos, se esquematizan en el diagrama triangular de la figura 5.1.1. Este diagrama se ha construido utilizando los datos de equilibrio obtenidos por Bonner (1910) para el sistema hexano-etanol-agua (en el diagrama triangular se representan porcentajes en peso). En el apartado 3.1.3 se describen las operaciones esquematizadas en este diagrama. Con el sistema B se consigue inicialmente un buen rendimiento en la extracción de lípidos (79,6%, tabla 4.1.9) y a continuación un mal reparto (punto B') de estos lípidos entre las fases de hexano y etanol-agua (punto B₁) (52,2/27,4, tabla 4.1.9), mientras que con el sistema C se obtiene un bajo rendimiento en la extracción de lípidos (57,8%) y un reparto más favorable (punto C') de los lípidos entre ambas fases (51,4/8,6, tabla 4.1.9, que corresponden a los puntos C₁ y hexano puro en la figura 5.1.1). Por tanto parece obvio que la extracción de los lípidos debe realizarse con sistemas de composición semejante al B, e incluso con un mayor contenido en etanol

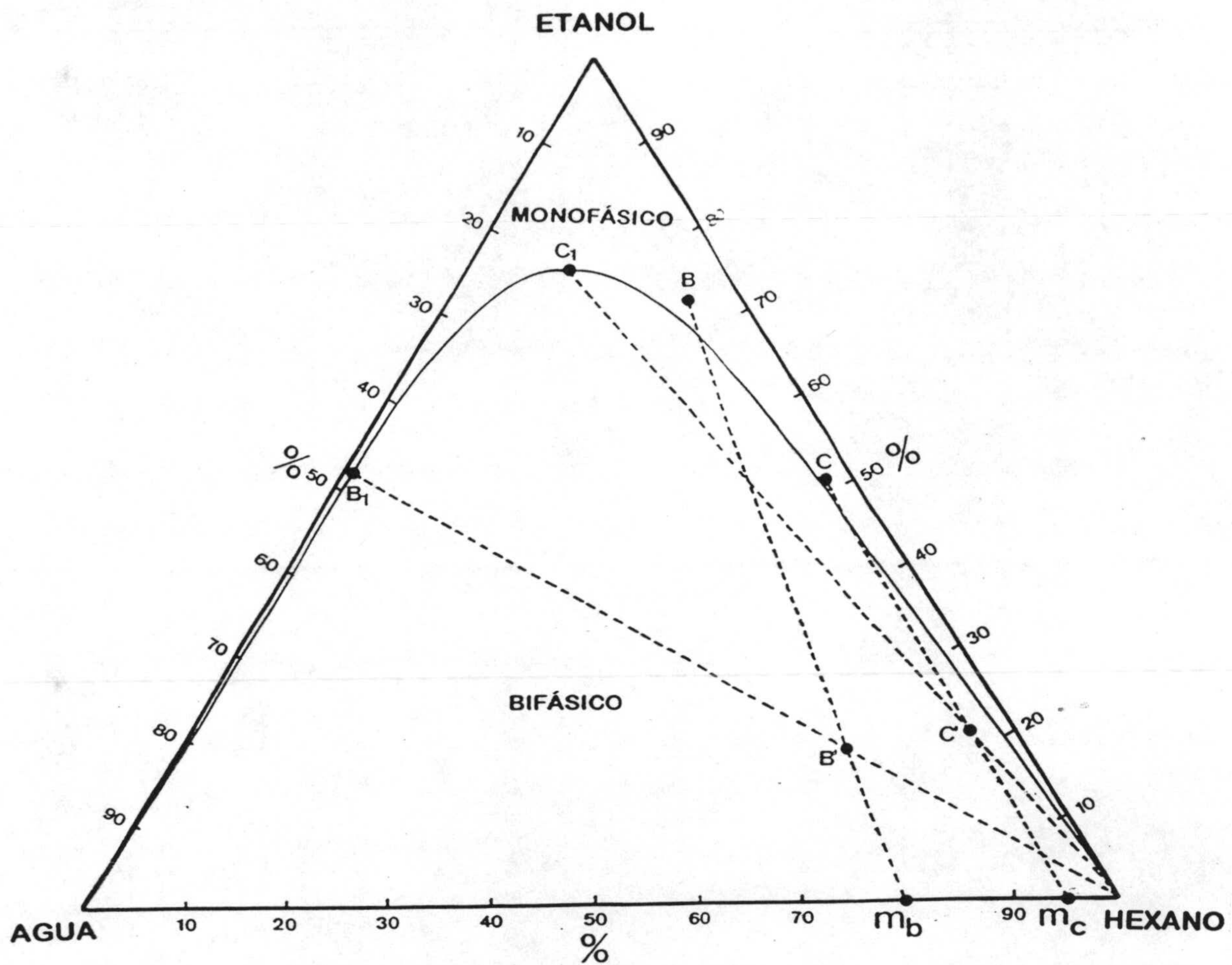


Figura 5.1.1.-Diagrama de fases del sistema ternario hexano-etanol-agua (Bonner,1910). Operaciones realizadas en la extracción y purificación de lípidos con los sistemas ternarios B y C.

(téngase en cuenta que el rendimiento en lípidos con etanol 96% es del 84,4%) y a continuación formar un sistema bifásico de composición semejante al C', es decir con un gran contenido en hexano para favorecer la presencia de los lípidos en el extracto.

La investigación de este método también debe dirigirse hacia una posible disminución de las cantidades de disolventes utilizadas, ya que en este estudio se han empleado volúmenes de sistema extractante equivalentes a los utilizados por Kates (1986) con el sistema A. Además pueden estudiarse otras posibilidades como la modificación de los coeficientes de reparto adicionando electrolitos o modificar el tiempo y la temperatura de extracción.

El orden en la efectividad de extracción de los sistemas ensayados (tabla 4.1.9) decrece en el siguientes orden:

A.- Cloroformo-metanol-agua 1:2:0,8 v/v/v,

E.- Etanol 96% v/v

B.- Hexano-etanol (96% v/v) 1:2,5 v/v,

D.- n-Butanol

G.- Hexano-Isopropanol 1:1,5 v/v

F.- Etanol (96% v/v)/Agua 1:1 v/v

C.- Hexano-etanol (96% v/v) 1:0,9 v/v

Observando el contenido en alcoholes de estos sistemas puede concluirse que en general el rendimiento de la extracción es mayor cuanto más alto es este contenido. Este hecho se cumple cuando se comparan entre sí los sistemas con el mismo tipo de alcohol (etanol) y es incluso cierto cuando el alcohol es el isopropanol. Hay tan sólo dos excepciones a esta conclusión: que el sistema A, cloroformo/metanol/agua, sea el más efectivo con sólo un 53% en metanol y que el n-butanol, sea menos efectivo que los sistemas A, E y B. Estos resultados pueden explicarse debido a que aunque el factor dominante sobre el porcentaje de lípidos extraídos es la cantidad de alcohol, el rendimiento también se hace mayor cuanto mayor es la polaridad del alcohol. De hecho el sistema A debe también su mayor eficacia a que el cloroformo es ligeramente más polar que el hexano (completamente apolar).

Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos en el fraccionamiento de los lípidos de la biomasa de la microalga marina *I. galbana* en lípidos neutros (26,2%) y polares (72,23%), como se pone de manifiesto en la tabla

5.1.1 (que se ha obtenido a partir de los resultados que se muestran en la tabla 4.1.1, teniendo en cuenta el tipo de lípidos que eluyen con cada disolvente, apartado 3.1.8), ya que estos lípidos son más solubles en disolventes polares como los alcoholes, mientras que los lípidos neutros son más solubles en hidrocarburos apolares como el hexano, Christie (1982). Aunque la fracción de lípidos neutros también es importante la baja apolaridad de los alcoholes (mayor en el isopropanol y en el butanol que muestran efectividades altas) es suficiente para disolverlos. Los lípidos neutros son generalmente lípidos de reserva unidos débilmente a la biomasa y, por tanto, fáciles de disolver, mientras que los lípidos polares son generalmente lípidos estructurales, más difíciles de extraer, que se extraerán en mayor cantidad a medida que aumenta el contenido en alcohol del sistema extractante.

Este resultado también explicaría el bajo rendimiento obtenido en la extracción de lípidos de la microalga *Spirulina* (Ahlgren y Merino, 1991) con el sistema hexano/isopropanol 3:2 debido al bajo contenido de este disolvente en alcohol; de tal manera que estos autores no recomiendan en modo alguno la utilización de este sistema para la extracción de los lípidos de la microalgas.

En la tabla 5.1.2 se muestran los rendimientos en SA, EPA y DHA, así como en los PUFAs n-3, en los lípidos extraídos, calculados mediante la ecuación [3.1.6] utilizando los datos que se muestran en las tablas 4.1.2 a 4.1.9. Estos valores representarían, en el mejor de los casos, un rendimiento en la extracción de ácidos grasos en un hipotético proceso llevado a cabo en dos etapas: una primera de extracción de la fracción lipídica y una segunda de obtención de los ácidos grasos mediante hidrólisis ácida (método de Lepage y Roy, 1984) del extracto lipídico obtenido. Se observa que los rendimientos alcanzados en la extracción de SA son superiores a los alcanzados en la extracción de lípidos (tabla 4.1.9), los rendimientos para el EPA son similares y los rendimientos en DHA inferiores. De nuevo este hecho parece poner de manifiesto que los lípidos más difíciles de extraer son los lípidos polares o estructurales (tabla 4.1.9), ya que el DHA está contenido fundamentalmente en este tipo de lípidos (tabla 5.1.1). También en la microalga *Phaedactylum tricornutum* Yongmanichai y Ward (1991) ponen de manifiesto la presencia de DHA fundamentalmente en los fosfolípidos.

Tabla 5.1.1.: Composición en ácidos de la biomasa y de las fracciones de lípidos apolares (26,2%) y polares (72,2%) obtenidas por fraccionamiento en columna y calculados a partir de los resultados que se muestran en la tabla 4.1.1. Los lípidos apolares son eluidos con cloroformo y los lípidos polares, con acetona y metanol.

A,graso	Biomasa	Fracciones	
		Apolares	Polares
14:0	10,1	1,47	5,19
16:0	20,3	5,78	15,00
16:1 n7	21,4	5,58	14,80
18:0	0,7	0,59	2,33
18:1 n9	1,4	0,85	3,49
18:1 n7	3,6	0,66	1,88
18:2 n6	0,9	0,60	1,94
18:3 n6	0,2	0,12	0,23
20:0	0,0	0,21	0,12
18:3 n3	1,2	0,44	1,30
20:1 n9	0,1	0,08	0,65
18:4 n3 (SA)	6,4	1,38	4,62
20:3 n6	0,3	0,11	0,61
22:0	0,0	0,10	0,00
20:4 n6	0,7	0,41	0,59
22:1 n11	0,1	0,00	0,19
22:1 n9	0,0	0,08	0,11
20:5 n3(EPA)	22,6	5,72	14,23
24:0	0,1	0,00	0,07
22:4 n6	1,3	0,08	0,11
22:5 n3	0,2	0,09	0,07
22:6 n3(DHA)	8,4	1,85	4,72
Suma	100,0	26,20	72,23
Saturad,	31,2	8,15	22,71
Monoins,	26,6	7,25	21,10
Pufas-n3	38,8	9,48	24,94
Pufas-n6	3,4	1,32	3,48

Tabla 5.1.2.-Rendimientos en la extracción de lípidos totales (tabla 4.19) y de :
a) SA , b)EPA , c)DHA y d) Σ (SA, EPA,DHA), obtenidos con
cada uno de los sistemas extractantes utilizados . Calculados
mediante la ecuación (3.1.6)

Sistema extractante	Lípidos totales	Rendimientos	
		a) ac. estearidónico(SA)	
		Extracto	Refinado
A : 'CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 1:2:0,8 v/v/v	93,8	108,9	1,2
B : 'Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v	79,6	46,5	30,8
C : 'Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v	57,8	49,0	11,6
D : 'n-Butanol	70,4	70,5	-
E : 'Etanol(96%)	84,4	92,3	-
F : 'Etanol(96%)/H ₂ O 1:1 v/v	63,3	81,6	-
G : 'Hexano/Isopropanol 1:2,5 v/v	66,0	74,3	-

Sistema extractante	Lípidos totales	b) ac.eicosapentaenoico(EPA)	
		Extracto	Refinado
		A : CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 1:2:0,8 v/v/v	93,8
B : Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v	79,6	49,4	24,8
C : Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v	57,8	53,2	11,0
D : n-Butanol	70,4	67,3	-
E : Etanol(96%)	84,4	82,2	-
F : Etanol(96%)/H ₂ O 1:1 v/v	63,3	65,7	-
G : Hexano/Isopropanol 1:1,5 v/v	66,0	67,0	-

Tabla 5.1.2.(cont)-Rendimientos en la extracción de lípidos totales (tabla 4.19) y de : a) SA , b)EPA , c)DHA y d) Σ de los tres mediante la ecuación

Sistema extractante	Lípidos totales	Rendimiento	
		c) a.docosaheptaenoico(DHA)	
		Extracto	Refinado
A : CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 1:2:0,8 v/v/v	93,8	92,9	0,5
B : Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v	79,6	51,0	17,4
C : Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v	57,8	49,6	9,9
D : n-Butanol	70,4	60,8	-
E : Etanol(96%)	84,4	83,0	-
F : Etanol(96%)/H ₂ O 1:1 v/v	63,3	32,2	-
G : Hexano/Isopropanol 1:2,5 v/v	66,0	55,1	-

Sistema extractante	Lípidos totales	Rendimientos	
		d) ácidos Σ (SA,EPA,DHA)	
		Extracto	Refinado
A : 'CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 1:2:0,8 v/v/v	93,8	101,1	0,7
B : 'Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v	79,6	49,3	24,1
C : 'Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v	57,8	49,4	10,8
D : 'n-Butanol	70,4	66,3	-
E : 'Etanol(96%)	84,4	84,2	-
F : 'Etanol(96%)/H ₂ O 1:1 v/v	63,3	60,8	-
G : 'Hexano/Isopropanol 1:2,5 v/v	66,0	65,6	-

5.1.2.- Extracción de ácidos grasos por saponificación directa

En este caso se utilizaron los mismos sistemas extractantes que en la extracción de lípidos (excepto el sistema A) pero adicionando KOH, por lo que mediante este procedimiento se obtienen directamente los ácidos grasos (sales potásicas en una primera etapa) en lugar de los lípidos. Este método podría por tanto tener la ventaja de disminuir el tiempo y el costo de la operación, con respecto a un proceso en dos etapas de extracción de lípidos y saponificación de los mismos.

En las tablas 4.1.10 a 4.1.15 se muestran los perfiles en los ácidos grasos en cada una de las extracciones realizadas. En todos los casos estos perfiles son análogos al de la biomasa original y a los correspondientes extractos lipídicos cuando no se realizó la saponificación simultánea (tablas 4.1.2 a 4.1.8). Además los perfiles son prácticamente los mismos en las dos condiciones de saponificación empleadas (60°C y 1 h ó temperatura ambiente y 8 h).

En la tabla 4.1.16 se muestran los rendimientos globales en ácidos grasos alcanzados con cada uno de los sistemas extractantes. En todos los casos se puede observar que las condiciones de operación empleadas no afectan a los rendimientos que se obtienen con cada uno de los sistemas, ya que en las dos condiciones de operación utilizadas estos rendimientos son muy semejantes. El mayor rendimiento se alcanzó con el sistema hexano/etanol 96% 1:2,5 v/v a 60°C y 1 h (81%) que es muy parecido al que se obtiene con etanol 96% (79,8% y 79,2%). El orden de efectividad (tabla 4.1.16) es el siguiente:

- B.- Hexano-etanol (96% v/v) 1:2,5 v/v,
- E.- Etanol 96% v/v
- G.- Hexano-Isopropanol 1:1,5 v/v
- C.- Hexano-etanol (96% v/v) 1:0,9 v/v
- F.- Etanol (96% v/v)/Agua 1:1 v/v
- D.- n-Butanol

Si bien los sistemas C y F dan rendimientos semejantes estando ambos por debajo del 50%. Este orden en la efectividad de los distintos sistemas ensayados es prácticamente idéntico al obtenido en la efectividad de la extracción de lípidos (con la excepción del n-butanol que se comentará más adelante).

Por otra parte, si se comparan los rendimientos obtenidos en estos experimentos con los correspondientes a la extracción de lípidos con el mismo sistema (tabla 4.1.9), se observa que éstos últimos son más elevados (con la excepción de los sistemas B y B1 que dan rendimientos muy semejantes). Este hecho, unido a la semejanza de los perfiles y al orden de las efectividades ya comentados, parecen poner de manifiesto que la saponificación de los lípidos tiene lugar una vez que estos están en disolución y por tanto los rendimientos obtenidos en la saponificación directa tendrían un límite en los obtenidos en la extracción de lípidos y, por tanto, el valor de aquellos depende en primer lugar de la bondad del sistema extractante utilizado. Por tanto en este caso son válidas todas las consideraciones hechas en la extracción de lípidos con respecto a qué disolvente es más adecuado.

A este respecto Ackman y cols. (1970) y Napolitano y cols. (1990) sugieren que cuando se realiza la saponificación directa los rendimientos en ácidos grasos son superiores a los que se obtendrían por extracción previa de los lípidos y posterior saponificación de los mismos, debido a que el KOH produce una mayor rotura de la pared celular de algunas microalgas. Sin embargo este hecho puede no ser cierto en microalgas con paredes celulares débiles fáciles de romper mediante los disolventes orgánicos usuales como ocurre con la microalga *I. galbana* utilizada en este trabajo.

El descenso en el rendimiento de la extracción de ácidos grasos con respecto a la extracción de lípidos, circunstancia que es más acusada en los sistemas C1, C2, F1 y F2 (tablas 4.1.9 y 4.1.16), es probablemente debido, no a que la saponificación de los lípidos previamente disueltos haya tenido lugar con rendimientos bajos, sino a una pérdida de dichos ácidos grasos, sobre todo en la etapa posterior de extracción de ácidos libres con hexano. Hechos de este tipo han sido puestos de manifiesto por varios autores como por ejemplo Gellerman y Schlenk (1965).

Una ventaja importante del sistema B cuando se realizan la extracción y la saponificación de manera simultánea es que en este caso no se presenta el inconveniente de tener una fracción importante de lípidos impurificados en la fase hidroetanólica como ocurría cuando se hacía sólo la extracción de lípidos (27,4% del total, tabla 4.1.9). En este caso todos los ácidos grasos están inicialmente en la fase hidroalcohólica y pueden extraerse fácilmente con hexano.

El sorprendente bajo rendimiento obtenido en la extracción de ácidos grasos con n-butanol (9%, tabla 4.1.16) puede tener su origen en haber seguido en lo posible el

mismo método experimental con este disolvente que con los otros cinco sistemas para que los resultados fueran totalmente comparativos. En todos los demás casos después de realizada la saponificación se añaden 100 ml de agua para que los jabones queden solubilizados en la disolución hidroalcohólica formada y así extraer posteriormente con hexano los lípidos insaponificables (sobre todo carotenoides). Sin embargo el n-butanol es muy poco soluble en agua (9 g/100 g de agua), por lo que en este caso hubo que añadir una gran cantidad de agua para solubilizar el butanol, quedando por tanto los ácidos grasos muy diluidos. La posterior extracción con igual cantidad de hexano que con los demás sistemas, ha hecho difícil que pudieran extraerse cantidades mayores de ácidos grasos.

Al igual que se hizo con los extractos lipídicos, a partir de los perfiles de ácidos grasos que se muestran en las tablas 4.1.10 a 4.1.15 y de los rendimientos globales (tabla 4.1.16) se han calculado, mediante la ecuación [3.1.6], los rendimientos parciales en la extracción por saponificación directa de SA, EPA, DHA y PUFAs (tabla 5.1.3). Los rendimientos parciales máximos se alcanzan con el sistema ternario hexano/etanol (96%) 1:2,5 v/v, cualesquiera que sean las condiciones de saponificación empleadas. El etanol 96% también proporciona análogos resultados. Sin embargo el resto de los sistemas proporcionan unos rendimientos parciales bajos y siempre inferiores a los que se alcanzan en la extracción de los lípidos (tabla 5.1.2). Así mismo, al igual que se muestra en la tabla 5.1.2, en la tabla 5.1.3 se observa el rendimiento en SA es muy alto, el de EPA del mismo valor que el correspondiente rendimiento global y el de DHA inferior. La explicación de estos resultados es, lógicamente, la misma que en la extracción de lípidos.

Tabla 5.1.3.-Rendimientos en la extracción de ácidos grasos totales (Tabla 4.1.16) y de los ácidos grasos: a)SA; b)EPA; c)DHA; y d) Σ (SA,EPA,DHA) obtenidos con cada uno de los sistemas utilizados y en las condiciones experimentales indicadas. Calculados mediante la ecuación [3.16].

Sistema de extracción/saponificación. Condiciones: tiempo y temperatura.	A.grasos totales	SA en el extracto
8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v 1 hora,60°C 8 horas,temperatura ambiente.	81,0 75,0	82,3 91,4
8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v 1 hora,60°C 8 horas,temperatura ambiente	48,0 47,1	60,0 65,5
8 g KOH / 380 ml n-butanol 1 hora , 60 °C	9,0	17,4
8 g KOH / 380 ml Etanol (96%) 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	79,8 79,2	81,0 77,3
8 g KOH / 380 ml Etanol(96%)/H2O 1:1 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	46,5 45,5	55,9 57,6
8 g KOH / 380 ml Hexano/Isopropanol) 1:1,5 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	62,0 61,1	94,9 90,7
Sistema de extracción/saponificación. Condiciones: tiempo y temperatura	A.grasos totales	EPA en el extracto
8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v 1 hora,60°C 8 horas,temperatura ambiente.	81,0 75,0	79,9 79,0
8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v 1 hora,60°C 8 horas,temperatura ambiente	48,0 47,1	48,2 48,1
8 g KOH / 380 ml n-butanol 1 hora , 60 °C	9,0	7,5
8 g KOH / 380 ml Etanol (96%) 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	79,8 79,2	80,2 72,9
8 g KOH / 380 ml Etanol(96%)/H2O 1:1 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	46,5 45,5	45,1 44,5
8 g KOH / 380 ml Hexano/Isopropanol) 1:1,5 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	62,0 61,1	63,9 66,5

Tabla 5.1.3 (cont): Rendimientos en la extracción de ácidos grasos totales (Tabla 4.1.16) de los ácidos grasos: a)SA; b)EPA; c)DHA; y d) Σ (SA,EPA,DHA) obtenidos con cada uno de los sistemas utilizados y en las condiciones experimentales indicadas. Calculados mediante la ecuación [3.16].

Sistema de extracción/saponificación. Condiciones: tiempo y temperatura.	A.grasos totales DHA en el extracto	
8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v 1 hora,60°C 8 horas,temperatura ambiente.	81,0	72,3
8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v 1 hora,60°C 8 horas,temperatura ambiente	48,0	40,0
8 g KOH / 380 ml n-butanol 1 hora , 60 °C	9,0	6,1
8 g KOH / 380 ml Etanol (96%) 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	79,8	74,1
8 g KOH / 380 ml Etanol(96%)/H2O 1:1 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	79,2	68,8
8 g KOH / 380 ml Etanol(96%)/H2O 1:1 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	46,5	37,6
8 g KOH / 380 ml Hexano/Isopropanol) 1:1,5 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	45,5	37,4
8 g KOH / 380 ml Hexano/Isopropanol) 1:1,5 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	62,0	46,5
8 g KOH / 380 ml Hexano/Isopropanol) 1:1,5 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	61,1	48,0
Sistema de extracción/saponificación. Condiciones: tiempo y temperatura .	A.grasos totales	Σ (SA,EPA,DHA) en el extracto
8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:2,5 v/v 1 hora,60°C 8 horas,temperatura ambiente.	81,0	78,6
8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v 1 hora,60°C 8 horas,temperatura ambiente	75,0	78,4
8 g KOH / 380 ml Hexano/Etanol(96%) 1:0,9 v/v 1 hora,60°C 8 horas,temperatura ambiente	48,0	47,5
8 g KOH / 380 ml n-butanol 1 hora , 60 °C	47,1	46,6
8 g KOH / 380 ml Etanol (96%) 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	9,0	8,6
8 g KOH / 380 ml Etanol (96%) 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	79,8	78,9
8 g KOH / 380 ml Etanol(96%)/H2O 1:1 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	79,2	72,6
8 g KOH / 380 ml Etanol(96%)/H2O 1:1 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	46,5	46,5
8 g KOH / 380 ml Etanol(96%)/H2O 1:1 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	45,5	45,4
8 g KOH / 380 ml Hexano/Isopropanol) 1:1,5 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	62,0	59,2
8 g KOH / 380 ml Hexano/Isopropanol) 1:1,5 v/v 1 hora, 60°C 8 horas,temperatura ambiente.	61,1	66,2

5.2.- OBTENCION DE CONCENTRADOS DE PUFAs POR EL METODO DE LOS COMPUESTOS DE INCLUSIÓN DE UREA

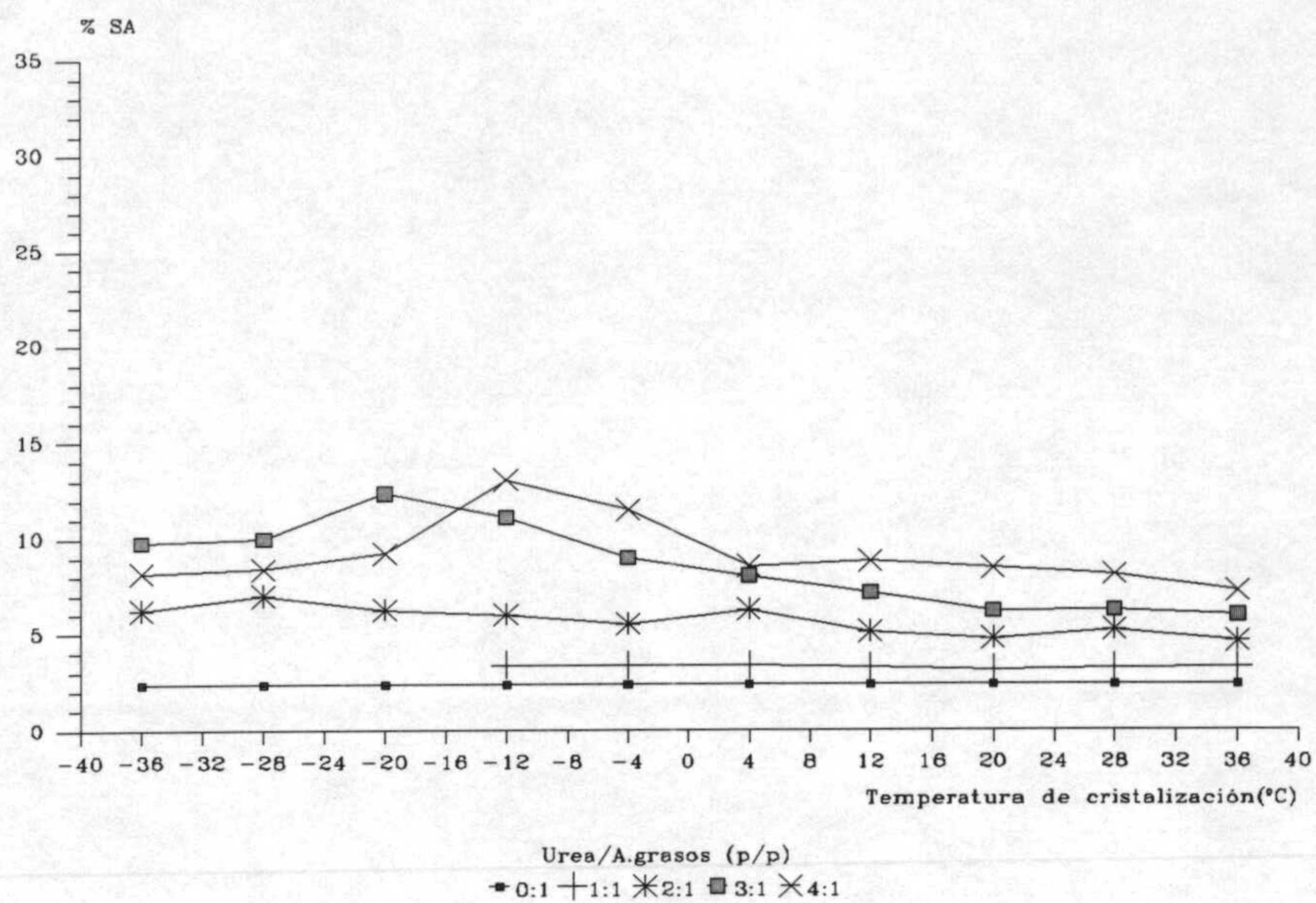
En las tablas 4.2.1 a 4.2.54 se muestran los resultados obtenidos en la concentración de PUFAs a partir de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao y la microalga marina *I. galbana*. Estos resultados corresponden a los contenidos en ácidos grasos de los concentrados de urea y a los rendimientos en su recuperación. Como ya se ha indicado el objetivo de esta investigación ha sido estudiar la influencia de la temperatura de cristalización y de la relación urea/ácidos grasos sobre la concentración de los PUFAs n3, utilizando metanol y etanol como disolventes. Para este estudio se han utilizado ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao y de él se han obtenido las condiciones óptimas para obtener concentrados de PUFAs a partir de ácidos grasos de la microalga *I. galbana*.

Con el fin de obtener composiciones en ácidos grasos de los concentrados de urea comparables entre sí, las composiciones de los concentrados procedentes de aceite de hígado de bacalao en que se basa esta discusión se han referido a un mismo aceite de partida, ya que como se puede observar en las tablas de resultados los concentrados originales se obtuvieron a partir de extractos de aceites de composiciones diferentes. Como ya se ha indicado en el apartado 4.2.1 los valores de las composiciones en que se basa esta discusión se han calculado mediante las ecuaciones [4.2.1] y [4.2.2] asumiendo que los factores de concentración no dependen de la composición del extracto de ácidos grasos de partida. Aunque esta hipótesis no se cumpla totalmente los errores que se comenten con su aplicación no son demasiado elevados ya que las composiciones de todos los aceites de partida, son, en general, muy semejantes.

5.2.1.- Cristalización en una sola etapa utilizando como disolvente metanol

En la figura 5.2.1 se han representado las variaciones de las composiciones del SA, EPA, DHA y suma de los tres, con la temperatura de cristalización a las distintas relaciones urea/ácidos grasos, cuando el disolvente empleado fue metanol (se han representado los datos referidos al aceite A que se muestran en las tablas 4.2.12 a 4.2.21). En la figura 5.2.2 se muestra la variación con la relación urea/ácidos grasos y la temperatura del rendimiento total en ácidos grasos en los concentrados de urea (representación de los resultados de la tabla 4.2.22). En la figura 5.2.3 se muestran las variaciones de los rendimientos en la recuperación de SA, EPA, DHA y suma de los tres

a) SA



b) EPA

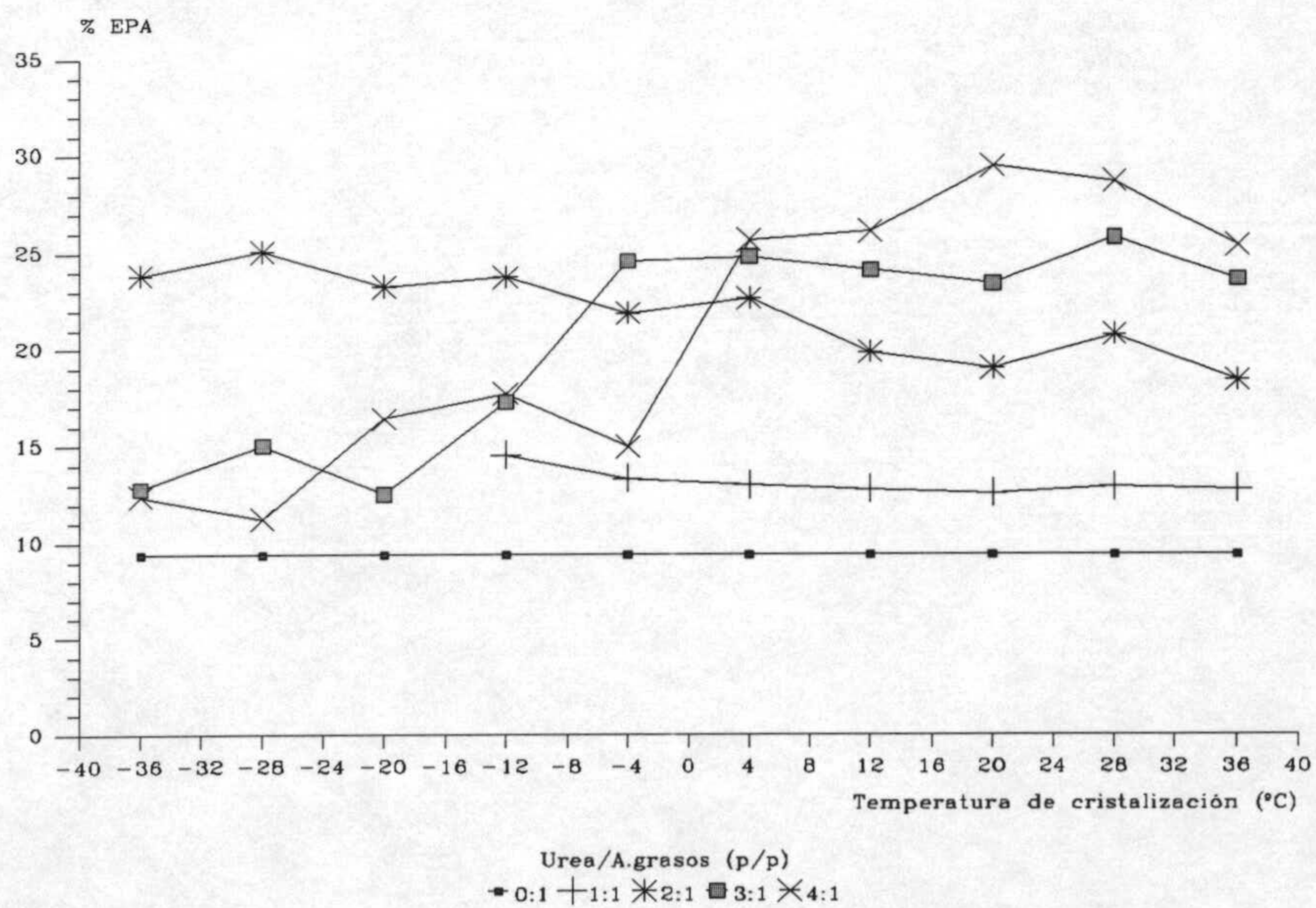
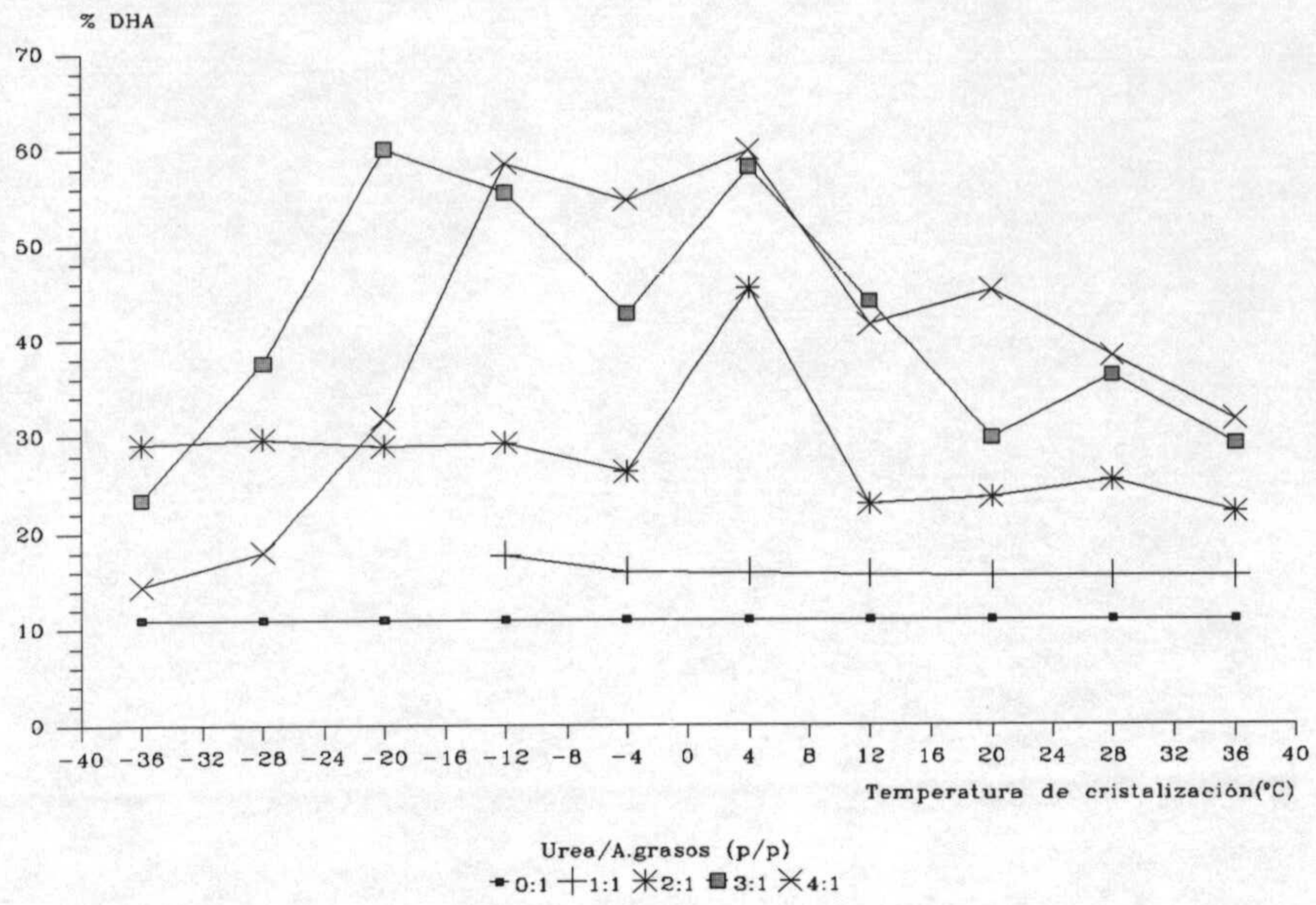


Figura 5.2.1.-Influencia de la temperatura y la relación urea/ácidos grasos sobre la concentración (%) de los ácidos a)SA; b)EPA; c)DHA ; d) Σ (SA, EPA, DHA). Tablas 4.2.12 a 4.2.21. Disolvente : metanol.

c) DHA



d) (SA+EPA+DHA)

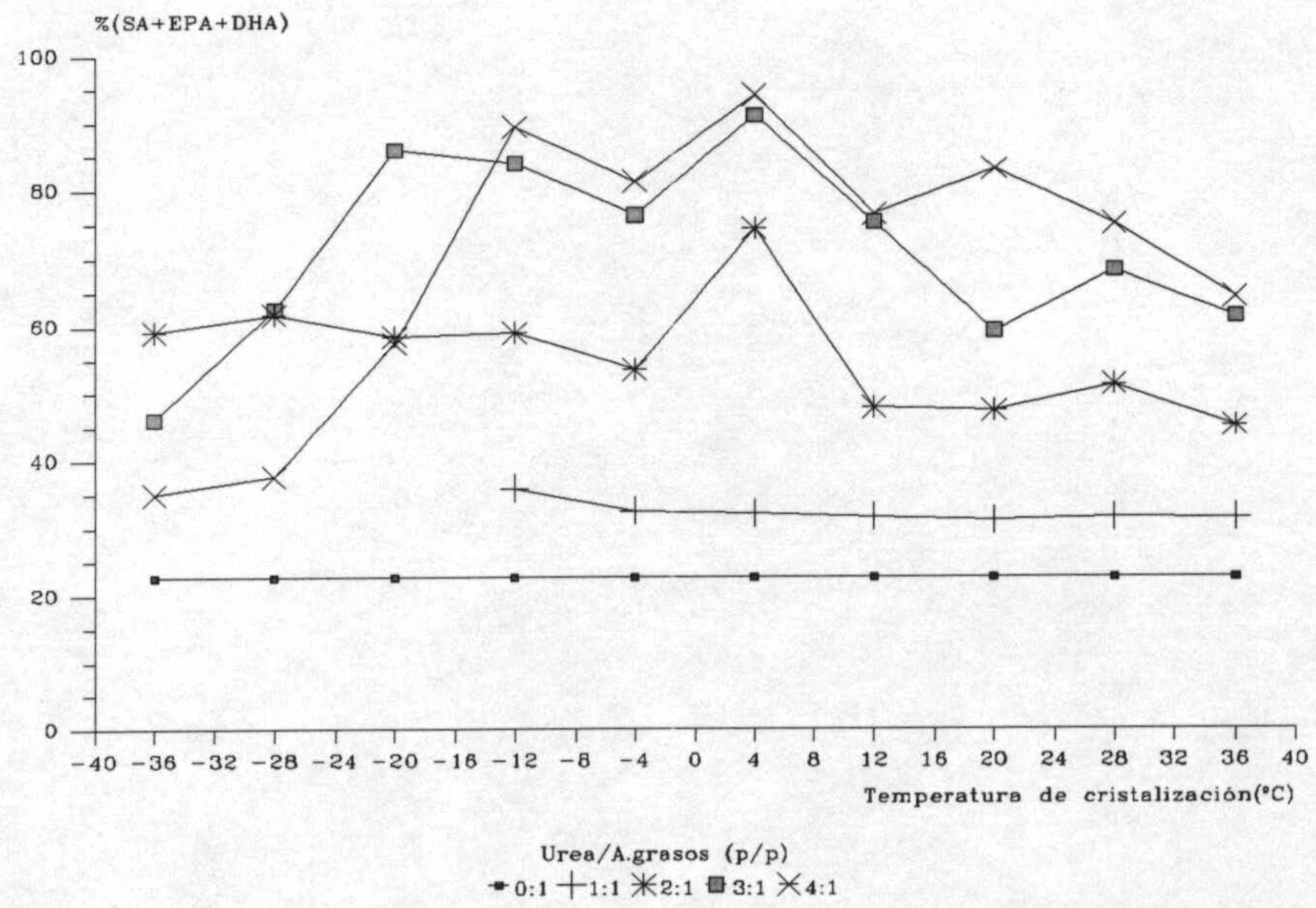


Figura 5.2.1.- (Continuación)

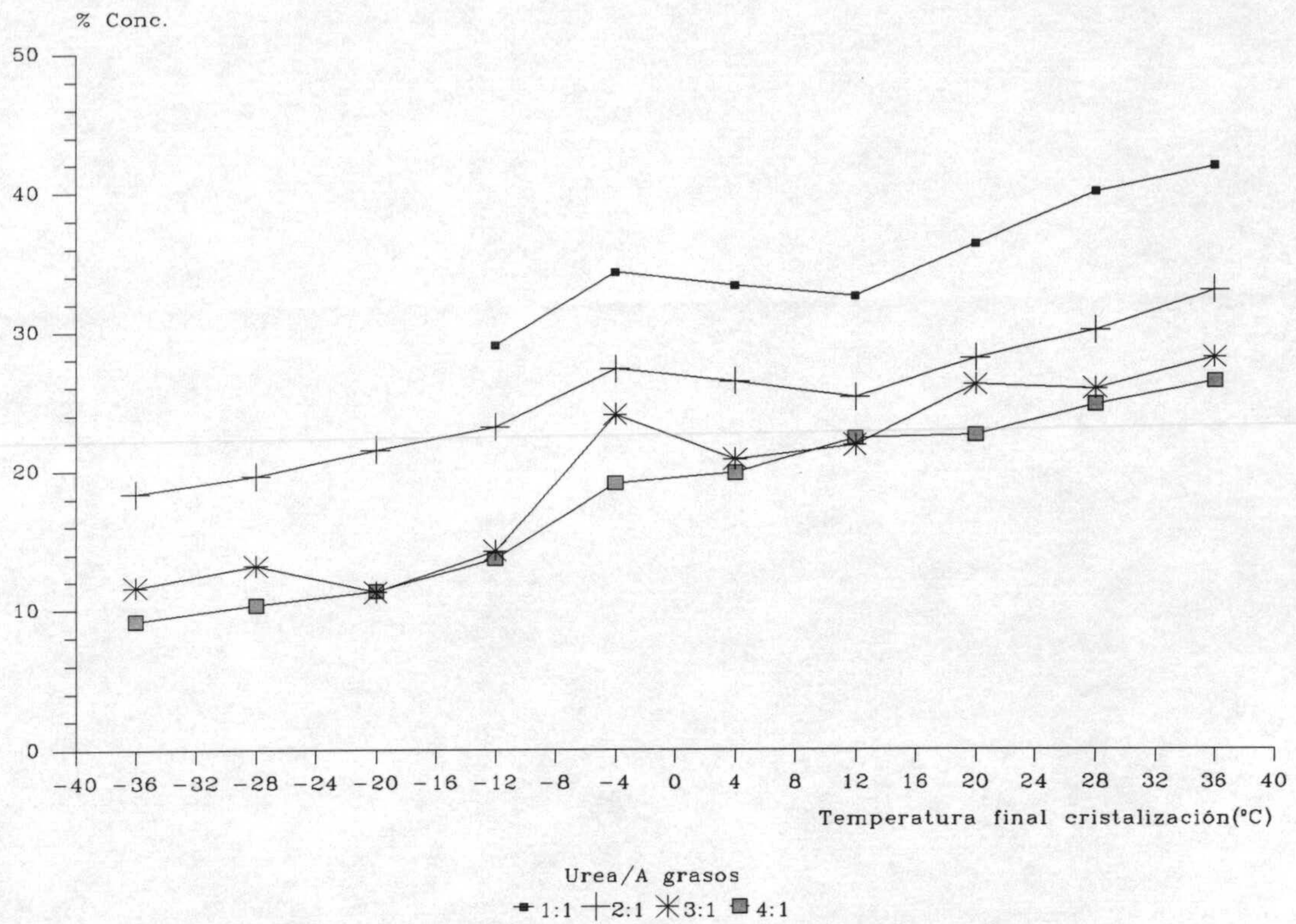


Figura 5.2.2.- Influencia de la temperatura de cristalización y de la relación urea/a.graso sobre el rendimiento en ácidos grasos totales en los concentrados en PUFAs (tabla 4.2.22). Disolvente : metanol. .

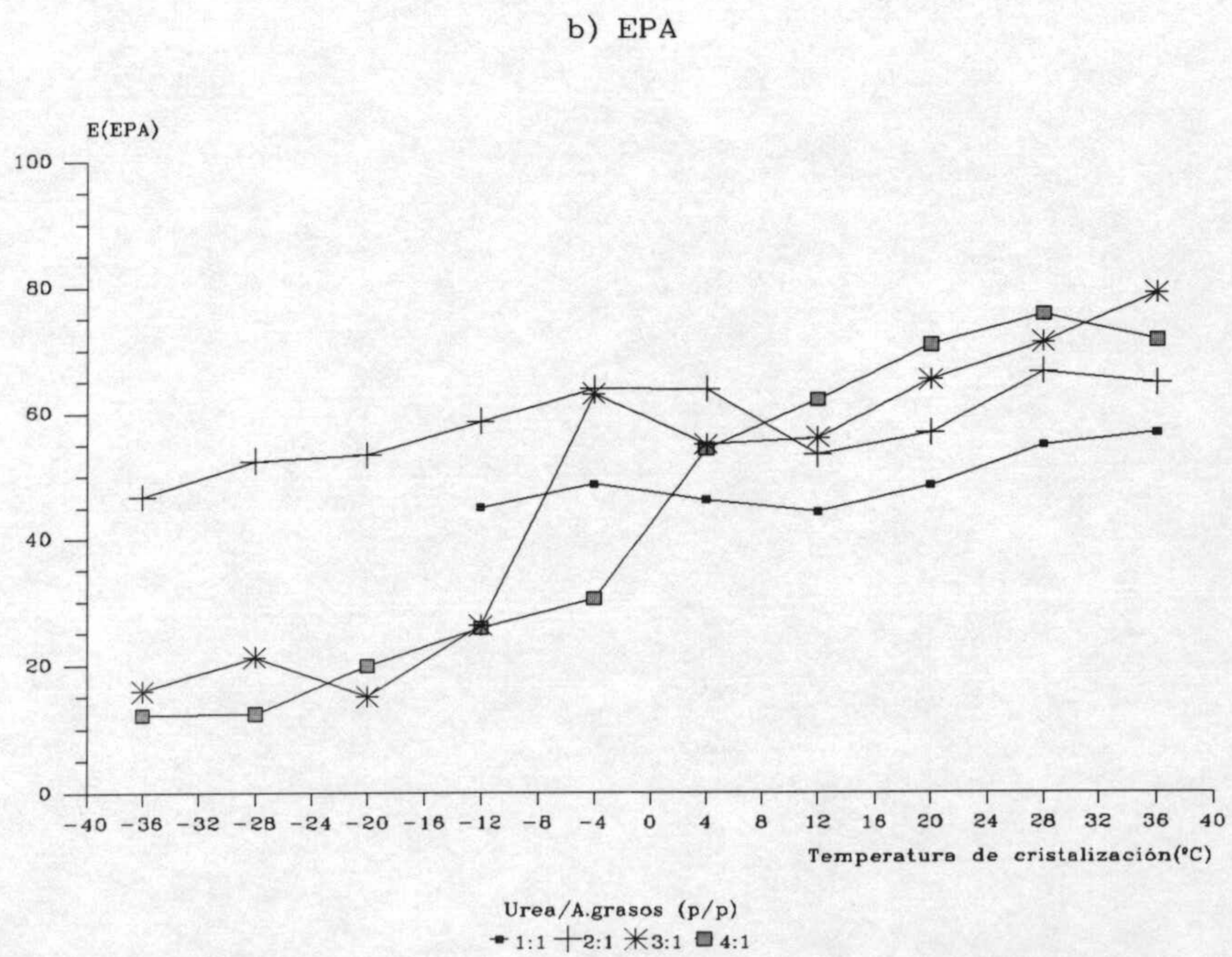
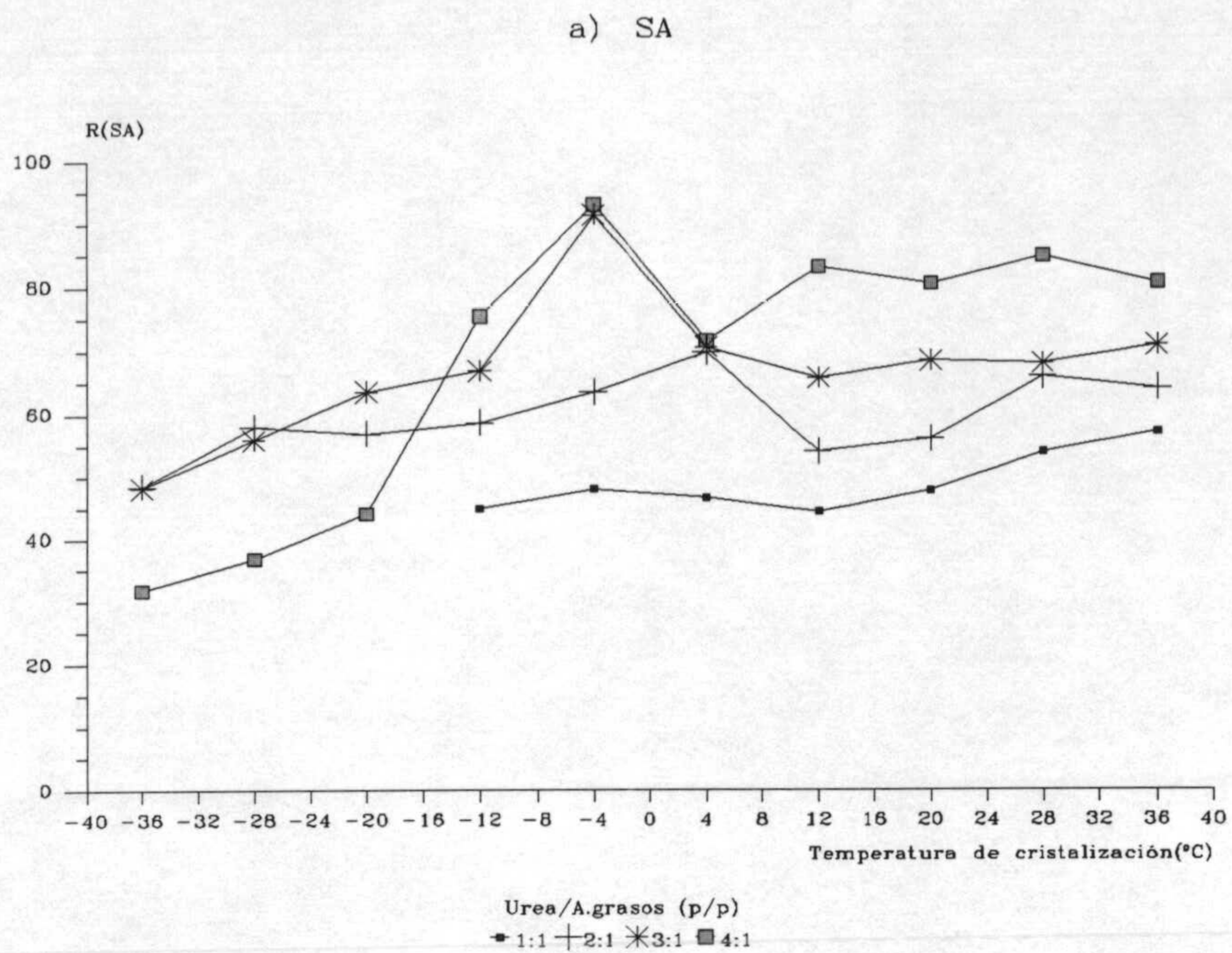
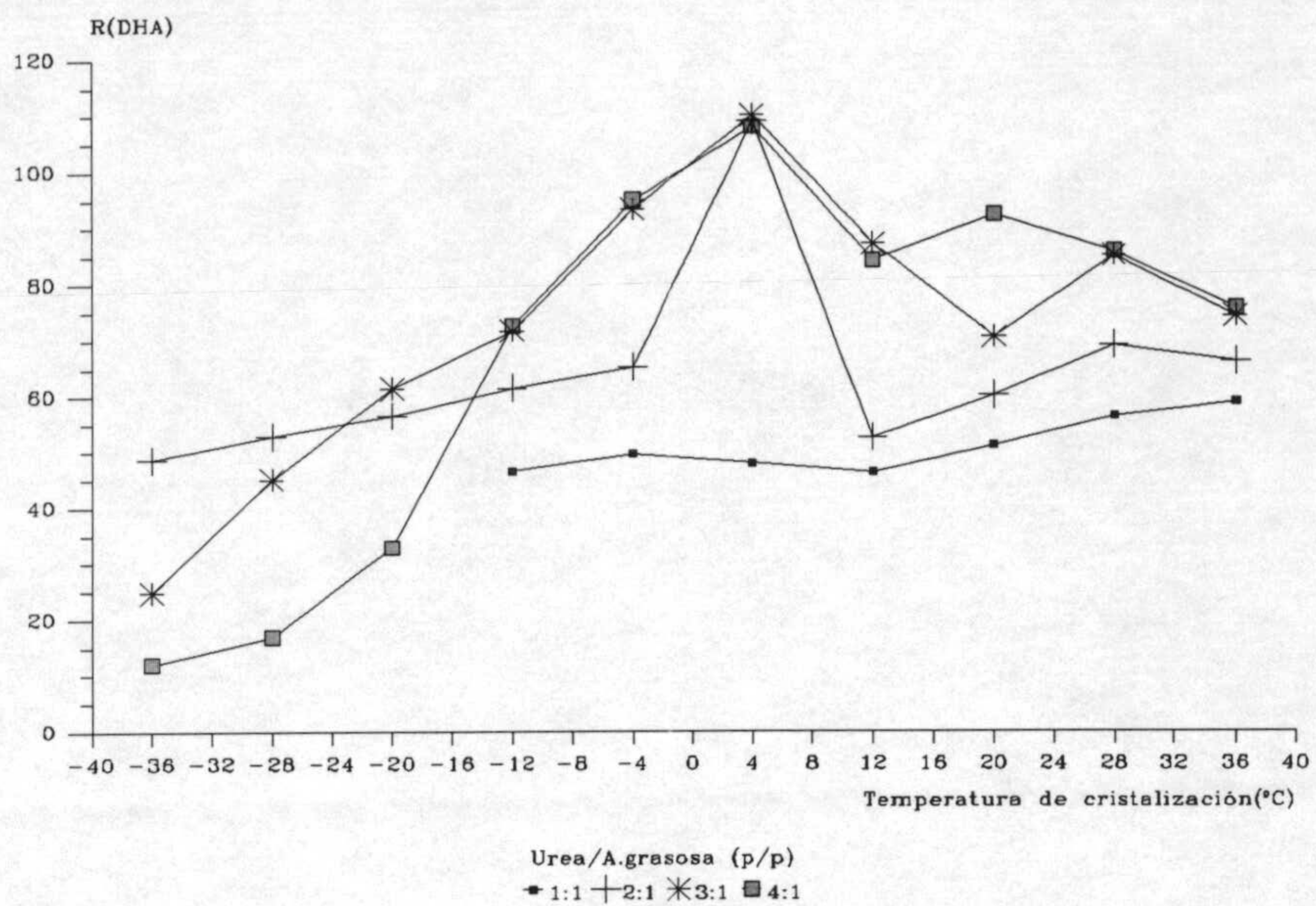


Figura 5.2.3.-Influencia de la temperatura y la relación urea/ácidos grasos sobre el rendimiento en la recuperación de los ácidos a)SA; b)EPA; c)DHA ; d) Σ (SA, EPA, DHA). Tablas 4.2.23 a 4.2.26 . Disolvente: metanol

c) DHA



d) (SA+EPA+DHA)

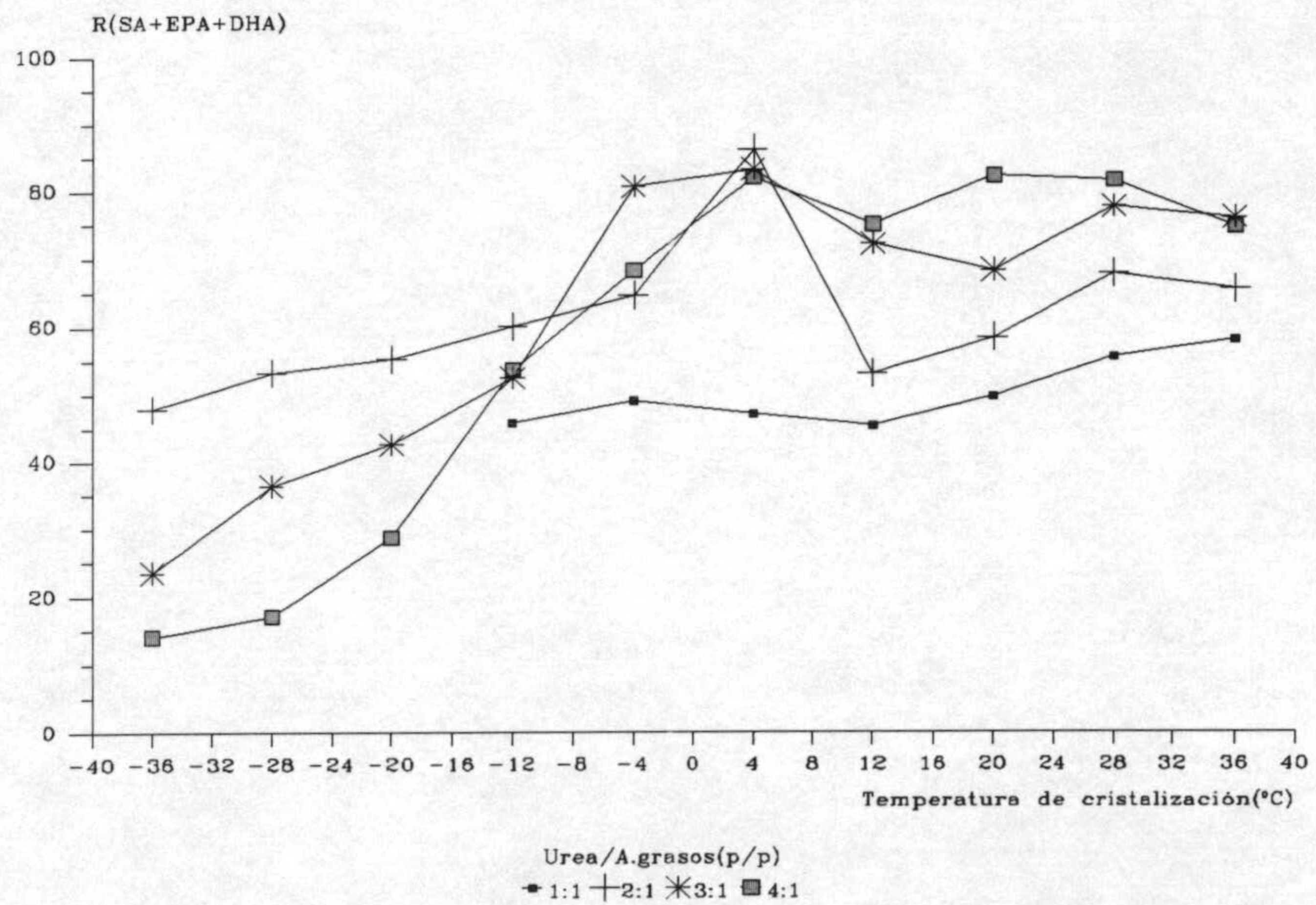


Figura 5.2.3.-Continuación

con la temperatura de cristalización, a las distintas relaciones urea/ácidos grasos (representación de los datos de las tablas 4.2.23 a 4.2.26).

Aunque, como se comprobará inmediatamente, no puede desligarse la influencia de la relación urea/ácidos grasos y de la temperatura sobre la concentración en PUFAs, para llevar cierto orden en la discusión de los resultados obtenidos se distinguirá entre la influencia ambas variables.

- Influencia de la relación urea/ácidos grasos

En las figuras 5.2.1 y 5.2.3 se observa que la forma en que varían las composiciones y los rendimientos tanto con la relación urea/ácidos grasos como con la temperatura es diferente en los rangos de bajas y de altas temperaturas.

En la figura 5.2.1 se observa que, en el rango de altas temperaturas, la composición de los concentrados en los tres PUFAs de interés aumenta con la relación urea/ácidos grasos, mientras que a bajas temperaturas ocurre casi lo contrario. También se observa que, para la mayoría de las temperaturas elevadas ensayadas, la diferencia de composiciones en PUFAs n³ obtenida con las relaciones 3:1 y 4:1 no es muy pronunciada.

En la figura 5.2.2 se observa como el aumento de la relación urea/ácidos grasos hace disminuir el rendimiento global en la recuperación de ácidos grasos y como las diferencias entre los rendimientos a las distintas relaciones se van haciendo más pequeñas, observándose una diferencia escasa entre los rendimientos obtenidos con las relaciones 3:1 y 4:1.

Los resultados obtenidos en el rango de altas temperaturas coinciden con los obtenidos por otros autores como Traitler y cols. (1988), Wille y cols.(1987) y Ratnayake y cols. (1988) y corroboran el hecho, ya comentado en la introducción (apartado 2.4.5), de que la relación en peso en que la urea y los ácidos grasos forman estos compuestos tiene un valor medio de 3:1 (su valor exacto depende de cada ácido graso) y un aumento en esta relación favorece la formación los compuestos de inclusión de todos los ácidos grasos, tanto más cuanto mayor es la estabilidad de dichos compuestos (Schlenk, 1954). Por tanto deben aumentar el contenido del filtrado en los ácidos grasos más insaturados (aumento de la pureza de los PUFAs) (Gruger, 1960 y

Domart y cols., 1955) y la cantidad de ácidos grasos que forman complejos de inclusión (disminución del rendimiento al aumentar la relación urea/ácidos grasos).

En la figura 5.2.3 se observa que, en el rango de altas temperaturas, a medida que aumenta la relación urea/ácidos grasos aumenta el rendimiento en la recuperación de PUFAs, mientras que a bajas temperaturas ocurre prácticamente lo contrario. Así pues, a altas temperaturas, interesa operar a relaciones urea/ácidos grasos de 4:1 (si bien a veces hay poca diferencia con la relación 3:1) ya que tanto el contenido de los concentrados como el rendimiento en la recuperación de cada uno de los tres PUFAs de interés es el más elevado.

Si al aumentar la relación urea/ácidos grasos disminuyen los rendimientos globales (figura 5.2.2) y aumentan los rendimientos en PUFAs n3 (figura 5.2.3d), parece claro que, en el rango de altas temperaturas, un aumento de la relación urea/ácidos grasos conduce a un aumento en la formación de compuestos de inclusión de ácidos grasos saturados, y monoinsaturados, no produciéndose una segregación en los cristales de los ácidos grasos poliinsaturados.

La relación urea/ácidos grasos puede utilizarse para segregar determinados tipos y/o pares de ácidos grasos, es decir, se trata de una variable esencial en la selectividad del enriquecimiento en PUFAs de los concentrados. En la tabla 5.2.1 puede observarse que para una relación 1:1 se eliminan bien los ácidos grasos saturados mientras que los monoinsaturados mantienen su concentración e incluso pueden concentrarse; a una relación 2:1 se eliminan algo más los monoinsaturados y para 3:1 y 4:1 la eliminación de ambos es prácticamente total. Estos resultados se aprecian con nitidez en la figura 5.2.4 en la que se han representado los cromatogramas correspondientes a la disolución inicial de ácidos grasos, figura 5.2.4a, junto con los cromatogramas de los concentrados obtenidos para las relaciones 1:1 a 4:1, figuras 5.2.4b a 5.2.4e, respectivamente.

Si como medida de la selectividad en la concentración llevada a cabo se utilizan los cocientes que se muestran en la tabla 5.2.1, la influencia de la relación urea ácido grasos es evidente. Así el cociente saturados + monoinsaturados/suma SA+EPA+DHA decrece a medida que aumenta la relación urea/ácidos grasos pasando de 1,67 a 0,05 para las relaciones 1:1 a 4:1, respectivamente, lo que pone de manifiesto claramente que un aumento de la relación urea/ácidos grasos hace aumentar de una manera progresiva la eliminación de los saturados y monoinsaturados. Por otra parte, también puede apreciarse que para las relaciones 1:1 y 2:1 hay un enriquecimiento selectivo en el

Tabla 5.2.1.-Influencia de la relación urea/a.grasos en la composición en ácidos grasos de los concentrados y sobre las relaciones EPA/DHA, $(\text{Sat}+\text{Monoinsat})/(\text{SA}+\text{EPA}+\text{DHA})$ y $\text{Sat}/\text{Monoinsat}$. Temperatura 20°C. Disolvente: metanol.

A.Graso	CLO-A	Relación Urea/a.graso			
		1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	2,89	1,00	0,56	0,32
16:0	10,63	2,56	0,58	0,29	0,24
16:1n7	7,79	9,16	9,12	6,12	0,76
18:0	2,57	0,81	1,17	1,43	2,07
18:1n9	16,95	17,86	8,12	2,10	0,48
18:1n7	4,64	5,14	3,41	0,99	0,00
18:2n6	1,47	1,96	2,60	2,50	0,74
18:3n6	0,15	0,20	0,31	0,39	0,58
20:0	0,17	0,24	0,31	0,27	0,08
18:3n3	0,78	1,05	1,46	1,52	0,78
20:1n9	10,76	9,40	2,01	1,50	0,62
18:4n3	2,36	3,12	4,75	6,21	8,45
20:3n6	0,06	0,10	0,15	0,17	0,20
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	0,72	1,06	1,24	1,22
22:1n11	8,25	3,99	0,91	0,00	0,00
22:1n9	0,11	0,06	0,00	0,00	0,00
20:5n3	9,36	12,53	18,99	23,40	29,45
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	0,67	1,00	1,30	1,78
22:5n3	1,17	1,55	2,23	2,49	1,78
22:6n3	10,98	15,45	23,60	29,70	45,14
N.I	6,50	10,54	17,22	17,81	5,31
Saturados	17,64	6,50	3,05	2,55	2,71
Monoinsaturados	48,50	45,61	23,57	10,72	1,87
Sat+Monoins	66,14	52,12	26,63	13,27	4,58
SA+EPA+DHA	22,70	31,10	47,34	59,31	83,04
Σ n3	24,65	33,70	51,02	63,32	85,59
Σ n6	2,71	3,65	5,13	5,60	4,52
EPA/DHA	0,85	0,81	0,80	0,78	0,65
$(\text{Sat}+\text{Monoins})/(\text{SA}+\text{EPA}+\text{DHA})$	2,91	1,67	0,56	0,22	0,05
Sat/Monoins	0,36	0,14	0,14	0,23	1,45

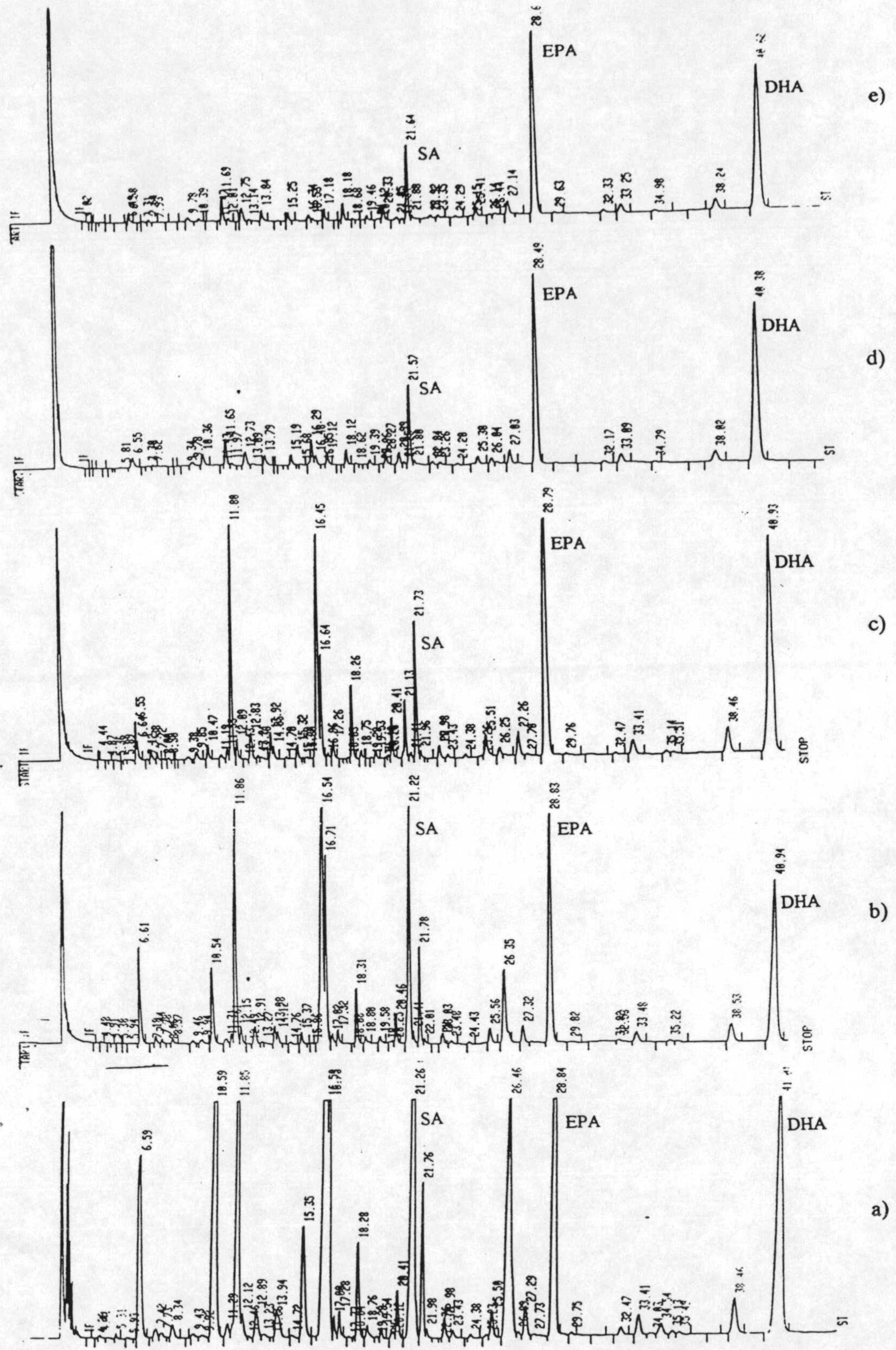


Figura 5.2.4.-Cromatogramas de gases de a) extracto de ácidos grasos del aceite de hígado de bacalao y de los concentrados de urea obtenidos con las relaciones urea/a.grasos b) 1:1, c) 2:1, d) 3:1 y e) 4:1. Disolvente metanol, 28°C.

concentrado de ácidos grasos monoinsaturados con respecto a los saturados, puesto que el cociente saturados/monoinsaturados para estas relaciones se mantiene en un valor pequeño, aumentando a relaciones mayores.

Por último en la tabla 5.2.1 puede apreciarse que un aumento de la relación urea/ácidos grasos aumenta ligeramente la selectividad de la separación entre el DHA y el EPA ya que el cociente EPA/DHA disminuye al aumentar esta relación, lo que parece indicar que el EPA tiene mayor tendencia a formar compuestos de inclusión que el DHA.

- Influencia de la temperatura de cristalización

En la figura 5.2.2 se observa que el rendimiento en la recuperación de ácidos grasos aumenta claramente con la temperatura de cristalización. Este hecho es lógico ya que la disminución de la temperatura de cristalización aumenta la tendencia a formar compuestos de inclusión, Schlenk (1954).

En la figura 5.2.1 se observa que el contenido en ácidos grasos de los concentrados no varía de una forma uniforme en todo el intervalo de temperaturas ensayado, ni presenta una forma similar para los tres ácidos grasos, así, mientras el SA y el DHA presentan máximos en el intervalo de -12°C a 4°C , el EPA presenta también composiciones bajas a bajas temperaturas que se incrementan en el intervalo de -4°C a 4°C para mantenerse aproximadamente estables a temperaturas superiores, presentándose un máximo a 20°C ; así pues, considerando los tres ácidos grasos en conjunto (figura 5.2.1d) puede concluirse que la riqueza de las fracciones en estos PUFAs está desfavorecida por las temperaturas muy bajas, siendo la temperatura óptima 4°C .

Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (tabla 2.8); así por ejemplo Traitler y cols. (1988) obtienen un factor de concentración máximo para el ácido γ -linolénico a 0°C y Wille y cols. (1987) obtienen como temperaturas óptimas -5°C para el SA, 15°C para el EPA y 0°C para el DHA, muy similares a las obtenidas en este trabajo, incluso en cuanto al comportamiento diferente del EPA. El factor de concentración de un determinado ácido es el cociente entre el contenido en el concentrado obtenido y el contenido en la disolución de ácidos grasos original.

En la tabla 5.2.2 se muestran los rendimientos en la recuperación de ácidos grasos totales, de SA, EPA, DHA y suma de los tres, a una relación urea/ácidos grasos constante (4:1) y a todas las temperaturas ensayadas (resultados tomados de las tablas 4.2.22 a 4.2.26). En esta tabla se ponen también de manifiesto varios hechos comentados ya por otros autores. En primer lugar, si se comparan los porcentajes de SA, EPA y DHA recuperados en los distintos concentrados se observa que por debajo de -12°C los tres PUFAs forman compuestos de inclusión, aunque es el EPA el que queda ocluido en un mayor porcentaje, recuperándose en menor proporción en el filtrado; a partir de -4°C el SA y el DHA se recuperan casi totalmente mientras que el EPA no aparece en proporción elevada en el filtrado hasta los 28°C . Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ratnayake y cols. (1988) que ponen de manifiesto que el EPA tiene una mayor tendencia que el SA y el DHA a formar compuestos de inclusión y esta tendencia aumenta bruscamente por debajo de -18°C . Este hecho justifica los bajos rendimientos en la recuperación de EPA a bajas temperaturas, con respecto a los de SA y DHA, obtenidos tanto en este trabajo (tabla 4.2.24) como por algunos autores como Haagsma y cols. (1982) (tabla 5.2.5) y Ratnayake y cols. (1988). En la tabla 5.2.2 también se muestra la relación entre los porcentajes de los concentrados en EPA y en DHA (tablas 4.2.12 a 4.2.21); estas relaciones muestran que el enriquecimiento producido es más selectivo para el DHA a temperaturas entre -12 y 4°C . A bajas temperaturas no hay selectividad porque ambos PUFAs se acomplejan por igual y a altas temperaturas tampoco lo hay porque ninguno de ellos se acompleja.

Los rendimientos en la recuperación de los PUFAs (figura 5.2.3) aumentan, en general, con la temperatura de cristalización, sin embargo este incremento tan sólo es uniforme para el EPA, que presenta máximos a 28°C , el SA y el DHA presentan estos máximos a -4°C y 4°C , respectivamente; como temperatura óptima para conseguir un rendimiento alto en la recuperación de PUFAs n3 pueden considerarse los 4°C (figura 5.2.3d).

Ya se ha comentado el comportamiento diferente de la influencia de la relación urea/ácidos grasos sobre composiciones y rendimientos en los rangos de bajas y altas temperaturas (figuras 5.2.1 y 5.2.3). Una explicación de este hecho puede darse si se tiene en cuenta la influencia de las temperaturas de cristalización muy bajas en presencia de un exceso de urea. En estas condiciones se produce ya una disminución de los contenidos de los filtrados en PUFAs, puesto que están siendo incluidos éstos en los cristales de urea, tanto más cuando menor es la temperatura y mayor el exceso de urea, lo cual ya se ha puesto de manifiesto en la tabla 5.2.2. Esta inclusión de los PUFAs en

Tabla 5.2.2.- Influencia sobre los rendimientos de los ácidos SA, EPA, y DHA en los concentrados y sobre las relaciones entre los porcentajes de EPA y DHA en dos concentrados. Relación urea:a.grasos 4:1. Disolvente: metanol

Temperatura (°C)	Rendimiento				% Recup. total	EPA/DHA (*)
	SA	EPA	DHA	SA+EPA +DHA		
-36	31,74	12,09	12,05	14,11	9,15	0,85
-28	36,79	12,39	16,92	17,12	10,32	0,62
-20	44,13	19,87	32,81	28,65	11,32	0,51
-12	75,48	25,81	72,76	53,69	13,64	0,30
-4	92,96	30,44	95,07	68,20	19,07	0,27
4	71,60	54,27	107,98	82,05	19,81	0,42
12	83,15	62,04	84,23	74,97	22,28	0,63
20	80,53	70,75	92,46	82,27	22,49	0,65
28	84,88	75,60	85,98	81,59	24,70	0,75
36	80,72	71,46	75,88	74,56	26,35	0,80

(*) 0,85 en el aceite original.

los cristales se ve favorecida porque en estas condiciones todos los ácidos grasos saturados, monoeno y dieno han sido ya incluidos en los cristales de urea.

Puede también observarse que para la relación urea/ácidos grasos 2:1 (figura 5.2.1 y tabla 5.2.3) se produce un descenso bastante homogéneo del contenido de los concentrados en PUFAs a medida que aumenta la temperatura, es decir, en este caso no tiene lugar un descenso de estos contenidos a bajas temperaturas (como ocurre con las relaciones 3:1 y 4:1) debido a que se opera con defecto de urea y, por tanto, a todas las temperaturas ensayadas quedan ácidos grasos distintos de los PUFAs sin acomplejar con la urea. En la tabla 5.2.3 puede observarse que en este caso es posible utilizar las temperaturas comprendidas entre -4°C y 36°C para segregar, aunque no cuantitativamente, los ácidos grasos saturados de los monoinsaturados. A 36°C se eliminan bastante bien los saturados y se concentran los monoinsaturados de cadena más corta como el 16:1n7.

Tabla 5.2.3.- Influencia de la temperatura sobre la composición en ácidos grasos de los concentrados (tablas 4.2.12 a 4.2.21) y sobre las relaciones Sat/Monoins y (Sat+Monoins)/(SA+EPA+DHA) Relación urea/a.grasos 2:1. Disolvente: metanol.

A.graso	Aceite-A	Temperatura (°C)									
		-36	-28	-20	-12	-4	4	12	20	28	36
14:0	4,20	1,08	0,83	0,57	0,63	0,63	0,71	0,83	1,00	1,02	1,95
16:0	10,63	0,42	0,22	2,95	0,20	0,31	0,23	0,18	0,58	0,53	0,56
16:1n7	7,79	7,27	6,30	6,88	8,32	10,57	6,86	11,46	9,12	9,55	10,45
18:0	2,57	0,66	0,78	0,58	0,53	0,61	0,13	0,50	1,17	0,55	0,47
18:1n9	16,95	3,55	0,92	1,28	5,22	6,62	3,23	8,39	8,12	9,55	13,51
18:1n7	4,64	1,89	1,30	1,19	2,51	3,81	1,44	4,64	3,41	3,77	4,59
18:2n6	1,47	3,05	0,36	2,85	2,93	2,98	1,61	2,91	2,60	2,78	2,59
18:3n6	0,15	0,41	0,48	0,39	0,32	0,32	0,38	0,32	0,31	0,30	0,26
20:0	0,17	0,00	0,53	0,19	0,21	0,18	0,15	0,19	0,31	0,00	0,00
18:3n3	0,78	1,65	2,21	1,52	1,62	1,51	0,99	1,49	1,46	1,44	1,39
20:1n9	10,76	1,31	0,47	0,40	1,38	1,39	1,30	1,45	2,01	2,44	4,06
18:4n3	2,36	6,24	7,00	6,26	5,99	5,48	6,26	5,08	4,75	5,19	4,60
20:3n6	0,06	0,22	0,17	0,15	0,17	0,00	0,14	0,32	0,15	0,00	0,00
22:0	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20:4n6	0,52	1,29	1,52	1,13	0,23	1,13	1,04	1,25	1,06	1,25	0,95
22:1n11	8,25	0,65	0,25	0,53	0,23	0,34	0,40	0,13	0,91	0,47	0,66
22:1n9	0,11	0,00	0,00	0,00	0,24	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20:5n3	9,36	23,85	25,08	23,32	23,76	21,84	22,64	19,82	18,99	20,74	18,38
24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:4n6	0,51	1,42	1,74	2,19	1,31	0,51	1,45	1,15	1,00	1,15	1,07
22:5n3	1,17	2,92	3,44	2,77	2,95	2,69	2,40	2,40	2,23	2,52	2,19
22:6n3	10,98	29,09	29,65	28,96	29,23	26,25	45,37	22,89	23,60	25,34	22,13
Saturados	17,64	2,17	2,36	4,30	2,02	1,74	1,22	1,70	3,05	2,10	2,97
Monoinsat	48,50	14,66	9,23	10,28	17,90	23,01	13,23	26,06	23,57	25,78	33,27
SA+EPA+DHA	22,70	59,18	61,73	58,54	58,98	53,57	74,26	47,79	47,34	51,27	45,11
Sat/Monoins	0,36	0,15	0,26	0,42	0,11	0,08	0,09	0,07	0,13	0,08	0,09
(Sat+Monoins)/(SA+EPA+DHA)	2,91	0,28	0,19	0,25	0,34	0,46	0,19	0,58	0,56	0,54	0,80

Desde un punto de vista económico y teniendo en cuenta que en nuestro laboratorio se pretenden separar los PUFAs puros por HPLC preparativa a partir de estos concentrados, parece más importante obtener elevados rendimientos en la recuperación de PUFAs que contenidos elevados de éstos. En la tabla 5.2.4 se muestra un resumen de los mejores resultados obtenidos con metanol (tomados de las tablas 4.2.16 a 4.2.21 y 4.2.23 a 4.2.26); se observa que si bien a bajas temperaturas (-4°C y 4°C) los rendimientos en SA y DHA son elevados, los de EPA son excesivamente bajos, por ello quizás sea preferible trabajar a mayores temperaturas (entre 20 y 28°C) ya que en este caso los rendimientos de EPA son los más elevados y los de SA y DHA son aceptables. Si lo que se pretende es un enriquecimiento selectivo en alguno de ellos es evidente que a la temperatura de -4°C se obtiene la máxima separación entre el EPA y el DHA (tablas 5.2.2 y 5.2.4).

Así pues puede concluirse que para la concentración de los PUFAs n3 (SA, EPA y DHA) la temperatura óptima de cristalización está en torno a los 4°C ; por encima de esta temperatura se obtienen purezas menores debido a que la tendencia a formar compuestos de inclusión de todos los ácidos grasos desciende al aumentar la temperatura, como indican los mayores rendimientos obtenidos a altas temperaturas, por lo que quedan cantidades importantes de insaturados (monoeno en este caso) sin acomplejar con la urea; por debajo de 4°C disminuyen los contenidos de los concentrados en PUFAs debido a que a bajas temperaturas estos ácidos grasos también forman compuestos de inclusión.

En la tabla 5.2.5 se muestra un resumen de las concentraciones, factores de concentración y rendimientos obtenidos por diferentes autores, junto con alguno de los mejores resultados obtenidos en este trabajo, los cuales son del mismo orden de magnitud que los hallados por estos autores. No obstante los rendimientos en la recuperación de PUFAs obtenidos en esta investigación son en general mayores que los obtenidos por estos autores.

Tabla 5.2.4.- Rendimientos, R_{AU} , concentraciones, C, (% sobre a.grasos totales), factores de concentración, f, y relaciones entre las concentraciones de EPA y DHA, (EPA/DHA), en los concentrados. Relación urea/a.grasos 4:1. Disolvente metanol.

	Temperatura (°C)					
	-4	4	12	20	28	36
$R_{AU}(SA)$	92,93	71,60	83,17	80,53	84,88	80,72
C(SA)	11,50	8,53	8,81	8,45	8,11	7,23
f		3,61			3,44	
$R_{AU}(EPA)$	30,44	54,27	62,13	70,74	75,60	71,45
C(EPA)	14,94	25,64	26,10	29,44	28,65	25,38
f		2,73			3,06	
$R_{AU}(DHA)$	45,00	107,98	84,21	92,38	85,93	75,83
C(DHA)	54,70	54,85	41,50	45,10	38,22	31,60
f		5,45			3,48	
$R_{AU}(\Sigma(SA,EPA,DHA))$	68,16	82,05	75,00	82,22	81,56	74,53
C($\Sigma(SA,EPA,DHA)$)	81,14	94,02	76,41	82,99	74,96	64,21
f		4,15			3,30	
(EPA/DHA)	0,27	0,42	0,63	0,65	0,75	0,80

Tabla 5.2.5.-Concentraciones (% sobre a.grasos totales) C, rendimientos R_{AU} , y factores de concentración f, obtenidos para los ácidos SA, EPA y DHA por el método de los compuestos de inclusión de urea. Comparación con los resultados referenciados por otros autores.

Referencia	SA				EPA				DHA			
	C_i	C_c	f	R_{AU}	C_i	C_c	f	R_{AU}	C_i	C_c	f	R_{AU}
Haagsma (1982)	2,4	10	4,2	100	12,1	22,6	2,28	60	11,7	44,6	3,81	101
Wille (1987)	1,7	7,2	4,2	84,7	13,9	36,8	2,64	53	13,6	40,9	3	60,2
Ackman(1988)	0,8	5,1	6,4	-	5,4	32,5	6,01	-	3,9	29,2	7,48	64
Ratnayake(1988)	3,6	11,2	3,11	100	12,6	32,9	2,6	91	4,4	11,1	2,52	88
Cohen y cols(1993)	21,5	79,7	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cohen y cols(1991)	-	-	-	-	47,5	81,9	1,72	-	-	-	-	-
Traitler y cols(1988)	3,7	15,5	4,2	-	18,2	79,6	4,37	-	-	-	-	-
Fujita y Makuta(1983)	1,7	61	3,6	56	14,5	57,3	3,95	51	4,3	17,5	4,07	49
Rodriguez,A (1994)	2,9	8,5	2,93	22,2	7	17,6	2,51	19,1	14,3	46,8	3,27	24,8
Este trabajo	2,36	8,53	3,6	71,6	9,36	25,6	2,73	54,2	10,9	59,8	5,45	100

C_i : Porcentaje en el aceite original.

C_c : Porcentaje en el concentrado.

5.2.2.- Cristalización en varias etapas

En la tabla 4.2.27 se muestran las concentraciones de ácidos grasos obtenidas en cada una de las etapas de concentración de PUFAs realizadas añadiendo la urea secuencialmente. En el apartado 3.2.1 se describe la técnica utilizada que básicamente consiste en partir de una disolución con 100 g de ácidos grasos y añadir 100 de urea (relación 1:1), realizar una primera cristalización a 4°C y volver a añadir 100 g de urea al filtrado, volver a cristalizar y así repetir esta operación dos veces más de manera que en total se añaden 400 g de urea; es decir se ha utilizado una relación urea/ácidos grasos 4:1 pero añadiendo la urea en 4 etapas seguidas todas ellas de una cristalización, con lo cual se han obtenido 4 filtrados cuyos perfiles de ácidos grasos se muestran en la tabla 4.2.27; en esta tabla aparece el perfil de una quinta cristalización realizada añadiendo 100 g más de urea. El rendimiento en ácidos grasos totales recuperados, se determinó en el cuarto filtrado (400 g de urea) y tubo un valor medio del 8,3%.

Este rendimiento es muy inferior al obtenido cuando la urea se adicionó en una sola etapa en las mismas condiciones (relación 4:1, 4°C y disolvente metanol), que fue del 19,8%; además los factores de concentración de los PUFAs n3 obtenidos en una sola etapa son también algo superiores a los obtenidos cuando la cristalización se hace por etapas (3,68 y 3,36, obtenidos de las tablas 4.2.7 y 4.2.27, respectivamente); si además se tiene en cuenta que en este caso el método experimental es mucho más laborioso se puede concluir que, si el objetivo es concentrar PUFAs n3, la cristalización por etapas no presenta ninguna ventaja con respecto a la cristalización en una sola etapa.

En la tabla 4.2.27 se observa que a partir de la segunda etapa no se consigue una mejora significativa ni en las composiciones en PUFAs n3, ni en la selectividad de la separación, ya que las relaciones EPA/DHA y saturados + monoinsaturados/SA+EPA+DHA permanecen constantes; por tanto con esta técnica bastaría utilizar una relación urea/ácidos grasos 2:1, lo que supondría un ahorro de urea.

Por otra parte en esta tabla se observa también que en la primera etapa se eliminan fundamentalmente los saturados, mientras que la composición de los monoinsaturados se mantiene constante, en la segunda etapa ya se eliminan éstos mientras que los dienos parecen no eliminarse muy cuantitativamente, si bien este hecho no puede apreciarse con claridad debido a la escasez de estos ácidos (tan sólo existe el

linoleico, C18:2 n6). A partir de la segunda etapa tan sólo se concentran los PUFAs como ya se ha comentado.

5.2.3.- Cristalización en una sola etapa utilizando como disolvente etanol

En las figuras 5.2.5 y 5.2.7 se muestran la variación de las composiciones y rendimientos, respectivamente, de SA, EPA, DHA y suma de los tres con la relación urea/ácidos grasos y la temperatura de cristalización cuando el disolvente es etanol (se han obtenido representando los resultados que se recogen en las tablas 4.2.38 a 4.2.52).

En general (figura 5.2.5d) parece observarse una disminución de los contenidos en PUFAs con la temperatura, si bien se presenta un máximo a 4°C. Estos contenidos aumentan con la relación urea/ácidos grasos, excepto en el intervalo de -36°C a 12°C en que los porcentajes de PUFAs n3 obtenidos con la relación 3:1 con mayores que los obtenidos con la relación 4:1. En general, con este disolvente se observan diferencias muy pequeñas entre las purezas obtenidas con las relaciones 3:1 y 4:1. También en este caso el EPA (figura 5.2.5b) presenta un comportamiento algo diferente al SA y DHA, presentando un máximo a 20°C.

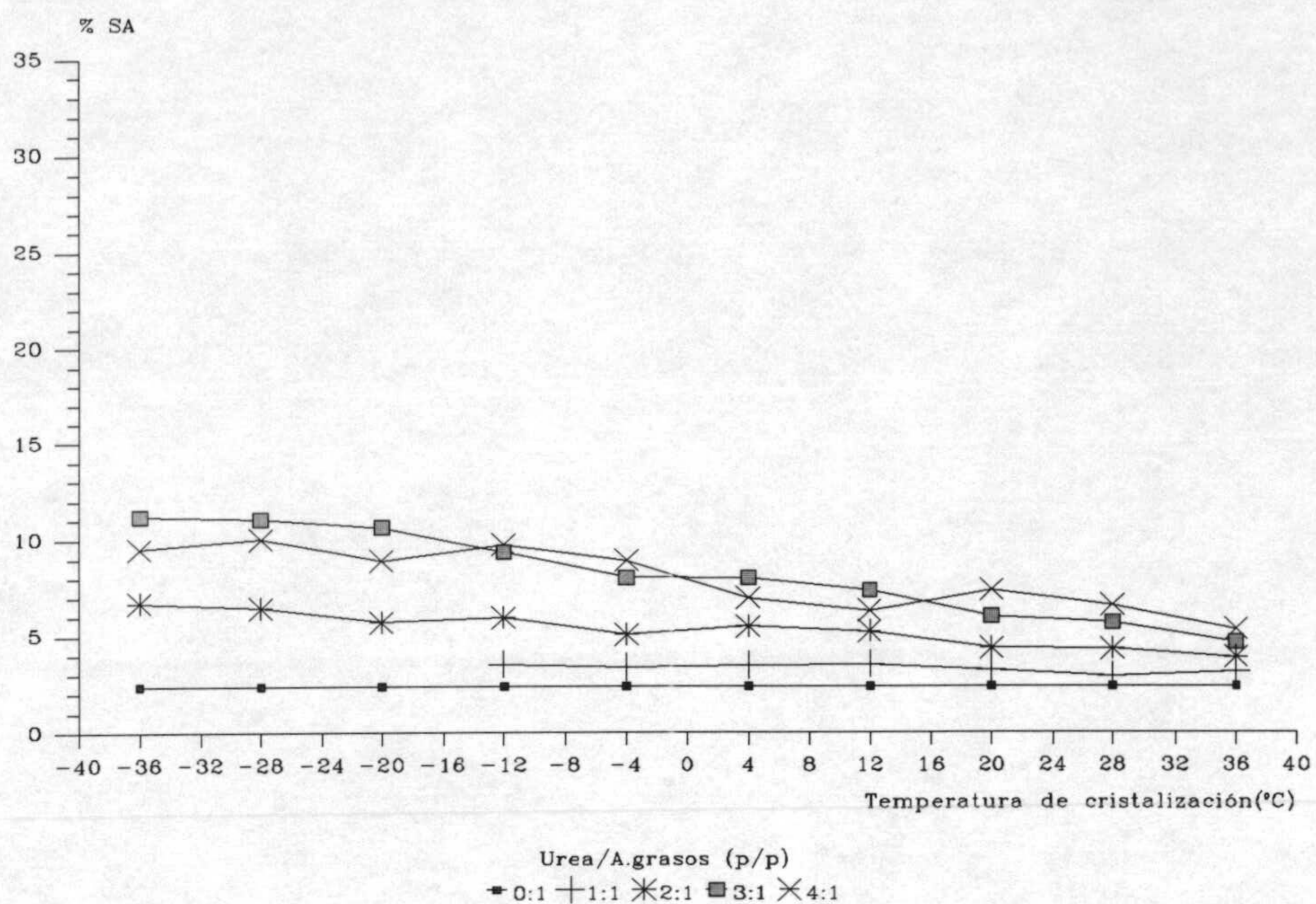
En cuanto a los rendimientos en PUFAs n3, se observa que en general (figura 5.2.7d) aumentan con la temperatura y con la relación urea/ácidos grasos, a altas temperaturas, y también en este caso las diferencias entre las relaciones 3:1 y 4:1 son muy escasas.

Por otra parte, también se observa, al igual que ocurría con metanol que a bajas temperaturas tanto las composiciones como los rendimientos en PUFAs son menores que a altas temperaturas y además tanto más pequeños cuanto mayor es la relación urea/ácidos grasos, al contrario de lo que sucede a altas temperaturas.

Es decir, los resultados obtenidos son muy similares a los obtenidos con metanol, sobre todo en lo que respecta a la influencia de las variables estudiadas, si bien, como ya se ha indicado, en este caso las diferencias entre los porcentajes de PUFAs n3 y los rendimientos obtenidos con las relaciones 4:1 y 3:1 son muy escasas.

En lo que respecta a los valores de los contenidos de los concentrados en cada uno de los PUFAs y a sus rendimientos, en la tabla 5.2.6 se muestra un resumen de los mejores resultados obtenidos con etanol, que como se observa son del mismo orden de

a) SA



b) EPA

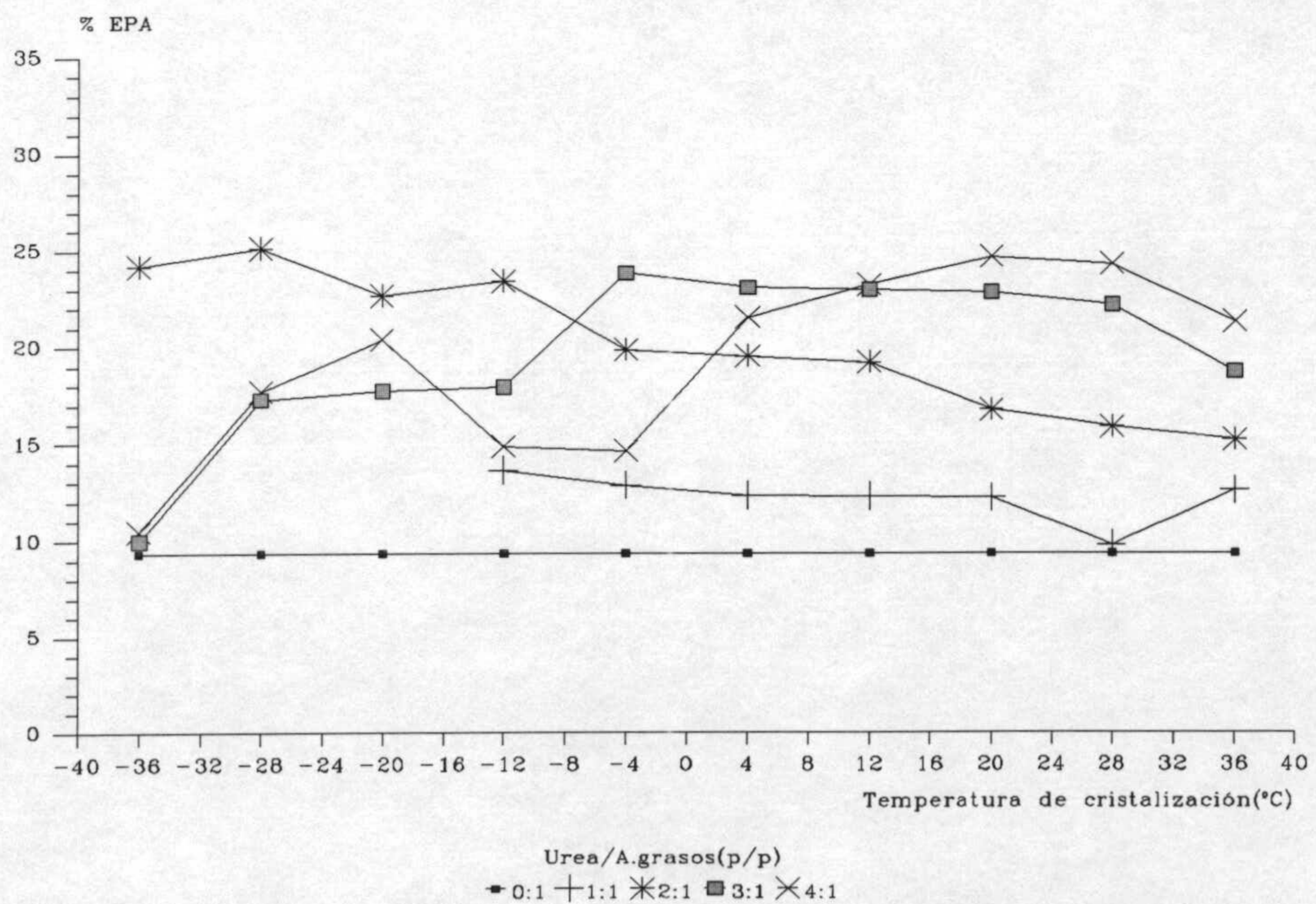
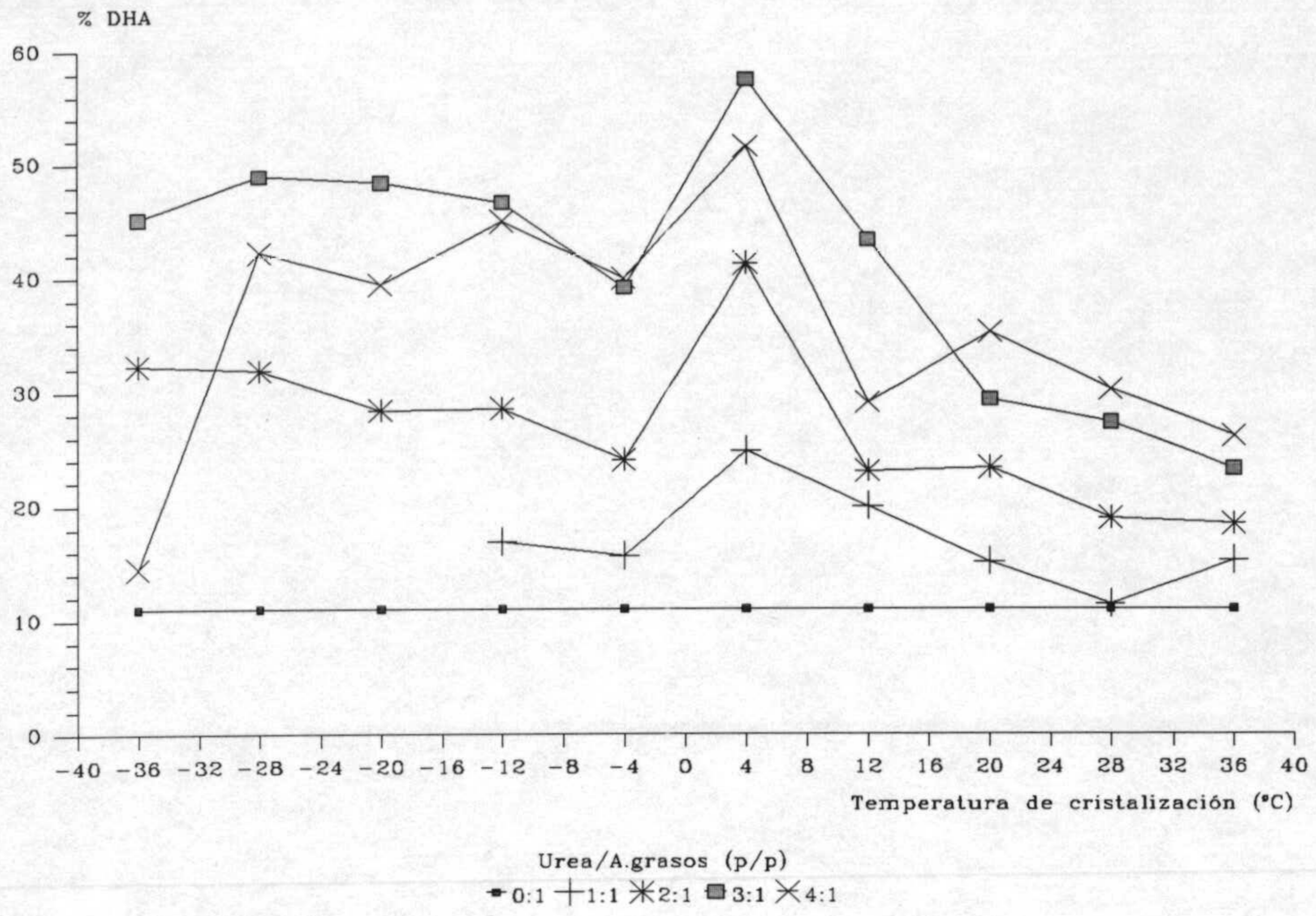


Figura 5.2.5.-Influencia de la temperatura y la relación urea/ácidos grasos sobre la concentración (%) de los ácidos a)SA; b)EPA; c)DHA ; d) Σ (SA, EPA, DHA). Tablas 4.2.38 a 4.2.47. Disolvente : etanol.

c) DHA



d) (SA+EPA+DHA)

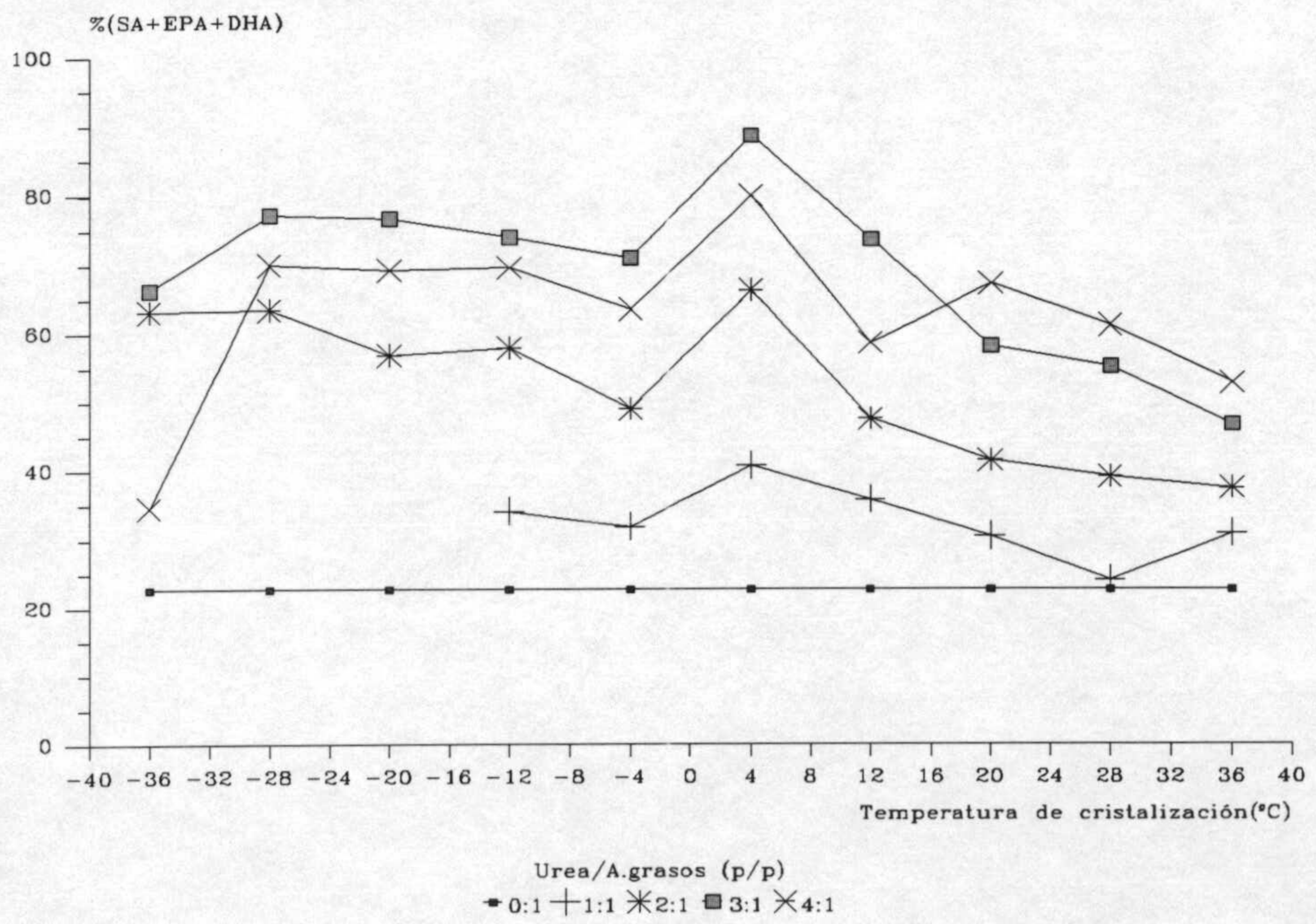


Figura 5.2.5.- Continuación

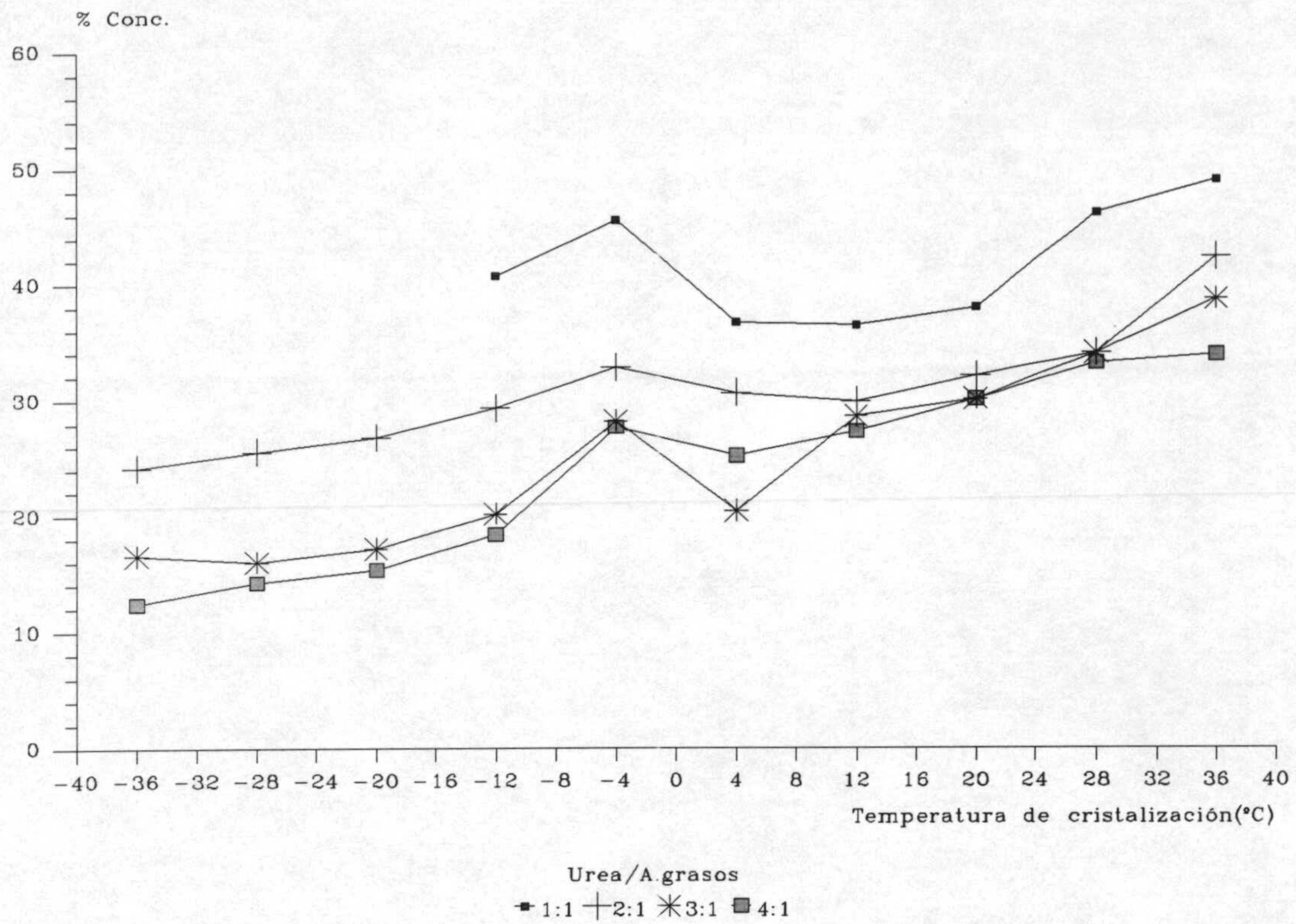


Figura 5.2.6.- Influencia de la temperatura de cristalización y de la relación urea/a.graso sobre el rendimiento en ácidos grasos totales en los concentrados en PUFAs (tabla 4.2.48). Disolvente : etanol

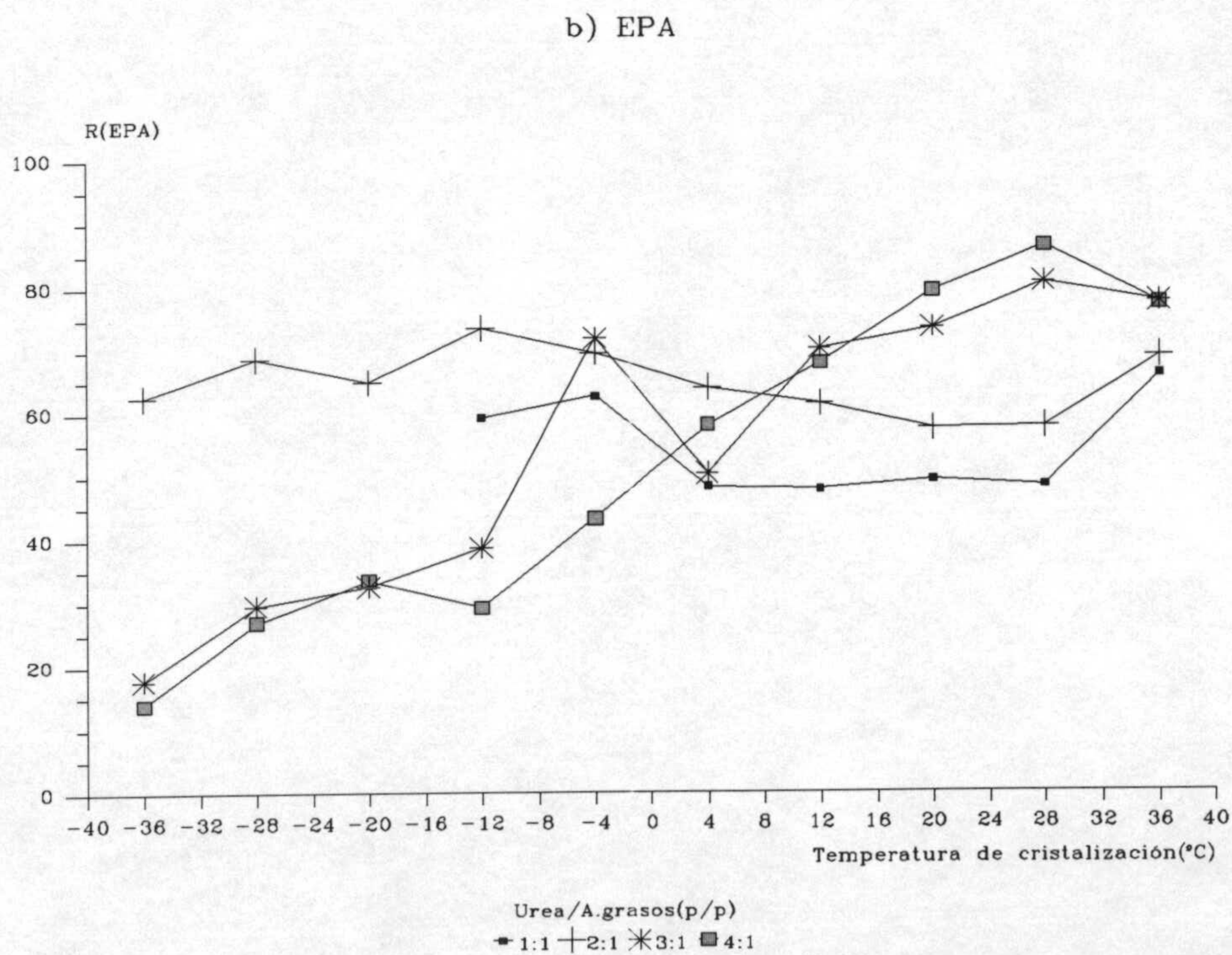
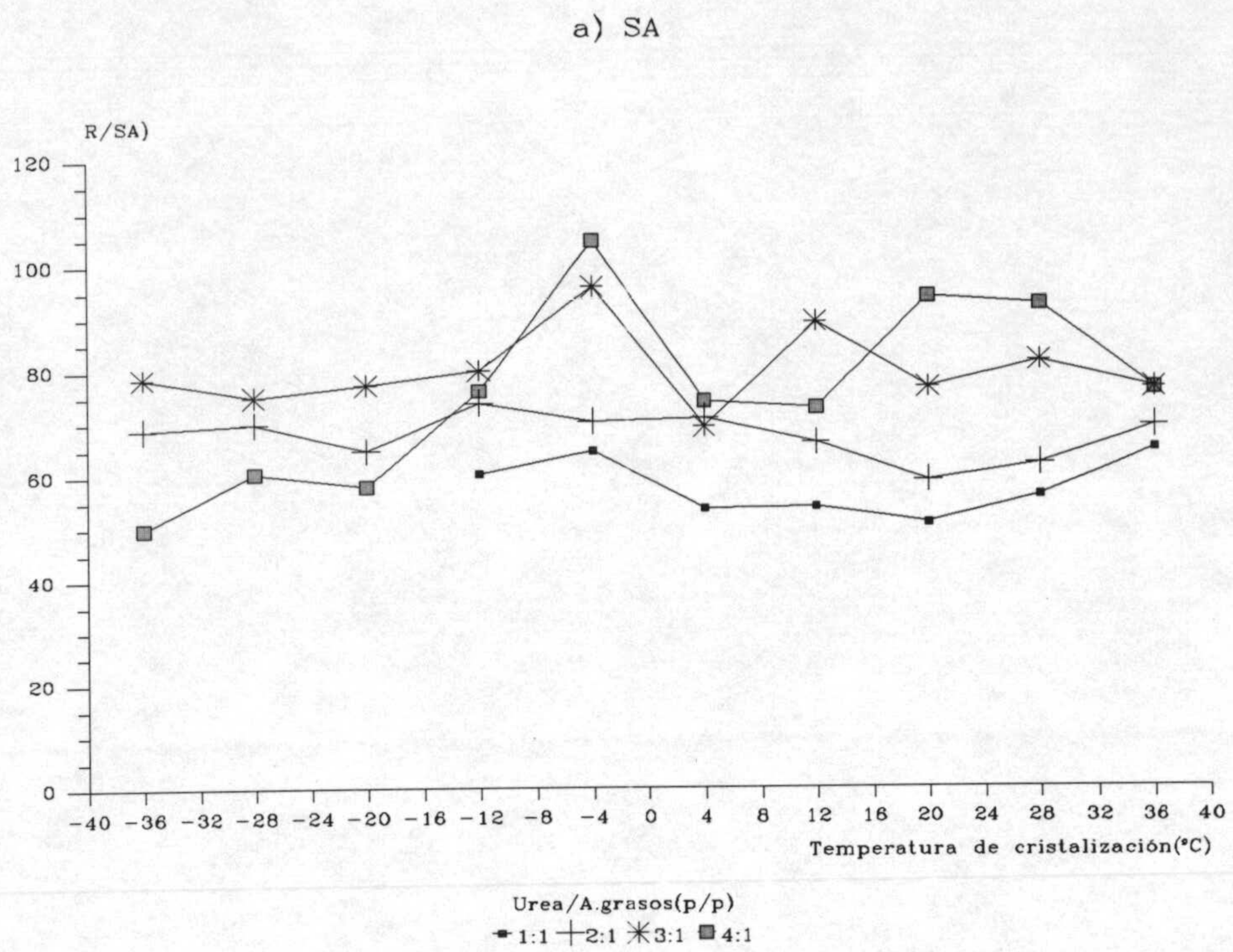
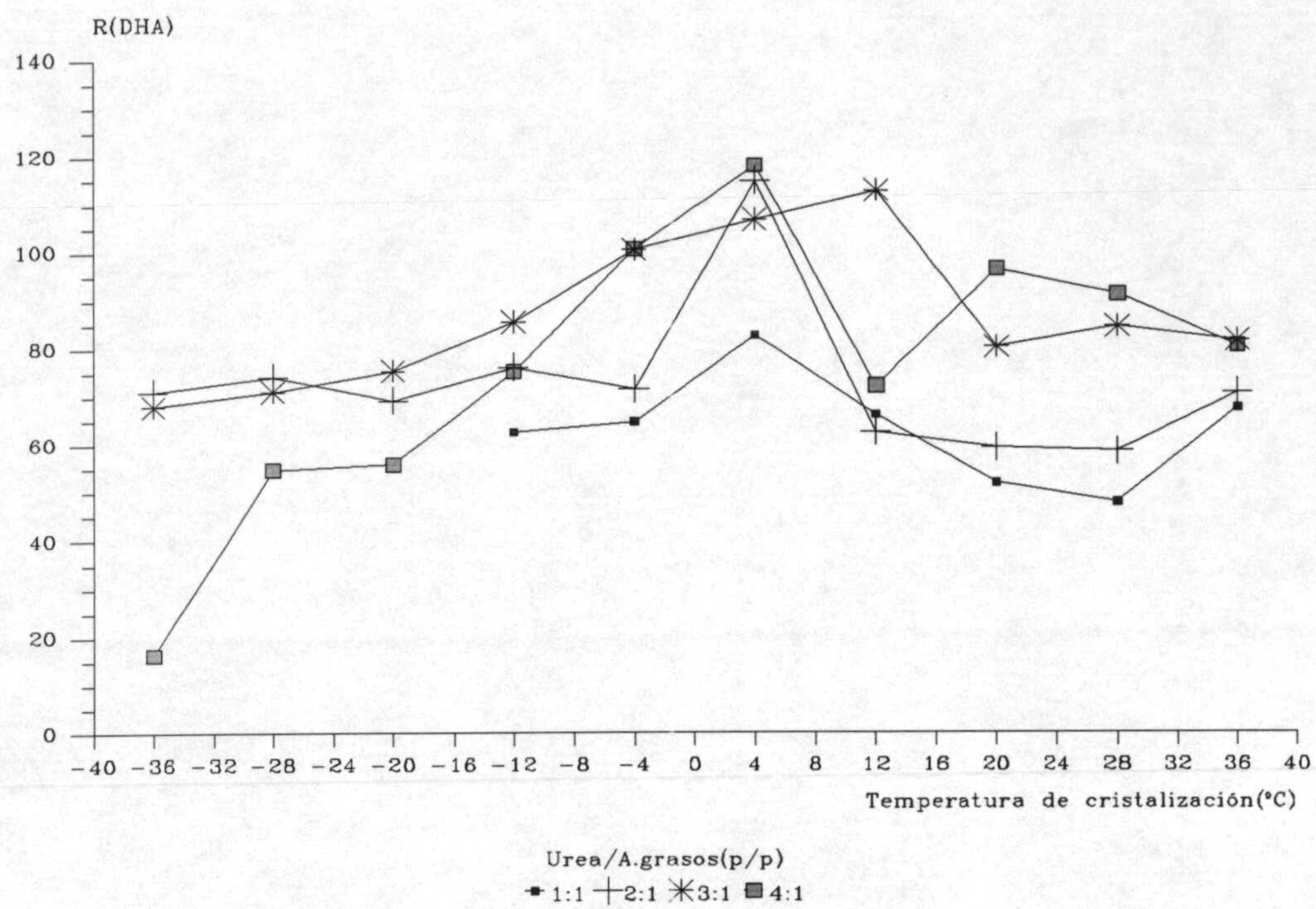


Figura 5.2.7.-Influencia de la temperatura y la relación urea/ácidos grasos sobre el rendimiento en la recuperación de los ácidos a)SA; b)EPA; c)DHA ; d) Σ (SA, EPA, DHA). Tablas 4.2.49 a 4.2.52 . Disolvente: etanol

c) DHA



d) (SA+EPA+DHA)

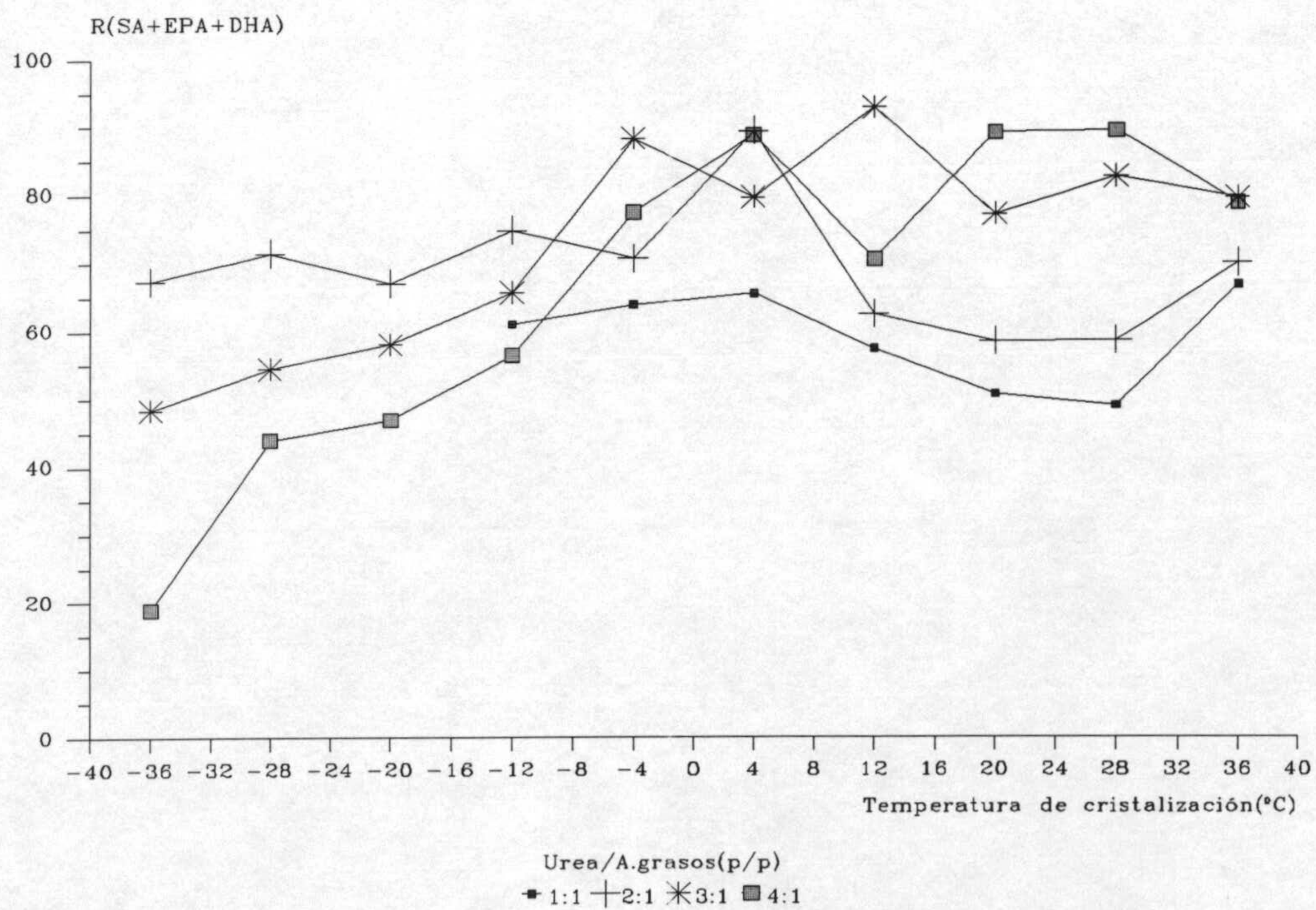


Figura 5.2.7.-Continuación.

Tabla 5.2.6.- Rendimientos, R_{AU} , concentraciones, C, (% sobre a.grasos totales), factores de concentración, f, y relaciones entre las concentraciones de EPA y DHA, (EPA/DHA), en concentrados de diferentes relaciones urea/a.grasos 4:1 y temperaturas, utilizando etanol como disolvente.

Condiciones		SA			EPA			DHA			$\Sigma(SA,EPA,DHA)$			EPA/ DHA
T^a °C	Urea/a.g.	C (%)	R_{AU}	f	C (%)	R_{AU}	f	C (%)	R_{AU}	f	C (%)	R_{au}	f	
-36	3:1	11,2	78,6											
-4	3:1							57,4	100					
12	3:1										73,6	92,7		
28	3:1				22,2	80,5					61,1	89,3		
-4	4:1	8,9	100		14,6	43,2		31,9	100		63,4	77,4		0,37
4	4:1	7	74,1	2,95	21,5	57,9	2,3	51,4	100	4,7	79,9	88,7	3,5	0,42
28	4:1	6,6	92,4		24,3	86,1		30,2	91,3		61,1	89,3		0,8

Los mejores resultados se muestran sombreados

magnitud que los que se muestran en la tabla 5.2.4 con metanol, aunque en este caso no siempre los mejores resultados corresponden a la relación urea/ácidos grasos 4:1, sino que también con 3:1 se han obtenido valores de rendimientos y porcentajes de PUFAs altos. No obstante se pueden apreciar diferencias; por un lado la selectividad EPA/DHA es inferior en este caso a cuando el disolvente fue metanol (sobre todo a -4°C); por otro lado el factor de concentración alcanzado con etanol es también algo inferior al obtenido con metanol. Sin embargo esta diferencia es pequeña y el etanol tiene, entre otras (apartado 2.4.6), las ventajas de ser biocompatible y más barato que el metanol.

5.2.4. Concentración de los PUFAs de la fracción lipídica de la microalga marina *Isochrysis galbana*

A la vista de los resultados ya comentados obtenidos con ácidos grasos procedentes de aceite de hígado de bacalao se decidió aplicar el método de los compuestos de inclusión de urea a los ácidos grasos procedentes de la microalga *I. galbana* realizando la adición de la urea y la cristalización en una sola etapa, utilizando una relación urea/ácidos grasos 4:1 y una temperatura de cristalización de 4°C. En estas condiciones tanto la concentración de PUFAs n3 como el rendimiento de su recuperación es máximo, si bien, como ya se ha comentado, no coincide con los mejores resultados para el EPA, que son óptimos a 20°C.

En las tablas 4.2.53 y 4.2.54 se muestran los perfiles de ácidos grasos de los dos concentrados de PUFAs obtenidos a partir de dos extractos de ácidos grasos de *I. galbana* diferentes. En la tabla 5.2.7 se muestra un resumen de los resultados medios obtenidos para los tres PUFAs de interés; en ella se observa que tanto los factores de concentración como los rendimientos son inferiores a los obtenidos con aceite de hígado de bacalao (tablas 5.2.4 y 5.2.6). Estos resultados parecen debidos a las pequeñas cantidades de ácidos grasos utilizadas (1,552 g y 237,2 mg, apartado 3.2.2), lo que ha obligado a operar en unas condiciones experimentales difíciles y ha conducido a que si bien las pérdidas de ácidos grasos en valor absoluto sean las mismas que con aceite de hígado de bacalao, porcentualmente son en este caso más elevadas. Entre los resultados que se muestran en la tabla 5.2.7 destaca el bajo rendimiento de recuperación de EPA (30%). Este resultado, además de lo ya indicado, confirma que las condiciones no son las idóneas para el EPA debido a la gran tendencia de este ácido a formar compuestos de inclusión a bajas temperaturas.

Tabla 5.2.7.- Resultados medios (concentraciones C, rendimientos R_{AU} y factores de concentración f) para los a.grasos de interés SA, EPA, DHA y Σ (SA, EPA, DHA) contenidos en los concentrados obtenidos por el método de los compuestos de inclusión de urea aplicado a extractos de ácidos grasos procedentes de *I. galbana* y utilizando una relación urea/a.grasos 4:1, temperatura de cristalización 4°C y disolvente metanol.

	A.graso			
	SA	EPA	DHA	Σ (SA EPA DHA)
C_i (%)	7,16	2,38	6,88	36,42
C_c (%)	21,21	39,9	21,96	83,07
R_{AU} (%)	49,79	29,96	3,61	38,32
f	2,96	1,78	3,19	2,28

Rendimiento medio en la recuperación de ácidos grasos totales : 16,8 %.

C_i : Porcentaje en el aceite original.

C_c : Porcentaje en el concentrado.

De cualquier manera los factores de concentración obtenidos coinciden con los referenciados por Cohen y Cohen (1991) (tabla 5.2.5) que es el único trabajo que conocemos de aplicación del método de la urea a ácidos grasos de microalgas marinas (en este caso para concentración de EPA procedente de *Porphyridium cruentum* obtiene un factor de concentración de 1,72). Este autor parte también de muy pequeñas cantidades de ácidos grasos (1 g), si bien no da datos que permitan calcular el rendimiento en la recuperación de EPA.

5.2.5.- Análisis estadístico de los resultados obtenidos en la concentración de PUFAs por el método de los compuestos de inclusión.

Los datos utilizados en el análisis estadístico se presentan en la tabla 5.2.8.,(todos los realizados entre -12°C y 36°C que se recogen en las tablas 4.2.15 a 4.2.21 y 4.2.41 a 4.2.47). La no inclusión de los experimentos realizados a -36°C y -28°C y -20°C se debe a que a estas temperaturas, como se observa en las tablas 4.2.12 a 4.2.14 y 4.2.38 a 4.2.40, no se dispone de información a la relación urea/ácidos grasos 1:1.

El objetivo de este apartado es analizar estadísticamente la influencia en el contenido de los concentrados en SA, EPA, DHA, PUFAs n3 y relación EPA/DHA (variables de respuesta) de las variables estudiadas (temperatura de cristalización, relación urea/ácidos grasos y tipo de disolvente) y de las interacciones entre las mismas. La relación EPA/DHA se incluye como variable de respuesta ya que se trata de una variable indicativa de la selectividad del proceso de separación de ambos PUFAs n3.

El análisis estadístico ha consistido en un análisis multifactorial de la varianza, tomando como factores la temperatura de cristalización de los cristales de urea, el tipo de disolvente y la relación urea/ácidos grasos. Dicho análisis se ha realizado teniendo en cuenta las interacciones entre los factores.

Por otra parte, se ha realizado el ajuste de los datos experimentales que se recogen en la tabla 5.2.8 a un modelo polinomial de segundo orden, en el que se incluye una variable cualitativa para el tipo de disolvente empleado. Las tablas y figuras de este trabajo se han obtenido con el paquete estadístico STATGRAPHICS versión 5.

A continuación se discuten los resultados para la respuesta principal, es decir, el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 (% *n*-3 PUFAs). En la tabla 5.2.9.

Tabla 5.2.8.- Concentraciones de SA,EPA,DHA, Σ (SA,EPA,DHA) y relaciones EPA/DHA utilizados en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la concentración de PUFAs por el método de la urea.

Temperatura	% SA	% EPA	% DHA	% n3-PUFAs	EPA/DHA	Disolvente	Urea/a.s grasos
-12	5,99	23,76	29,23	63,55	0,81	1	2
-12	5,93	23,42	28,49	61,54	0,82	2	2
-4	5,48	21,84	26,25	57,77	0,83	1	2
-4	5,07	19,85	24	52,71	0,82	2	2
4	6,26	22,64	45,37	77,65	0,49	1	2
4	5,49	19,53	41,2	69,18	0,47	2	2
12	5,08	19,82	22,89	51,69	0,86	1	2
12	5,23	19,19	23,13	51,46	0,82	2	2
20	4,75	18,99	23,6	51,02	0,80	1	2
20	4,36	16,74	23,3	47,6	0,71	2	2
28	5,19	20,74	25,34	55,23	0,81	1	2
28	4,31	15,85	18,91	41,92	0,83	2	2
36	4,6	18,38	22,13	48,69	0,83	1	2
36	3,88	15,2	18,47	40,46	0,82	2	2
-12	11,11	17,28	55,52	85,15	0,31	1	3
-12	9,35	17,94	46,56	74,5	0,38	2	3
-4	8,99	24,58	42,72	77,48	0,57	1	3
-4	8,02	23,82	39,12	72,55	0,60	2	3
4	8,04	24,8	58,18	92,94	0,42	1	3
4	8,04	23,07	57,36	90,02	0,40	2	3
12	7,13	24,1	44,04	78,23	0,54	1	3
12	7,35	22,94	43,28	76,57	0,53	2	3
20	6,21	23,4	29,7	63,32	0,78	1	3
20	6,03	22,81	29,29	61,93	0,77	2	3
28	6,22	25,78	36,23	71,64	0,71	1	3
28	5,66	22,15	27,27	58,96	0,81	2	3
36	5,99	23,61	29,15	63,14	0,80	1	3
36	4,68	18,72	23,25	50,23	0,80	2	3
-12	13,05	17,7	58,53	89,86	0,30	1	4
-12	9,71	14,87	44,9	71,16	0,33	2	4
-4	11,5	14,94	54,74	82,2	0,27	1	4
-4	8,91	14,62	39,9	64,3	0,36	2	4
4	8,53	25,64	59,85	96,23	0,42	1	4
4	6,97	21,52	51,4	81,84	0,41	2	4
12	8,81	26,07	41,51	78,26	0,62	1	4
12	6,29	23,22	29,04	62,81	0,79	2	4
20	8,45	29,45	45,14	85,59	0,65	1	4
20	7,39	24,64	35,17	69,24	0,70	2	4
28	8,11	28,65	38,22	78,81	0,74	1	4
28	6,57	24,28	30,15	64,97	0,80	2	4
36	7,23	25,38	31,62	68,7	0,80	1	4
36	5,33	21,29	26,19	56,81	0,81	2	4
-12	3,36	14,52	17,66	38,51	0,82	1	1
-12	3,48	13,62	16,9	36,72	0,80	2	1
-4	3,31	13,3	15,96	35,23	0,83	1	1
-4	3,35	12,86	15,6	34,44	0,82	2	1
4	3,31	12,98	15,84	34,79	0,81	1	1
4	3,46	12,32	24,81	42,57	0,49	2	1
12	3,22	12,75	15,64	34,26	0,81	1	1
12	3,49	12,27	20,04	38,24	0,61	2	1
20	3,12	12,53	15,45	33,7	0,81	1	1
20	3,19	12,22	15,09	32,87	0,80	2	1
28	3,19	12,87	15,49	34,12	0,83	1	1
28	2,86	9,79	11,38	26,05	0,86	2	1
36	3,24	12,75	15,5	34,07	0,82	1	1
36	3,14	12,58	15,21	33,51	0,82	2	1

aparecen los resultados del MANOVA (Análisis multifactorial de la varianza). Los resultados muestran que el factor principal, o que mayor influencia tiene en la respuesta es la relación urea/ácidos grasos, como se desprende del valor F (668,1) para dicho factor, teniendo además un nivel de significación estadístico mayor del 99,9 %. El efecto de la temperatura y el tipo de disolvente empleado también presentan el mismo nivel de significación estadístico. Por tanto, las tres variables experimentales consideradas en este estudio deben ser tenidas en cuenta para obtener valores elevados de la concentración de los PUFAs *n*3.

Tabla 5.2.9.- Resultados del análisis multifactorial de la varianza.

Fuente de variación	F-ratio			
	% SA	% EPA	% DHA	EPA/DHA
A) Temperatura	54,9 ***	13,4 ***	84,8 ***	42,7 ***
B) Relación U./A.G.	480,4 ***	456,5 ***	381,2 ***	60,8 ***
C) Disolvente	56,7 ***	92,4 ***	42,5 ***	0,06 ns
Interacciones				
AB	10,6 ***	31,7 ***	10,1 ***	10,8 ***
AC	1,4 ns	4,3 **	1,7 ns	1,7 ns
BC	18,9 ***	5,8 **	15,3 ***	4,1 *
SSQ (error)	2,7	11,6	94,9	0,05
SSQ (total)	318	1410	10278	1,82

ns: estadísticamente no significativo.

*: significativo (0,01 < P < 0,05).

**: significativo (0,001 < P < 0,01).

***: significativo (P < 0,001).

La interacción más importante entre los factores se da entre la relación urea/ácidos grasos y el tipo de disolvente. Este hecho se aprecia claramente en la figura 5.2.8., donde, a medida que se aumenta la relación urea/ácidos grasos la influencia del tipo de disolvente va siendo cada vez importante y desfavorable para la utilización de etanol. Este hecho ya se ha puesto de manifiesto en el apartado 5.2.3 de esta discusión. Como se desprende de dicha figura, el proceso de concentración de los ácidos grasos poliinsaturados a partir del aceite inicial está más favorecido en el caso de utilizar metanol como disolvente.

En las figuras 5.2.9. a 5.2.11 aparecen los intervalos de confianza al 95 % para las medias de los tres factores considerados en el estudio de esta respuesta. Estas figuras ponen de manifiesto que las condiciones que producen la mayor respuesta, es

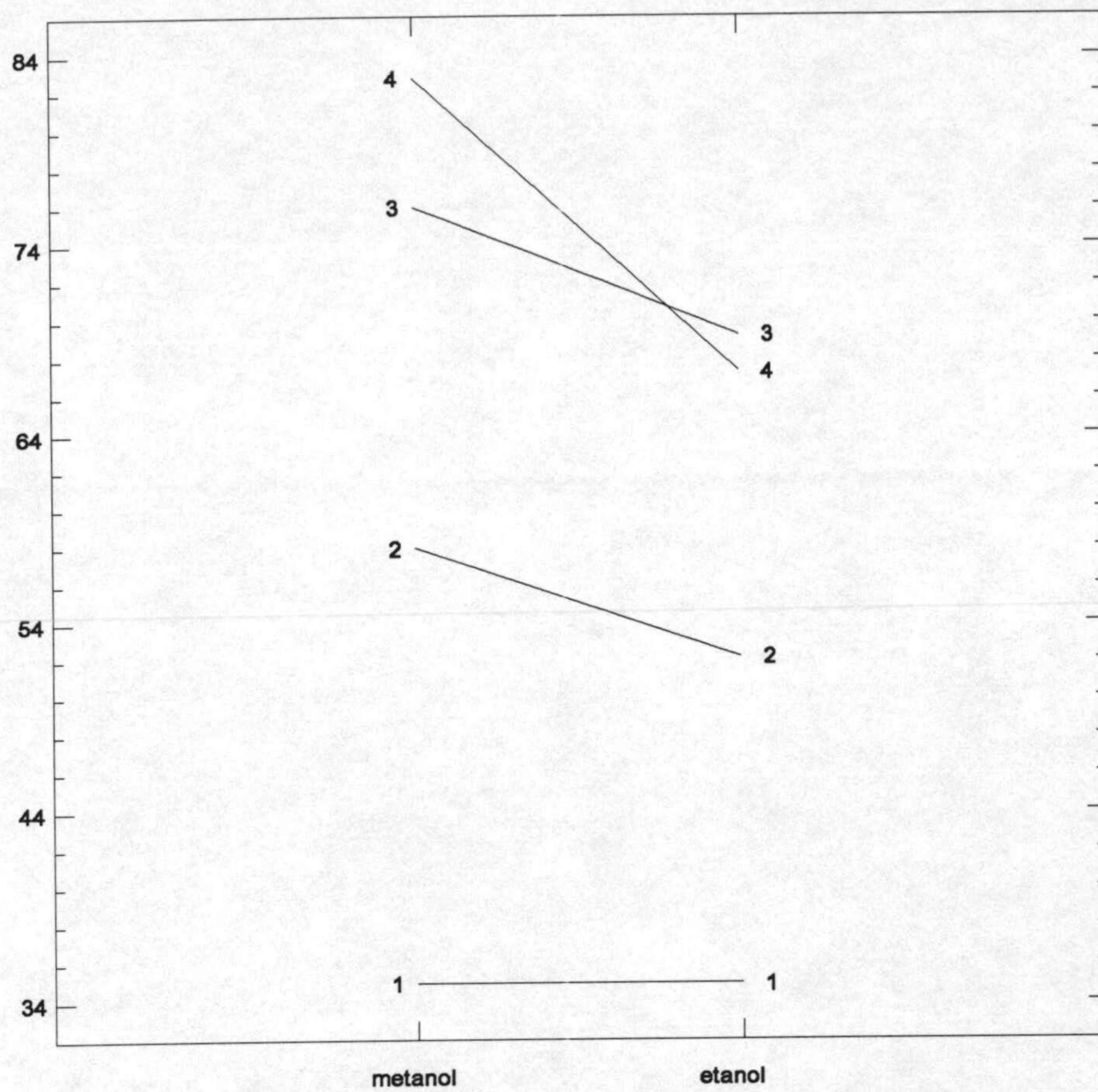


Figura 5.2.8.- Interacciones entre factores: disolvente - relación.

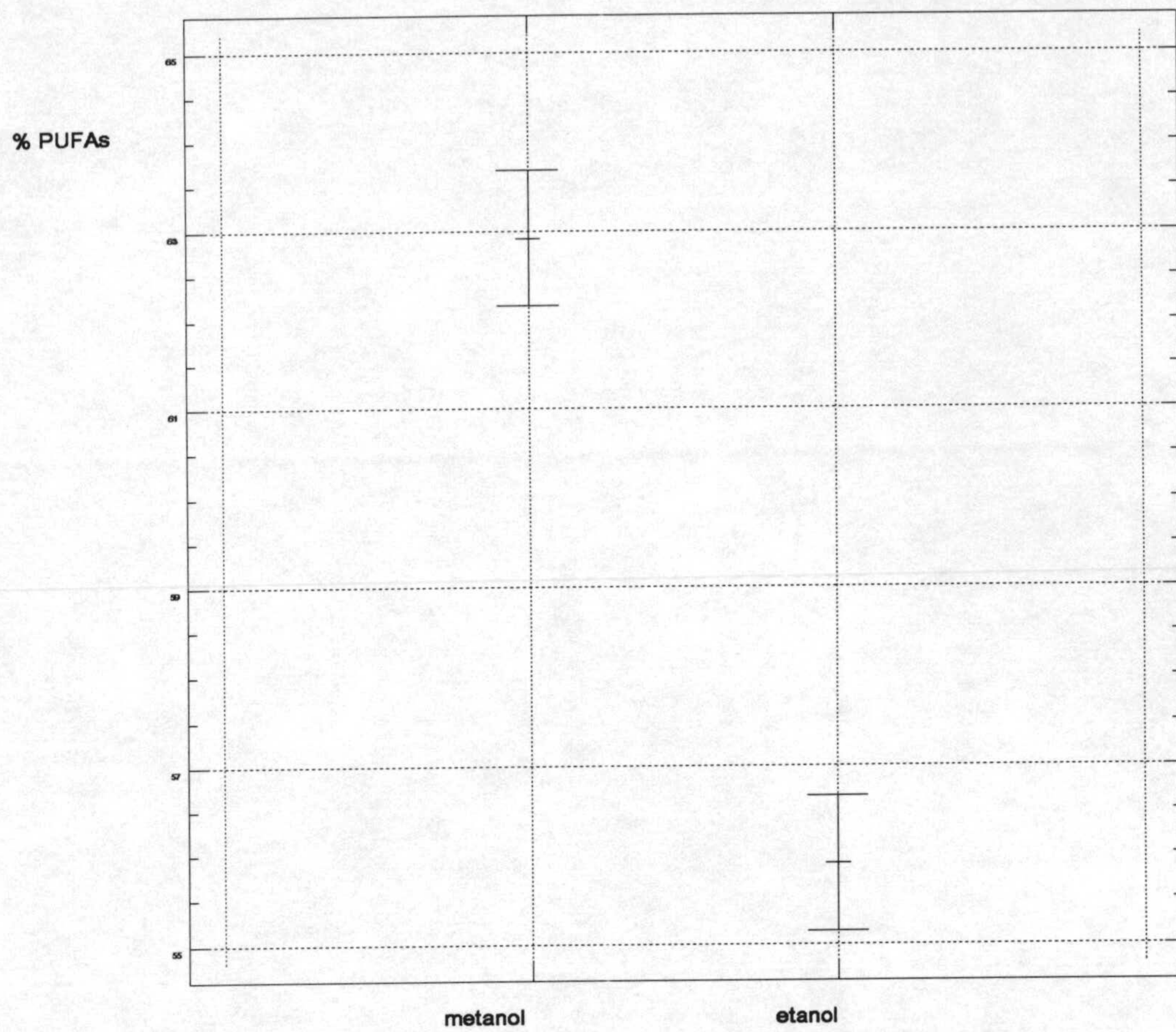


Figura 5.2.9.- Intervalos de confianza del 95 % para las medias del tipo de disolvente

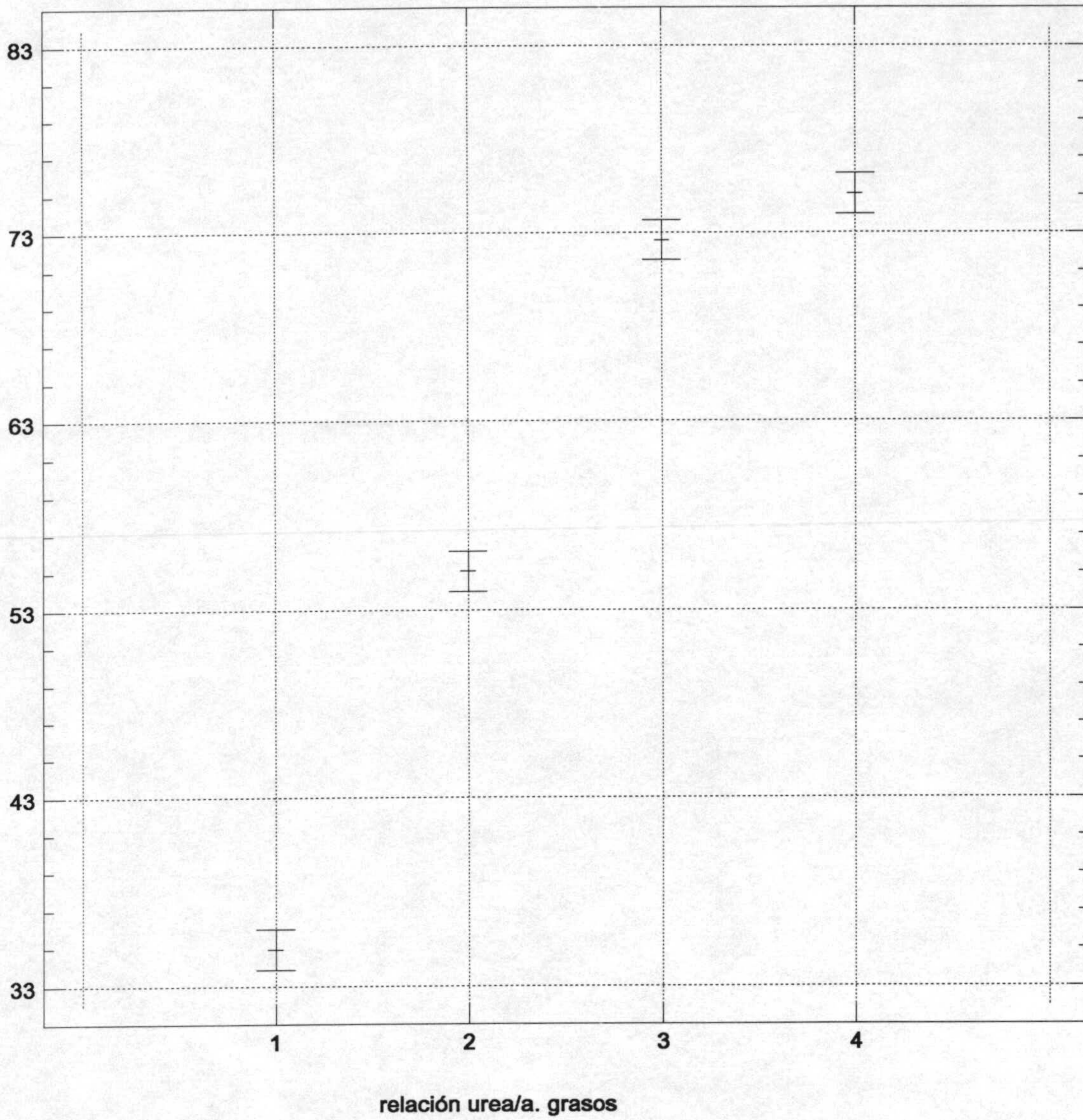


Figura 5.2.10.- Intervalos de confianza del 95 % para las medias de la relación urea/a. grasos

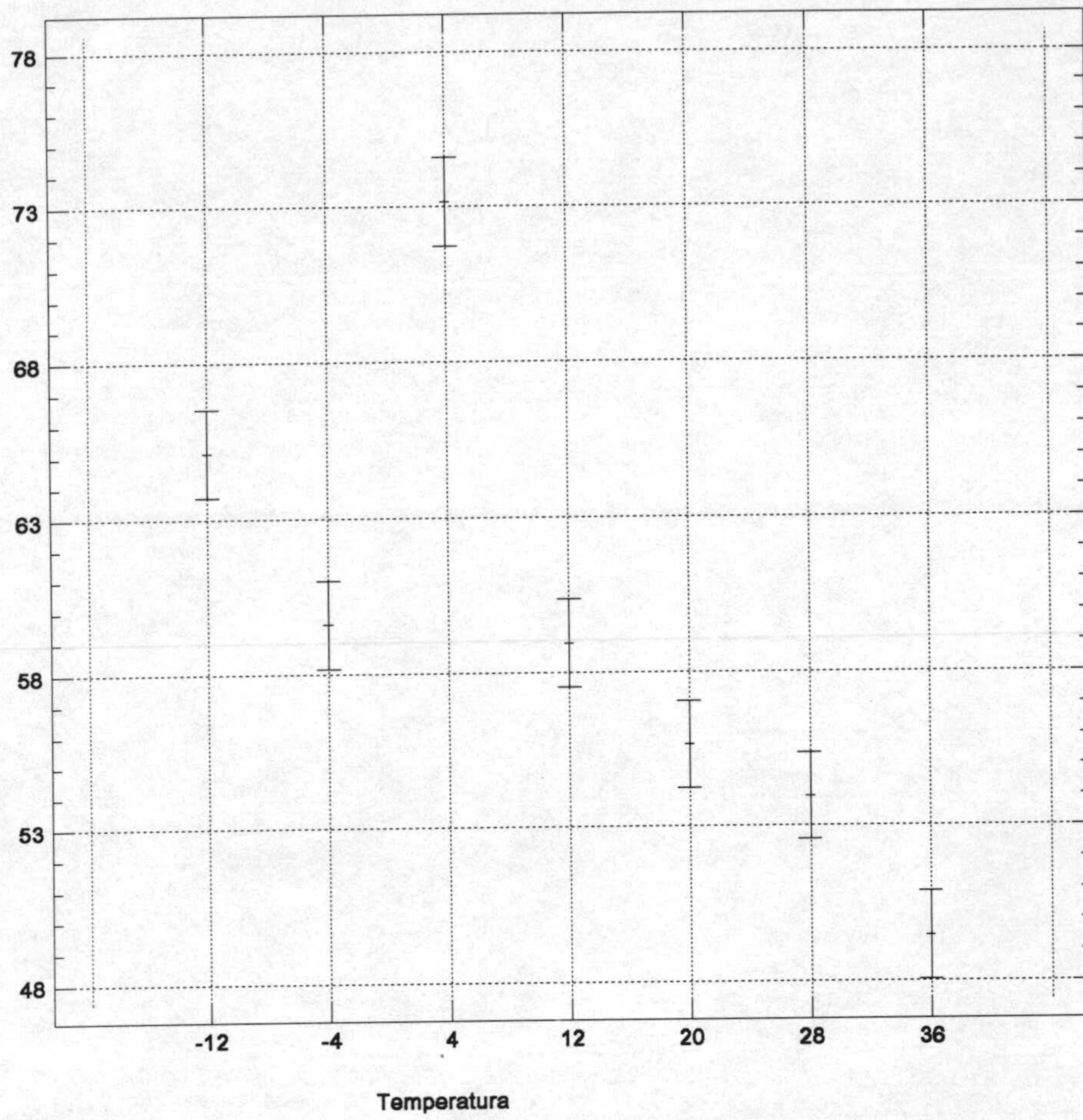


Figura 5.2.11.- Intervalos de confianza al 95 % para las medias de la temperatura.

decir, el mayor porcentaje de PUFAs *n*-3 son la relación 4/1, la temperatura de 4°C y la utilización de metanol. La veracidad de dichas condiciones se apoya en el hecho de que no hay solapamiento de los intervalos de confianza para las medias de los valores anteriormente citados y el resto de los niveles del factor considerado.

En la tabla 5.2.10. se resumen los resultados para las restantes respuestas. Como se puede apreciar, el factor principal es la relación urea/ácidos grasos en todas las respuestas, análogamente a la respuesta principal. Todos los factores son estadísticamente significativos (como mínimo al 95 % de intervalo de confianza) para todas las respuestas, excepto para el factor tipo de disolvente en la relación EPA/DHA. Se incluye en esta tabla la suma de cuadrados total y la del error para dar una idea del margen de error experimental, el cual puede considerarse aceptable en las condiciones de operación seleccionadas.

Tabla 5.2.10.- Resultados del ANOVA para la respuesta % *n*-3 PUFAs.

Fuente de variación	SSQ	DF	F-ratio
Efectos principales			
A) Temperatura	2917	6	67,1 ***
B) Relación Urea/A. grasos	14524	3	668,1 ***
C) Disolvente	690	1	95,3 ***
Interacciones			
AB	882	18	6,7 ***
AC	100	6	2,3 ns
BC	427	3	19,6 ***
error	130	18	
total	19674	55	

SSQ: suma de cuadrados.

DF: Grados de libertad.

ns: estadísticamente no significativo.

*: significativo (0,01 < P < 0,05).

**: significativo (0,001 < P < 0,01).

***: significativo (P < 0,001).

El modelo de regresión propuesto para el ajuste de los datos experimentales es el siguiente:

$$Y = B_0 + B_1 (T) + B_2 (R) + B_{12} (TR) + B_{11} (T)^2 + B_{22} (R)^2 + B_{dte} (Xd) \quad [5.2.1]$$

donde Y es la variable dependiente, T y R son los factores, es decir, la temperatura de cristalización y la relación urea/a. grasos, respectivamente. Xd es una variable binaria que toma el valor (0) si el disolvente utilizado es metanol y (1) si es etanol. Esta variable introduce efectos cualitativos en el modelo de regresión, como en este caso es el cambio de disolvente. Los B_i son los coeficientes del modelo, los cuales aparecen recogidos en la tabla 5.2.11, junto con la codificación del nivel de significación.

En la tabla 5.2.11. también aparece el coeficiente de determinación (R-sq) para comprobar la bondad del ajuste. A modo de ejemplo, y en la figura 5.2.12 se representa la desviación de los valores observados frente a los predichos por el modelo para el porcentaje de PUFAs *n*-3. Los resultados de esta tabla confirman las conclusiones del análisis de la varianza. La respuesta predicha por el modelo sería menor en todos los casos para el cambio de metanol a etanol, como reflejan los coeficientes para la variable binaria Xd, ya que todos son negativos y la variable Xd toma el valor (1) si se utiliza etanol. Otro hecho destacable en este sentido es que los coeficientes más altos de los términos lineales son los de la relación urea/a. grasos, ya que éste es el factor principal.

Tabla 5.2.11.- Coeficientes del modelo de regresión.

Parámetros	Variables dependientes				
	% SA	% EPA	% DHA	% <i>n</i> -3 PUFAs	EPA/DHA
B ₀	0,62 ns	6,24 **	0,35 ns	9,43 ns	0,91 ***
B ₁	0,004 ns	-0,12 *	0,21 ns	0,05 ns	-0,006 *
B ₂	3,19 ***	11,11 ***	21,3 ***	36,67 ***	-0,11 ns
B ₁₂	-0,03 ***	0,09 ***	-0,16 **	-0,07 ns	0,004 ***
B ₁₁	0,0008 ns	-0,003 **	-0,006 ns	-0,009 *	0,00007 ns
B ₂₂	-0,21 *	-1,8 ***	-2,09 *	-4,41 ***	-0,004 ns
B _{dte}	-0,78 ***	-2,06 **	-4,0 *	-7,02 ***	-0,003 ns
r ² (aj.)	91,04 %	78,67 %	77,93 %	85,06 %	63,61 %

ns: estadísticamente no significativo.

*: significativo (0,01 < P < 0,05).

**: significativo (0,001 < P < 0,01).

***: significativo (P < 0,001).

r² (aj.): Coeficiente de determinación (ajustado para los grados de libertad).

Respecto a la relación EPA/DHA, la cual se tomado como una estimación de la separación para estos ácidos, presenta un coeficiente de determinación bajo y los coeficientes de los términos cuadráticos no son estadísticamente significativos.

De los resultados obtenidos puede concluirse que mediante el método de los compuestos de inclusión de la urea pueden obtenerse concentrados de PUFAs de mayor o menor pureza según la relación urea/ácidos grasos y la temperatura de cristalización que se utilice. Ambas variables se pueden utilizar para seleccionar a partir de qué grado de insaturación se desean concentrar los ácidos grasos.

Para la concentración de los PUFAs n3 (SA, EPA y DHA) la temperatura óptima de cristalización está en torno a los 4°C; por encima de esta temperatura se obtienen purezas menores debido a que la tendencia a formar compuestos de inclusión de todos los ácidos grasos desciende al aumentar la temperatura, como indican los mayores rendimientos obtenidos a altas temperaturas, por lo que quedan cantidades importantes de monoenos y, sobre todo, dienos sin acomplejar con la urea; por debajo de 4°C disminuyen los contenidos de los concentrados en PUFAs debido a que a bajas temperaturas estos ácidos grasos también forman compuestos de inclusión.

La relación urea/ácidos grasos óptima es 4:1 peso/peso, si bien en muchas ocasiones los resultados no son muy superiores a los obtenidos con la relación 3:1.

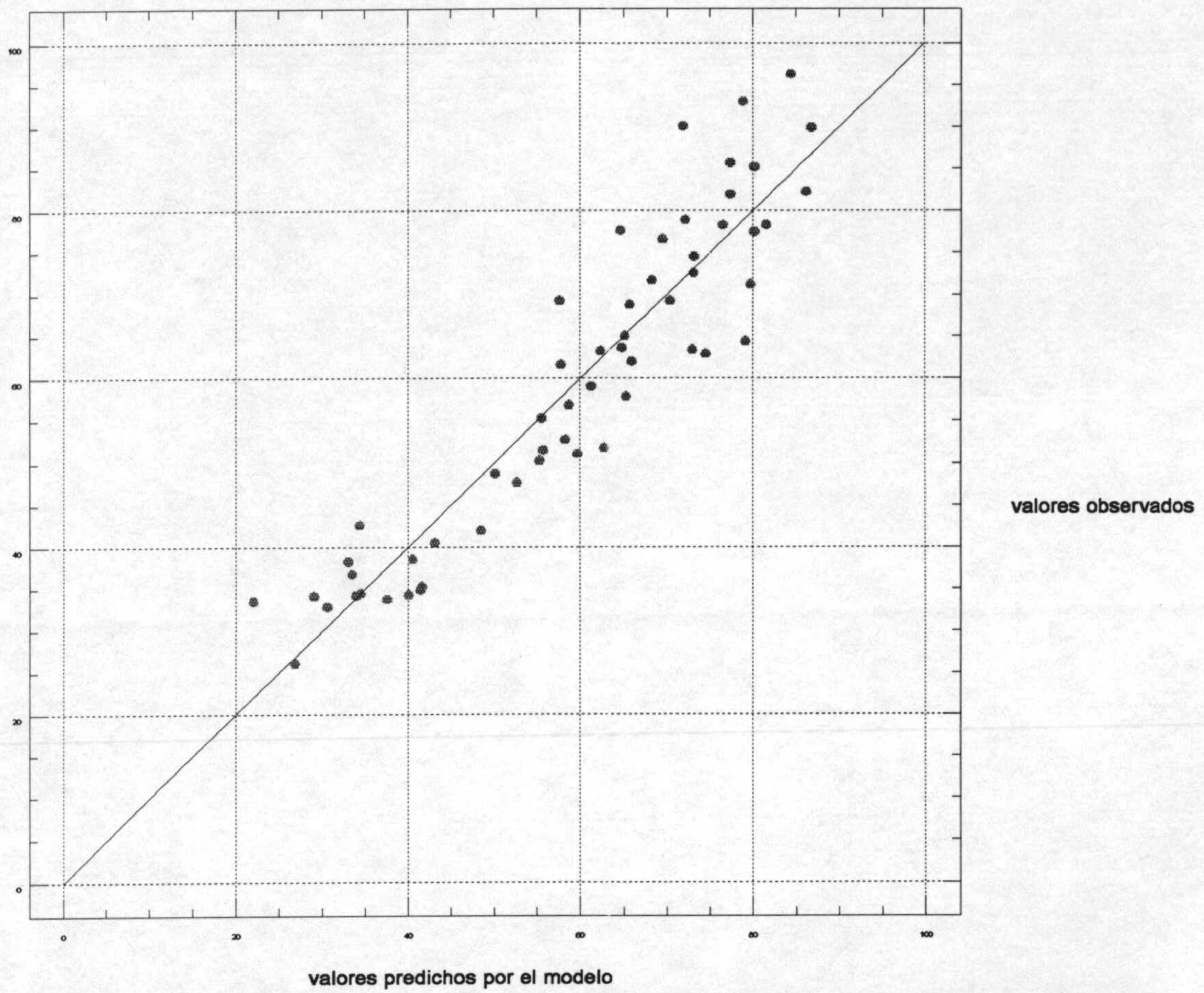


Figura 5.2.12.- Desviación de los datos experimentales al modelo para la respuesta % n-3 PUFAs

5.3.- PURIFICACION DE SA, EPA Y DHA POR CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

En este apartado se van a discutir los resultados obtenidos en la puesta a punto de un método para la obtención de SA, EPA y DHA de alta pureza por HPLC. Esta puesta a punto se ha realizado a escala analítica con concentrados de PUFAs obtenidos por el método de los compuestos de inclusión de urea partiendo de aceite de hígado de bacalao. Los mejores resultados obtenidos a escala analítica se han escalado a nivel semipreparativo y las mejores separaciones conseguidas a este nivel se han aplicado a concentrados de PUFAs procedentes de la microalga *I. galbana*. Los perfiles de ácidos grasos y las concentraciones de los concentrados de PUFAs de que se ha partido se muestran en las tabla 4.3.2.

Las variables estudiadas han sido:

- el tipo de la fase móvil,
- el flujo de fase móvil,
- la cantidad de muestra cargada y
- la composición de la fase móvil.

Los valores óptimos de las variables indicadas con cada fase móvil se han elegido determinando tres parámetros en todos los cromatogramas: el factor de capacidad, K' , el factor de separación, α , y la resolución, R . Los valores óptimos de estos parámetros se han elegido teniendo en cuenta que se desean purezas y rendimientos de los tres ácidos de interés próximos al 100%.

5.3.1.- Purificación de SA, EPA y DHA utilizando concentrados de PUFAs de aceite de hígado de bacalao.

5.3.1.1.- Fase móvil metanol-agua

En las tablas 4.3.3 a 4.3.5 se muestran las condiciones experimentales en que se han realizado estas separaciones a escala analítica así como los tiempos de elución o retención de los tres PUFAs de interés y las anchuras de los picos a fin de determinar los parámetros cromatográficos ya comentados.

- Influencia del caudal de fase móvil

En la tabla 5.3.1 se muestran los valores del factor de capacidad, K' , del factor de separación, α , y la resolución, R . El factor de capacidad de cada ácido graso se ha calculado mediante la ecuación [2.2], el factor de separación es el cociente entre los factores de capacidad de los dos PUFAs que eluyen consecutivamente (SA y EPA por un lado y EPA y DHA por otro) y la resolución, R , se calcula mediante la ecuación [2.3]. En la figura 5.3.1 se han representado, a título de ejemplo, los valores de K' , α y R que se muestran en la tabla 5.3.1a.

Tanto en la tabla 5.3.1 como en la figura 5.3.1a se observa que, en el intervalo de flujos ensayado, el valor de K' permanece prácticamente constante para cada uno de los tres ácidos de interés. Este resultado es totalmente lógico ya que la distribución de equilibrio del soluto entre las fases estacionaria y móvil no debe estar afectada por la velocidad de la fase móvil (K' representa la relación entre las cantidades de soluto retenidas entre la fase estacionaria y la fase móvil, apartado 2.4.6.b); estos resultados coinciden con lo obtenido por Bürgisser y cols. (1993) que utilizó una columna cromatográfica para obtener las isotermas de partición de varios compuestos, observando que la constante de partición era independiente del caudal de fase móvil.

Estos resultados también ponen de manifiesto que el volumen de fase móvil necesario para separar una mezcla de PUFAs determinada no depende del caudal empleado (el producto tiempo de elución.flujo de fase móvil permanece constante) y, por tanto, siempre que la resolución sea aceptable, interesará utilizar un caudal elevado para disminuir el tiempo necesario para una separación dada.

Del mismo modo puede observarse que ni el factor de separación (tabla 5.3.1 y figura 5.3.1b) ni la resolución (tabla 5.3.1 y figura 5.3.1c) están influenciados por el caudal de fase móvil. R permanece constante ya que aunque los tiempos de retención disminuyen al aumentar el flujo, también disminuyen en una proporción similar los ensanchamientos de banda (ecuación [2.3]).

Según lo comentado en el apartado 2.4.6d de la introducción, la anchura de banda es inversamente proporcional al número de pisos teóricos (ecuación [2.18]), por lo que, en este caso el número de pisos teóricos de la columna, N , debe aumentar (aumento de la eficacia) a medida que se incrementa el caudal. En la tabla 5.3.2 se

Tabla 5.3.1.-Influencia del caudal de la fase móvil sobre el factor de capacidad K', el factor de separación α y la resolución R. Columna analítica.

a) Fase móvil : MeOH/H₂O(1%AcH) 85:15 p/p .- Carga de concentrado : 1,114 mg

Caudal (ml/min)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA-EPA	EPA-DHA	SA-EPA	EPA-DHA
0,50	1,97	2,29	3,74	1,16	1,63	1,41	2,18
0,75	1,84	2,13	3,42	1,16	1,60	1,44	2,12
1,00	1,88	2,23	3,64	1,89	1,63	1,18	2,08
1,25	1,83	2,14	3,41	1,17	1,60	1,29	2,09

b) Fase móvil : MeOH/H₂O(1%AcH) 90:10 p/p .- Carga de concentrado : 0,743 mg

Caudal(ml/min)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA-EPA	EPA-DHA	SA-EPA	EPA-DHA
0,50	1,35	1,58	2,15	1,17	1,37	1,19	1,67
0,60	1,31	1,40	1,63	1,07	1,16	0,70	0,48
0,75	1,17	1,28	1,67	1,09	1,31	0,80	0,77
1,00	1,31	1,53	2,06	1,17	1,35	1,09	1,50

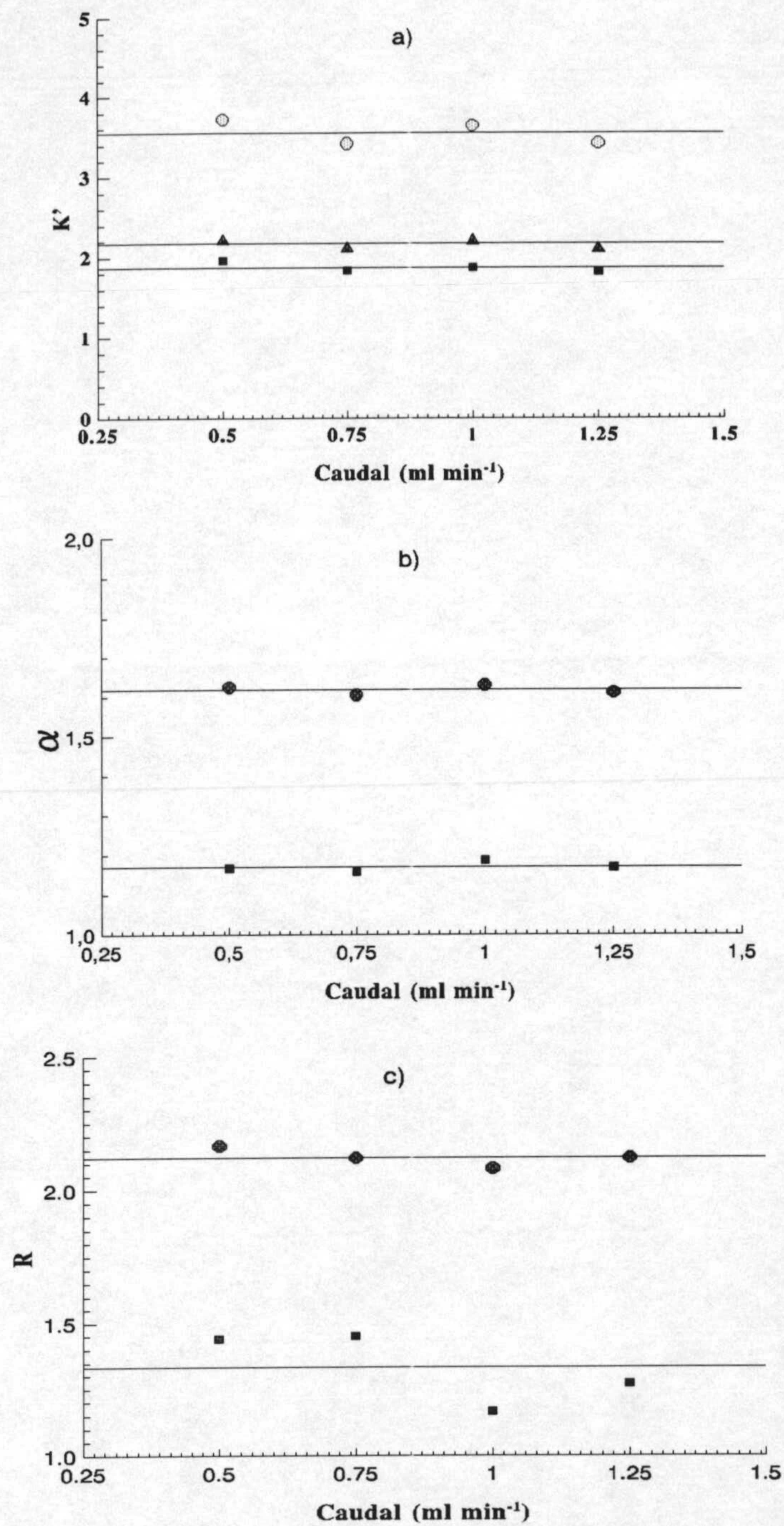


Fig.5.3.1.-Influencia del caudal de la fase móvil sobre: a) El factor de capacidad (K'); (●) DHA (▲) EPA y (■) SA, b) el factor de separación (α), (●) EPA-DHA y (■) SA-EPA, c) la resolución (R), (●) EPA-DHA y (■) SA-EPA. Columna analítica. MeOH-H₂O (1% AcH) 85:15 p/p y 1,114 mg de concentrado de PUFAs de AHB.

Tabla 5.3.2 .-Influencia del caudal de la fase móvil sobre el número de pisos teóricos N, de la columna analítica de los ácidos SA,EPA y DHA (ecuación [2.23]). Columna analítica.

Caudal(ml/min)	N		
	SA	EPA	DHA
0,25	5637	289	422
0,50	30072	484	498
0,75	4927	369,5	366
1,00	4071	442	306
1,25	3515	634	654

Fase móvil : MeOH/H2O(1%AcH) 85:15 p/p. Carga del concentrado:0,743 mg.

muestran el número de pisos teóricos de la columna analítica en función del caudal de fase móvil para unas condiciones cromatográficas concretas, calculados según la ecuación [2.23]; en ella se observa que tanto para el EPA como para el DHA se confirma un aumento de N a medida que crece el caudal, lo cual basta para hacer que las resoluciones SA-EPA y EPA-DHA permanezcan aproximadamente constantes.

En la figura 5.3.2 se muestran cuatro cromatogramas realizados a caudales de fase móvil crecientes. Se observa, como ya se ha comentado, que a medida que crece el caudal de fase móvil decrecen los tiempos de retención y también las anchuras de los picos.

Así pues, si el caudal no influye en la resolución, interesará trabajar al flujo más elevado posible y por ello el factor limitante en cuanto a esta variable vendrá dado por la presión máxima a que pueden someterse estas columnas.

- Influencia de la cantidad de muestra

Este estudio se llevó a cabo para hallar la máxima cantidad de muestra que puede separarse con resoluciones aceptables (no inferiores a la unidad). En la tabla 5.3.3 se muestra la influencia de la cantidad de muestra cargada en la columna sobre K' , α y R con las tres fases móviles metanol-agua (1%AcH) ensayadas. En todos los casos se observa que para valores pequeños de la cantidad de muestra K' es mayor y que a medida que la cantidad de muestra aumenta K' se hace más pequeño hasta alcanzar un valor aproximadamente constante en el rango de cantidades de muestra ensayado. Este mismo resultado puede observarse en los cromatogramas de la figura 5.3.3 si se comparan entre sí los tiempos de elución de los tres ácidos de interés para cada una de las cantidades de muestra cargadas. Este descenso es más acusado cuanto mayor es la longitud de cadena del ácido graso (mayor para el DHA que para el EPA y mayor para el EPA que para el SA), siendo prácticamente constante para el SA (tabla 5.3.3).

Si de nuevo tenemos en cuenta el significado del factor de capacidad (apartado 2.4.6b) estos resultados parecen poner de manifiesto que las isothermas de equilibrio no son lineales en todo el rango de cantidades de muestra ensayado. La no linealidad de la isoterma se traduce en una desviación del perfil de concentraciones de la forma gaussiana (figura 2.8 b y c), sin embargo en este caso K' permanece constante en el rango superior de concentraciones, por lo que los perfiles no deben desviarse

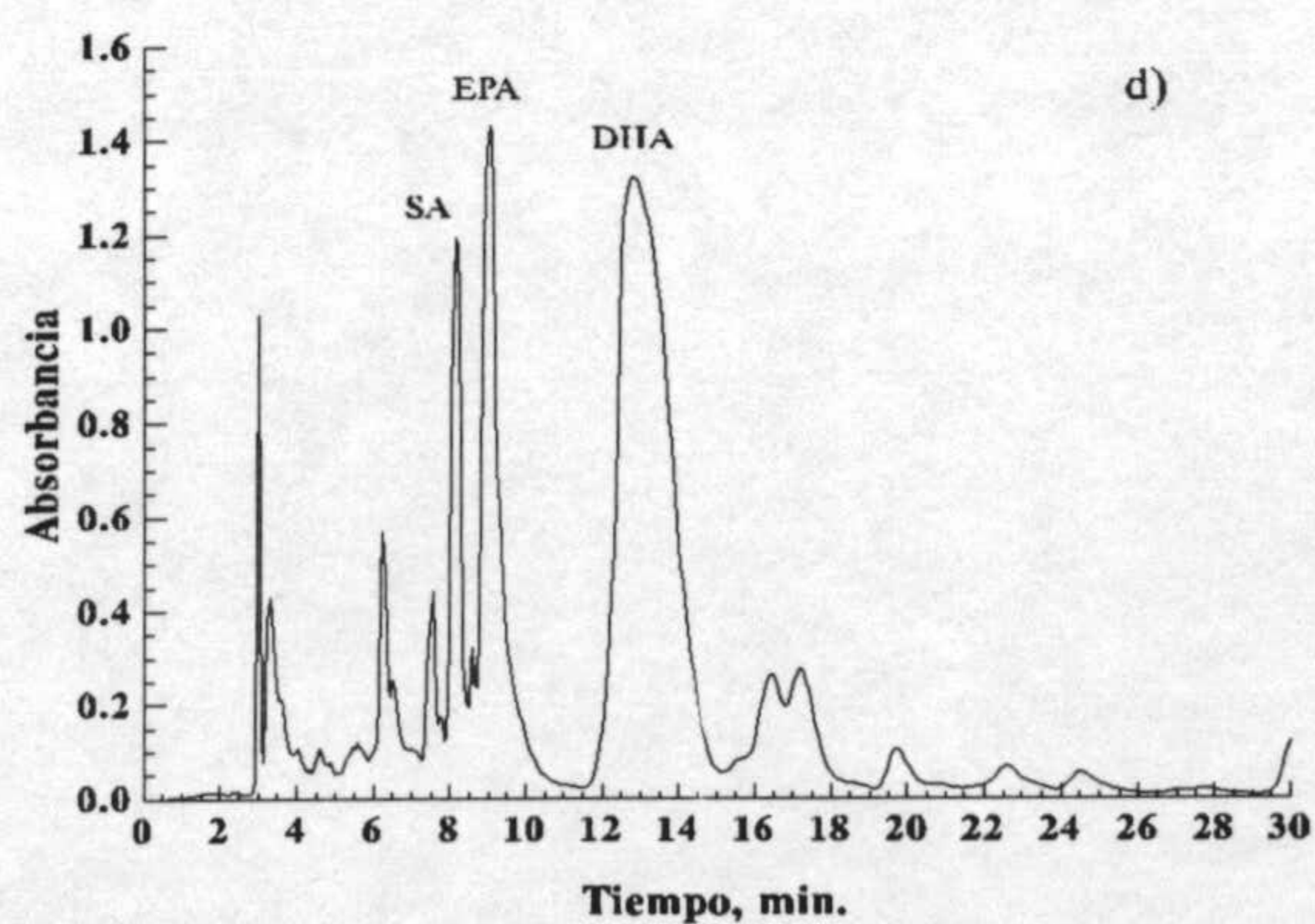
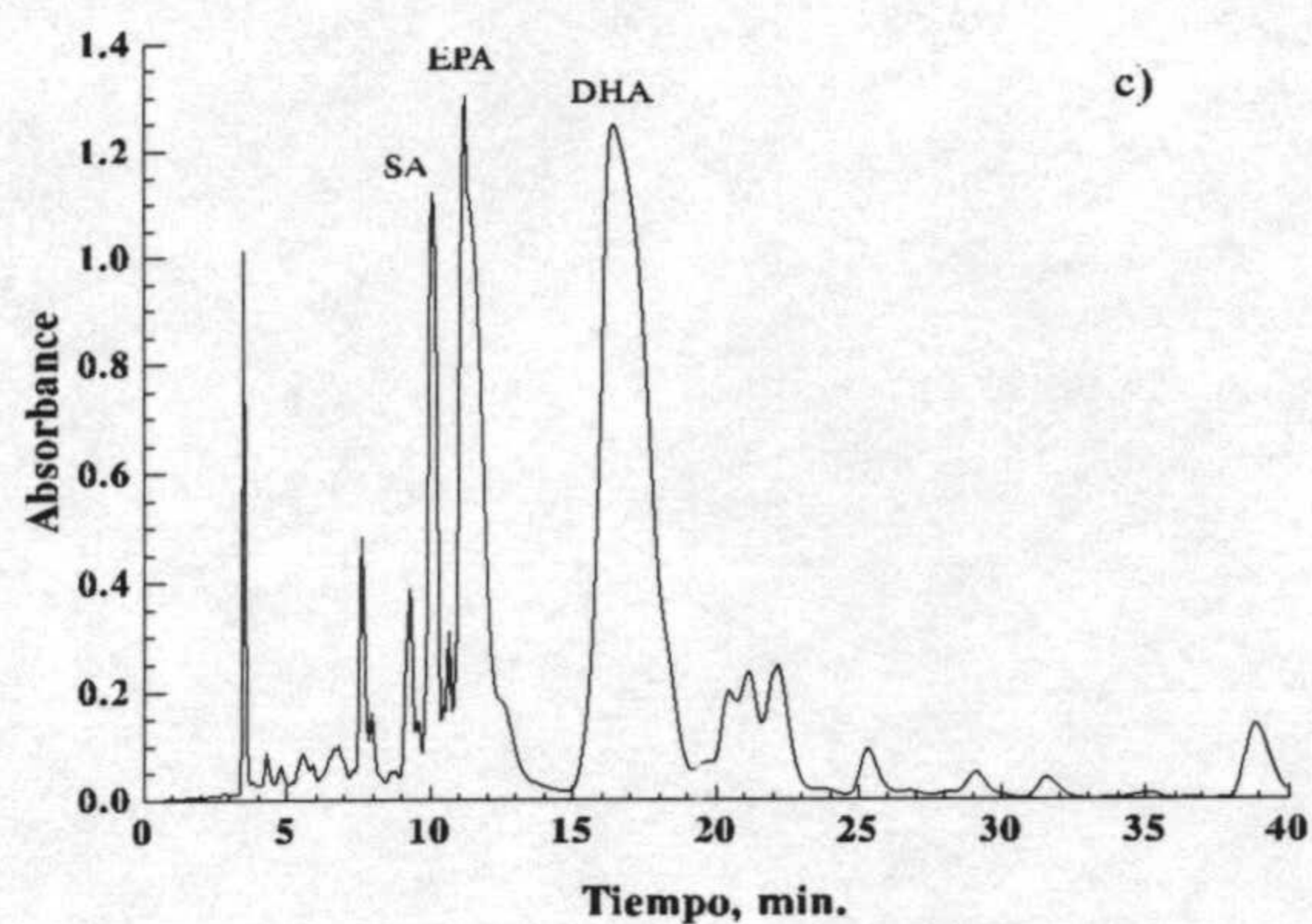
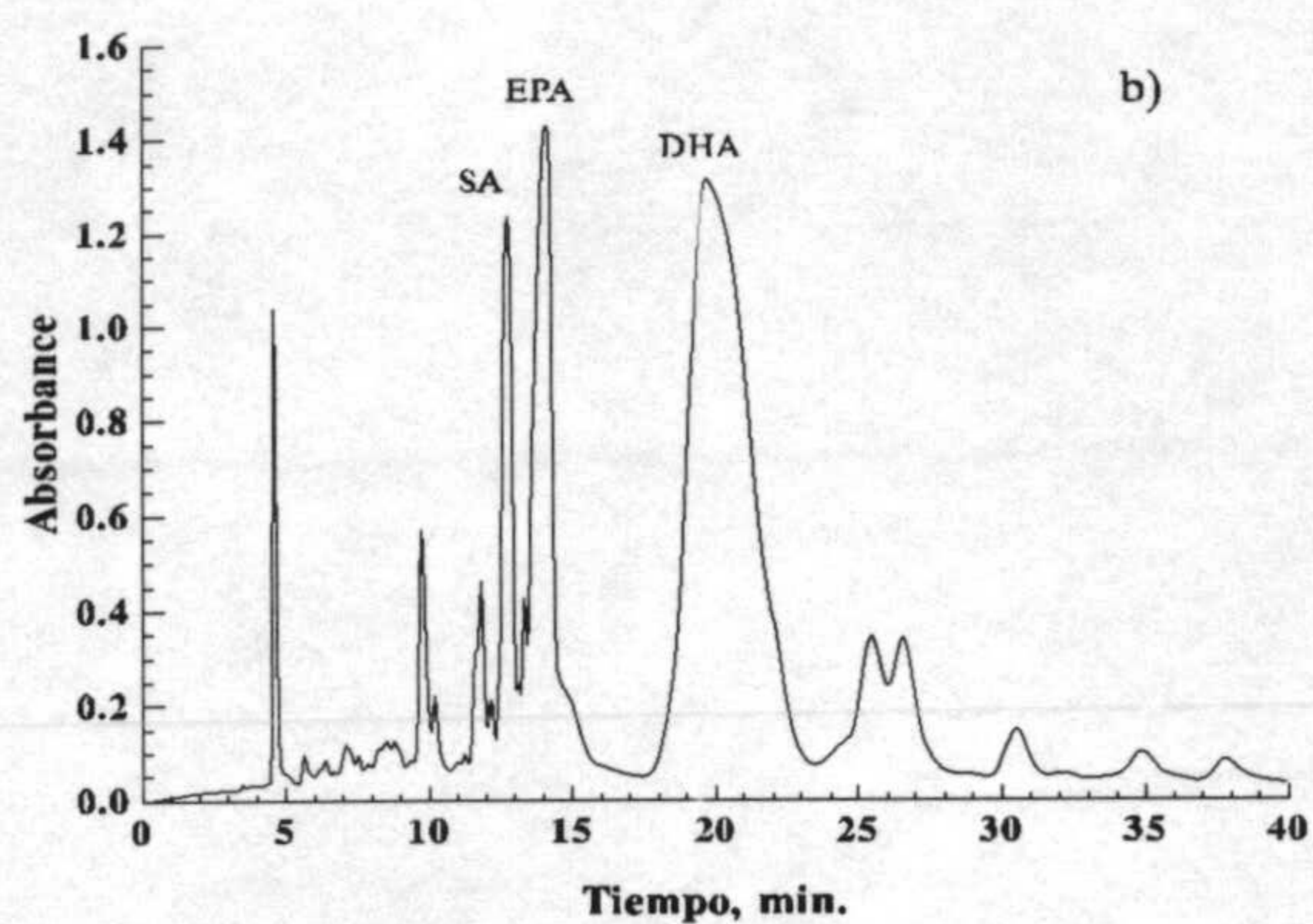
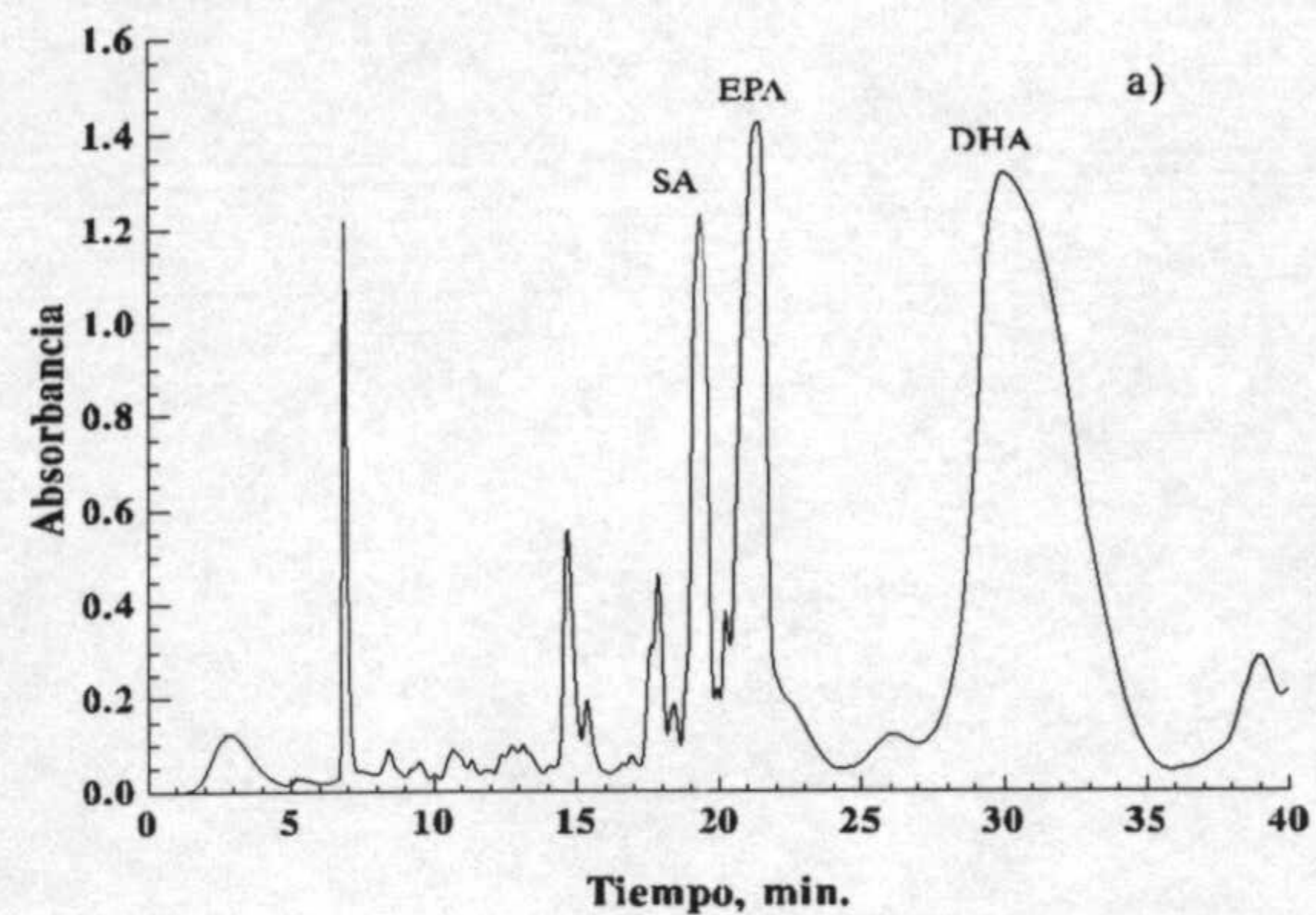


Fig.5.3.2.-Influencia del caudal de fase móvil: a) 0,5 ml/min, b) 0,75 ml/min, c) 1,0 ml/min, d) 1,25 ml/ min. Columna analítica. Fase móvil: MeOH-H₂O (1% AcH) 85:15 p/p. Muestra: 1,114 mg de concentrado de PUFAs de AHB.

Tabla 5.3.3.- Influencia de la cantidad de muestra y de la composición de la fase móvil sobre el factor de capacidad K' , el factor de separación α y en la resolución R. Columna analítica.

Fase móvil: MeOH/H ₂ O(1%AcH)90:10 p/p. Caudal: 0,75 ml/min							
Cantidad (mg)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA-EPA	EPA-DHA	SA-EPA	EPA-DHA
0,416	1,32	1,46	2,05	1,11	1,40	1,17	1,42
0,557	1,32	1,41	1,85	1,07	1,31	0,75	0,81
0,743	1,16	1,28	1,67	1,09	1,30	0,80	0,77
1,114	1,20	1,33	1,50	1,10	1,14	0,85	0,64
0,929	1,21	1,33	1,56	1,10	1,17	0,91	0,55
1,486	1,21	1,33	1,50	1,10	1,13	0,85	0,64
Fase móvil: MeOH/H ₂ O(1%AcH)85:15 p/p. Caudal: 0,75 ml/min							
Cantidad (mg)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA-EPA	EPA-DHA	SA-EP	EPA-DHA
0,033	3,20	4,34	6,02	1,29	1,39	3,62	4,34
0,743	2,07	2,82	4,37	1,37	1,55	1,48	1,49
1,109	1,84	2,11	3,11	1,15	1,47	1,14	1,28
1,114	1,84	2,13	3,42	1,16	1,60	1,44	2,12
1,386	1,67	1,96	2,83	1,16	1,45	0,98	1,01
1,857	1,93	2,25	2,95	1,17	1,31	1,08	0,86
Fase móvil: MeOH/H ₂ O(1%AcH)80:20 p/p. Caudal: 1,25 ml/min							
Cantidad (mg)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA-EPA	EPA-DHA	SA-EPA	EPA-DHA
0,186	3,88	5,71	8,56	1,47	1,50	3,91	4,13
0,371	4,33	6,40	9,50	1,48	1,48	3,65	3,93
0,743	3,31	5,20	7,94	1,57	1,53	3,10	2,93
1,114	3,00	4,67	7,45	1,56	1,60	3,31	2,67
1,486	3,20	4,73	7,53	1,48	1,59	1,95	1,71
1,857	3,23	4,42	7,35	1,37	1,66	1,27	1,60
2,228	3,77	4,58	7,96	1,21	1,74	0,86	1,64

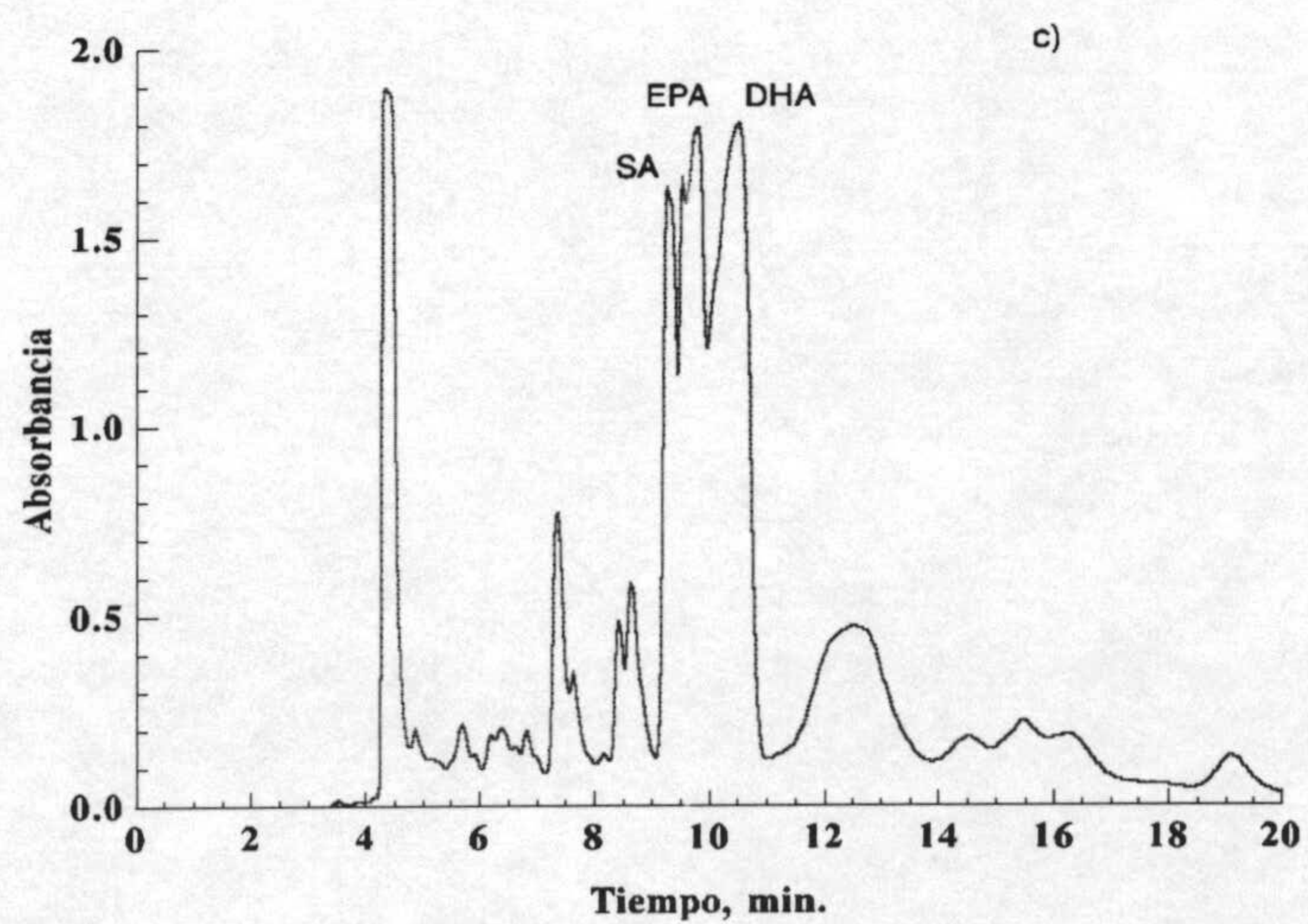
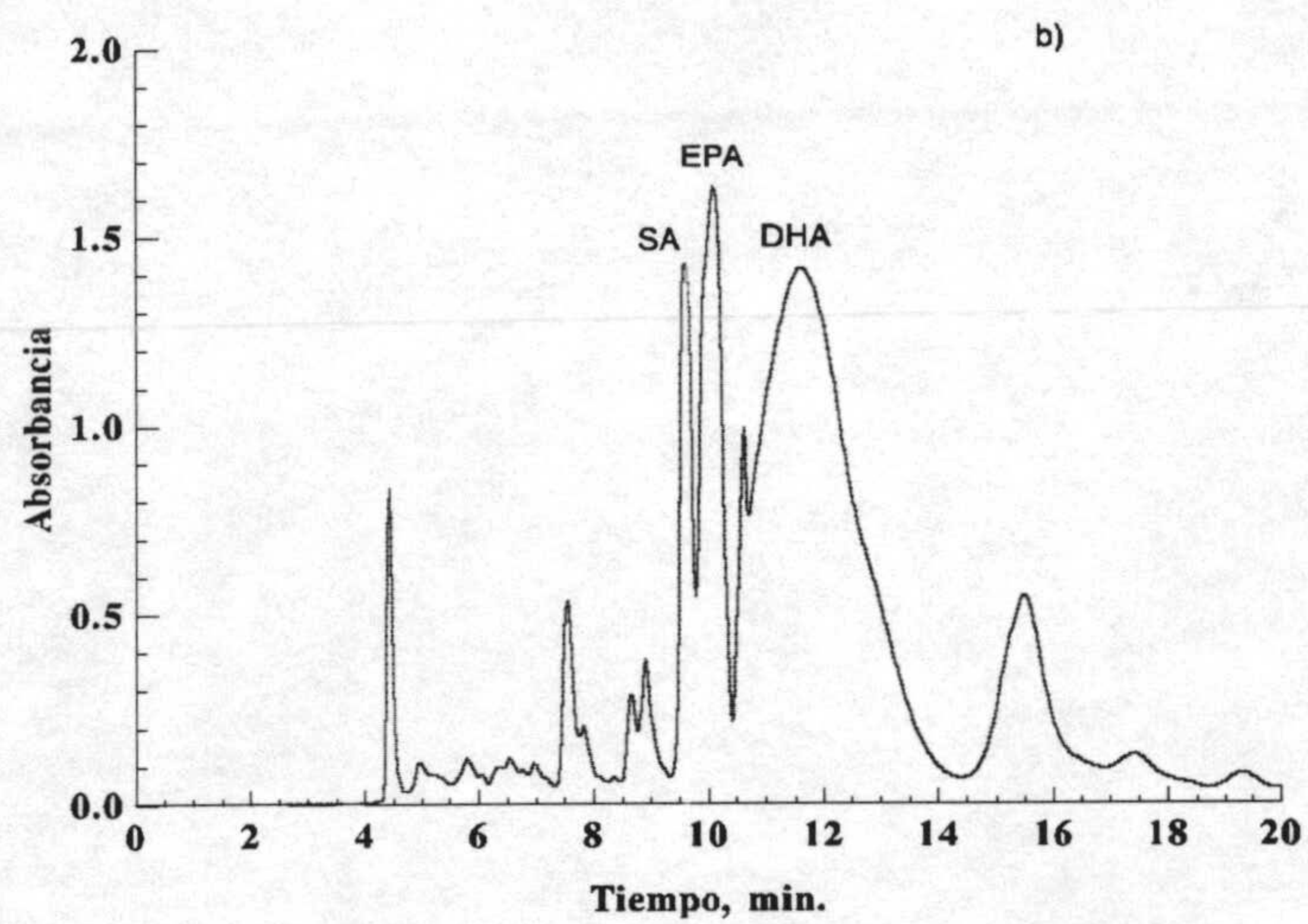
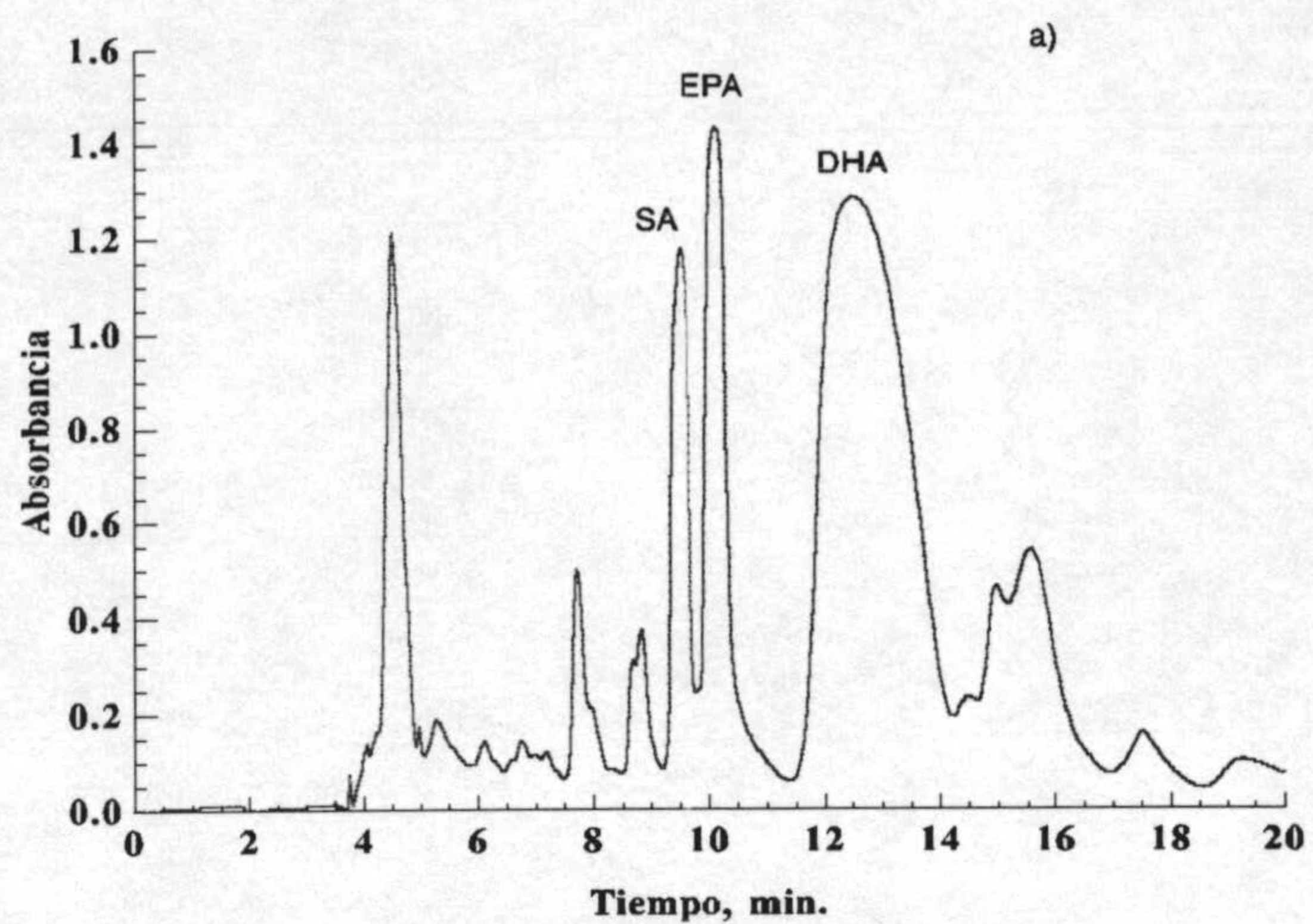


Fig.5.3.3.-Influencia de la cantidad de PUFAs cargados de AHB: a) 0,416 mg, b) 0,743 mg, c) 1,482 mg. Columna analítica. Fase móvil: MeOH-H₂O (1% AcH) 90:10 p/p. Caudal 0,75 ml/min.

excesivamente de la forma gaussiana, al menos por este hecho y en la mayor parte de las cantidades ensayadas, como se observa en la figura 5.3.3, donde prácticamente todos los picos conservan un perfil aproximadamente gaussiano. A la vista de la forma de los picos que se muestran en la figura 5.3.3 estos resultados parecen indicar que las isotermas de distribución de los PUFAs tienen una forma similar a la indicada en la figura 2.8.b (isoterma tipo Langmuir). Este descenso del tiempo de retención al aumentar la cantidad de muestra es puesto de manifiesto también por Burgisser y cols. (1993).

En la tabla 5.3.3 también se muestran los valores de los factores de separación obtenidos con las tres fases móviles y cantidades crecientes de muestra. En general, en el rango ensayado, no se observa influencia alguna de la cantidad de muestra cargada sobre los valores de α .

En cuanto a la resolución, tanto en la tabla 5.3.3 como en la figura 5.3.3 se observa que disminuye a medida que se incrementa la cantidad de muestra. Teniendo en cuenta que el factor de separación prácticamente no se modifica con esta variable, parece que este resultado se debe a la influencia de los factores cinéticos, es decir, a un ensanchamiento de banda o, lo que es igual, a una pérdida de la eficacia (disminución del número de pisos teóricos) a medida que se incrementa la cantidad de muestra cargada.

En la tabla 5.3.4 se muestran el número de pisos teóricos calculados para cantidades de muestra crecientes en unas de las condiciones cromatográficas ensayadas. En esta tabla no se observa una disminución de N muy acentuada, ni tampoco en los cromatogramas de la figura 5.3.3 se observa un ensanchamiento de banda muy apreciable al aumentar la cantidad de muestra cargada. Por tanto parece que la pérdida de resolución al aumentar esta cantidad de muestra no es debida a pérdida en la eficacia separadora de la columna (efectos cinéticos), sino que debe estar motivada por efectos termodinámicos a pesar de que α permanezca prácticamente constante. De hecho, si se observa la tabla 5.3.3, el valor de α correspondiente a la separación EPA-DHA con metanol-agua (1%AcH) 90:10 disminuye al aumentar la cantidad de muestra, lo cual hace pensar que el hecho de que en los demás casos permanezca constante es tan sólo debido a que la variación de los K' correspondientes (SA-EPA y EPA-DHA) es proporcional. Por tanto parece que esta pérdida de resolución al aumentar la cantidad de muestra en el rango ensayado es debida al descenso de K' , el cual podría evitarse actuando sobre las condiciones de equilibrio, es decir sobre la fase móvil.

Tabla 5.3.4.-Influencia de la cantidad de muestra cargada sobre el número de pisos teóricos N de la columna analítica de los ácidos SA,EPA y DHA (Ecuación[2.23]).

Fase móvil: MeOH/H₂O(1%AcH) 85:15 p/p. Caudal : 0,75 ml/min.

Cantidad (mg)	N		
	SA	EPA	DHA
0,033	10141	5077	5355
0,743	4927	370	366
1,108	4189	1133	272
1,114	4691	1811	294
1,486	5102	986	278
1,857	4440	1336	130

Este resultado es, por otra parte, lógico, ya que las mejores resoluciones con las cantidades de muestra mayores se han obtenido con metanol-agua (1%AcH) 80:20, que es la fase móvil para la cual K' tiene valores mayores, es decir aquella para la cual el equilibrio de distribución del soluto está más desplazado hacia la fase estacionaria. Sin embargo esta fase móvil tiene el inconveniente, como se comentará más adelante, de aumentar mucho el tiempo necesario para una separación dada. Una manera de cargar cantidades de muestra grandes evitando que K' disminuya, sin que por otra parte aumente mucho el tiempo de elución, es ir disminuyendo el poder eluyente de la fase móvil mediante una elución en gradiente.

Con respecto al cálculo del número de pisos teóricos mediante la ecuación [2.23] es preciso indicar que, además de ser un cálculo muy impreciso puesto que se ha realizado obteniendo los parámetros de la ecuación [2.23] de los cromatogramas de una manera gráfica, se trata de un cálculo muy aproximado ya que esta ecuación se basa en una serie de hipótesis que no siempre se cumplen totalmente; así por ejemplo la ecuación [2.23] se basa en suponer una isoterma de equilibrio lineal (ver apartado

2.4.6d), lo cual, como acabamos de comentar no se cumple en este caso, además también se basa en suponer un perfil gaussiano para los picos cromatográficos, lo cual es difícil que ocurra en una muestra tan compleja como son los concentrados de PUFAs, en los que difícilmente un pico corresponde a una sustancia pura, existiendo siempre sustancias en pequeñas cantidades que impurifican las mayoritarias.

En la tabla 5.3.3 puede observarse que cuando se cargan en la columna cantidades de PUFAs superiores a 0,416, 1,386 y 1,857 mg con metanol-agua (1%AcH) 90:10, 85:15 y 80:20 p/p, respectivamente, las resoluciones obtenidas indican que aparecen solapamientos que rebajan la pureza de las fracciones, ya que en esos casos se obtienen resoluciones por debajo de la unidad (para $R = 1$ la separación estaría en torno al 98% y para $R = 1,5$ la separación es prácticamente total, Valcarcel, 1990), por tanto, dado que el objetivo de esta investigación es obtener SA, EPA y DHA con purezas y rendimientos lo más elevados posible, las cantidades de PUFAs que se han escalado a nivel semipreparativo están en torno a las cantidades antes indicadas con cada una de las fases móviles. Lógicamente sería posible escalar cantidades de muestra mayores pero a costa de una disminución de la resolución y por tanto de una disminución de los rendimientos y/o de la pureza. En este sentido Tokiwa y Kanazawa (1981) (tabla 2.10) cargan cantidades de muestra muy elevadas a costa de obtener rendimientos de tan solo el 66,7% en EPA y el 53,3% en DHA. No obstante, para una comparación exhaustiva habría de tenerse en cuenta que estos autores utilizan una columna de un diámetro interno y una porosidad bastante mayores a las empleadas en este trabajo. Desafortunadamente en la bibliografía existen muy pocos trabajos en los que junto a las purezas obtenidas se aporten los rendimientos en la recuperación de ácidos grasos, por lo que es difícil realizar un estudio comparativo más completo.

- Influencia de la composición de la fase móvil

Basta comparar entre sí los factores de capacidad que se muestran en la tabla 5.3.3 correspondientes a las tres fases móviles utilizadas para observar que este parámetro aumenta notablemente al disminuir el porcentaje de metanol.

En la figura 5.3.4 se observa que K' disminuye exponencialmente a medida que aumenta el porcentaje de metanol en la fase móvil, es decir, a medida que aumenta el poder eluyente de la fase móvil. Este resultado es idéntico al obtenido por Avelano y cols. (1983) en la separación de ácidos grasos libres con acetonitrilo-agua. La mayor

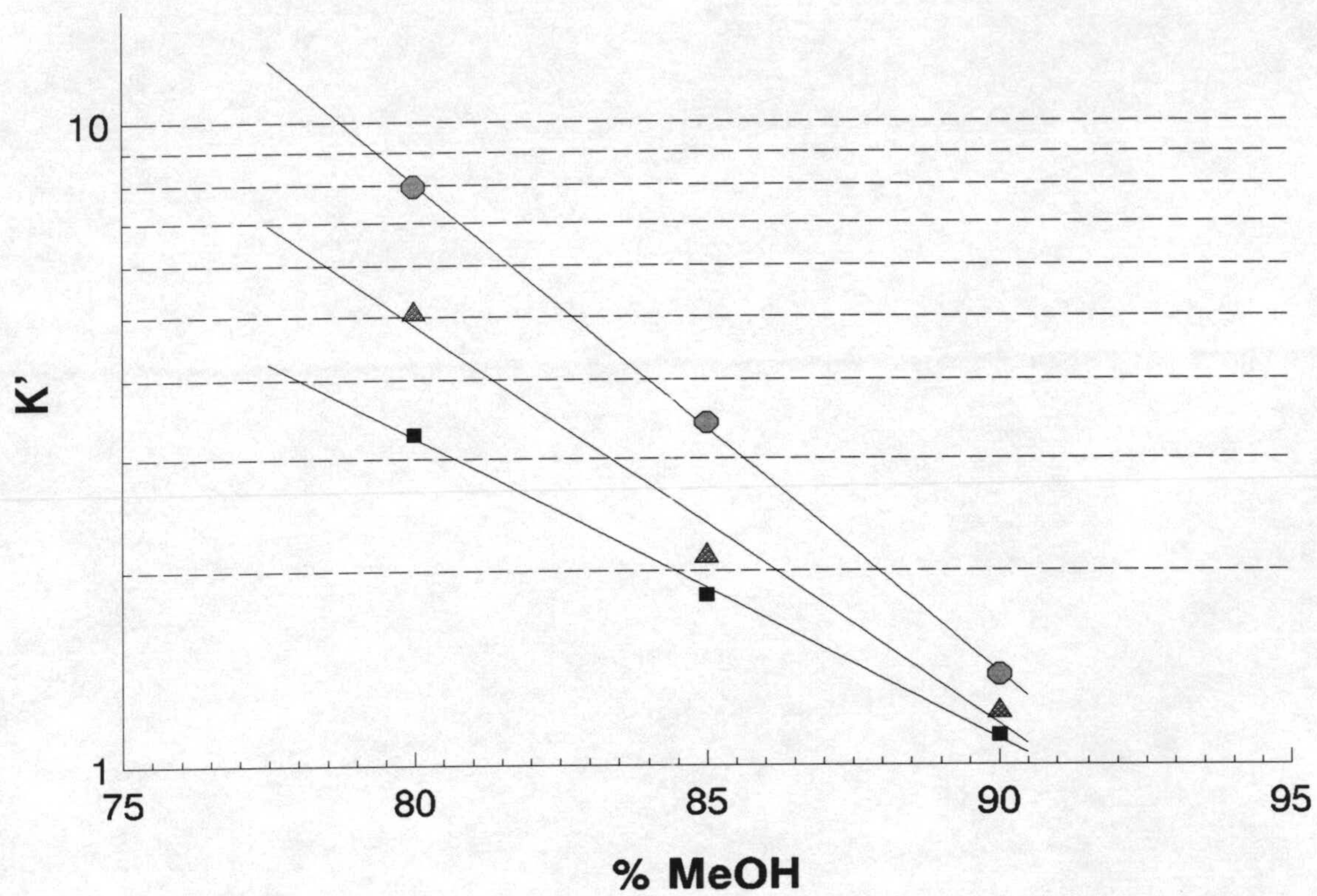


Fig 5.3.4.-Influencia de la composición de la fase móvil (MeOH-H₂O (1% AcH)) sobre el factor de capacidad. Columna analítica. Caudal 0,75 ml/min. Muestra cargada: 1,114 mg de AHB. (●) DHA, (▲) EPA, (■) SA.

pendiente de la recta correspondiente al DHA, seguida de la del EPA y SA, indica que una disminución del porcentaje de metanol en la fase móvil harían disminuir más el factor de capacidad del DHA que el del EPA y éste que el del SA (téngase en cuenta además que esta disminución es exponencial), con lo cual se mejoraría la separación entre los tres ácidos, como se pone más claramente de manifiesto observando que el factor de separación disminuye a medida que aumenta el porcentaje en metanol (tabla 5.3.3). Este hecho se observa con claridad si se comparan entre sí los cromatogramas que se muestran en la figura 5.3.5.

Por otra parte, según Wille y cols. (1987), para que la separación de estos productos a gran escala sea económicamente viable los factores de capacidad K' deben estar comprendidos entre 1 y 5. En este caso, esto se cumple cuando la fase móvil es metanol-agua (1%AcH) 90:10 y 85:15 pero no siempre cuando se trata de metanol-agua (1%AcH) 80:20, si bien en este caso es cuando las resoluciones son mayores, como observa en la tabla 5.3.3.

Los factores de separación SA-EPA tienen valores muy próximos a la unidad con metanol-agua (1%AcH) 90:10, lo que indica una separación total difícil, valores en torno a 1,2 con metanol-agua (1%AcH) 85:15, lo que indica una separación de dificultad moderada y valores alrededor de 1,4 con metanol-agua (1%AcH) 80:20, lo cual pone de manifiesto que la separación total del SA y del EPA con esta fase móvil es bastante factible. Los valores de α correspondientes a la separación EPA-DHA son en general mayores que los correspondientes a SA-EPA y van desde valores en torno a 1,2 con metanol-agua (1%AcH) 90:10 a 1,5 con metanol-agua (1%AcH) 80:20, lo que indica que la separación de estos dos PUFAs es bastante factible con estas fases móviles.

En la tabla 5.3.3 también puede observarse que si bien los factores de separación del EPA-DHA son prácticamente siempre mayores que los correspondientes al SA-EPA, con los valores de la resolución ocurre lo contrario. Este hecho es debido, evidentemente, a que la eficacia de la columna con respecto al DHA es siempre bastante inferior que la correspondiente al SA, lo cual se observa claramente en la tabla 5.3.5. En esta tabla también se observa que el número de pisos teóricos varía con cierta aleatoriedad con la composición de la fase móvil; en todo caso parecen aumentar con respecto al SA y disminuir con respecto al DHA a medida que se incrementa el porcentaje de metanol, mientras que el número de pisos teóricos para el EPA parece ser

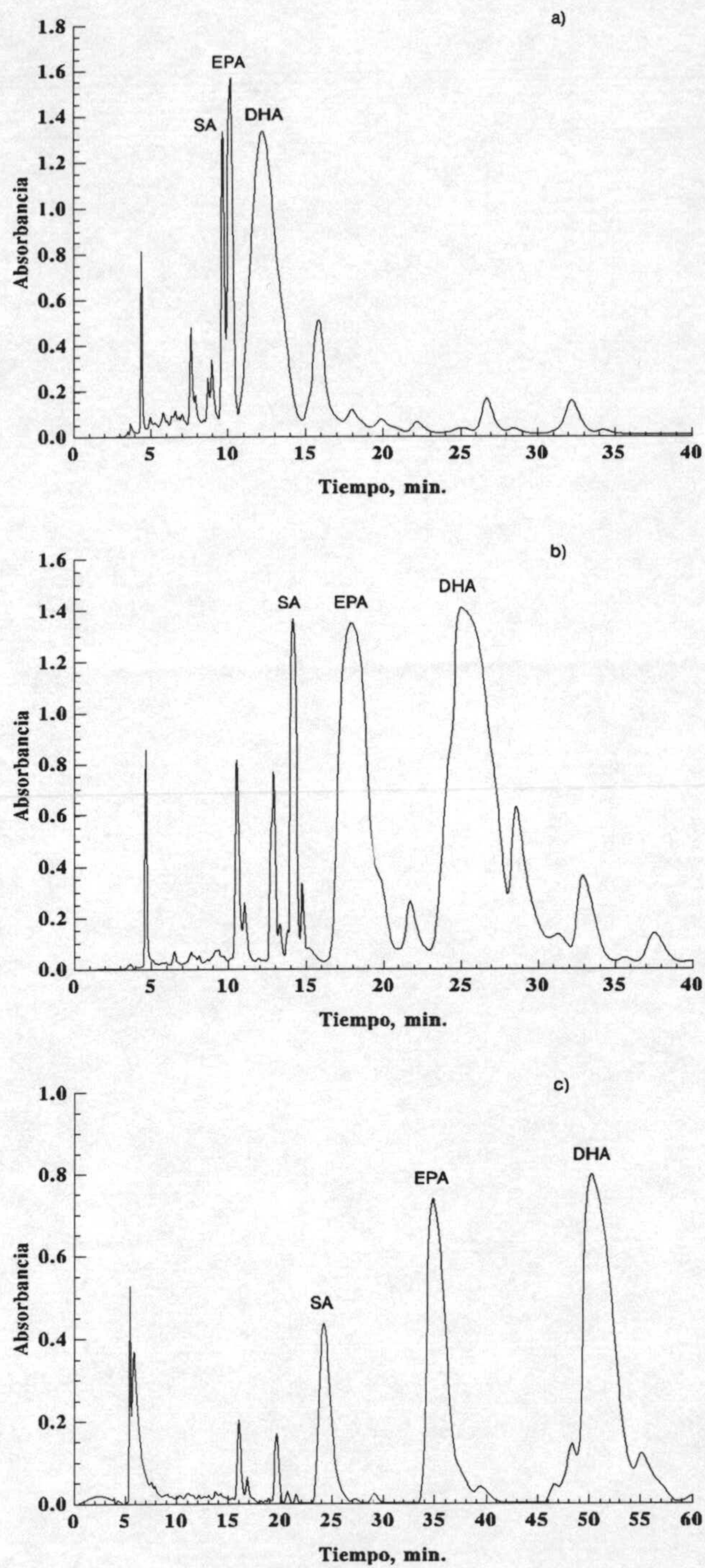


Fig.5.3.5.-Influencia de la composición de la fase móvil (MeOH-H₂O (1% AcH)): a) 90:10 p/p, b) 85:15 p/p, c) 80:20 p/p. Columna analítica. Caudal : 0,75 ml/min. Muestra cargada: 1,114 mg de PUFAs de AHB

Tabla 5.3.5.-Influencia de la composición de la fase móvil sobre el número de pisos teóricos N (ecuación [2.23]) sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de materia K_{1a} (ecuación [2.34]) y sobre la constante de equilibrio k (ecuación [2.21]).

Fase móvil : MeOH/H ₂ O(1%ACh). Caudal: 0,75 ml/min. Carga del concentrado:0,743 mg									
Composición	N			K_{1a}			K		
	SA	EPA	DHA	SA	EPA	DHA	SA	EPA	DHA
80:20	2101	2520	1500	6,32	7,54	4,51	4,28	6,13	8,84
85:15	4927	370	366	14,83	1,12	1,10	2,51	3,15	4,89
90:10	10005	4443	206	30,10	13,37	0,62	1,75	1,84	2,16

independiente de la composición de la fase móvil, lo cual significaría de nuevo que sería interesante iniciar la separación con metanol-agua 90:10 (número de pisos alto para el SA) y finalizarla con metanol-agua 80:20 (número de pisos alto para el DHA), tal y como se ha indicado también al estudiar la influencia de la cantidad de muestra.

En la tabla 5.3.5 también se incluyen los coeficientes volumétricos de transferencia de materia, k_{1a} (apartado 2.4.6 e), y las constantes de equilibrio, K (apartado 2.4.6 d), calculadas con las ecuaciones [2.34] y [2.21], respectivamente. Lógicamente para un caudal de fase móvil determinado k_{1a} es directamente proporcional a N, por lo que las conclusiones que pueden obtenerse son las mismas que las ya comentadas para el número de pisos teóricos. Además el cálculo de k_{1a} está basado en numerosas hipótesis (apartado 2.4.6.e), algunas de las cuales ya se ha comprobado que no se cumplen. Estas hipótesis son: isoterma de distribución lineal, cinética de todo el proceso controlada por la transferencia de materia en el seno de la disolución, dispersión axial despreciable y número de unidades de transferencia igual al número de pisos teóricos. Por todo esto no se han utilizado los valores de k_{1a} para la discusión de los resultados obtenidos.

Los valores de la constante de equilibrio, K (relación entre las concentraciones de soluto en la fase estacionaria y la fase móvil, apartado 2.4.6 b), que se muestran en la tabla 5.3.5 se han calculado mediante la ecuación [2.21] estimando previamente la porosidad del relleno, ϵ , asumiendo que los poros del relleno (cuyo diámetro es

conocido, 80 Å) son canales cilíndricos cuya área lateral es igual a las superficie de las partículas del relleno. Si se comparan los valores de K con los valores del factor de capacidad, K' (relación entre cantidades de soluto en la fase estacionaria y en la fase móvil), que se muestran en la tabla 5.3.3 se observará que ambos son muy semejantes y varían de una manera totalmente idéntica con la composición de la fase móvil, por lo que la constante de equilibrio podría utilizarse en lugar de K' para predecir la influencia de los factores termodinámicos en la separación de los PUFAs. Sin embargo, dada la mayor simplicidad de cálculo de K' se ha preferido utilizar este parámetro.

En la figura 5.3.5 se pone claramente de manifiesto la mejora de la resolución al disminuir el porcentaje de metanol en la fase móvil, si bien también aumenta notablemente el tiempo de separación.

- Elución en gradiente

En el estudio realizado de la influencia de la cantidad de muestra y de la composición de la fase móvil sobre los parámetros cromatográficos se ha visto que sería interesante estudiar la separación de los PUFAs disminuyendo progresivamente el poder eluyente de la fase móvil.

Por ello se han realizado experimentos en los que la separación se ha iniciado con metanol-agua (1%AcH) 90:10 y tras 5 min de elución se ha comenzado a modificar la composición de la fase móvil mezclando la anterior con metanol-agua (1%AcH) 80:20, haciendo crecer el caudal de esta fase móvil y decrecer el de metanol-agua 90:10 de una forma lineal. Estos experimentos se han realizado manteniendo el caudal total constante (0,5 ml/min) y en primer lugar se ha hecho un estudio con una mezcla de EPA y DHA (patrones) aplicando la mejor separación obtenida a un concentrado de PUFAs.

En la tabla 5.3.6 se muestran los tiempos de elución obtenidos con distintos gradientes y a partir de éstos se han calculado los factores de capacidad, K' , y de separación, α , que se muestran en la tabla 5.3.6 (la resolución no es representativa para la elución en gradiente). En esta tabla se observa que a medida que aumenta la pendiente del gradiente aumenta el valor del factor de separación, α , debido a que el DHA cada vez sale más separado del EPA, lo cual se observa claramente en la figura 5.3.6.

Tabla 5.3.6.- Influencia de la elución en gradiente sobre el factor de capacidad K', el factor de separación α , y el tiempo de separación, tsep (tabla 4.3.6, apartado 3.3.2).

Composición fases móviles: A: MeOH/H ₂ O(1%AcH)90:10 y B: MeOH/H ₂ O(1%AcH)80:20.				
Caudal : " " : 0,5 ml/min				
a) Muestra:mezcla de patrones EPA y DHA de 0,02 mg/ml de cada uno. Carga : 0,02 mg de cada uno				

Δt , min	K'		α	Observaciones
	EPA	DHA	EPA-DHA	
	3,41	4,36	1,28	E.isocrática, 100% A
120	3,27	4,23	1,29	
60	2,98	3,84	1,29	
25	2,72	3,96	1,46	
20	2,68	4,07	1,52	
15	2,58	4,56	1,77	

b) Muestra:concentrado de a.grasos de A.H.B. Carga: 0,584 mg

Δt ,min	K'		α	t sep,min	Observaciones
	EPA	DHA	EPA-DHA		
-	1,84	2,65	1,44	20	E.isocrática, 100% A
25	1,98	3,24	1,64	30	
-	6,32	9,68	1,53	100	E isocrática, 100% B

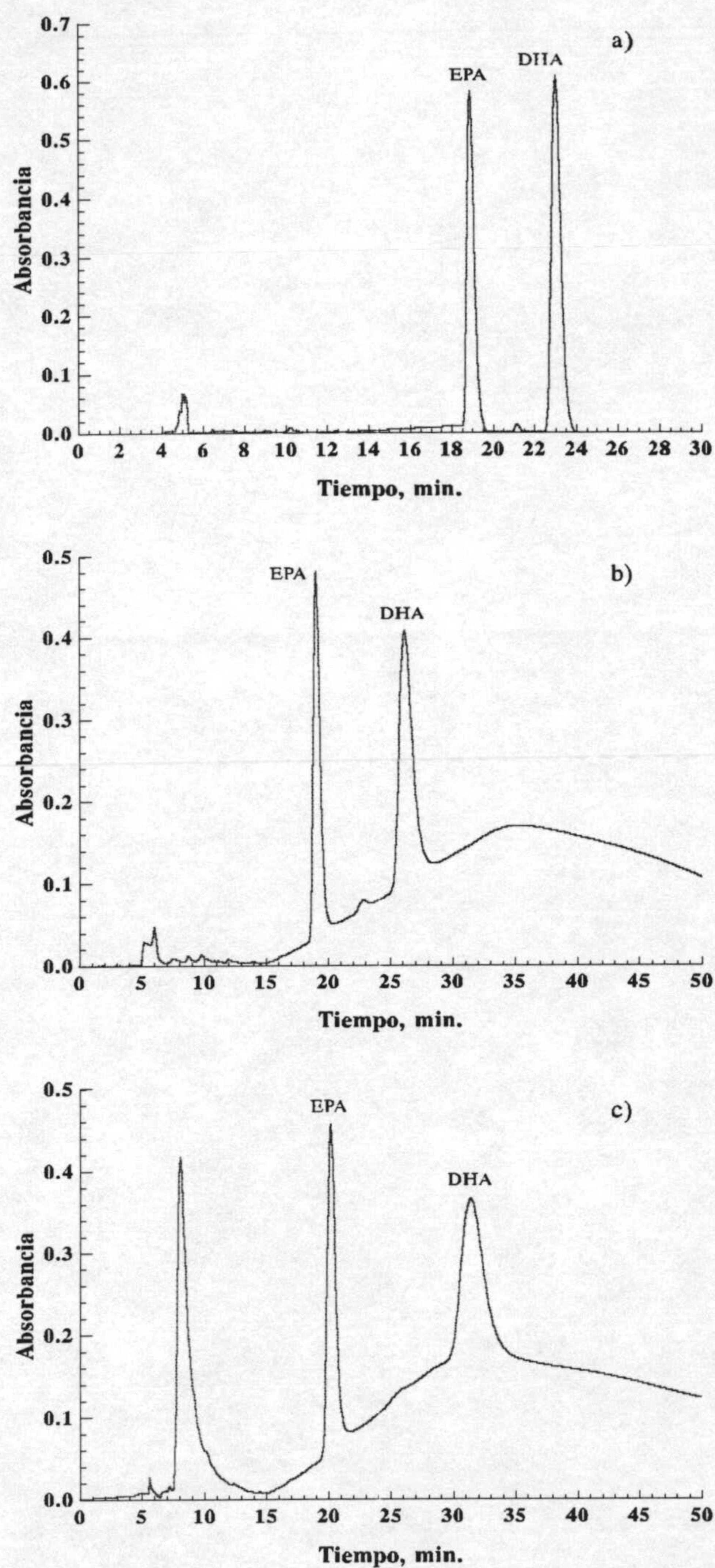


Fig 5.3.6.- Influencia de la elución en gradiente: a) elución isocrática: MeOH-H₂O (1%AcH) 90:10 p/p; b)elución en gradiente : $\Delta t=20$ min; c) elución en gradiente : $\Delta t=15$ min. Columna analítica. Muestra cargada: 0,04 mg de una mezcla de EPA y DHA (patrones de Sigma). Caudal: 0,5 ml/min. Δt =tiempo para pasar del 100% de MeOH-H₂O (1% AcH) 90:10 p/p a 100% de MeOH-H₂O (1% AcH) 80:20 p/p

También en la tabla 5.3.6 se comparan los valores de K' , α y los tiempos necesarios para las separaciones de los cromatogramas que se muestran en la figura 5.3.7. Se observa que mediante la elución en gradiente se pueden conseguir separaciones de la misma calidad que las realizadas con la fase móvil de menor poder eluyente (metanol-agua 80:20), ya que el factor de separación de la elución en gradiente de la muestra de PUFAs (1,64, tabla 5.3.6) es incluso mayor que el correspondiente a la elución isocrática con metanol-agua 80:20 (1,53); además el tiempo de separación de la elución en gradiente (30 min) es ligeramente superior al necesario para realizar la separación con la fase móvil de mayor poder eluyente (metanol-agua 90:10) (20 min) y mucho más pequeño que el tiempo necesario para realizar la separación con metanol:agua 80:20.

De cualquier manera, el estudio de elución en gradiente realizado ha sido muy escaso, por ejemplo no se ha estudiado la influencia de la cantidad de muestra, y por ello no se han escalado a nivel semipreparativo ninguno de los cromatogramas realizados en estas condiciones. Este trabajo se realizará en un plazo muy breve dadas las buenas perspectivas en cuanto a sus resultados.

- Separaciones a escala semipreparativa

Teniendo en cuenta los resultados comentados a nivel analítico se han escalado a nivel semipreparativo las separaciones llevadas a cabo en modo isocrático con las tres fases móviles para las cuales la cantidad de muestra es la más alta posible para una resolución en torno a la unidad y el caudal de fase móvil es el más alto posible teniendo en cuenta la presión máxima a que pueden ser sometidas estas columnas (3000 psi).

El escalamiento se ha realizado multiplicando la cantidad de muestra y el caudal aplicados en la columna analítica por los factores de escalamiento f y m , respectivamente, que se han calculado mediante las ecuaciones [2.39] y [2.40].

En las tablas 4.3.8 a 4.3.10 se recogen los perfiles de las fracciones de los cromatogramas que se muestran en la figura 5.3.8. En estas tablas se dan las purezas de cada fracción en SA, EPA y DHA; los rendimientos en la recuperación de cada uno de los PUFAs de interés se han calculado mediante la ecuación [3.3.2]. Ambos resultados

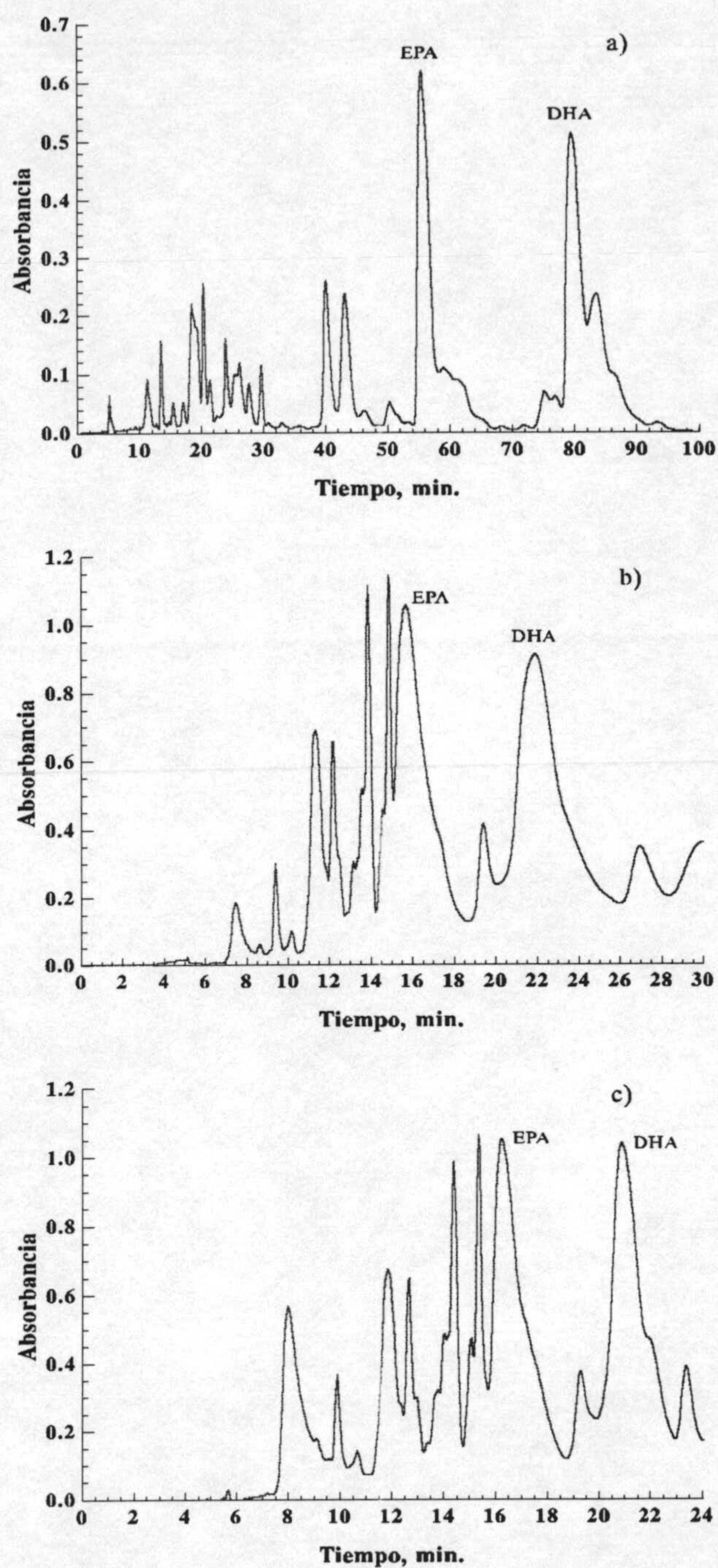


Fig.5.3.7.-Comparación entre la elución isocrática y en gradiente de un concentrado de PUFAs de AHB: a) elución isocrática con MeOH-H₂O (1% AcH) 80:20 p/p; b) elución en gradiente: $\Delta t=20$ min y c) elución isocrática con MeOH-H₂O (1% AcH) 90:10 p/p. Columna analítica. Caudal : 0,5 ml/min Muestra cargada: 0,584 mg.

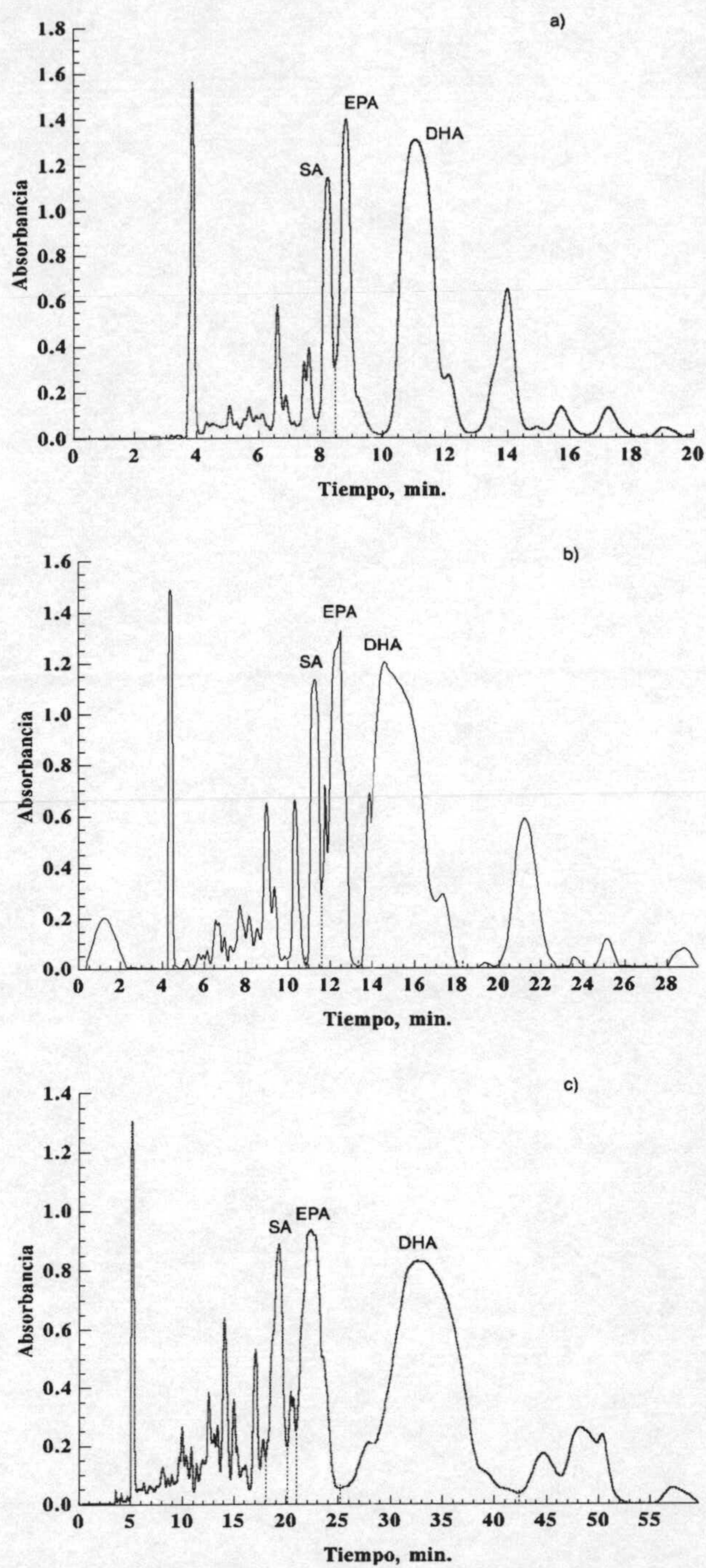


Fig 5.3.8.-Separación de los ácidos grasos SA, EPA y DHA a partir de concentrados de PUFAs de AHB en la columna semipreparativa. Fases móviles MeOH-H₂O (1% AcH) : a) 90:10 p/p; 3,5 ml/min y 1,94 mg; b) 85:15 p/p; 3,5 ml/min y 6,65 mg; c) 80:20 p/p, 3,0 ml/min y 10,53 mg. Las purezas y rendimientos se muestran en la tabla 5.3.7

se muestran en la tabla 5.3.7. En esta misma tabla se muestran las condiciones experimentales de las separaciones analíticas escaladas a nivel semipreparativo, así como las condiciones experimentales de estas separaciones en la columna semipreparativa.

En la figura 5.3.8 se muestran estos cromatogramas y se indican los cortes correspondientes a cada una de las fracciones, los cuales se han realizado manteniendo el criterio de obtener rendimientos próximos al 100%, mientras que las purezas se pretenden obtener lo más altas posible manteniendo las resoluciones en valores próximos a la unidad. Sin embargo no siempre las resoluciones calculadas ($R_{EPA-DHA}$ y R_{SA-EPA}) indican la bondad de la separación ya que a veces aparecen sustancias intercaladas que impurifican las fracciones, como se observa en la figura 5.3.8. Este hecho, junto con la baja resolución que se obtiene en algún caso (tabla 5.3.7) y la posible existencia en las fracciones de otros ácidos grasos que no se detectan a la longitud de onda utilizada, hacen descender la pureza de las fracciones. También parecen anormalmente bajos, en algunos casos, los valores de los rendimientos obtenidos; este hecho tiene difícil explicación y tan sólo puede deberse a consideraciones de tipo experimental (muestra que queda en el volumen muerto del inyector, muestra que queda retenida en la columna y eluye posteriormente y, fundamentalmente, extracción no cuantitativa de los PUFAs de las fracciones para su análisis por CG).

Observando los resultados que se muestran en la tabla 5.3.7 parece claro que los mejores resultados se han obtenido con metanol-agua(1%AcH) 80:20 p/p, ya que cargando la mayor cantidad de muestra se consiguen las purezas y rendimientos más altos. Puede destacarse la fracción que contiene el 99,3% del EPA cargado con el concentrado de PUFAs con una pureza del 94,4%. Las purezas obtenidas están en el orden de las mayores obtenidas en los trabajos que se muestran en la tabla 2.10. Sin embargo, la comparación en este sentido es incompleta ya que tan sólo Tokiwa y Kanazawa (1981) dan valores de rendimientos en ácidos grasos, los cuales son muy inferiores a los obtenidos en este trabajo. Es de preveer que los rendimientos obtenidos por el resto de los autores sean incluso inferiores a la vista de los cromatogramas que muestran en sus trabajos. Un valor bajo del rendimiento puede no ser importante si el concentrado de partida es abundante y barato, como quizás ocurra con los concentrados de PUFAs obtenidos a partir de aceites de pescado, pero puede no ser así si los concentrados se obtienen a partir de fracciones lipídicas relativamente más costosas de obtener.

Tabla 5.3.7.-Escalamiento del aislamiento de PUFAs por HPLC: Resoluciones obtenidas a escala analítica en los cromatogramas escalados a nivel semipreparativo; rendimientos y purezas para los ácidos SA, EPA y DHA de las fracciones separadas en las columnas semipreparativas. Muestras de PUFAs de aceite de hígado de bacalao. Se incluyen las condiciones cromatográficas utilizadas en ambas columnas.

Columna Analítica					Columna Semipreparativa							
fase móvil		Cantidad, mg	Resolución		Caudal ml/min	Carga, mg	SA		EPA		DHA	
Composición	Caudal ml/min		SA-EPA	EPA- DHA			Pureza	Rend.	Pureza	Rend.	Pureza	Rend.
MeOH-H ₂ O 90:10	0,75	0,416	1,17	1,42	3,5	1,94	93,2	93,3	88,1	89,8	80,5	84,4
MeOH-H ₂ O 85:15	0,75	1,386	0,98	1,01	3,5	6,65	85,5	81,5	93,6	97,6	84,9	95,4
MeOH-H ₂ O 80:20	0,60	2,218	0,94	1,20	3,0	10,53	91,9	98,4	94,4	99,3	84,6	96,6
EtOH-H ₂ O 80:20	0,30	0,138	1,12	1,06	1,5	0,693	87,3	87,7	87,4	88,6	72,2	81,7
EtOH-H ₂ O 75:25	0,30	0,277	2,73	1,66	1,5	1,386	84,5	78,2	90,3	79,7	79,6	70,5
EtOH-H ₂ O 70:30	0,40	0,564	2,18	0,69	2,0	2,771	69,7	76,4	91,3	85,1	79,5	100

Los rendimientos y purezas de los ácidos grasos se pueden obtener de una manera teórica a partir de los datos que suministran los cromatogramas utilizando las ecuaciones [2.8] y [2.9]. Estos cálculos se han realizado para los cromatogramas que se muestran en la figura 5.3.8 a partir de los cuales se han separado las fracciones cuyas purezas y rendimientos determinados experimentalmente se muestran en la tabla 5.3.7; los rendimientos y purezas teóricos obtenidos se muestran en la tabla 5.3.8. Si se comparan los resultados experimentales y los teóricos se puede apreciar que ambos son del mismo orden de magnitud pero no hay una coincidencia que permita utilizar los datos teóricos como resultados fiables. Esta falta de coincidencia puede ser debida a varios factores, todos relativos a las hipótesis en que se basa la obtención de las ecuaciones [2.8] y [2.9] y a la complejidad de la muestra de PUFAs que se separa; es decir, el cálculo de las purezas y rendimientos (apartado 2.4.6c) se basa en suponer que cada pico corresponde a una sustancia pura y que estos picos tienen un perfil gaussiano; además para que la coincidencia fuera mayor todas las ácidos grasos presentes en la muestra deben de ser detectados y figurar en el cromatograma y, a la inversa, en el cálculo de la pureza mediante la ecuación [2.9] pueden considerarse picos que no correspondan a ácidos grasos determinados por CG. Es decir, el cálculo de las purezas y rendimientos mediante estas ecuaciones puede ser válido para muestras mucho más simples que las empleadas en este trabajo.

Tabla 5.3.8.- Purezas y rendimientos calculados a partir de los cromatogramas mediante las ecuaciones 2.9 y 2.8 respectivamente.

Fase móvil		Carga (mg)	SA		EPA		DHA	
Composición	Caudal		Pureza	Rend.	Pureza	Rend.	Pureza	Rend.
MeOH/H ₂ O 90:10	3,5	1,940	97,2	93,4	82,1	97,8	82,0	99,5
MeOH/H ₂ O 85:15	3,5	6,650	98,0	94,9	91,6	100,0	62,1	93,3
MeOH/H ₂ O 80:20	3,0	10,530	93,9	86,4	88,9	95,7	97,5	94,7

5.3.1.2.- Fase móvil etanol-agua (1%AcH)

- Estudio a escala analítica

En la tabla 4.3.11 se muestran las condiciones experimentales en que se han hecho las separaciones con etanol y los tiempos de elución de los tres PUFAs de interés.

En la tabla 5.3.9 se muestra la influencia del caudal de fase móvil sobre los valores de K' , α y R observándose que, al igual que ocurría con metanol-agua, esta variable parece no influir sobre ninguno de los tres parámetros; por tanto parece que las separaciones deben hacerse al caudal más elevado posible para realizar las separaciones en el menor tiempo posible.

En la tabla 5.3.10 se muestra la influencia de la cantidad de muestra cargada y de la composición de la fase móvil sobre K' , α y R para las fases móviles etanol-agua utilizadas. En general se observa que K' tiene un valor elevado para las cantidades más pequeñas y que para cantidades mayores K' disminuye hasta hacerse casi constante; estos resultados son idénticos a los obtenidos con metanol-agua (tabla 5.3.3). Los valores de α , si bien parecen no permanecer constantes como con metanol-agua, tampoco presentan una variación homogénea. En cuanto a la resolución puede observarse que en general (excepto para la resolución SA-EPA con etanol-agua 70:30) disminuye a medida que aumenta la cantidad de muestra cargada.

La influencia de la composición de la fase móvil es también idéntica a lo ya comentado con metanol-agua, es decir, a medida que aumenta el poder eluyente (aumento del porcentaje de etanol) disminuye apreciablemente el factor de capacidad y la resolución (tabla 5.3.10), siendo, por tanto, posible separar menor cantidad de muestra con una resolución aceptable. Estos hechos se pueden también apreciar observando los cromatogramas de la figura 5.3.9, en la que, a título de ejemplo, se muestran tres cromatogramas obtenidos con las tres fases móviles etanol-agua (1%AcH) utilizadas.

Si se comparan los caudales de fase móvil utilizados con metanol-agua y con etanol-agua y las cantidades de muestra cargadas con unas y otras fases móviles (tablas 4.3.3 a 4.3.5 y tabla 4.3.11 ó tablas 5.3.1, 5.3.3, 5.3.9 y 5.3.10), inmediatamente se observa que los caudales de fase móvil que ha sido posible utilizar con etanol-agua son

Tabla 5.3.9.- Influencia del caudal de la fase móvil sobre el factor de capacidad K', el factor de separación α , y la resolución R. Columna analítica.

a) Fase móvil : EtOH/H₂O(1%AcH) 70:30.

Muestra : concentrado de A.H.B. Carga: 0,376 mg

Caudal(ml/min)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA- EPA	EPA- DHA	SA- EPA	EPA- DHA
0,15	2,30	2,67	3,56	1,16	1,33	2,63	2,19
0,30	2,25	2,61	3,44	1,16	1,32	2,06	1,57
0,40	2,33	2,70	3,62	1,16	1,34	2,32	1,55

b) Fase móvil: EtOH/H₂O(1%AcH) 75:25.

Muestra : concentrado de A.H.B. Carga: 0,416 mg

Caudal(ml/min)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA- EPA	EPA- DHA	SA- EPA	EPA- DHA
0,20	1,58	1,85	2,07	1,17	1,12	1,99	0,94
0,30	1,67	1,93	2,16	1,16	1,12	1,74	0,97
0,40	1,57	1,81	2,03	1,15	1,12	1,82	1,02

Tabla 5.3.10.- Influencia de la cantidad de muestra cargada el factor de capacidad K', el factor de separación α , y la resolución R

a) Fase móvil: EtOH/H₂O(1%AcH) 70:30 p/p.
Caudal : 0,4 ml/min.

Carga(mg)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA-EPA	EPA-DHA	SA-EPA	EPA-DHA
0,376	2,33	2,70	3,62	1,16	1,34	2,32	1,55
0,416	2,12	2,46	3,19	1,16	1,30	1,73	1,54
0,554	2,15	2,51	2,95	1,17	1,17	1,85	0,86
0,564	2,14	2,62	3,03	1,22	1,16	2,18	0,69

b) Fase móvil : EtOH/H₂O(1%AcH) 75:25 p/p.
Caudal : 0,3 ml/min

Carga(mg)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA-EPA	EPA-DHA	SA-EPA	EPA-DHA
0,277	1,60	1,87	2,09	1,17	1,12	2,73	1,66
0,416	1,67	1,93	2,16	1,16	1,12	1,74	0,97

c) Fase móvil : EtOH/H₂O(1%AcH) 80:20 p/p.
Caudal : 0,3 ml/min

Carga(mg)	K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA-EPA	EPA-DHA	SA-EPA	EPA-DHA
0,138	1,12	1,30	1,50	1,16	1,15	1,12	1,06
0,277	0,97	1,10	1,22	1,13	1,11	0,94	0,59
0,416	1,10	1,24	1,38	1,13	1,11	0,87	0,63

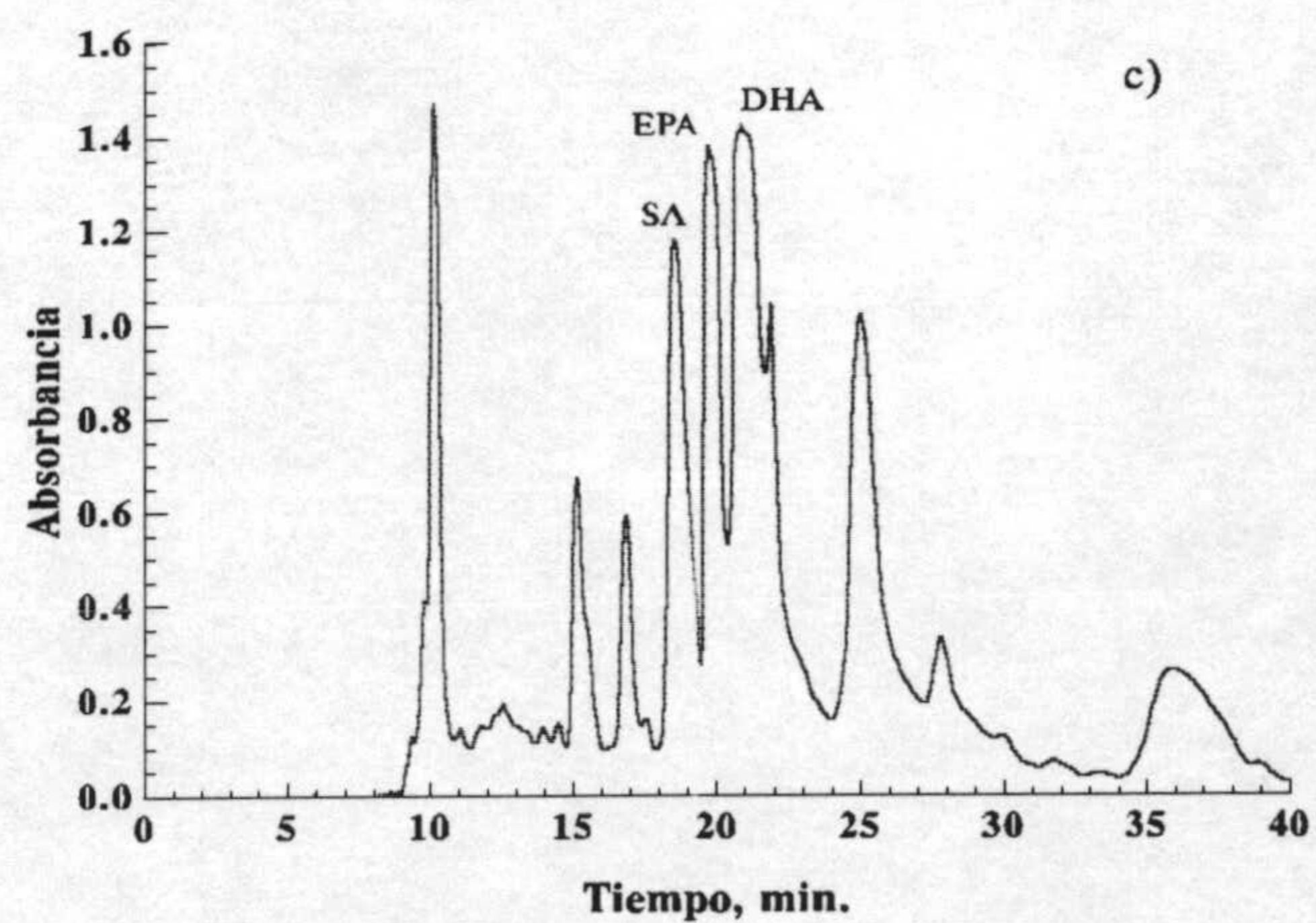
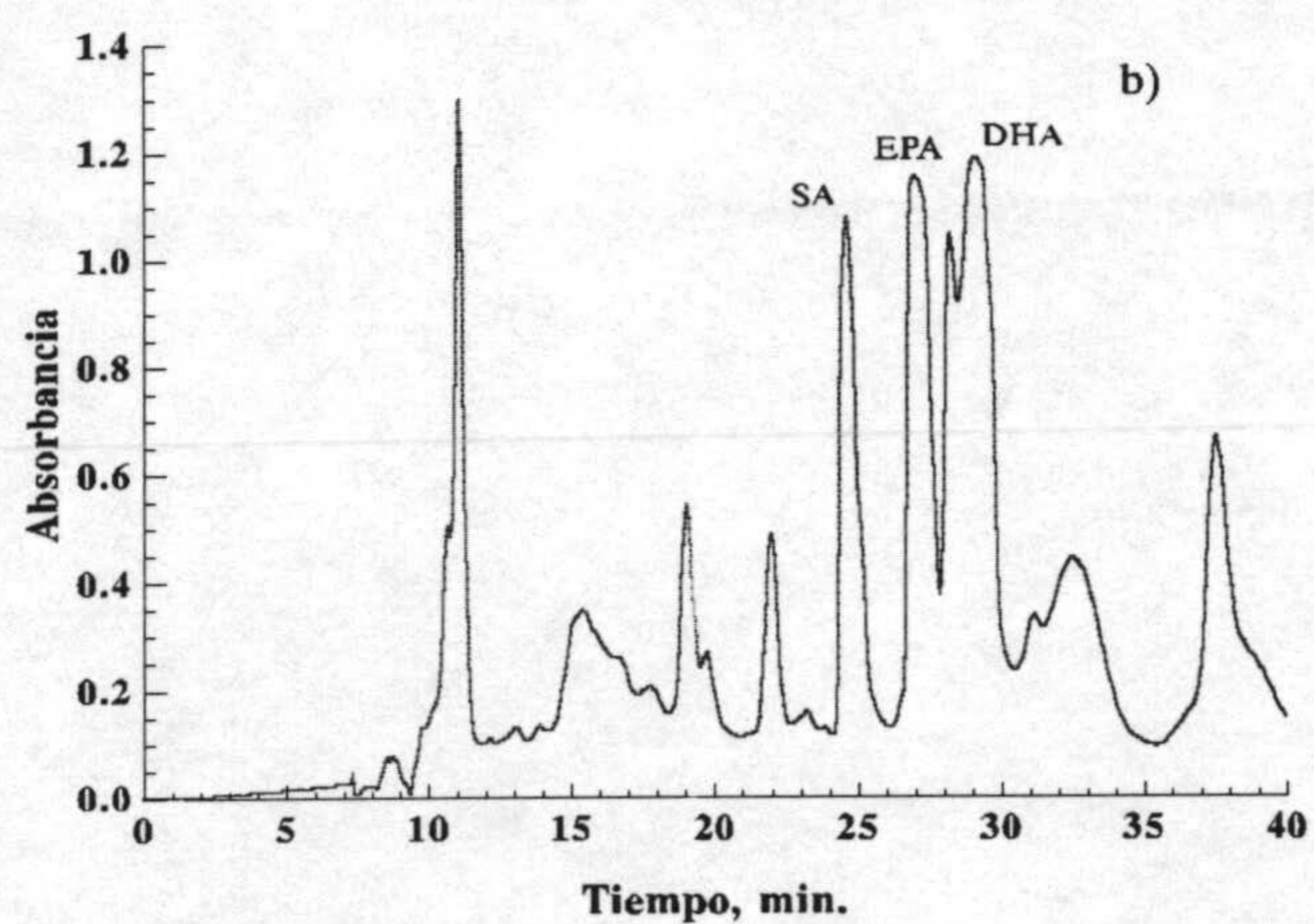
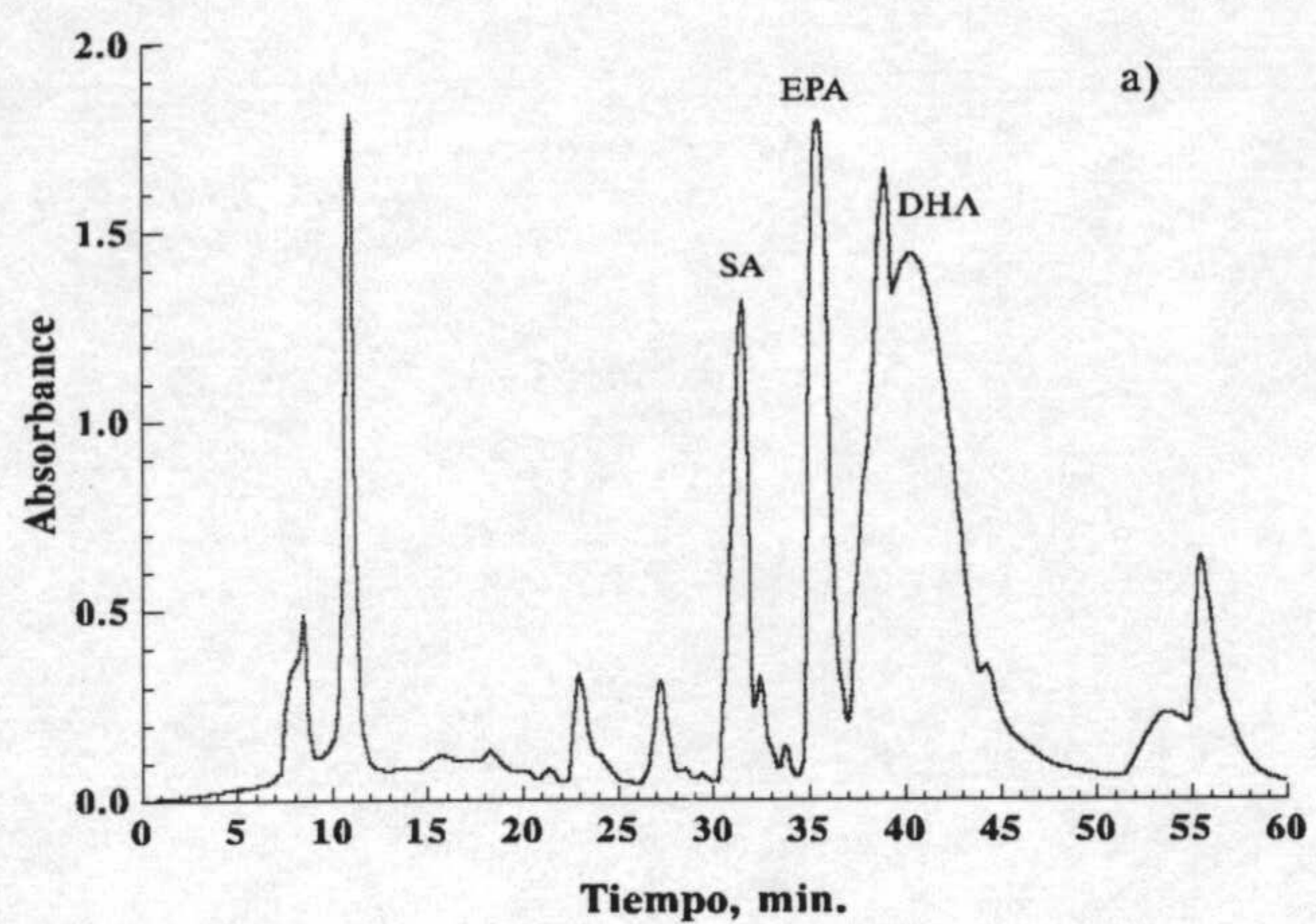


Fig 5.3.9.-Influencia de la composición de la fase móvil (EtOH-H₂O (1%AcH)): a) 70:30 p/p, b) 75:20 p/p, c) 80:20 p/p. Columna analítica. Caudal : 0,30 ml/min. Muestra cargada : 0,554 mg de PUFAs de AHB.

muy inferiores a los utilizados con metanol-agua, lo cual es debido a que el etanol es mucho más viscoso que el metanol (las viscosidades del metanol y del etanol a 25°C son, respectivamente, 0,64 y 1,2 c.p.) y por ello para conseguir caudales de etanol-agua semejantes a los conseguidos con metanol-agua se necesitan presiones superiores a las aconsejadas para las columnas utilizadas (3000 psi). También las cantidades de muestra que es posible cargar con éstas fases móviles son muy inferiores a las que se pueden cargar con metanol-agua.

Una comparación más clara de los dos tipos de fases móviles utilizadas se muestra en la tabla 5.3.11; en ella se observa que a pesar de ser el flujo de etanol-agua (1%AcH) 80:20 la mitad del de metanol-agua (1%AcH) 80:20, los tiempos de elución son mucho más pequeños para el primero; este hecho significa que las separaciones se llevarían a cabo en menor tiempo con etanol-agua, pero también implica que los factores de capacidad, K' , son mucho más pequeños para el etanol-agua, lo cual significa que el equilibrio de distribución está mucho más desplazado hacia la fase móvil cuando ésta es etanol-agua. Si los factores de capacidad son más pequeños y además más semejantes entre sí con etanol-agua (tabla 5.3.11), los factores de separación son más próximos a la unidad con esta fase móvil y, por tanto, también las resoluciones son bastante más pequeñas. Y todo esto a pesar de que la cantidad cargada con metanol-agua es más de 2,5 veces mayor que la cargada con etanol-agua.

Lógicamente las fases móviles etanol-agua de mayor porcentaje en etanol (semejantes a las ensayadas con metanol) no tienen interés ya que se obtendrían resoluciones aún más pequeñas y además también la viscosidad sería mayor.

Estos hechos ponen de manifiesto que sí, debido a su carácter biocompatible, se desea utilizar etanol-agua como fase móvil es necesario utilizar columnas de mayor porosidad, en las que, al menos, el caudal de fase móvil será más elevado, aunque es de preveer que en estas columnas la resolución será menor, ya que ésta decrece al aumentar el tamaño de partícula de la fase estacionaria.

Tabla 5.3.11.- Influencia del tipo de fase móvil sobre el factor de capacidad K', el factor de separación α , y la resolución R.

a) Composición fase móvil : MeOH/H₂O(1%AcH) 80:20.
 Caudal " " : 0,6 ml/min.
 Cantidad de muestra: 1,108 mg

tm,min	t _R ,min			K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA	EPA	DHA	SA- EPA	EPA- DHA	SA- EPA	EPA- DHA
5,6	24,30	32,60	49,10	3,34	4,82	7,68	1,44	1,61	2,00	2,04

b) Composición fase móvil : MeOH/H₂O(1%AcH) 80:20.
 Caudal " " : 0,3 ml/min.
 Cantidad de muestra: 0.416 mg

Tm,min	t _R ,min			K'			α		R	
	SA	EPA	DHA	SA	EPA	DHA	SA- EPA	EPA- DHA	SA- EPA	EPA- DHA
8,8	18,5	19,7	20,8	1,1	1,24	1,38	1,13	1,11	0,87	0,63

- Separaciones a escala semipreparativa

Teniendo en cuenta que la influencia del caudal de fase móvil y de la cantidad de muestra cargada sobre la resolución es idéntica a la obtenida con metanol se han escalado las separaciones realizadas en la columna analítica que se muestran en la tabla 5.3.7, que corresponden caudales de fase móvil máximos en la columna semipreparativa (teniendo como límite la presión a que es posible someter esta columna) y a cantidades de muestra para las cuales las resoluciones son mayores que la unidad (en algún caso se han escalado cromatogramas cuyas resoluciones son inferiores a la unidad debido al interés en aumentar la cantidad de muestra cargada).

En la tabla 5.3.7 puede observarse que tanto los caudales de fase móvil como las cantidades de muestra que es posible cargar en las columnas son bastante inferiores a las cargadas con metanol-agua por las razones ya apuntadas en el estudio a nivel analítico.

En las tablas 4.3.13 a 4.3.15 se muestran los perfiles de las fracciones de cada una de las separaciones realizadas; en estas tablas figuran las purezas de SA, EPA y DHA y a partir de estos datos se han calculado los rendimientos (ecuación [3.3.2]). Tanto las purezas como los rendimientos obtenidos experimentalmente son también inferiores a los obtenidos con metanol-agua. Si bien no puede establecerse una relación muy rigurosa entre los valores de las resoluciones analíticas y los de las purezas y rendimientos, no parecen fácil de explicar estos resultados, sobre todo a la vista de los cromatogramas (figura 5.3.10) donde no parecen observarse una gran cantidad de impurezas.

5.3.2.- Purificación de SA, EPA Y DHA a partir de concentrados de PUFAs obtenidos de la fracción lipídica de la microalga *I. galbana*

En la tabla 4.3.17 se muestra el perfil del concentrado de PUFAs procedente de la microalga *I. galbana* que se ha cargado en la columna semipreparativa a fin de obtener fracciones ricas en SA, EPA y DHA en las condiciones óptimas encontradas con PUFAs de aceite de hígado de bacalao. Estas condiciones se recogen en la tabla 4.3.16; como se observa estas separaciones se han llevado a cabo utilizando las fases móviles de menor poder de elución (metanol-agua 1%AcH 80:20 y etanol-agua 1%AcH

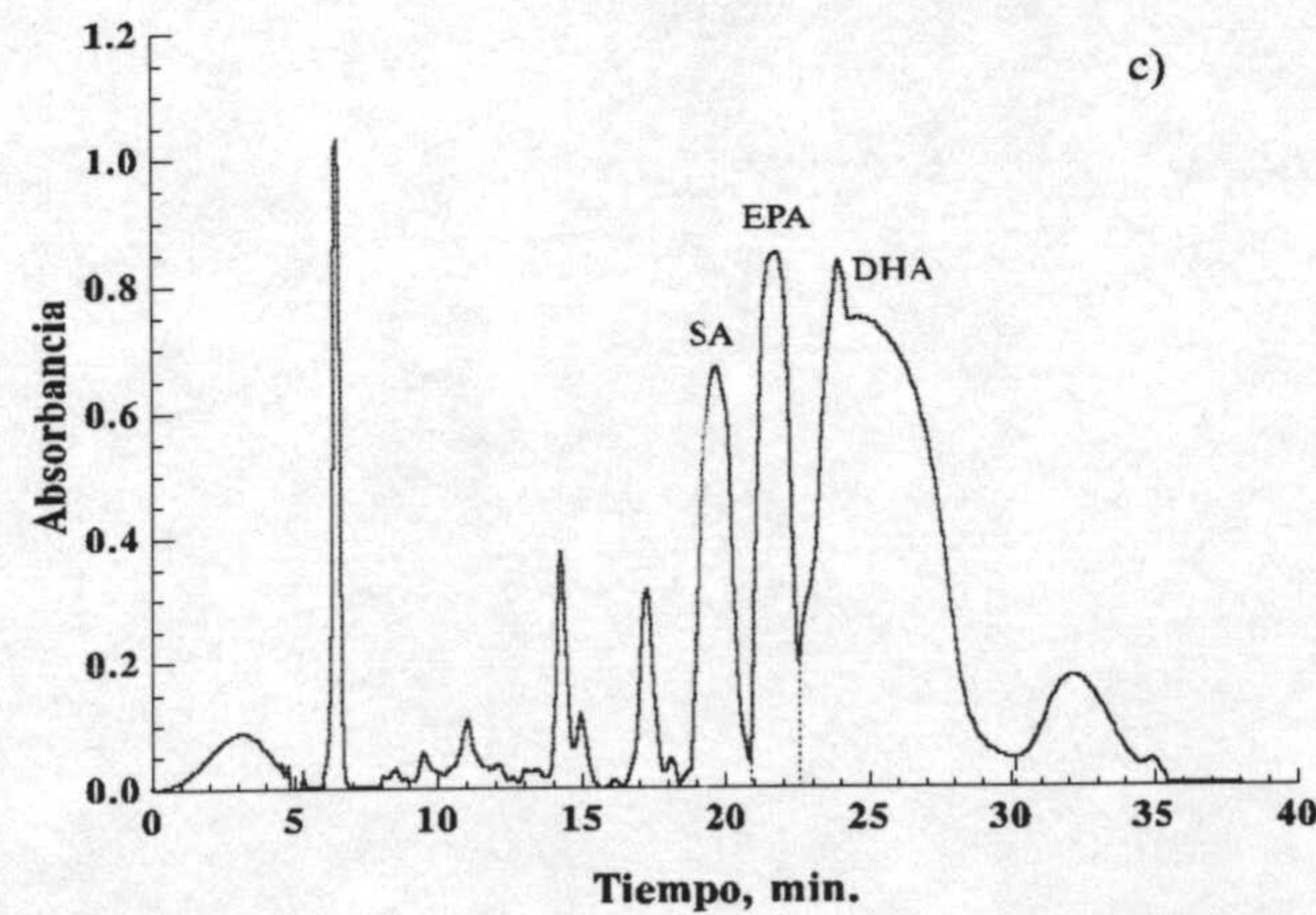
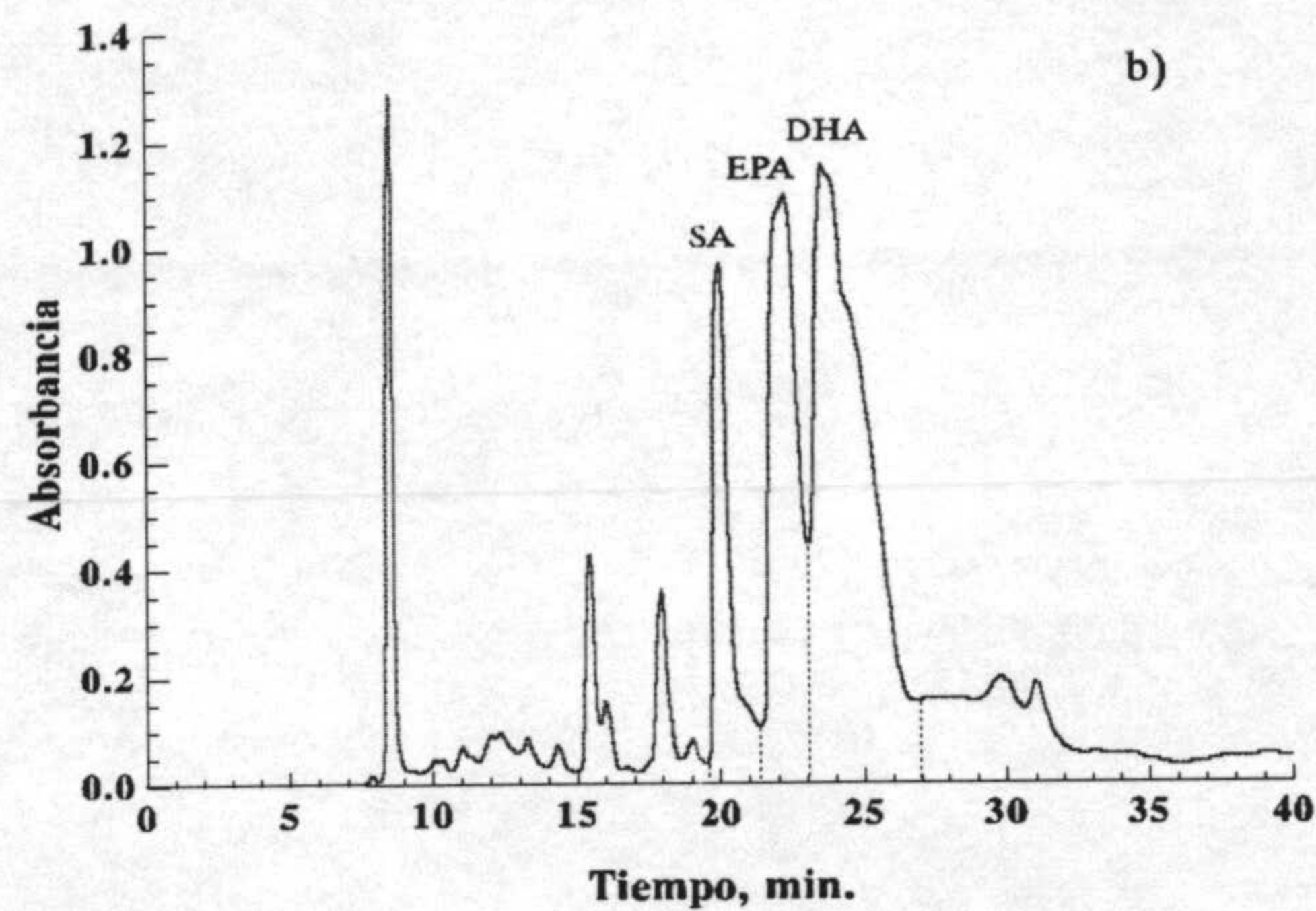
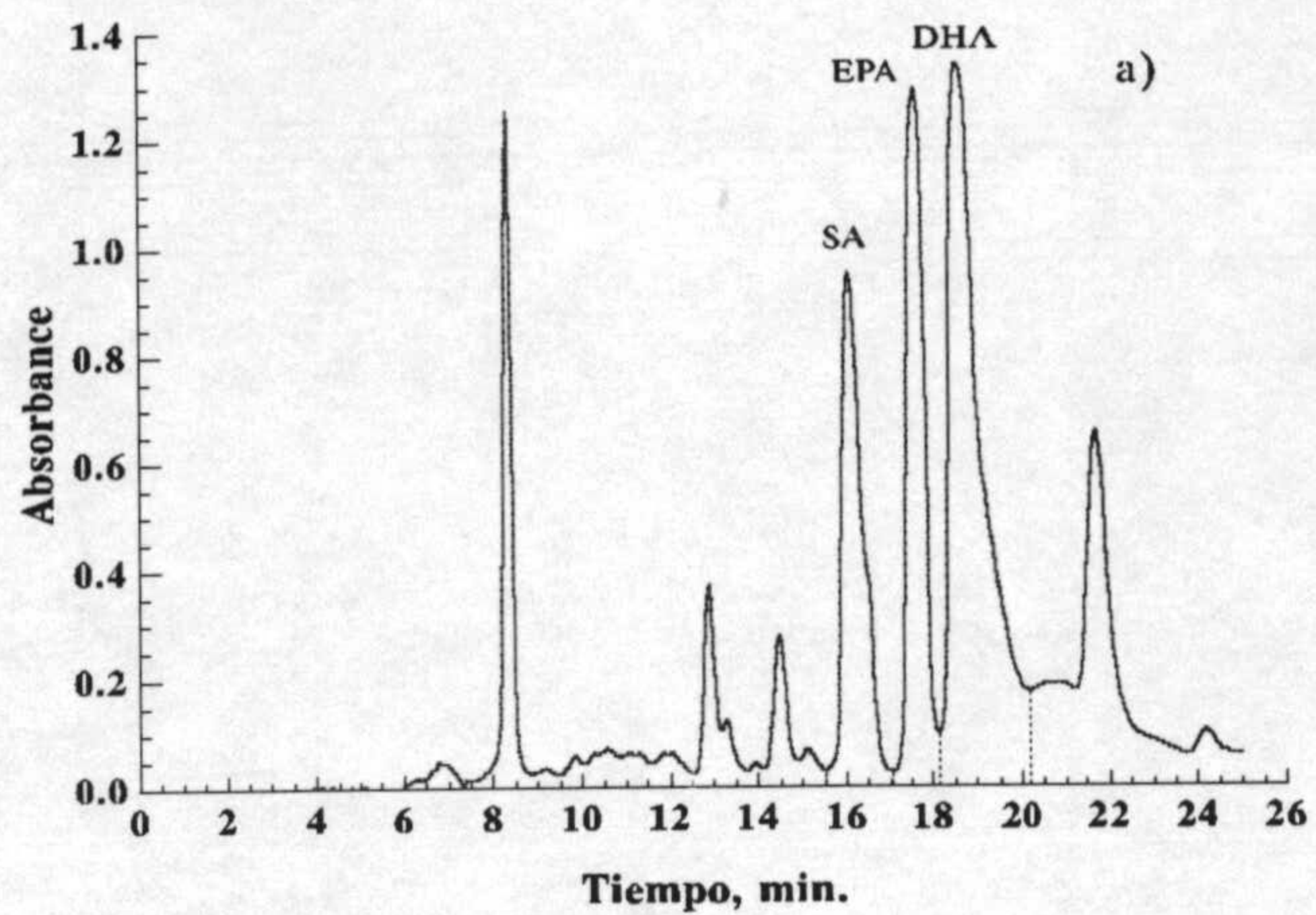


Fig 5.3.10.- Separación de los ácidos grasos SA, EPA y DHA a partir de concentrados de PUFAs de AHB en la columna semipreparativa. Fases móviles MeOH-H₂O (1% AcH) : a)80:20 p/p, 1,5 ml/min y 0,693 mg; b) 75:25 p/p, 1,5 ml/min y 1,586 mg; c)70:30 p/p, 2,0 ml/min y 2,77 mg.

70:30 p/p) a fin de facilitar la separación de cantidades de PUFAs elevadas en fracciones de alta pureza con rendimientos también elevados. Se han cargado cantidades de PUFAs y caudales de fase móvil similares a las que figuran en la tabla 5.3.7 (PUFAs de aceite de hígado de bacalao). La diferencia entre los tiempos de elución de los PUFAs de *I. galbana* y de aceite de hígado de bacalao que se observan en condiciones cromatográficas idénticas (figuras 5.3.9, 5.3.10 y 5.3.11) se deben a que en el primer caso se utilizó una precolumna (4.6 x 45 mm) para proteger la columna semipreparativa.

Las purezas y rendimientos obtenidos se muestran en la tabla 5.3.12 y los cromatogramas en la figura 5.3.11. Estos cromatogramas muestran la presencia de un gran número de sustancias a tiempos de elución pequeños, sin embargo el análisis por CG de estos concentrados no revela la presencia de un mayor número de ácidos grasos que en los concentrados de aceite de hígado de bacalao (tablas 4.3.1 y 4.3.17), por tanto se trata de otras sustancias, sobre todo pigmentos, que absorben fuertemente a la longitud de onda utilizada, Christie (1987). En la figura 3.3.4b se muestra el espectro UV del concentrado cargado y en el se observan bandas de absorción a 408 y 697 nm que corresponden a carotenoides y clorofilas respectivamente. Además en el análisis por CG de las fracciones 1, 2 y 3 del cromatograma 5.3.11c no se identificó ningún ácido graso.

En la tabla 5.3.12 se muestran los excelentes resultados obtenidos con metanol-agua (1% AcH) 80:20, obteniéndose, por ejemplo, EPA del 96% de pureza con un rendimiento prácticamente del 100%. Las purezas y rendimientos obtenidos con etanol-agua (1% AcH) 70:30 p/p no son tan elevados, aunque en general las purezas y rendimientos obtenidos a partir de la microalga son superiores a los obtenidos a partir de aceite de hígado de bacalao (comparar las tablas 5.3.7 y 5.3.12).

En la figura 5.3.12 se muestran los cromatogramas de gases de las fracciones de SA, EPA y DHA obtenidas de las fracciones del cromatograma 5.3.11c y si se comparan con los cromatogramas de gases de los patrones recién suministrados por Sigma (figura 3.3.3), puede observarse que la pureza de los ácidos grasos obtenidos es incluso superior a la de los patrones.

En la figura 5.3.13 se muestran los espectros UV de todas las fracciones obtenidas. Si se comparan estos espectros con los de los patrones recién suministrados

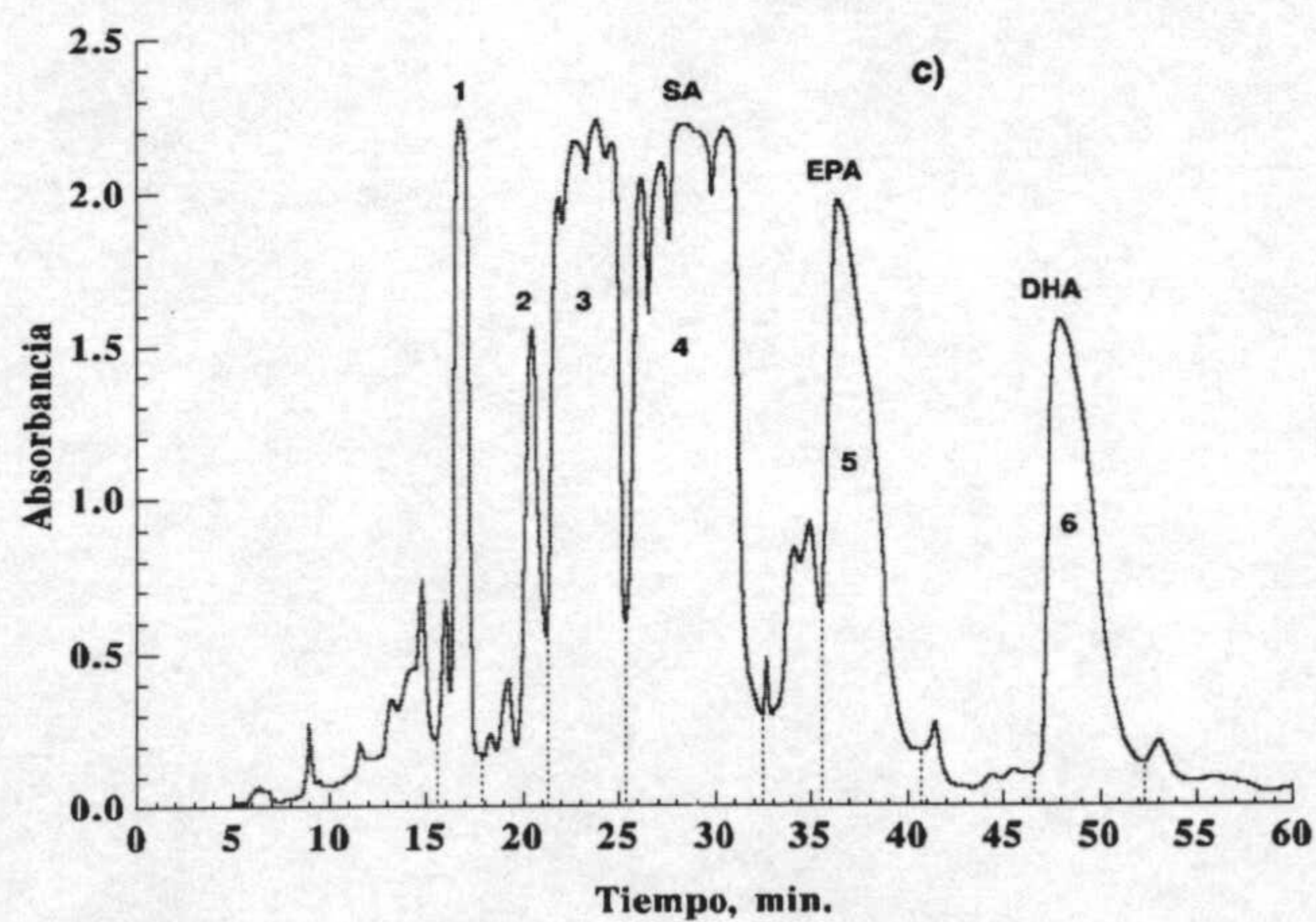
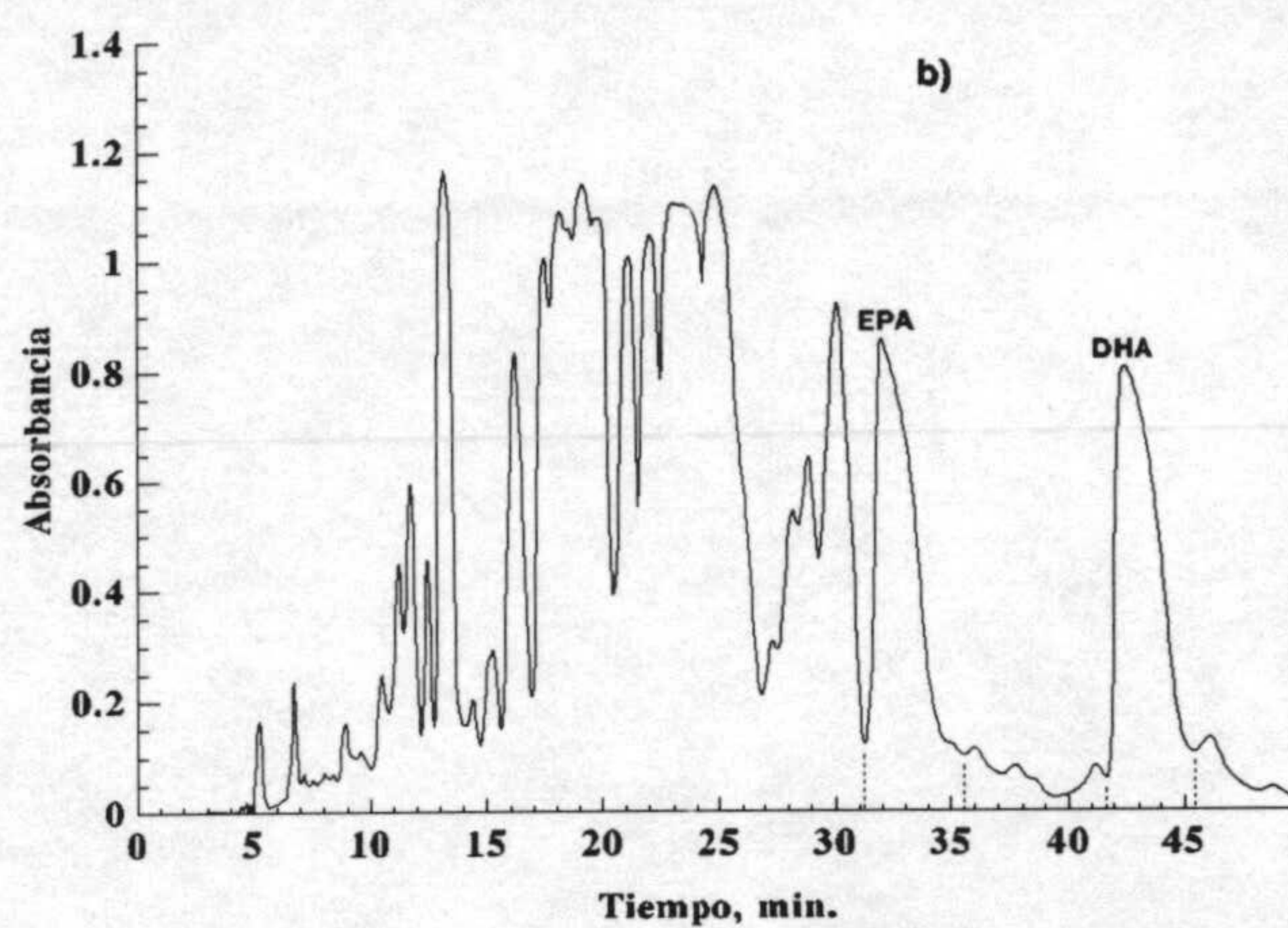
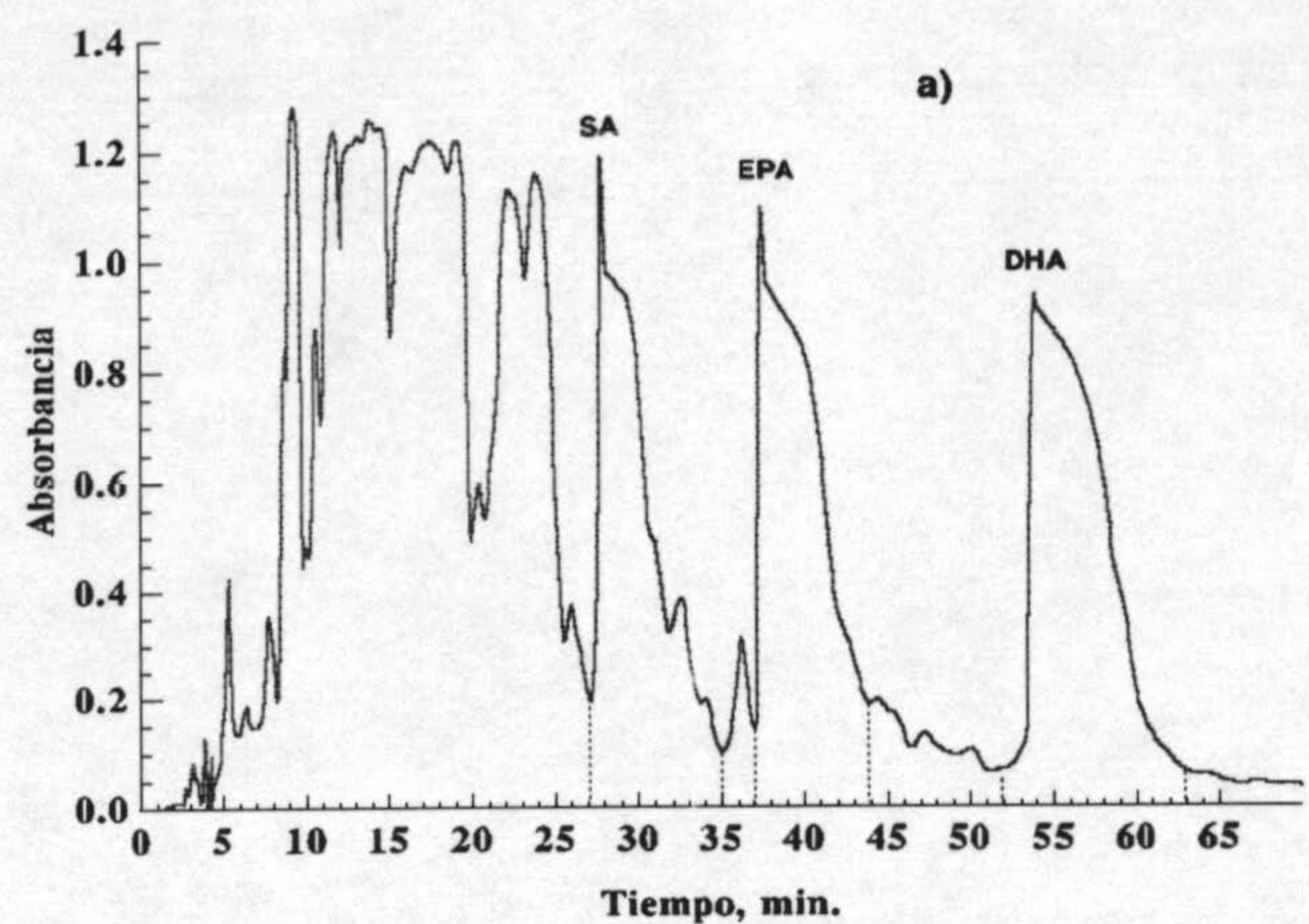


Fig 5.3.11.-Separación de SA, EPA y DHA a partir de un concentrado de PUFAs de *Isochrysis galbana* en columna semipreparativa: a) MeOH-H₂O (1% AcH) 80:20 p/p, 3 ml/min, 9,49 mg; b) EtOH-H₂O (1%AcH) 70:30 p/p, 2,0 ml/min, 2,77 mg; c) EtOH-H₂O (1%AcH) 70:30 p/p, 1,5 ml/min, 2,77 mg; c). Las purezas y rendimientos se muestran en la tabla 5.3.12.

Tabla 5.3.12.- Purezas y rendimientos obtenidos en la separación en distintas condiciones cromatográficas de los ácidos SA, EPA y DHA. Columna semipreparativa. Muestra : concentrados de PUFAs de *Isochrysis galbana*

Fase móvil			SA		EPA		DHA	
Composición	Caudal ml/min	Cantida dmg	Pureza	Rend	Pureza	Rend	Pureza	Rend.
MeOH-H ₂ O; 80:20	3,0	9,49	94,8	100,0	96,0	99,6	94,3	94,0
EtOH-H ₂ O ; 70:30	2,0	2,77	-	-	90,8	80,0	90,7	84,0
EtOH-H ₂ O; 70:30	1,5	2,77	88,7	76,3	92,0	84,0	92,0	87,7

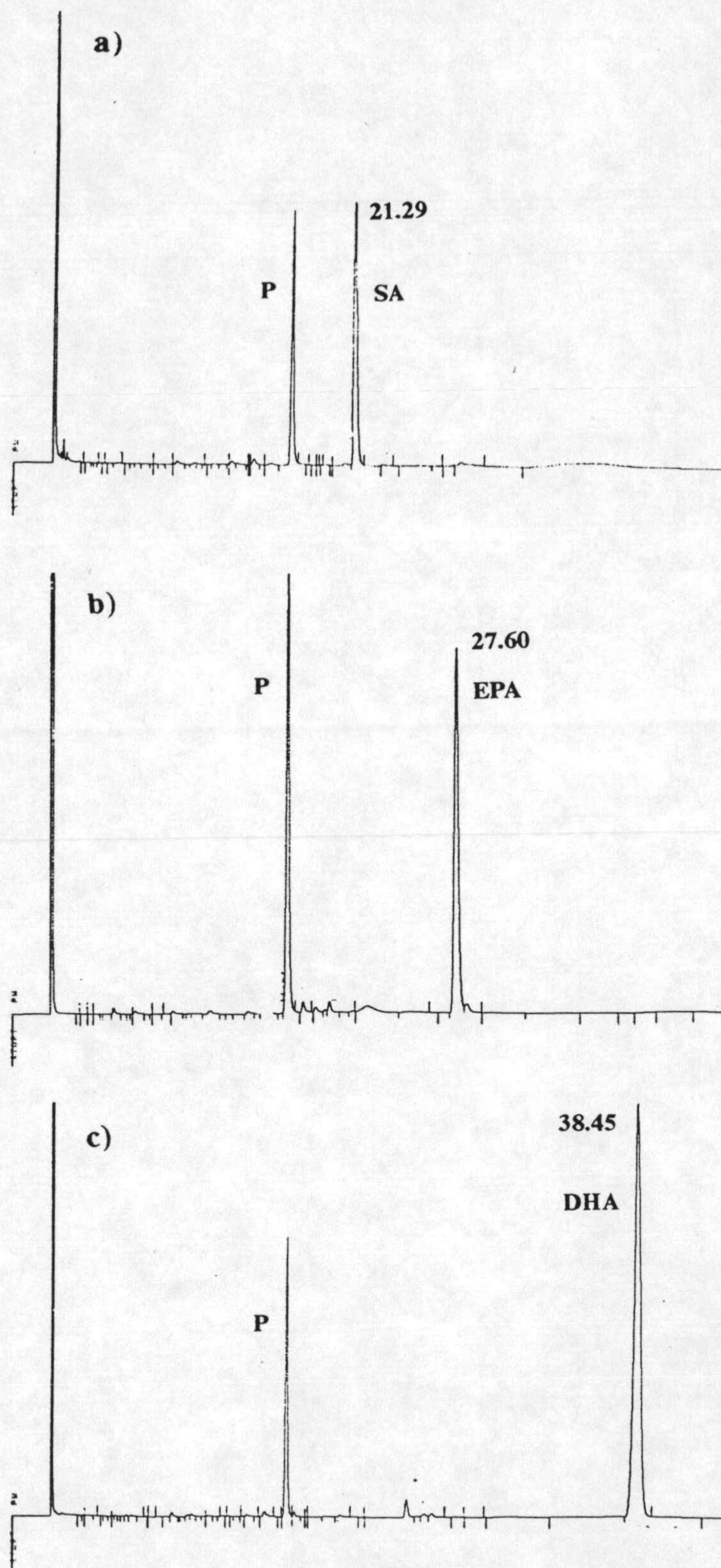


Fig 5.3.12.-Cromatogramas de gases de las fracciones ricas en los ácidos : a) SA, b)EPA y c) DHA; obtenidas con EtOH-H₂O (1%AcH) 70:30 p/p, 1,5 ml/min y 2,77 mg de PUFAs de *Isochrysis galbana* (cromatograma 5.3.11.c). Pueden compararse con los cromatogramas de los patrones (Fig 3.3.2).

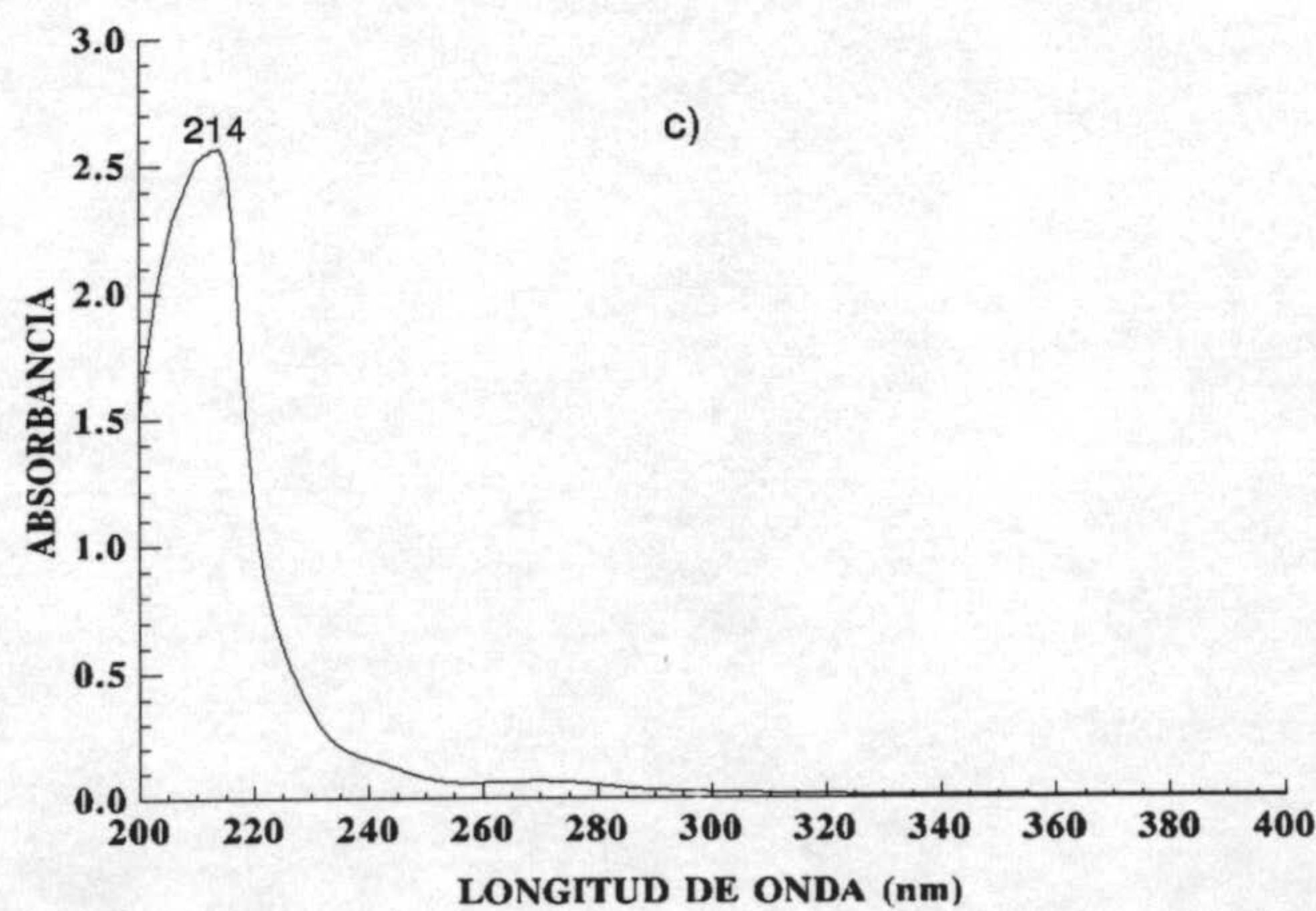
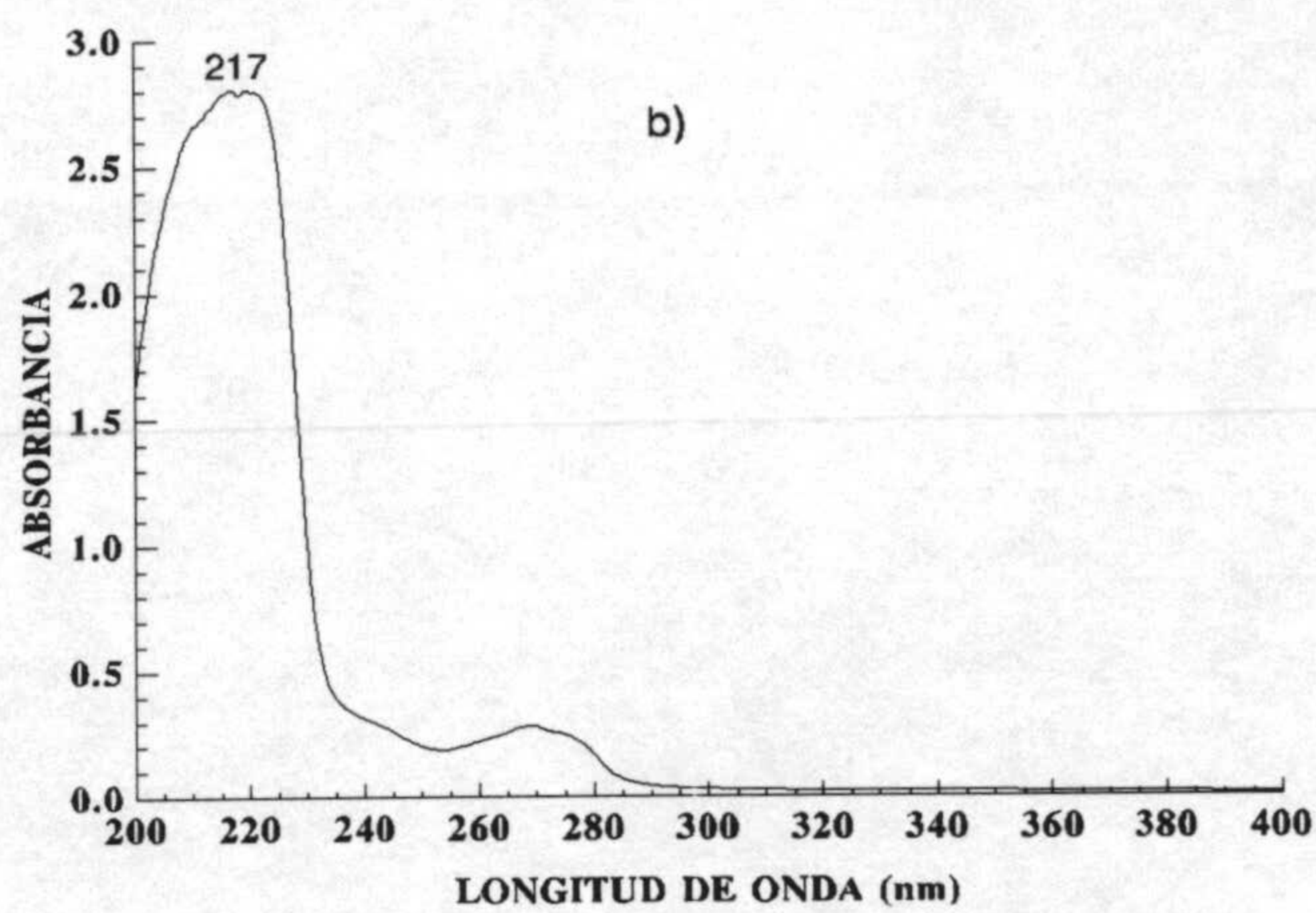
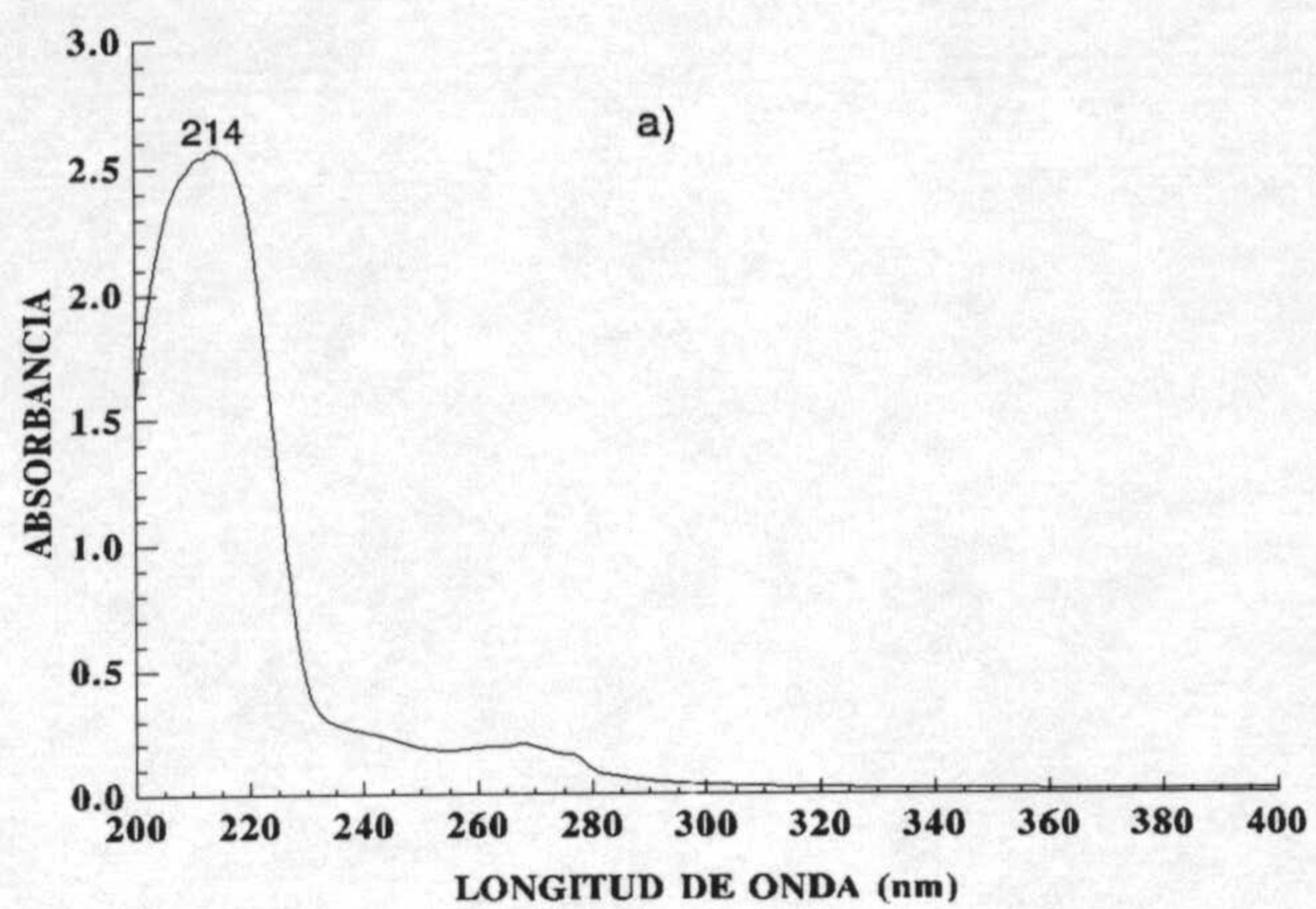


Fig 5.3.13.-Espectros UV de las fracciones ricas en los ácidos : a) SA, b)EPA y c) DHA; obtenidas con EtOH-H₂O (1%AcH) 70:30 p/p, 1,5 ml/min y 2,77 mg de PUFAs de *Isochrysis galbana* (cromatograma 5.3.11.c).

por Sigma, figura 3.3.2, de nuevo se observa que casi en todos los casos los espectros son idénticos, lo cual prueba que durante el proceso de obtención no se produjo degradación alguna de los PUFAs, ya que, uno de los primeros efectos de la oxidación de los PUFAs es la aparición de conjugaciones que dan lugar a bandas de absorción a longitudes de onda más elevadas (apartado 2.1.2).

Es difícil comparar estos resultados con los obtenidos por otros autores ya que hasta donde sabemos no existen trabajos de obtención de estos PUFAs a partir de microalgas marinas. Tan solo Cohen y Cohen (1991) (tabla 2.10) obtiene EPA a partir de la microalga *P. cruentum*, si bien realiza la separación en columna cromatográfica abierta a la atmósfera y carga cantidades de PUFAs de tan sólo 1 mg.

En cualquier caso los resultados mostrados en la tabla 5.3.12 para lípidos procedentes de *I. galbana* corresponden a experimentos iniciales y es necesaria una mayor investigación en esta línea. En este sentido puede trabajarse en varias direcciones, por ejemplo dado que la resolución crece logarítmicamente con el descenso de la concentración de alcohol, puede incrementarse la carga de la columna bajando el porcentaje de alcohol en la fase móvil, naturalmente hasta donde permitan la solubilidad de los PUFAs en las mezclas alcohol-agua. También debe profundizarse en el estudio de la elución en gradiente.

Utilizando las ecuaciones [2.40] y [2.39] para el escalamiento de la cantidad de muestra a separar y del flujo de fase móvil a columnas preparativas comerciales de 5,7 x 30 cm con la misma fase estacionaria se podrían separar hasta 2 g de PUFAs para obtener diariamente unos pocos gramos de SA, EPA y DHA. Tales productividades tendrían sin duda un gran interés económico.

Resumiendo en un párrafo el trabajo del que se da cuenta en esta memoria, hay que concluir diciendo que es posible obtener SA, EPA y DHA de elevada pureza y con rendimientos elevados partiendo de aceites de pescado y de la fracción lipídica de microalgas mediante un proceso de tres etapas: saponificación, concentración en PUFAs por el método de la urea y separación de las fracciones por HPLC preparativa. Así por ejemplo se han conseguido fracciones de hasta un 94,4% de pureza en EPA (con un rendimiento del 91,9%) partiendo de aceite de hígado de bacalao y de hasta un 96% de pureza partiendo de la microalga *I. galbana* (rendimiento del 99,6%) con metanol-agua (1%AcH) 80:20 p/p. Utilizando etanol-agua (1%AcH) como fase móvil (biocompatible) es posible alcanzar purezas y rendimientos similares pero las cantidades

obtenidas en cada experimento son muy pequeñas. Por ello es necesario realizar más investigación a fin de aumentar la cantidad a cargar, por ejemplo utilizando columnas de mayor porosidad.

6.-Conclusiones

6. CONCLUSIONES

6.1.- Extracción de lípidos de la microalga *Isochrysis galbana*

1.- El sistema ternario hexano-etanol (96% v/v) 1:2,5 v/v es un buen sistema para la extracción y purificación de lípidos y ácidos grasos (cuando se realiza la saponificación directa), ya que se obtienen rendimientos en torno al 80% en lípidos o ácidos grasos libres. Por tanto puede sustituir al sistema cloroformo-metanol-agua cuando sea imprescindible utilizar sistemas biocompatibles.

2.- El rendimiento en la extracción de lípidos y de ácidos grasos libres es mayor cuanto mayor es el contenido en alcohol del sistema extractante y cuanto mayor es la polaridad de este alcohol, lo que está de acuerdo con el mayor contenido en lípidos polares de esta microalga.

3.- El etanol del 96% es un buen sistema para la extracción de lípidos y ácidos grasos (cuando se realiza la saponificación directa) ya que se obtienen rendimientos en ácidos grasos saponificables en ambos casos superiores al 80%, si bien se trata de lípidos o ácidos grasos impurificados que es necesario purificar posteriormente con un disolvente apolar.

4.- El porcentaje en la recuperación de lípidos purificados tras la extracción de los mismos es mayor cuanto mayor sea el contenido en un disolvente apolar, como el hexano, en el sistema ternario de extracción-purificación, una vez que se forma el sistema bifásico fase hidroalcohólica-fase hexánica para la separación de los contaminantes no lipídicos.

5.- Los rendimientos en la extracción de SA, EPA y DHA no son del mismo orden de magnitud que los de la extracción de lípidos o ácidos grasos totales, lo que indica que estos tres PUFAs no se encuentran repartidos uniformemente entre los distintos tipos de lípidos de la microalga; así, mientras que el SA se recupera en un mayor porcentaje que los lípidos totales, estando por tanto presente en una mayor proporción en los lípidos neutros, el DHA se encuentra en un mayor porcentaje en los lípidos polares y se recupera en menor proporción que los lípidos totales.

6.- En la obtención de ácidos grasos libres por saponificación directa, ésta tiene lugar cuando los lípidos están en disolución y por tanto los rendimientos obtenidos están limitados por los rendimientos en la extracción de lípidos, dependiendo éstos de la bondad del sistema extractante.

6.2.- Obtención de concentrados de PUFAs a partir de extractos de ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao por el método de los compuestos de inclusión de urea

7.- El porcentaje de PUFAs n3 en los concentrados obtenidos por el método de los compuestos de inclusión de urea y el rendimiento en la recuperación de estos ácidos aumenta con la relación urea/ácidos grasos a temperaturas de cristalización entre -4°C y 36°C , mientras que por debajo de -28°C ocurre lo contrario. De cualquier forma interesa operar a altas relaciones urea/ácidos grasos y altas temperaturas.

8.- A altas temperaturas, al aumentar la relación urea/ácidos disminuyen los rendimientos en la recuperación de ácidos grasos totales y aumentan los rendimientos de recuperación de PUFAs, por tanto un aumento de la relación urea/ácidos grasos conduce a un aumento en la formación de compuestos de inclusión de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, no produciéndose la inclusión en los cristales de los PUFAs.

9.- La relación urea/ácidos grasos puede utilizarse para segregar los ácidos grasos en función de su grado de insaturación. Así a altas temperaturas, con una relación 1:1 se pueden eliminar preferentemente los saturados, a una relación 2:1 los saturados y, en menor grado, los monoinsaturados y a 3:1 y 4:1 ambos tipos de ácidos.

10.- La tendencia a formar compuestos de inclusión de todos los ácidos grasos aumenta a medida que disminuye la temperatura y a muy bajas temperaturas (por debajo de -12°C) también los PUFAs de cadena larga forman compuestos de inclusión, como lo prueban los bajos rendimientos en la recuperación de estos PUFAs a bajas temperaturas, si bien es el EPA el que queda ocluido en un mayor porcentaje.

11.- Para la concentración de los PUFAs n3 (SA, EPA y DHA) la temperatura óptima de cristalización está en torno a los 4°C, por encima se obtienen purezas menores debido a que quedan ácidos grasos saturados y monoinsaturados sin ser segregados por la urea y por debajo descienden las purezas y los rendimientos ya que todos los ácidos grasos incluidos los PUFAs forman compuestos de inclusión. A 4°C y relación urea/ácidos grasos 4:1 se recuperaron el 82% de los PUFAs n3 con un 94% de pureza, utilizando como disolvente metanol y, en las mismas condiciones, utilizando etanol, se recuperaron el 89% de los PUFAs n3 con un 80% de pureza.

12.- Si se desean obtener altos rendimientos en EPA las condiciones óptimas con ambos disolvente son temperaturas en torno a 28°C y relación urea/ácidos grasos 4:1.

13.- Operando a la relación urea/ácidos grasos 2:1 es posible utilizar las temperaturas entre -4°C y 36°C para segregar, aunque no cuantitativamente, los ácidos grasos saturados de los monoinsaturados, puesto que en este caso se opera con defecto de urea.

14.- La adición de la urea en etapas sucesivas seguidas de las cristalizaciones correspondientes tan sólo presenta la ventaja de que en dos etapas se consigue la misma concentración en PUFAs n3 que cuando se adiciona una cantidad doble de urea en una sólo etapa, si bien se trata de un método mucho más laborioso.

15.- Adicionando la urea en etapas sucesivas se obtienen contenidos en PUFAs algo inferiores a cuando toda la urea se adiciona en una sola etapa y también rendimientos en la recuperación de PUFAs mucho más pequeños.

16.- La adición de la urea por etapas puede utilizarse para segregar los ácidos grasos en función de su grado de insaturación; así en un primera etapa (relación 1:1) se segregan los saturados, en la segunda (relación urea total añadida/ácidos grasos iniciales 2:1) los monoinsaturados y a partir de la tercera se concentran sólo los PUFAs.

17.- La influencia de las variables estudiadas sobre la concentración de los PUFAs no depende del disolvente utilizado, ya que los resultados obtenidos con etanol son idénticos a los obtenidos con metanol. Las únicas diferencia encontradas fueron que los factores de concentración alcanzados utilizando como disolvente etanol son algo inferiores a los obtenidos con metanol y que las purezas y rendimientos obtenidos con las relaciones urea/ácidos grasos 3:1 y 4:1 son muy semejantes.

18.- El análisis multifactorial de la varianza de los porcentajes de PUFAs n3 obtenidos en los concentrados por el método de la urea indican que la variable que más influye en la concentración es la relación urea/ácidos grasos, como se desprende del valor de F (668,1) correspondiente a esta variable, teniendo además un nivel de significación estadístico mayor al 99,9%. La temperatura de cristalización y el tipo de disolvente también presentan el mismo nivel de significación estadístico. Por tanto las tres variables experimentales consideradas en este estudio deben ser tenidas en cuenta.

19.- Según este análisis la interacción más importante entre las variables se da entre la relación urea/ácidos grasos y el tipo de disolvente, ya que a medida que aumenta la relación urea/ácidos grasos la influencia del disolvente va siendo cada vez mayor y desfavorable para el etanol. Para cualquier relación el proceso de concentración está más favorecido utilizando metanol como disolvente.

6.3.- Purificación de SA, EPA y DHA por cromatografía líquida de alta resolución

20.- El caudal de fase móvil no influye sobre el factor de capacidad o distribución de equilibrio (relación entre masas) del soluto (SA, EPA y DHA) entre la fase estacionaria y la fase móvil, por lo que el volumen de fase móvil necesario para separar una mezcla de PUFAs no depende del caudal empleado.

21.- La resolución entre el SA y el EPA y entre el EPA y el DHA es independiente del caudal de fase móvil, ya que, aunque al aumentar el caudal los tiempos de retención disminuyen, también disminuyen en una proporción similar los ensanchamientos de banda o la eficacia separadora de la columna evaluada como número de pisos teóricos. Por tanto interesará operar al máximo caudal que permita la presión que soportan las columnas a fin de realizar la separación en el menor tiempo posible.

22.- Los factores de capacidad del SA, EPA y DHA disminuyen al aumentar la cantidad de muestra cargada, lo que indica que las isotermas de distribución de estos PUFAs no son lineales en todo el rango de cantidades de muestra ensayado.

23.- La resolución disminuye a medida que se incrementa la cantidad de muestra cargada debido a la disminución de los factores de capacidad, ya que la eficacia

separadora de la columna (número de pisos teóricos) no disminuye al aumentar la cantidad de muestra cargada.

24.- El factor de capacidad disminuye exponencialmente a medida que aumenta el poder eluyente de la fase móvil (aumento del porcentaje en metanol); esta disminución es mayor para el DHA que para el EPA y mayor para éste que para el SA, por tanto una disminución del poder eluyente de la fase móvil mejoraría la separación entre los tres PUFAs.

25.- Los factores de separación SA-EPA, α , tienen valores muy próximos a la unidad con metanol-agua (1%AcH) 90:10, lo que indica una separación total difícil, valores en torno a 1,2 con metanol-agua (1%AcH) 85:15, lo que indica una separación de dificultad moderada y valores alrededor de 1,4 con metanol-agua (1%AcH) 80:20, lo cual pone de manifiesto que la separación total del SA y del EPA con esta fase móvil es bastante factible. Los valores de α correspondientes a la separación EPA-DHA son en general mayores que los correspondientes a SA-EPA y van desde valores en torno a 1,2 con metanol-agua (1%AcH) 90:10 a 1,5 con metanol-agua (1%AcH) 80:20, lo que indica que la separación de estos dos PUFAs es bastante factible con estas fases móviles.

26.- Mediante una elución en gradiente en la que se introduce inicialmente la fase móvil de mayor poder eluyente (metanol-agua, 1%AcH 90:10 p/p) y linealmente se va aumentando el porcentaje de la fase móvil de menor poder eluyente (metanol-agua, 1%AcH 80:20 p/p) se pueden conseguir separaciones entre los PUFAs de la misma calidad que las obtenidas con la fase móvil de menor poder eluyente (con elución isocrática) y en tiempos de separación ligeramente superiores a los que se necesitan con la fase móvil de mayor poder eluyente.

27.- En una columna semipreparativa de 1 x 25 cm, con metanol-agua (1%AcH) 80:20 p/p, se han conseguido separar 10,53 mg de concentrado de PUFAs de aceite de hígado de bacalao (9,5% en SA, 35,9% en EPA y 35,8% en DHA) obteniéndose SA del 92% de pureza, EPA del 94% y DHA del 85%, con rendimientos en la recuperación de estos ácidos del 98%, 99% y 97%, respectivamente.

28.- Utilizando etanol-agua (1%AcH) como fase móvil se pueden cargar cantidades de PUFAs mucho más pequeñas que con metanol-agua para obtener una misma resolución y para conseguir purezas y rendimientos similares. Así, con etanol-agua (1%AcH)

70:30, a nivel semipreparativo, se consiguió obtener SA del 70% de pureza, EPA del 91% y DHA del 80% con unos rendimientos del 76%, 85% y 100% respectivamente, partiendo de 2,77 mg de PUFAs de aceite de hígado de bacalao (9,5% en SA, 35,9% en EPA y 35,8% en DHA).

29.- Utilizando la columna semipreparativa, a partir de 9,5 mg de concentrado de PUFAs de *I. galbana* (22,5% de SA, 39,3% de EPA y 22,5% de DHA) se han obtenido fracciones de SA del 95% de pureza, EPA del 96% y DHA del 94% con rendimientos del 100% para el SA y el EPA y del 94% para el DHA, utilizando metanol-agua (1%AcH) 80:20 p/p como fase móvil.

30.- Con la misma columna anterior y utilizando etanol-agua (1%AcH) 70:30 p/p se han conseguido obtener SA del 89% de pureza, EPA del 92% y DHA del 92%, con rendimientos del 76%, 84% y 88%, respectivamente, partiendo de 2,8 mg de PUFAs de *I. galbana*.

31.- Los PUFAs de alta pureza obtenidos muestran cromatogramas de gases que demuestran purezas superiores a los patrones suministrados por Sigma y espectros UV similares a los de estos patrones que demuestran que durante el proceso de obtención no se produjo degradación alguna de estos ácidos grasos.

- Conclusiones finales

32.- Es posible obtener SA, EPA y DHA de elevada pureza y con rendimientos elevados partiendo de aceites de pescado y de la fracción lipídica de microalgas mediante un proceso de tres etapas: saponificación, concentración en PUFAs por el método de la urea y separación de las fracciones por HPLC preparativa. Así por ejemplo se han conseguido fracciones de hasta un 94,4% de pureza en EPA (con un rendimiento del 91,9%) partiendo de aceite de hígado de bacalao y de hasta un 96% de pureza partiendo de la microalga *I. galbana* (rendimiento del 99,6%) con metanol-agua (1%AcH) 80:20 p/p. Utilizando etanol-agua (1%AcH) como fase móvil (biocompatible) es posible alcanzar purezas y rendimientos similares pero las cantidades obtenidas en cada experimento son muy pequeñas.

33.- La investigación a corto plazo debe dirigirse hacia:

Estudiar la relación cantidad de sistema extractante/cantidad de biomasa a fin de disminuir las cantidades de disolventes utilizadas en la extracción de lípidos y ácidos grasos de la biomasa. Además pueden estudiarse otras posibilidades como la modificación de los coeficientes de reparto adicionando electrolitos o modificar el tiempo y la temperatura de extracción.

Estudiar en profundidad la elución en gradiente analizando la influencia de la cantidad de muestra para conseguir separaciones similares a las conseguidas con las fases móviles de menor poder eluyente pero en tiempos mucho más pequeños.

Estudiar la separación por HPLC en columnas de mayor porosidad a fin de aumentar los caudales de fase móvil (menores presiones), aumentar las cargas y utilizar etanol-agua como fase móvil.

Escalar las separaciones a columnas de mayor tamaño con el fin de hacer interesante económicamente la obtención de PUFAs de alta pureza.

7.-Bibliografía

7.- BIBLIOGRAFIA

ABU-NASR, A. M. y HOLMAN, R. T., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**: 2, 41-45, 1954.

ABU-NASR, A. M., POTTS, W. M. y HOLMAN, R. T., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**: 16-31, 1954.

ACKMAN, R. G., *Technological Advances in improved and alternative sources of lipids*. Edited by B. S. Kamel y Y. Kakuda, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 292-328, 1994.

ACKMAN, R. G., ADDISON, R. F., y HOOPER, S. N., *J. Fisheries Res. Board of Canada*, **27**: 2, 251-255, 1970.

ACKMAN, R. G., RATNAYAKE, W. M. N. y OLSSON, B., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**: 1, 136-138, 1988.

ADAMS, M. A. y NAKANISHI, K., *J. of Liquid Chromatography*, **2**: 8, 1097-1136, 1979.

AHLGREN, G. y MERINO, L., *Arch. Hydrobiol.*, **121**: 3, 295-306, 1991.

ALVAREZ COBELAS, M., *Grasas y Aceites*, **40**: 2, 118-145 y **40**: 3, 213-223, 1989.

ANSOLEAGA, J. J. y CORONAS, R. *Monografías médicas/dietética y nutrición*. **3**., 135-140, 1989.

AVELDANO, M. I., VAN ROOLLINS, M. y HORROCKS, L. A. *J. of Lipid Res.* **24**: 83-93, 1983.

BAJPAI, P. y BAJPAI, P. K., *J. of Biotechnol.*, **30**: 161-183, 1993.

BAJPAI, P., BAJPAI, P. K. y WARD, O. P., *Mycol. Res.*, **95**: 1294-1298, 1991a.

BAJPAI, P., BAJPAI, P. K. y WARD, O. P., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **31**: 267-272, 1991b.

BAJPAI, P., BAJPAI, P. K. y WARD, O. P., *J. Ind. Microbiol.* **9**: 1-18, 1992.

BAKER, R. H., BARKENBUS, C. y ROSWELL, C. A., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **12**: 468-471, 1940.

BANG, H. O. y DYERBERG, J., *Acta Med. Scand.*, **210**: 245-248, 1981.

BAUCHART, D. y AUROUSSEAU, B., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 121-124, marzo, 1980.

BELTER, P. A., CUSSLER, E. L. y WHEI-SHOU HU, *Bioseparations. Downstream Processing for Biotechnology*. Wile-Interscience Publication. John Wiley & Sons Inc., 183-219, 1988.

BLIGH, E. G. y DYER, W. J. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911, 1959.

BONNER, W. D. *J. Phys. Chem.*, **14**: 738, 1910.

BOUSTANI EI S., COLETTE, C., MONNIER, L., DESCOMPS, B., CRASTES DE PAULET, A. y MENDY, F. *Lipids*. **22**: 10, 711-714, 1987.

BRADEN, L.M. y CARROLL, K.K., *Lipids*, **21**: 4, 285, 1986.

BRONGEEST-SCHOUTE, H. C., VAN GENT, C. M., LUTEN, J. B. y RUITER, A. *The Am. J. of Clinical Nutrition*. **34**: 1652-1657, 1981.

BROWN, J. B. y KOLB, D. K. *Progress in the Fats and other Lipids*. vol III. Pergamon Press. London. 57-94, 1955.

BÜRGISSER, CH. S., CENIK, M. BORKOVEC, M. y STICHER, H. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 5, 943-948, 1993.

CHEE, K. M., XIAN GONG, J., GOOD REES, D. M., MOHSEN MEYDANI, LINNE AUSMAN, JULIA JOHNSON, SIGUEL, E. N. and SCHAEFER, E. J., *Lipids*, **25**: 9, 523-528, 1990.

CHOI, K. J., NAKHOST, Z., KRUKONIS, V. J. y KAREL, M., *Food Biotechnology*, **1**: 2, 263-271, 1987.

CHRISTIE, W. W., *Lipids Analysis*, 2nd Edition, Pergamon Press, Oxford, 1982.

CHRISTIE, W. W. *HPLC and Lipids, A practical Guide*. Pergamon Press, 20, 1987.

COHEN, Z., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**: 9, 1251, 1987.

COHEN, Z., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**: 12, 916-920, 1990.

COHEN, Z., y COHEN, S. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**. 1, 16-19, 1991.

COHEN, Z., REUNGJITCHACHAWALI, M., SIANGDUNG, W. y TANTICHAROEN, M., *J. of Applied Phycology*, **5**: 109-115, 1993.

COHEN, Z., VONSHAK, A., RICHMOND, A., *J. Phycol.*, **24**: 328-332, 1988.

COLEMAN, L. W., ROSEN, B. H. y SCHWARTZBACH, S. D., *Plant Cell Physiol.*, **29**: 423-432, 1988.

COREY, E. J. y WRIGHT, S. W., *J. Org. Chem.*, **53**: 5980-5981, 1988.

CRAMER, F. D., *Reviews of Pure and Applied Chemistry*, **5**: 3, 143-164, 1955.

DOMART, C., MIYAUCHI, D. T. y SUMERWELL, W. N., *The J. of the Am. Oil Chem. Soc.*, **32**: 481-483, 1955.

DYERBERG, J. *Nutrition Reviews*. **44**: 4, 125-134, 1986.

EISENBACH, W., *Ber. Bunsenges Phys. Chem.*, **88**: 882-887, 1984.

EWART, J. W. y PRUDER, G.D., *J. World Maricul. Soc.*, **12**: 1, 333-339, 1981.

FABREGAS, J., HERRERO, C., ABALDE, J., y CABEZAS, B., *Aquaculture*, **50**:, 1-11, 1985.

FERNANDEZ REIRIZ, M. J., PEREZ CAMACHO, A., FERREIRO, M. J., BLANCO, J., PLANAS, M., CAMPOS, M. J. y LABARTA, U., *Aquaculture*, **83**:, 17-37, 1989.

FISCHER, S. y WEBER, P. C., *Nature*, **307**: 165-168, 1984.

FOGG, G. E., Nitrogen Nutrition and Metabolic Patterns in Algae, *Sumposia. Soc. Exptl. Biol.*, **13**, 106-125, 1959.

FOLCH, J., ASCOLI, I., LEES, M., MEATH, J.A. y LeBARON, F.N., *J. Biol. Chem.*, **191**: 833, 1951.

FOLCH, J., LEES, M. y STANLEY, G. M., *J. Biol. Chem.*, **226**: 497-509, 1957.

FUJITA, T., MAKUTA, M., *U. S. Patent*, 4,377,526, 1983.

GAIDAY, N.V., IMBS, A.B., KUKLEV, D.V. Y LATYSHEV, N.A., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **68**: 4, 230-233, 1991.

GALLOWAY, S. B., *U. S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Charleston Laboratory, Charleston, SC, NOAA Technical Memorandum, NMFS SEFC-241*, 1989.

GARCIA CAMACHO, F., MOLINA GRIMA, E., MARTINEZ SANCHO, M^a. E. y SANCHEZ VILLASCLARAS, S., *Grasas y Aceites*. **41**: 1, 13-18, 1990.

GELLERMAN, J. L., y SCHLENK, H., *J. Protozool.* **12**: 2, 178, 1965.

GRANT, G. *American Laboratory*. **May**: 80-85, 1988.

GRUGER, E.H., *Methods of separation of fatty acids from fish oils with emphasis on industrial applications*, 11th Annual Conference, Pacific Fisheries Technologists, Gerhart, Oreg, March 27-28, 1960.

GUICHARDANT, M., TRAITLER, H., SPIELMANN, D., SPRECHER, H. y FINOT, P. A. *Lipids*. **28**: 4, 321-324, 1993.

HAAGSMA, N., VAN GENT, C. M., LUTEN, J. B. DE JONG, R. W. y VAN DOORN, E. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **59**: 3, 117-118, 1982.

HAMILTON, R. J., y ROSSEL, J. B. *Analysis of Oils and Fats*. London, England. Elsevier Applied Science, 270-273, 1986.

HANSMANN, E., *Handbook of phycological methods, culture methods and growth measurements*. Ed. Stein JR. Cambridge University Press, Cambridge, p. 359, 1973.

HARA, A. y RADIN, N. S. *Analytical Biochemistry*. **90**: 420, 1978.

HARDARDOTTIR, S. y KINSELLA, J. E., *J. Food Sci.*, **53**: 1656-1661, 1988.

HEROLD, P. M. y KINSELLA, J. E., *The Am. J. of Clinical Nutrition*. **43**: 566-598, 1986.

HELM, M. M. y LAING, I., *Aquaculture*, **62**: 281-288, 1987.

HOLMAN, R. T., *Progress in the Fats and other Lipids*. eds. R. T. Holman, W. O. Lundberg y T. Malkin. Pergamon Press, London, vol. 2, 51-98, 1954.

HOLMAN, R. T. y RAHM, J. J., *Progress in the Fats and other Lipids*. Pergamon Press, London, vol. 9, 13-90, 1966.

HOLMAN, R. T., *Progress in the Fats and other Lipids*. Pergamon Press, vol. 9, chapter 1, 1-11, 1966.

INNIS, S. M. *Prog. Lipid Res.* **30**: 1, 39-103, 1991.

IVERSON, J. L. WEIK, R. W., *J. of the A. O. A. C.*, **50**: 5, 1111-1118, 1967.

JORDI, H. C., *J. of Liquid Chromatography*, **1**: 2, 215-230, 1978.

KAIN, J. M. y FOGG, G. E., *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **37**: 781-788, 1958.

KAPLAN, D., COHEN, Z. y ABELIOVICH, A., *Biomass*, **9**: 37-48, 1986.

KATES, M., *J. of Lipids Res.*, **5**: 132-135, 1964.

KATES, M., *Techniques of Lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*, 2nd revised edition. Edited by Burdon, R. H. y Van Knippenberg, P. H., Amsterdam, Netherlands. Elsevier Science Publishers B. V., 106-107, 1986.

KATES, M. *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*. 2nd printing 2nd edition. Edited by Burdon, R. H. y Van Knippenberg, P. H. Amsterdam, Netherlands. Elsevier Science Publishers B. V. 168-170, 1988.

KOCHERT, G., *Handbook of phycological methods. Physiological and biochemical methods*, edited by J. Hellebust y S. Cragg, Cambridge University Press, London, p. 189, 1978.

KRUKONIS, V. J., *Supercritical Fluid Extraction and Chromatography: Techniques and Applications*. eds. B. A. Charpentier y M. R. Sevenants. ACS Sm. Series, No. 366. Am. Chemical Society Pub., Chicago. pp. 26-43, 1988a.

KRUKONIS, V. J., *Supercritical fluid processing: current research and operations*. Paper presented at the 1st International Symposium on Supercritical Fluids, Oct. 17-19, Nice, Francia, 1988b.

KYLE, D. J., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**: 9, 1251, 1987.

LANDS, W. E. M., *Fish and Human Health*. Academic Press, Orlando, 1986.

LAWSON, L. D. y HUGHES, B. G. *Biochem. and Biophysic. Res. Communications*. **152**: 1, 328-335, 1988.

LEAF, D. A. *Jano*. **39**: 914, 39-42, 1990.

LEPAGE, G. y ROY C. *J. Lipid Research*. **25**: 1391-1396, 1984.

LIE KEN JIE, M. S. F., *Adv. Chromatogr.* chapter 1, 1-57, 1980.

LLIOU, J. P., JOURD'HEUIL, D., ROBIN, F., SERKIZ, B. GUIVARC'H, P. VOLLAND, J. P. y VILAINE, J. P. *Lipids*. **27**: 12, 959-967, 1992.

LOPEZ ALONSO, D., MOLINA GRIMA, E., SANCHEZ PEREZ, J. A., GARCIA SANCHEZ, J. L., GARCIA CAMACHO, F., *Aquaculture*, **102**: 363-371, 1992a.

LOPEZ ALONSO, D., MOLINA GRIMA, E., SANCHEZ PEREZ, J. A., GARCIA SANCHEZ, J. L., GARCIA CAMACHO, F., *Phytochemistry*, **102**: 363-371, 1992b.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.

LUNDBERG, W. O. y JÄRVI, P., *Progres in the Fats and Other Lipids*, Pergamos Press, vol. 9, chapter 10, 377-406, 1966.

LYNCH, D. V. y THOMPSON, G. A., *Plant Physiol.*, **74**: 193-197, 1984.

MARKLEY, K. S., *Fatty Acids, Their Chemistry, Properties, Production, and Uses*. Second edition, edited by K. S. Markley. Part 3. Interscience Publishers. Chapter XX, Techniques of Separation, pp 2016-2099, 1964.

McELROY, O. E., JORDAN, W. JR., McLAUGHLIN, J. JR., y FREEMAN, M. E., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 286-287, mayo, 1955.

MEHTA, J., LOPEZ, L. M. y WARGOVICH, T., *Am. J. Cardiol.* **59**: 1, 155, 1987.

MENDEZ MORALES, E., *Tesis Doctoral*, Facultad de Química. Universidad de la Republica Oriental del Uruguay, 1993.

MENDEZ, E., LUCAS, M^a E., JACHMANIAN, I., GROMPONE, M. A., *5º Congreso Latinoamericano sobre Procesamiento de Grasas y Aceites*. Venezuela, 1993.

MISHRA, V. K., TEMELLI, F., y OORAIKUL, B. *Food Res. International*. **26**., 217-226, 1993.

MIYASHITA, K., NARA, E. y OTA, T. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 10, 1638-1640, 1993.

MOLINA GRIMA, E., SANCHEZ PEREZ, J. A., GARCIA SANCHEZ, J. L., GARCIA CAMACHO, F., LOPEZ ALONSO, D., *Process Biochemistry*, en prensa, 1992.

HALGUNSET, J., LUND, E. W. & SUNDE, A., *Improved separation of biologically C₁₄-C₂₀ fatty acids by reversed phase high performance chromatography. J. Chromatogr.*, **237**: 496-499, 1982.

MOLINA GRIMA, E., SANCHEZ PEREZ, J. A., GARCIA CAMACHO, F., GARCIA SANCHEZ, J. L., LOPEZ ALONSO, D., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 599-605, 1993.

MORTENSEN, J. Z., SCHMIDT, E. B., NIELSEN, A. H. y DYERBERG, J., *Thromb. Haemostas (Stuttgart)*, **50**: 2, 543-546, 1983.

NAGLE, N. y LEMKE, P., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **24/25**: 355, 1990.

NAPOLITANO, G. E., ACKMAN, R. G., RATNAYAKE, W. M. N., *J. of the World Aquaculture Society*, **21**: 2, 122-129, 1990.

NELSON, A. M. *Geriatrics*. **December**, 103-116, 1972.

NETTLETON, J. A. *J. of the Am. Dietetic Association*. **93**: 1, 58-64, 1993.

NILSSON, W. B., GAUGLITZ, E. J. JR., HUDSON, J. K., STOUT, V. F., y SPINELLI, J., *J. of the Am. Oil Chem. Soc.*, **65**: 1, 109-117, 1988.

NILSSON, W. B., GAUGLITZ, E. J. JR. y HUDSON, J. K., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**: 1596-1600, 1989.

NILSSON, W. B., SEABORN, G. T. y HUDSON, J. K., Partition coefficients for fatty acid esters in supercritical fluid CO₂ with and without ethanol. Paper presented at AOCS Annual Meeting, Chicago, III, 12-16, Mayo 1991.

NISSHIN OIL MILLS, *Japanese Patent* 184 442/1986.

ÖZCIMDER, M. y HAMMERS, W. E., *J. of Chromatography*, **187**: 307-317, 1980.

PARKE, M. W., *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **28**: 255-285, 1949.

PEI, P. T. S., HENLEY R. S. & RAMACHANDRAN, S., *New applications of high pressure reversed phase chromatography in lipids. Lipids*, **10**: 152-156, 1975.

PERRUT, M. *LC-GC international*. **1**: 6, 58-62, 1988.

PHILLIPSON, B. E., ROTHROCK, D. W., CONNOR, W. E. HARRIS, W. S. e ILLINGWORTH, D. R., *New. Engl. J. Med.*, **312**: 1210-1216, 1985.

PITT, G. A. J. y MORTON, R. A., *Progress in the Fats and other Lipids*. eds. R. T. Holman, W. O. Lundberg y T. Malkin. Pergamon Press, vol. 4, 228-278, 1957.

PLAKAS, S. P. y GUARINO, A. M. Omega-3 fatty acids and fish oils: is the news all good?. *Proceeding of the Eleventh Annual Tropical and Subtropical Fisheries Conference of the Americas*. Compyled by D. R. Ward and B. A. Smith. Individual papers edited by respective authors. Texas Agricultural Extension Service. Marine Service Program, 1986.

POHL, P. y ZURHEIDE, F., *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, **2**: 65-80, 1982.

POLAK, J. T., BALABAN, M., PEPLOW, A. y PHILIPS, A. J., *Supercritical Fluid Science and Technology*, eds K. P. Johnston y J. M. L. Penninger. ACS Symposium Series, No. 406, pp. 449-487, 1989.

PRIVETT, O. S., *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*. Chapter eleven, vol IX, part 3. Ed. by R. T. Holman, Pergamon Press, 407-452, 1968.

RATNAYAKE, W. M., OLSSON, N. B., MATTHEWS, D. y ACKMAN, R. G. *Fat Sci. Technol.* **90**:1, 381-386, 1988.

REDDY, B. S. y MARUYAMA, H., *Cancer Res.*, **46**: 3367, 1986.

RENAUD, S. M., PARRY, D. L. LUONG-VAN, THINH, KUO, C., PADOVAN, A. y SAMMY, N., *J. of Applied Phycology*, **3**: 43-53, 1991.

RICHARDSON, B., ORCUTT, D., SCHWERTNER, H., MARTINEZ, C., WICKLINE, H., *Appl. Microb.*, **18**: 245-250, 1969.

RICHMOND, A., *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*, ed. A. Richmond, CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida, 199-243, 1986.

RIVAS, J., FONTES, A. G., MORENO, J., RODRIGUEZ, H. y VARGAR, M.A., *Sociedad Española de Fisiología Vegetal*, Boletín No. **17**, 31-37, Junio, 1992.

RIZVI, S. S. H., CHAO, R. R. y LIEW, Y. L., *Supercritical Fluid Extraction and Chromatography: Techniques and Applications*, eds. B. A. Charpentier y M. R. Sevenants. ACS Sym. Series No. 366. American Chemical Society Pub., Chicago. pp. 88-108, 1988.

RODRIGUEZ, M. A., *Tesis Doctoral*, Facultad de Química. Universidad de la República Oriental del Uruguay, marzo, 1994.

RODRIGUEZ, A., BARRERA-ARELLANO, D. y GROMPONE, M. A., *Grasas y Aceites*, **44**: 4-5, 270-273, 1993.

RODRIGUEZ VICO, F., MARTINEZ CAYUELA, M., GARCIA PEREGRIN, E., RAMIREZ, H., *Analytical Biochemistry*, **183**: 275-278, 1989.

SAJIKI, J., YAMANAKA, T., TAKAHASHI, H., TSURUOKA, Y., MORI, K., TAKAHASHI, K. y HAYASHI, A. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.* **39**: 100-105, 1993.

SAMUELSON, B., *Science*, **220**: 568, 1983.

SANCHEZ PEREZ, J. A., *Tesis Doctoral*. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Experimentales de Almería. Universidad de Granada. 1992.

SCHLENK, H., *Progress in the Fats and other Lipids*. Pergamon Press, London, vol. 2, 243-267, 1954.

SCHLENK, H., *The J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**: 728-736, 1961.

SCHLENK, H., *Fatty acids. Their Chemistry, Properties, Production, and Uses. Techniques of Separation. B. Liquid Chromatography*. Chapter XX. Second completely revised and augmented edition. Edited by K. S. Markley, part 3, 2125-2247, 1964.

SCHLENK, H. and HOLMAN, R. T., *J. Am. Soc.*, **72**: 5001-5004, 1951.

SCHOLFIELD, C. R., *Fatty acids. Their Chemistry, Properties, Production, and Uses. Techniques of Separation. D. Countercurrent Distribution*. Second completely revised and augmented edition. Edited by K. S. Markley, part 3, 2283-2307, 1964.

SCHOLFIELD, C. R., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52**: 36-37, 1975.

SCHOLFIELD, C. R., *The J. of the Am. Oil Chem. Soc.*, 510-511, abril, 1979.

SETO, A. H., WONG, H. L. y HESSELTINE, C. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**: 892-894, 1984.

SHANTHA, N. C. y NAPOLITANO, G. E., *Journal of Chromatography*, **624**: 37, 1992.

SHUKLA, V. *Prog. Lipid Res.* **27**: 5-38, 1988.

SHIMIZU, S., KAWASHIMA, H., SHINMEN, Y., AKIMOTO, K. YAMADA, H., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**: 9, 1988.

SIMOPOULOS, A. P., *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**: 438-463, 1991.

SINGER, P., JAEGER, W., WIRTH, M., VOIGT, S., NAUMANN, E., ZIMONTKOWSKI, S., HAJDU, I. y GOEDICKE, W., *Artherosclerosis*, **49**: 99-108, 1983.

SINGH, G. y CHANDRA, R. K. *Prog. in Food and Nutrition Sc.*, **12**: 371-419, 1988.

SMITH, A. E., *Acta Cryst.*, **5**: 224-235, 1952.

SMITH, R. M., *Cosmética*, **1**: 2, 143-151, 1983.

SOON-YEONG, C., MIYASHITA, K., MIYAZAWA, T., FUJIMOTO, K. y KANEDA, T. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**: 6, 876-879, 1987.

STOUT, V. F., NILSSON, W. B., KRZYNOWEK, J. y SCHLENK, H., *Fish Oil in Nutrition*, ed. M. E. Stansby. Van Nostrand Reinhold Pub., N. Y.. pp. 73-119, 1990.

SWERN, D., *Fatty acids. Their Chemistry, Properties, Production, and Uses*, Second edition, Ed. K. S. Markley, Part 3, Interscience Publishers, Chapter XX, 2309-2358, 1963.

THOMPSON, P. A., HARRISON, P. J. y WHYTE, J. N. C., *J. Phycol.*, **26**: 278-288, 1990.

TOKIWA, S., KANANAZAWA, A. y TESHINA, S. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **47**: 5, 675, 1981.

TRAITLER, H., WILLE, H. J. y STUDER, A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**: 5, 755-760, 1988.

URAKAZE, M., HAMAZAKI, T., SODA, Y., MIYAMOTO, M., IBUKI, F., YANO, S. y KUMAGAI, A., *Thromb. Res.* **44**: 673, 1986.

UTTING, S. D., *Aquacult. Eng.*, **4**: 175-190, 1985.

VALCARCEL CASES, M. y GOMEZ HENS, A. *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona. España. Ed. Reverté S. A., 373-376, 1990.

VAN GENT, C. M., LUTEN, J. B., BRONGEEST-SCHOUTE, H. C. y RUITER A.
The lancet. December 8: 1249-1250. 1979.

WARTHEN, J. D. JR., *J. of the Am. Oil Chem. Soc.*, **52**: 151-153, 1975.

WHYTE, J. N., *Aquaculture*, **60**: 231-241, 1987.

WILLE, H. J., TRAITLER, H. y KELLY, M. *Revue Française des corps gras*. **34th year**: 2, 69-73, 1987.

WOODCOCK, B. E., SMITH, E., LAMBERT, W. H., JONES, W. M., GALLOWAY, J. H., GREAVES, M. y PRESTON, F. E., *Br. Med. J.*, 288: 592, 1984.

WRIGHT, S. W., KUO, E. Y., COREY, E. J., *J. Org. Chem.*, **52**: 19, 4399-4401, 1987.

YAMAGOUCHI, K., MURAKAMI, M., NAKANO, H., KONOSU, S., KOKURA, T. YAMAMOTO, H., KOSAKA, M. y HATA, K., *J. Agric. Fodd Chem.*, **34**: 904-907, 1986.

YAZAWA, K., ARAKI, K., OKAZAKI, N., WATANABE, K., ISHIKAWA, C., INOUE, A., NUMAO, N. y KONDO, K., *J. Biochem.*, **103**: 5, 1988.

YONGMANITCHAI, W. y WARD, O. P., *Process Biochemistry*, 117-125, **Agosto**, 1989.

YONGMANITCHAI, W. y WARD, O. P., *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2, 419-425, 1991.

ZHUKOV, A. V. y VERESHCHAGIN, A. G., *Advances in Lipids Research*, : 247-282, 1981.

ZIBOH, V. A., COHEN, K. A. ELLIS, C. N., MILLER, C., HAMILTON, T.A., KRAGBALLE, K., HYDRICK, C.R. y VOORHEES, V.J., *Arch. Dermatol.*, **122**: 11, 1277, 1986.

ZLOTNIK, I., DUBINSKY, Z., *Limnol. Oceanogr.*, **34**: 5, 831-839, 1989.

DILIGENCIA:

Reunido el Tribunal examinador en el día de la fecha, constituido por:

- D. FERNANDO CAMACHO RUBIO
- D. MIGUEL GARCÍA GUERRERO
- D. JOSE M. ANDUIAR PERAL
- D. FERNANDO VALDEZ SANZ
- D. PEDRO GONZÁLEZ TELLO

para juzgar la Tesis Doctoral del Licenciado Don ANTONIO GIMENEZ GIMENEZ

se acordó por unanimidad otorgar la calificación de Apto cum laude (Unanimidad) y para que conste, se extiende firmada por los componentes del Tribunal, la presente diligencia.

Granada, a 22 de Julio de 1994

El Secretario,

PEDRO GONZÁLEZ TELLO

El Presidente,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,